



HAL
open science

Assemblages 2D de l'Annexine A5 : Applications biotechnologiques & Aspects fonctionnels

Rémi Berat

► **To cite this version:**

Rémi Berat. Assemblages 2D de l'Annexine A5 : Applications biotechnologiques & Aspects fonctionnels. Biochimie [q-bio.BM]. Université Sciences et Technologies - Bordeaux I, 2007. Français. NNT : . tel-00363598

HAL Id: tel-00363598

<https://theses.hal.science/tel-00363598>

Submitted on 23 Feb 2009

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.

N° d'ordre : 3495

Université Bordeaux I

Ecole Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé

Spécialité : Biologie Moléculaire et cellulaire

Thèse

pour l'obtention du grade de

Docteur de l'Université Bordeaux I

présentée par

Rémi Bérat

.....

Assemblages 2D de l'Annexine A5

Applications biotechnologiques

&

Aspects fonctionnels

.....

Soutenu le 12 décembre 2007

Après avis de :

Mme Karine Anselme, *Chargée de recherches CNRS*,
M. Jean-Marie Freyssinet, *Directeur de recherches INSERM*

Rapporteur
Rapporteur

Devant le jury composé de :

M. Marc Bonneau, *Professeur Université Bordeaux II*
Mme Karine Anselme, *Chargée de recherches CNRS*
M. Jean-Marie Freyssinet, *Directeur de recherches INSERM*
Mme Marie-Bernadette Villiers, *Chargée de recherches CNRS*
Mme Laurence Bordenave, *Professeur Université Bordeaux II*
M. Alain Brisson, *Professeur Université Bordeaux I*

Président
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Co-directeur de thèse
Directeur de thèse

Remerciements

Ce travail de thèse a été financé par le Conseil Régional d'Aquitaine.

Je tiens à remercier en tout premier lieu mes deux directeurs de thèse : le Pr. Alain Brisson et le Pr. Laurence Bordenave.

Alain, tu m'as accueilli dans ton équipe et as dirigé cette thèse tout au long de ces trois années où tu m'as fait confiance. Malgré un emploi du temps chargé, tu as toujours été disponible 7 jours sur 7 pour m'aider et me guider dans la réalisation de ce travail en m'apportant la rigueur dont je manquais parfois. Tu m'as permis de voyager pour découvrir la science à l'échelle européenne et tu n'as jamais montré d'opposition à mes absences pour motifs associatifs. Encore merci Alain de m'avoir permis de travailler avec toi ces trois dernières années dans un environnement serein.

Laurence, vous m'avez permis de travailler et de m'intégrer dans votre équipe en me faisant totalement confiance sur la réalisation de ce travail. Pour cela, je vous en remercie.

Je remercie les membres du jury : Karine Anselme et Jean-Marie Freyssinet d'avoir été rapporteurs de ce travail, ainsi que Marc Bonneu et Marie-Bernadette Villiers d'avoir présidé et participé à ce jury. Merci d'avoir accepté de prendre le temps d'évaluer ce travail.

Merci à toutes les personnes qui m'ont aidé dans ce travail au sein des différents laboratoires bordelais :

Céline, tu as supporté mes nombreuses questions et ma consommation effrénée d'Annexine A5 de toute sorte. Merci pour ta disponibilité et ta bonne humeur permanente.

Ralf, merci de m'avoir enseigné l'art de l'AFM et d'avoir toujours répondu très clairement à mes questions naïves lors de mon Master et de ma première année de thèse.

Joséphine, tu as été très patiente avec moi lors de mes débuts en QCM-D sans oublier mes calculs de concentrations et les préparations de tampon interminables.

Murielle, j'ai découvert grâce à toi le monde de la culture cellulaire ; merci de ta patience et de ta gentillesse.

Merci Nicolas de m'avoir supporté comme encadrant durant ton premier stage et j'espère que tu ne m'en veux pas trop de t'avoir obligé à rester des heures devant le spectrofluorimètre pour essayer de détecter et doser des annexines qui collaient partout.

Merci à tous les membres du LIMNT et du CRAC pour l'ambiance de travail excellente qui règne au B8. Merci à l'équipe Biomatériaux et réparation tissulaire de Bordeaux 2 pour leur aide et leur gentillesse.

Je remercie tous ceux qui ont travaillé avec moi durant ces trois ans. Brigitte Städler pour son aide lors de ma visite à Zurich et le temps passé avec moi au microscope confocal lors de mes expériences de FRAP. Ernest Arenas et Carmen Saltó pour leur accueil lors de ma visite à Stockholm. Carmelo Di Primo pour le temps passé à m'initier au Biacore.

Je remercie ma famille pour leur soutien et leur confiance tout au long de mes études. Merci à mes parents qui m'ont fait confiance et m'ont laissé libre de choisir le chemin que je voulais prendre même si l'objectif pouvait paraître flou au départ.

Enfin, merci à Caro qui m'a toujours soutenu et a accepté le ménage à trois imposé avec l'Annexine A5. Merci de m'avoir supporté et d'être toujours là.

Sommaire

| | |
|---|----------|
| Abréviations | 1 |
| A. Présentation du travail | 3 |
| I. Contexte | 5 |
| II. Objectifs..... | 6 |
| B. Introduction | 9 |
| I. Les bicouches lipidiques supportées | 11 |
| II. L'Annexine A5 | 14 |
| A. Les annexines | 14 |
| B. Structure de l'Anx5 | 16 |
| C. Hypothèses sur le rôle fonctionnel de l'Anx5 | 20 |
| III. Matériels et Méthodes | 22 |
| A. Produits..... | 22 |
| B. Les cellules endothéliales humaines de veine saphène | 22 |
| C. Les cellules ostéoprogénitrices humaines | 23 |
| D. Les cellules souches embryonnaires de souris | 24 |
| E. Expression et purification d'Anx5 recombinante de rat..... | 24 |
| F. Synthèse des complexes Anx5-RGD et Anx5-IKVAV | 24 |
| G. Test de liaison de l'Anx5 et de protéines dérivées à des liposomes multilamellaires . | 25 |
| H. Préparation de petites vésicules lipidiques unilamellaires | 26 |
| I. Fonctionnalisation des supports de verre pour l'adhésion cellulaire | 26 |
| J. Expériences d'adhésion cellulaire | 26 |
| IV. Les techniques de caractérisation..... | 28 |
| A. Microbalance à cristal de quartz avec mesure de dissipation (QCM-D)..... | 28 |
| A1. Principe de fonctionnement..... | 28 |
| A2. La variation de la fréquence de résonance (Δf)..... | 29 |
| A3. La variation de la dissipation (ΔD) | 30 |
| A4. Les surfaces utilisées | 30 |
| A5. Exemples d'applications : formation d'une bicouche lipidique supportée et adsorption d'Anx5..... | 31 |
| B. Microscopie à force atomique (AFM)..... | 33 |
| B1. Principe de fonctionnement | 33 |

| | |
|--|-----------|
| B2. Utilisation de l'AFM en Sciences du vivant..... | 35 |
| C. Retour de fluorescence après photo-blanchiment (FRAP)..... | 36 |
| C. Résultats..... | 37 |
| I. Développement d'une plate-forme d'ancrage 2D pour l'adhésion cellulaire..... | 39 |
| A. Introduction | 39 |
| B. Résultats | 42 |
| B1. Synthèse des complexes Anx5-peptide d'adhésion..... | 42 |
| B2. Liaison et organisation 2D des matrices d'Anx5-peptide sur SLB | 43 |
| B2.1. Caractérisation de l'organisation 2D des complexes d'Anx5-peptide sur SLB par QCM-D | 44 |
| B2.2. Caractérisation de l'organisation 2D des complexes d'Anx5-RGD par AFM. | 45 |
| B3. Adhésion des cellules HSVE, HOP et MES sur les matrices 2D d'Anx5-peptide..... | 46 |
| B4. Influence de la densité d'Anx5-peptide sur l'attachement cellulaire | 48 |
| B5. Conclusions | 50 |
| II. Développement d'une plate-forme d'ancrage 2D pour l'immobilisation contrôlée d'anticorps et de protéines..... | 51 |
| A. Introduction | 51 |
| B. Présentation du projet..... | 55 |
| C. Présentation des partenaires moléculaires..... | 57 |
| D. Résultats | 60 |
| D1. Liaison de l'Anx5-ZZ à des IgGs..... | 64 |
| D2. Etude de la densité d'IgG immobilisées..... | 67 |
| D3. Construction d'un système sandwich IgG-I / PSA / IgG-II | 69 |
| D3.1. Comparaison de la liaison d'IgG anti-PSA à la plate-forme d'ancrage d'Anx5-ZZ | 69 |
| D3.2. Liaison de l'antigène spécifique de la prostate à une matrice 2D d'Anx5- ZZ/IgG anti-PSA..... | 69 |
| D3.3. Construction d'un système sandwich..... | 71 |
| D4. Etude de la densité d'antigènes PSA et d'IgG-II immobilisés..... | 71 |
| D5. Spécificité de l'Anx5-ZZ pour les différentes sous-classes d'IgG..... | 74 |
| D6. Construction de l'édifice Anx5-ZZ / IgG / Antigène en solution | 74 |
| D7. Considérations sur la méthode de détection..... | 76 |
| D8. Conclusions | 78 |

| | |
|--|-----|
| III. Etudes de l'interaction entre un anticorps anti-phospholipide et les assemblages 2D d'Anx5..... | 81 |
| A. Contexte | 81 |
| B. Formation d'assemblages 2D d'Anx5 sur SLB contenant des cardiolipides, par QCM-D et AFM | 81 |
| C. Liaison de CIC-15 à des SLB PC/CL..... | 83 |
| D. Interaction entre CIC-15 et l'Anx5 sur SLB PC/CL..... | 85 |
| E. Conclusions | 91 |
| IV. Influence des assemblages 2D d'Anx5 sur la dynamique des membranes..... | 92 |
| A. Mesure de la diffusion lipidique au sein de SLBs sur différents supports..... | 92 |
| B. Influence de la formation d'assemblages 2D d'Anx5 sur la dynamique des membranes | 96 |
| Références | 103 |
| Article I | 113 |
| Article II | 115 |

Abréviations

| | |
|------------|--|
| 2D | Bidimensionnel |
| β2-GPI | β2-glycoprotéine I |
| Anx1 | Annexine A1 |
| Anx2 | Annexine A2 |
| Anx5 | Annexine A5 |
| Anx5-IKVAV | Complexe covalent entre l'Anx5 et un peptide contenant la séquence IKVAV |
| Anx5-RGD | Complexe covalent entre l'Anx5 et un peptide contenant la séquence RGD |
| Anx5-SH | Double mutant (T163C ; C314S) de l'Anx5 |
| Anx5-ZZ | Protéine de fusion entre l'Anx5 et le fragment ZZ |
| SAP | Syndrome des Anti-Phospholipides |
| CL | Cardiolipide |
| DMEM | Dubelcco's Modified Egel's Medium |
| DOPC | 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine |
| DOPS | 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphosérine |
| DTDP | Dithiodipyridine |
| DTT | Dithiothreitol |
| EDTA | Acide éthylène-diamine-tétraacétique |
| EGTA | Acide éthylène-glycol-tétraacétique |
| ELISA | Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay |
| FRAP | Fluorescence Recovery After Photobleaching |
| HBSS | Hanks' Balanced Salt Solution |
| HOP | Cellules ostéoprogénitrices humaines |
| HSVE | Cellules endothéliales humaines de veine saphène |
| IgG | Immunoglobuline de classe G |
| LIF | Facteur inhibiteur de leucémie |
| LIMNT | Laboratoire d'Imagerie Moléculaire et NanobioTechnologie |
| MALDI-TOF | Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization – Time of Flight |
| MET | Microscopie Electronique à Transmission |
| MLV | Multi Lamellar Vesicle |

| | |
|----------|---|
| PSA | Antigène Spécifique de la Prostate |
| NBD | Nitro-Benzoxa-Diazoyl |
| QCM-D | Microbalance à cristal de quartz et mesure de la dissipation |
| R&D | Recherche et Développement |
| SDS-PAGE | Sodium Dodecyl Sulfate – Poly-Acrylamide Gel Electrophoresis |
| SLB | Bicouche lipidique supportée |
| RPS | Résonance plasmonique de surface |
| SUV | Small Unilamellar Vesicle |
| TFA | Acide trifluoracétique |
| Z | Domaine protéique Z liant le fragment Fc des IgG |
| Tampons | Tampon A : 10 mM Hepes, 150 mM NaCl, 2 mM NaN ₃ , pH 7,4 Tampon B : 10 mM Hepes, 15 mM NaCl, 2 mM NaN ₃ , pH 7,4 |

A. Présentation du travail

I. Contexte

Les nanosciences et les nanotechnologies ont émergé il y a une dizaine d'années de la convergence d'un certain nombre de facteurs, parmi lesquels les besoins de l'industrie de la micro-électronique en miniaturisation et l'avènement des microscopies à champ proche, permettant d'imager et de manipuler la matière à l'échelle de l'atome ou de la molécule, occupent une place centrale. Les nanotechnologies constituent un champ de recherches et de développements technologiques impliquant la fabrication de structures, de dispositifs et de systèmes à partir de procédés permettant de structurer la matière au niveau atomique, moléculaire ou supra moléculaire, à l'échelle nanométrique. Deux approches principales sont envisagées pour la construction des nanomatériaux. L'approche « *top-down* », c'est-à-dire du grand vers le petit, consiste à miniaturiser la taille des matériaux ; cette approche est utilisée par exemple en microélectronique pour la fabrication des masques par photolithographie. L'approche alternative du « *bottom-up* », c'est-à-dire du petit vers le grand, consiste à construire des nanomatériaux en assemblant atomes, molécules ou ensembles de molécules de manière contrôlée. Il est logique de penser que la conjugaison des efforts entrepris actuellement aboutiront à la conception de matériaux hybrides originaux, combinant des composés inorganiques, organiques et bio-organiques, et dotés de propriétés nouvelles. Grâce à l'engouement actuel des entreprises et des organismes publics internationaux pour la recherche et le développement (R&D) pour ce domaine (9,6 milliards de dollars en 2005), les nanotechnologies sont en pleine expansion et ouvrent sans cesse de nouvelles voies d'innovation (4000 brevets déposés aux Etats-Unis entre 1985 et 2006). De nombreux domaines bénéficient des avancées nanotechnologiques : l'électronique par la miniaturisation des composants informatiques, la mécanique par la synthèse de nouveaux matériaux comme les nanotubes de carbone, ou encore les sciences du vivant grâce au développement de méthodes et d'outils permettant d'appréhender les processus du vivant à l'échelle d'évènements élémentaires. A l'interface entre les nanotechnologies et les biotechnologies, les nanobiotechnologies se développent depuis la fin des années 1980 et ont actuellement de nombreuses applications : diagnostic médical, développement de nouveaux médicaments (anticorps, siRNA, ...) ainsi que leur délivrance intelligente et ciblée (liposomes fonctionnalisés), biomatériaux, contrôles alimentaires (puces à cellules), tests ADN (puces à

ADN), diagnostic hors laboratoire (tests de grossesse, dosage de la glycémie, bioterrorisme).

Les biopuces représentent une des applications les plus connues à ce jour en nanobiotechnologie. Les biopuces sont des outils d'analyse et de diagnostic résultant de la miniaturisation des systèmes utilisés précédemment. Les puces à ADN [1] ont constitué une révolution dans le domaine de la recherche génomique en offrant un outil haut débit pour l'analyse de l'expression génique. Les développements actuels tendent à réaliser des puces à protéines pour la protéomique [2] et des puces à cellules pour la détection d'espèces cellulaires et la réalisation de tests pharmacologiques sur cellule unique. Les puces à protéines, qui correspondent à une miniaturisation des systèmes classiques ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay), peuvent être bâties selon deux architectures principales en fonction du but recherché : la détection d'une protéine d'intérêt ou la recherche de ses partenaires. Dans le premier cas, différents anticorps sont greffés sur chaque spot de la puce et l'échantillon d'intérêt, préalablement marqué ou non [3], est injecté sur la puce pour détecter la présence de protéines reconnues par les anticorps [4]. Si le but est d'identifier des partenaires d'une protéine d'intérêt, différentes protéines connues (pouvant représenter la quasi-totalité de l'expression génique) sont déposées sur les différents spots de la puce, puis la protéine d'intérêt est ajoutée et ses partenaires sont identifiés [5,6]. Les puces à cellules fonctionnent sur le même principe, soit pour détecter un type cellulaire particulier (une bactérie pathogène par exemple), soit pour étudier l'interaction de différentes protéines greffées sur les spots de la puce avec un type cellulaire particulier.

II. Objectifs

Mon travail de thèse est au centre d'un projet de développement d'une plate-forme d'ancrage bidimensionnelle (2D) de molécules et de cellules, basée sur les propriétés d'auto-assemblage 2D de la protéine Annexine A5 (Anx5). L'objectif principal de mon projet de thèse était d'ordre biotechnologique, et consistait à réaliser deux plates-formes d'ancrage, l'une pour des molécules, l'autre pour des cellules.

Un second objectif de ma thèse était d'étudier les propriétés fonctionnelles des assemblages 2D de l'Anx5. Deux études ont été réalisées, l'une portant sur la liaison d'anticorps anti-phospholipides impliqués dans le syndrome anti-phospholipidique (SAP), l'autre portant sur l'influence des assemblages 2D d'Anx5 sur la dynamique des membranes.

Pour réaliser ces études, j'ai utilisé principalement deux techniques : la technique physico-chimique de la microbalance à cristal de quartz avec mesure de dissipation (QCM-D) et la technique d'imagerie moléculaire de la Microscopie à Force Atomique (AFM). Le QCM-D permet de caractériser en temps réel et avec une bonne résolution (une dizaine de ng / cm^2) l'adsorption de molécules sur un support solide. L'AFM permet d'imager à haute résolution (nm) des assemblages de molécules adsorbées sur support solide.

Ce manuscrit comprend quatre parties. La première partie « Présentation du travail » présente le contexte de ce travail et ses objectifs.

La partie « Introduction » présente successivement les éléments de construction de la plate-forme d'ancrage : bicouche lipidique supportée et Anx5, les matériels et méthodes utilisés dans ce travail puis les principales techniques : QCM-D, AFM et la technique de microscopie de fluorescence du FRAP.

La partie « Résultats » comprend quatre chapitres. Les deux premiers chapitres rassemblent deux projets à finalité biotechnologique reposant sur une même stratégie, à savoir exploiter les propriétés d'assemblage 2D de l'Anx5 pour immobiliser de manière contrôlée des composés, cellules ou protéines sur un support solide. Le 1^{er} chapitre présente le développement d'une plate-forme d'ancrage pour l'adhésion cellulaire. Le 2^{ème} chapitre présente le développement d'une plate-forme d'ancrage moléculaire, pour l'immobilisation contrôlée d'anticorps et de protéines. Le travail présenté dans ce dernier chapitre a constitué la partie principale de mes travaux de thèse. Les deux chapitres suivants rassemblent deux études concernant les propriétés fonctionnelles des assemblages 2D d'Anx5. Le 3^{ème} chapitre des Résultats présente l'étude de l'interaction entre un anticorps auto-immun impliqué dans le syndrome anti-phospholipide et les assemblages 2D d'Anx5. Le 4^{ème} et dernier chapitre présente une étude biophysique ponctuelle concernant l'influence de la formation des assemblages 2D d'Anx5 sur la dynamique de membranes modèles.

Etant donné la diversité des sujets abordés, chaque chapitre des Résultats sera précédé d'une courte introduction précisant le contexte ainsi que quelques notions spécifiques à chaque sujet.

La dernière partie donne les « Conclusions et perspectives » de mon travail de thèse.

Les résultats de mes travaux seront publiés dans trois articles. L'un, concernant le 1^{er} chapitre des Résultats est en cours de publication dans le journal *Biointerphases* (article joint). Un second article, concernant le 3^{ème} chapitre des Résultats est écrit et sera soumis

prochainement. Un troisième article résumant les travaux sur la plate-forme d'ancrage moléculaire est en fin de rédaction. D'autre part, une partie de mon travail présenté dans le 4^{ème} chapitre des Résultats est intégrée à une revue publiée dans Langmuir, dont je suis co-auteur (article joint).

B. Introduction

I. Les bicouches lipidiques supportées

Les membranes biologiques sont extrêmement importantes pour la vie cellulaire. Elles ont une fonction structurale de maintien de l'intégrité cellulaire, elles jouent le rôle de filtre entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule et elles participent à la communication cellulaire en exposant à leur surface des molécules spécifiques. La composition et la structure des membranes biologiques ont été élucidées au cours du XX^{ème} siècle [7] pour aboutir au modèle actuel de la structure des membranes, reposant sur le modèle de mosaïque fluide proposé en 1972 par Singer et Nicolson [8] (Fig. B1.1.A), et sur le concept de domaines lipoprotéiques peu mobiles appelés radeaux membranaires [9,10]. La membrane biologique est composée d'une bicouche lipidique (~ 50% en masse) associée à des protéines membranaires (~ 35%) et des sucres (~ 15%). Les lipides sont des molécules amphiphiles qui forment une barrière hydrophobe imperméable aux composés hydrophiles cellulaires ou extérieurs. Les lipides membranaires sont composés en majorité de phospholipides (55%) formés d'une tête polaire hydrophile et de deux queues hydrophobes reliées par un glycérol. La tête polaire peut être variable en taille et en charge, et les queues sont formées par des chaînes acyles différant par leurs longueurs (14 à 24 carbones) et leurs degrés d'insaturation. Par exemple, le 1,2-Dioleoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphosérine (DOPS) possède deux charges négatives et une charge positive à pH 7.4, donc est globalement chargé négativement ; ses deux queues hydrophobes sont formées de deux acides oléiques (18 carbones et 1 insaturation) (Fig. B1.1B).

La membrane biologique étant très complexe, les études des processus moléculaires se déroulant au niveau des membranes ont été largement basées sur des membranes modèles plus simples que des cellules entières, dans le but de maîtriser le maximum de paramètres. Le système le plus simple de membranes modèles est composé d'une bicouche lipidique comprenant un nombre restreint de phospholipides et ne contenant pas de protéines. Les modèles les plus utilisés sont les liposomes en solution [11], les monocouches lipidiques à l'interface air-eau [12], les membranes suspendues [13-15] et les membranes supportées [16-18]. Ces systèmes ont permis d'étudier les propriétés principales des bicouches lipidiques : structure, perméabilité, diffusion des lipides, comportement mécanique, liaison de ligands, incorporation de protéines membranaires, reconstitution de processus complexes, comme l'adhésion ou la fusion[19-22].

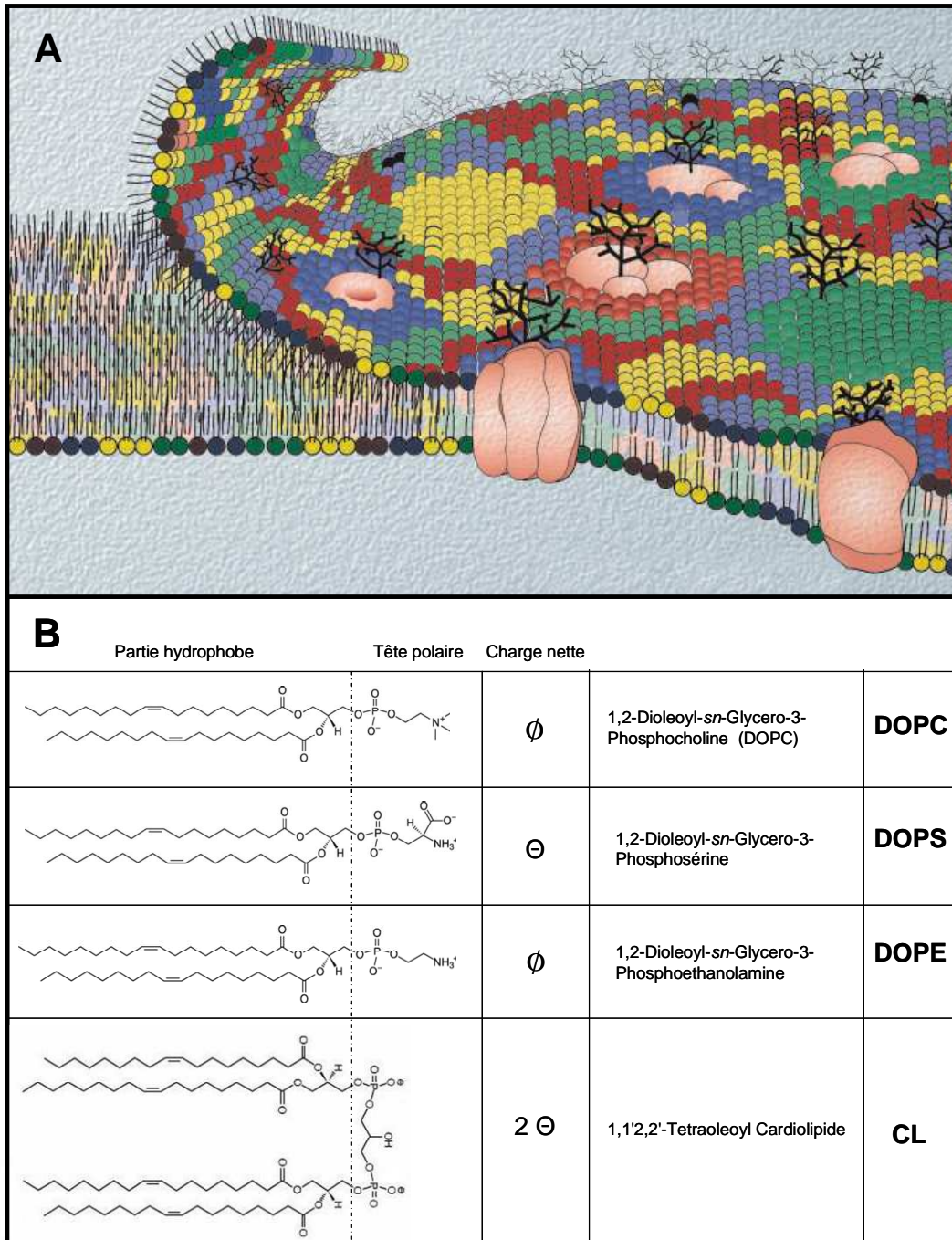


FIGURE B1.1 : **A :** Représentation schématique du modèle de membrane fluide proposé par Singer et Nicholson [8] (Image extraite de la référence [7]). **B :** Formule et charge de quelques phospholipides abondants dans les membranes biologiques et utilisés dans la majeure partie de cette étude.

Au cours de ma thèse, j'ai utilisé trois types de lipides abondants dans les membranes biologiques : le 1,2-dioléoyl-glycéro-phosphocholine (DOPC) qui est un phospholipide zwitterionique majoritaire dans les membranes biologiques, le 1,2-dioléoyl-glycero-phosphosérine (DOPS) qui est chargé négativement et est localisé presque exclusivement sur le feuillet interne des membranes biologiques et le cardiolipide (CL), lipide doublement

chargé négativement. Le principal modèle de membrane utilisé pour mes études est celui des bicouches lipidiques supportées (SLB) [16,18]. Ces dernières sont formées par dépôt de vésicules sur des supports solides hydrophiles (cf. partie VI.A.5 de cette introduction) [17,18,23-25]. Une étude approfondie de la formation des SLBs a été réalisée au laboratoire d'Imagerie Moléculaire et NanobioTechnologie (LIMNT) par Ralf Richter, au cours de sa thèse [26]. Cette étude a donné lieu à une revue publiée en 2006 dans laquelle sont inclus mes travaux sur la formation de SLB sur support d'oxyde de titane (TiO_2) [18] (Partie III.B.1 des résultats).

II. L'Annexine A5

A. Les annexines

Les annexines constituent une famille de protéines solubles qui partagent la propriété d'interagir de manière calcium dépendante avec des membranes contenant des phospholipides chargés négativement [27,28]. Les annexines interagissent avec les membranes par leur partie C terminale (C-ter) dont la séquence et la structure est conservée. Le domaine de liaison membranaire des annexines est constitué de quatre domaines homologues d'environ 70 acides-aminés, structurés en cinq hélices α [29]. Les parties N terminales (N-ter) des annexines présentent des longueurs et séquences variables contenant des sites de phosphorylation et de myristoylation. Les parties N-ter des annexines portent les éléments structuraux responsables des fonctions spécifiques des annexines (Fig. B2.1).

Si la fonction (ou les fonctions) des annexines n'est pas bien connue, les études menées jusqu'à présent montrent que ces protéines ubiquitaires sont impliquées dans de nombreux processus liés aux membranes, tels que le trafic vésiculaire, l'endocytose, l'exocytose, la dynamique des domaines rafts, la régulation de la coagulation sanguine ou de l'inflammation, ou encore la formation de canaux calciques [30,31].

En plus de leur liaison aux membranes anioniques, les annexines interagissent avec un certain nombre de protéines, comme le collagène de type II, l'actine G, la F-actine, le récepteur 2 du facteur de croissance endothélial vasculaire, les intégrines $\beta 5$, l'activateur du plasminogène tissulaire, le récepteur du formyl peptide ou encore la protéine kinase C [27].

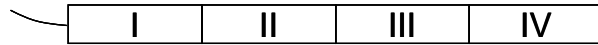
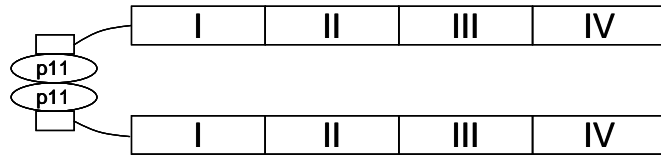
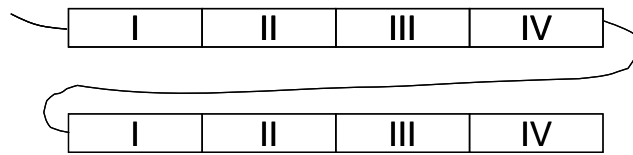
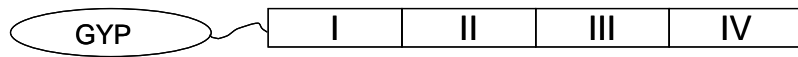
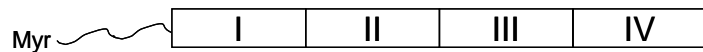
Annexine A3, A4, A5, A8**Annexine A1****Annexine A2****Annexine A6****Annexine A7, A11****Annexine A13**

FIGURE B2.1 : Les annexines de vertébrés connues sont classées selon les caractéristiques structurales de leur domaine N terminal (la partie C terminale étant composée de la répétition de 4 domaines homologues). La longueur du domaine N terminal varie de 12 à 19 résidus (Annexines A3, A4, A5, A8) jusqu'à 200 résidus (Annexine A11). Les Annexines A1 et A2 possèdent des sites de phosphorylation (sérines, thréonines et tyrosines) et une hélice α (petit rectangle) qui permet à l'Annexine A2 de lier la protéine p11. Le long domaine N terminal des Annexines A7 et A11 est riche en glycine (G), tyrosine (Y) et proline (P). L'Annexine A13 est la seule annexine présentant une myristoylation. (Schéma inspiré de la revue [32])

L'Annexine A5 (Anx5) est certainement l'annexine qui a été la plus étudiée jusqu'à présent. Ceci a une double explication. L'Anx5, dont la partie N-ter est limitée à quelques acides aminés, est la plus petite des annexines, ce qui fait d'elle le prototype des annexines pour leur comportement de liaison aux membranes. La seconde raison de la popularité de l'Anx5 est qu'elle est utilisée comme marqueur quasi-universel de l'apoptose. L'apoptose, de même que l'activation des plaquettes sanguines, s'accompagne en effet de processus de remaniement membranaire aboutissant à l'exposition de molécules de PS sur le feuillet externe des cellules ou fragments membranaires. En raison de son affinité pour les molécules de PS en présence de concentrations de Ca^{2+} de l'ordre du mM, ce qui correspond aux concentrations des milieux extracellulaires, l'Anx5 et ses dérivés marqués, principalement

fluorescents, sont utilisés en routine pour suivre l'apoptose, ou l'activation plaquettaire [33]. Outre l'Anx5, dont les propriétés structurales et fonctionnelles seront décrites ci-dessous, les annexines les plus étudiées sont l'Annexine A1 (Anx1) et l'Annexine A2 (Anx2).

L'Anx1 possède une partie N-ter longue de 40 résidus. La partie N-ter de l'Anx1 est enfouie dans la partie C-ter lorsque l'Anx1 est libre et elle est exposée au solvant lorsque l'Anx1 est associée aux membranes. Sous sa forme cytosolique, cette annexine est impliquée dans le bourgeonnement des endosomes multivésiculaires [27]. Comme l'Anx2 et l'Anx5, l'Anx1 possède la particularité d'avoir une double action, intracellulaire et extracellulaire. L'origine des annexines dans le compartiment extracellulaire est encore inconnue, car ces protéines ne présentent pas de peptide signal permettant leur sécrétion [34,35]. Sous sa forme extracellulaire, l'Anx1 inhibe l'inflammation [36,37] en empêchant par exemple l'extravasation des leucocytes.

L'Anx2 présente plusieurs partenaires cytoplasmiques. La formation de complexes tétramériques $(Anx2)_2-(p11)_2$, constitués de deux molécules d'Anx2 associées symétriquement à deux molécules de p11, a été largement étudiée, en raison du rôle potentiel de ces tétramères dans les processus d'exocytose [38]. Les molécules p11, encore appelées S100A10, appartiennent à la famille des protéines S100 [39]. Les protéines S100 présentent des motifs de liaison du Ca^{2+} de type « EF-hand » et forment des dimères stables. Les complexes tétramériques $(Anx2)_2-(p11)_2$ présentent deux sites de liaisons aux membranes, ce qui explique leur participation à des processus d'agrégation membranaire et d'exocytose, comme l'agrégation des granules chromaffines [40]. La structure moléculaire des jonctions inter-membranaires formées par l' $(Anx2)_2-(p11)_2$ a été résolue par cryo-MET, révélant entre autre les propriétés d'auto-assemblage 2D de ces tétramères au niveau de surfaces membranaires [41]. L'actine est un autre partenaire cytoplasmique de l'Anx2. Il a été proposé que l'Anx2 recrute l'actine du cytosquelette au niveau des domaines membranaires de type raft par sa liaison avec le cholestérol [42,43]. Au niveau extracellulaire, l'Anx2 est un co-récepteur du plasminogène et de l'activateur tissulaire du plasminogène (tPA) catalysant ainsi la formation de plasmine et la dégradation de la fibrine [44,45].

B. Structure de l'Anx5

L'Anx5 est une protéine d'environ 35.500 Da composée de 320 acides-aminés [29]. La forme de l'Anx5 est un pavé de $5 \times 3 \times 3 \text{ nm}^3$ légèrement courbé (Fig. B2.2). L'Anx5 se lie à

la membrane via sa face convexe, qui présente des sites de liaison des ions Ca^{2+} conservés dans la famille des annexines. La liaison entraîne peu de modifications de structure de l'Anx5 [46], seule une boucle du domaine III contenant un tryptophane (Trp-187) est externalisée de la protéine [47-49].

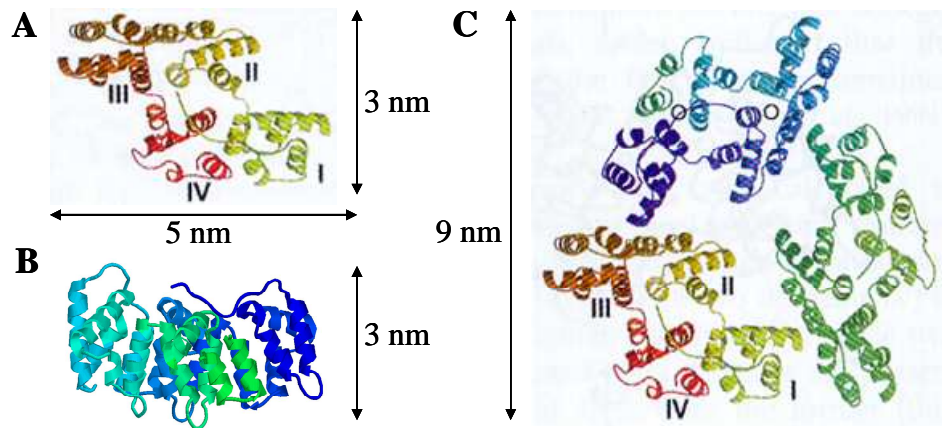


FIGURE B2.2 : Structure et dimensions de l'Annexine A5. **A :** Vue de dessus faisant apparaître les quatre domaines homologues, numérotés de I à IV selon Huber et al. [29]. **B :** Vue de côté montrant la forme incurvée; la face convexe se lie aux membranes. **C :** Vue du trimère cristallographique extraite de la référence [50].

La liaison entre annexines et membranes modèles a été étudiée par un grand nombre d'approches biochimiques et biophysiques [51].

Au LIMNT, nous utilisons principalement la technique de la microbalance à cristal de quartz avec mesure de dissipation (QCM-D) pour étudier en détail l'adsorption de l'Anx5 à des SLB et la microscopie de force atomique (AFM) pour étudier l'organisation 2D de l'Anx5.

Ces études ont permis l'élaboration du modèle suivant reliant adsorption et organisation 2D de l'Anx5. Une fois liés à une couche lipidique (monocouche à l'interface air-eau [52], liposomes en solution, ou SLB sur silice ou mica [53]), les monomères d'Anx5 diffusent à la surface de la membrane et s'associent spontanément en trimères qui s'auto-assemblent sous forme d'assemblages 2D cristallins ou compacts (Fig. B2.3).

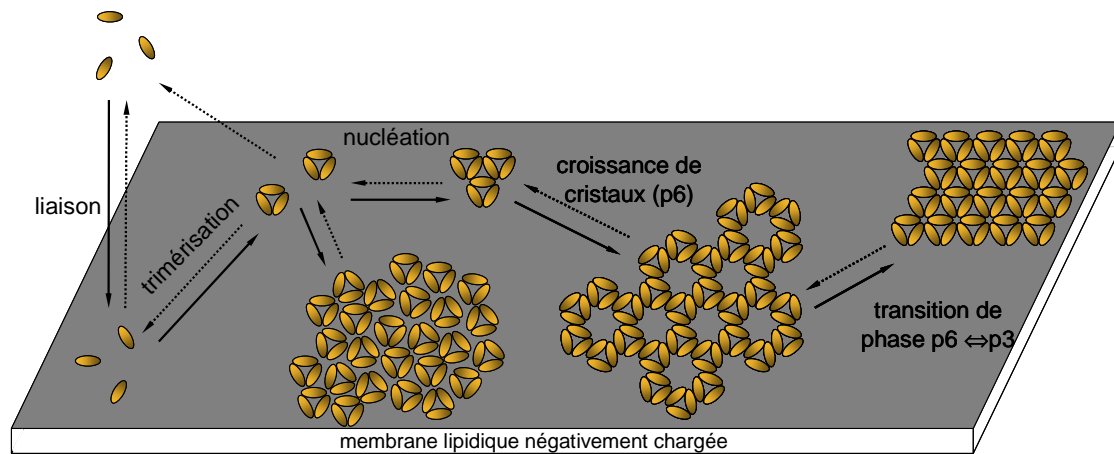


FIGURE B2.3 : Modèle de l'adsorption et de l'organisation 2D de l'Anx5 à la surface d'une SLB négativement chargée en présence de calcium (selon Richter at al. [54]).

Selon la nature de la surface lipidique, le comportement de ces trimères n'est pas le même. Sur monocouche à l'interface air-eau et sur une SLB formée sur support de mica, ces trimères s'auto-assemblent sous forme de cristaux 2D [12,55]. Les deux symétries cristallines les plus fréquemment rencontrées sont p6 et p3 (Fig. B2.4A,B) [56]. La formation et l'évolution de ces assemblages cristallins ont été mises en évidence initialement par microscopie électronique à transmission (MET) puis largement étudiées par MET et par AFM [12,57]. La symétrie p6 est la symétrie observée dans une large gamme de concentrations en PS et en Ca^{2+} . La symétrie p3 est obtenue par réorganisation d'un cristal p6 pour une SLB contenant plus de 40% de DOPS [57] ou après un stress mécanique [12]. Les trimères constituant l'unité de base des cristaux d'Anx5 autant en 2D qu'en 3D n'ont jamais été observés en solution [58]. En revanche, sur une SLB réalisée sur silice, les trimères forment des assemblages compacts [24] (Fig. B2.4D). L'origine de cette différence n'est pas connue à l'heure actuelle.

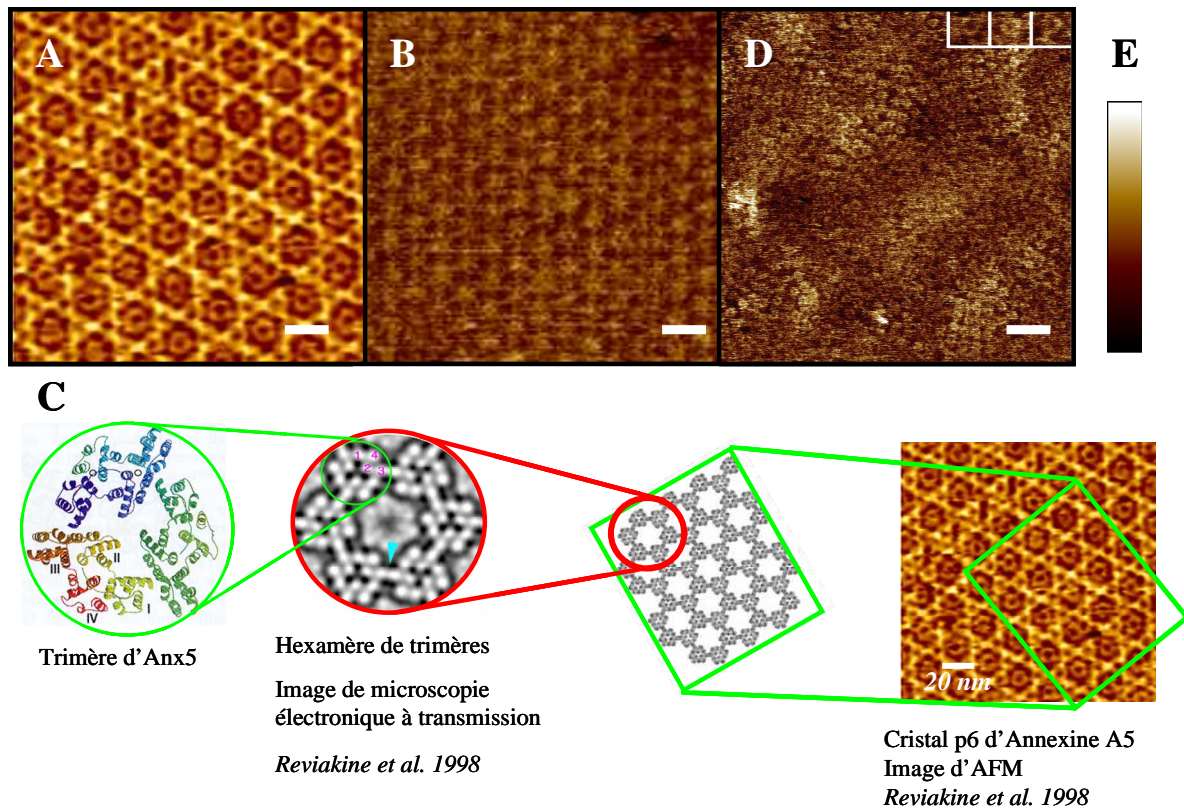


Figure B2.4 : **A :** Image AFM d'un cristal p6 d'Anx5. Barre d'échelle : 20nm. Réf. [59] **B :** Cristal p3 d'Anx5 observé par AFM. Barre d'échelle : 20nm. Réf [53]. **C :** Détails de la structure des trimères et du cristal d'Anx5 de symétrie p6. Les deux images de MET et d'AFM proviennent de la réf. [59]. **D :** Image AFM de trimères d'Anx5 sur une SLB réalisée sur silice. Barre d'échelle : 60nm. Réf. [24]. **E :** Barre d'échelle en Z représentée en code de couleurs ; dans les images AFM, les objets les plus hauts de l'échantillon apparaissent clairs et les objets les plus bas apparaissent sombres.

La propriété d'organisation 2D spontanée de l'Anx5 à la surface des SLB est au centre des projets de développement d'applications biotechnologiques auxquels s'intègre mon travail de thèse. Le concept de base est d'exploiter cette propriété de l'Anx5 pour biofonctionnaliser un matériau en formant une matrice 2D organisée à l'échelle nanométrique capable d'ancrer d'autres composés. Mon travail de thèse a porté sur le développement de plates-formes d'ancrage basées sur l'Anx5 pour deux applications :

- ⇒ L'induction de l'adhésion cellulaire (Chapitre I des résultats).
- ⇒ L'immobilisation contrôlée de molécules biologiques (Chapitre II des résultats).

C. Hypothèses sur le rôle fonctionnel de l'Anx5

L'Anx5 est une protéine ubiquitaire, présente en grande quantité dans le placenta, ce qui explique qu'elle y ait été isolée initialement [60,61]. L'Anx5 a une localisation majoritairement intracellulaire. Toutefois, l'Anx5 est présente dans le plasma à une concentration d'environ 5 à 10 ng/ml.

L'Anx5 présente des propriétés d'inhibition de la coagulation sanguine [61,62], et il a été proposé que l'Anx5 était impliquée dans la régulation de la coagulation sanguine [32,60]. Cependant, il a été rapidement reconnu que cette propriété d'inhibition de la coagulation pouvait résulter d'une simple compétition entre l'Anx5 et les facteurs de la coagulation, comme les facteurs Va, Xa ou II (prothrombine) pour leur ligand commun, la phosphatidylsérine [63] inhibant ainsi la formation du complexe prothrombinase.

Une autre hypothèse concernant la fonction de l'Anx5 a été proposée par J. Rand, dans le contexte du syndrome anti-phospholipide (SAP) [64]. Les patients présentant ce syndrome produisent des anticorps auto-immuns dirigés contre les cardiolipides, l'Anx5 ou la β 2 glycoprotéine I (β 2 GPI) [65]. Les femmes enceintes présentant un SAP sont sujettes à des avortements spontanés, ne pouvant mener leur grossesse au-delà de 10 semaines. Le traitement de cette pathologie est basé sur l'utilisation d'anticoagulants, car les avortements sont causés par des thromboses anormales se développant au niveau du placenta. J. Rand a proposé l'hypothèse selon laquelle les cellules syncytiotrophoblastiques du placenta sont couvertes par une structure agissant comme un bouclier anti-thrombotique, empêchant les facteurs de coagulation de se lier aux PS présentes à la surface des cellules [66-68]. Les anticorps anti-phospholipides déstabiliseraient cette structure, ce qui aurait pour conséquence de rendre accessibles les molécules de PS aux facteurs de la coagulation, et de permettre l'initiation du processus de coagulation sanguine. La capacité unique de l'Anx5 à former des réseaux 2D à la surface des membranes a incité J. Rand à proposer que le bouclier anti-thrombotique des cellules syncytiotrophoblastiques est composé d'un réseau 2D de molécules d'Anx5 liées aux molécules de PS [69].

D'autres rôles fonctionnels de l'Anx5 ont récemment été proposés au niveau de l'internalisation vésiculaire [70] et au niveau de l'apoptose [71]. En effet l'Anx5 à forte concentration inhibe la phagocytose des cellules apoptotiques [72,73] et influence la progression du programme de mort cellulaire. Une étude a montré que l'Anx5 retarde l'activation des caspases 3 (entraînant l'externalisation des PS et la génération de

microparticules lors du déclenchement de la mort cellulaire) après sa liaison à la surface de lymphocytes humains [74]. Néanmoins, une autre étude indique que l'Anx5 accélère le programme de mort cellulaire de cardiomyocytes de rat [75]. Ces observations contradictoires indiqueraient que l'influence de l'Anx5 sur l'apoptose dépend du type cellulaire.

Il serait certainement étonnant que l'Anx5, de même que l'ensemble des annexines, participe à autant de fonctions différentes. Il est probable que les annexines sont responsables d'une fonction majeure, qui reste à identifier.

III. Matériels et Méthodes

A. Produits

Le DOPC, le DOPS et les cardiolipides de cœur bovin (CL) proviennent d'Avanti Polar Lipids (AL, USA). Le sérum de veau fœtal vient de GIBCO (Invitrogen). La plupart des produits chimiques viennent de chez Sigma Aldrich ; les autres sont de qualité ultra-pure. L'eau a été purifiée par un système RiOs (Millipore, France).

Les solutions tampon suivantes ont été préparées : le tampon A contient 10 mM Hepes, 150 mM NaCl, 2 mM NaN₃, pH 7,4, supplémenté ou non avec 2 mM CaCl₂ ou 2 mM EGTA, ainsi qu'il sera indiqué dans le texte ; le tampon B contient 10 mM Hepes, 15 mM NaCl, 2 mM NaN₃, pH 7,4.

Les pastilles de mica muscovite de 12 mm de diamètre proviennent de Métafix (Mondidier, France). Les pointes AFM en nitrure de silicium de Silicone viennent de Digital instruments, Santa Barbara, CA). Les lamelles de verre de 12 mm de diamètre ont été achetées chez Fisher Scientific (Ilkirch, France). Les cristaux de QCM-D, couverts d'une couche d'or évaporée de 100 nm et recouvert de 50 nm d'oxyde de silice, proviennent de Q-Sense (Göteborg, Suède).

B. Les cellules endothéliales humaines de veine saphène

Le premier type cellulaire utilisé dans cette étude est composé de cellules primaires endothéliales humaines de veine saphène (HSVE). L'endothélium vasculaire est composé d'une monocouche de cellules endothéliales tapissant la face interne du réseau vasculaire : artères, veines et capillaires représentant environ 5.000 m² de surface exposée chez l'adulte. Les cellules endothéliales sont plates, orientées dans le sens de l'écoulement sanguin et polarisées : la face apicale constitue la paroi de la lumière du vaisseau sanguin et la face basale est en contact avec la lame basale constituée principalement de collagène de type IV, de fibronectine et de laminine. La membrane cellulaire basale est riche en intégrines lui permettant de se lier aux protéines de la lame basale au niveau des séquences peptidiques RGD présents sur certaines d'entre elles comme la laminine et la fibronectine. Du fait de l'inhibition de contact, le renouvellement des cellules endothéliales, *in vivo*, est de plusieurs

mois voir même quelques années. Les cellules HSVE utilisées dans cette étude ont été isolées de veines saphènes de patients ayant subi un pontage coronarien [76] et cultivées comme décrit par Fernandez et al. [76], modifié de Golledge et al. [81] au sein de l'unité Inserm 577. Les cellules sont cultivées en milieu M199 (Invitrogen Corp, Cergy Pontoise, France) supplémenté avec 20% de sérum de veau fœtal (Eurobio, Les Ulis, France), 50 IU/mL d'héparine (Sanofi Aventis, Paris, France), 10 ng/mL bFGF (Sigma Aldrich, St Quentin Fallavier, France) et 50 µg/mL de gentamicine (Biomedica, Boussens, France). Les cellules sont caractérisées par l'expression intracytoplasmique du facteur de Von Willebrand avant d'être utilisées pour nos expériences.

C. Les cellules ostéoprogénitrices humaines

Le deuxième type cellulaire utilisé dans ces travaux est constitué de cellules ostéoprogénitrices humaines (HOP) préparée au sein de l'Unité Inserm 577 (Bordeaux). Les prélèvements de moelle osseuse humaine sont fournis par l'équipe du Professeur Durandeu (CHU Pellegrin – Bordeaux) et proviennent de la diaphyse fémorale ou de la crête iliaque dont la ponction est effectuée au cours d'une intervention chirurgicale pour raison traumatique, chez des patients sains. Au sein du laboratoire Inserm, les prélèvements sont traités selon la méthode mise au point pour l'obtention des HOP [77,78]. Ainsi, des passages successifs de la suspension cellulaire de moelle osseuse à travers des aiguilles de gauge croissante (G-16, G-18 puis G-21) permettent d'homogénéiser et de dissocier les types cellulaires avant leur mise en culture. La culture est effectuée en milieu Iscove modifié de Dulbecco (IMDM, Gibco, France) additionné de 10% de sérum de veau fœtal (PAA, France) et de 10^{-8} M dexaméthasone. Ce dernier additif permet d'orienter vers un phénotype ostéoblastique les cellules adhérentes dès le début de la culture. Le traitement est effectué pendant les trois premiers changements de milieu de culture. Les HOP obtenus sont caractérisés par l'expression de la phosphatase alcaline et du facteur de transcription *cbfa1/runx2*, caractéristiques du phénotype ostéoblastique, puis utilisés dans nos expériences.

Le deuxième type cellulaire utilisé dans ces travaux est constitué de cellules ostéoprogénitrices humaines (HOP). Ces cellules sont en cours de différenciation pour former les ostéoblastes du tissu osseux. Lors d'intervention chirurgicale au niveau de la diaphyse fémorale, de la moelle osseuse est prélevée chez le patient. La suspension de moelle osseuse ainsi obtenue est purifiée et mise en culture en présence de dexaméthasone ce qui permet

d'induire la différenciation des cellules stromales en cellules ostéoblastiques. Ce sont ces cellules en cours de différenciation qui ont été utilisées dans ce travail.

Les études réalisées avec ces cellules ont été effectuées en collaboration avec Reine Bareille du laboratoire de Biomatériaux et réparation tissulaire.

D. Les cellules souches embryonnaires de souris

Le dernier type cellulaire utilisé est composé de cellules souches embryonnaires de souris. Ces cellules, isolées de blastocystes de souris, sont pluripotentes, participant à la formation de tous les tissus et des lignées germinales. Les cellules souches embryonnaires peuvent être cultivées *in vitro* et maintenues sous forme non différenciée par utilisation de facteur inhibiteur de leucémie (LIF) dans le milieu de culture. La différenciation peut être orientée, selon les facteurs de différenciation utilisés, vers différents types cellulaires. Ces cellules sont utilisées pour introduire des mutations génétiques dans des lignées de souris et pour produire des lignées de types cellulaires particuliers. La lignée de cellules souches embryonnaires utilisée dans ces travaux de thèse, appelée R1, a été décrite par Nagy et al. [79].

La préparation des cellules R1 a été réalisée par le Dr. C. Saltó, à l'Institut Karolinska de Stockholm. Les études réalisées avec ces cellules ont été effectuées en collaboration avec le Dr. C. Salto et le Pr. E. Arenas.

E. Expression et purification d'Anx5 recombinante de rat

L'expression et la purification de l'Anx5 et des protéines dérivées de l'Anx5 utilisées pour l'ensemble de mon travail de thèse, ainsi que la synthèse des complexes contenant des peptides d'adhésion cellulaire, ont été réalisées par Céline Gounou, assistante ingénieur au LIMNT (UMR-CBMN).

F. Synthèse des complexes Anx5-RGD et Anx5-IKVAV

Les peptides RGD (séquence : GCRGYGRGDSPG) et IKVAV (séquence : CSRARKQAASIKVAVSADR) ont été synthétisés par chimie Fmoc en phase solide [80] avec un appareil Biosystems 431A (Courtaboeuf, France), par Claude Manigand (UMR-CBMN). Ils ont été purifiés par chromatographie en phase inverse sur une colonne C-18 éluée

avec un gradient eau/acétonitrile contenant 0,1% d'acide trifluoroacétique (TFA) et lyophilisés.

Le couplage covalent de chaque peptide à l'Anx5-SH correspond à la formation d'un pont disulfure entre le groupe sulfhydryle de l'Anx5-SH et le groupe sulfhydryle du résidu cystéine contenu dans le peptide RGD ou IKVAV. Le couplage covalent a été réalisé comme décrit ci-après : 0,75 nmol de dimère (Anx5-S)₂ ont été réduites par addition de 10 mM de dithiothréitol (DTT) pendant 30 min à température ambiante. L'Anx5-SH réduite a été purifiée sur colonne de dessalage HiTrap (GE-Healthcare), éluée avec du tampon A. 63,5 nmol d'Anx5-SH en tampon A ont été mélangées à 254 nmol de peptide d'adhésion en 0,1% TFA et à 63,5 nmol de DTDP. Le mélange a été incubé pendant une nuit à température ambiante. Les complexes Anx5-peptide ont été purifiés sur colonne MonoQ, éluée avec un gradient de NaCl en tampon A. Leur pureté et leur masse ont été analysées par SDS-PAGE et spectroscopie de masse MALDI-TOF, respectivement.

G. Test de liaison de l'Anx5 et de protéines dérivées à des liposomes multilamellaires

Les vésicules lipidiques multilamellaires (MLVs) contenant un mélange DOPC/DOPS (4/1, poids/poids) ont été préparées de la manière suivante : les quantités désirées de lipides ont été mélangées et dissoutes dans du chloroforme, le solvant a été éliminé dans un évaporateur rotatif, un volume de tampon B a été ajouté pour obtenir une suspension à 10 mg/ml et la suspension a été homogénéisée par vortex. Un aliquot de 100 µg de MLVs a été incubé pendant 20 min avec une solution de protéines contenant un mélange de rapport connu Anx5/Anx5-peptide et une quantité totale de 40 µg de protéine (exprimé en quantité équivalente d'Anx5) dans un volume total de 200 µL de tampon A. Les protéines non liées ont été séparées des protéines liées aux MLV par centrifugation à 100 000 rpm pendant 45 min dans une centrifugeuse Beckmann Ultima. Le culot a été resuspendu dans 300 µL de tampon A et une seconde étape de centrifugation a été réalisée pour laver le culot. Le culot final a été resuspendu dans un volume total de 40 µL de tampon C. Les quantités relatives d'Anx5 et d'Anx5-peptide ont été analysées par SDS-PAGE.

H. Préparation de petites vésicules lipidiques unilamellaires

Les lipides DOPC, DOPS et CL ont été dissous en chloroforme, mélangés pour obtenir les mélanges DOPC/CL (8/1 ; rapport molaire) et DOPC/DOPS (7/3 ; poids/poids), séchés dans un évaporateur rotatif, resuspendus en tampon A à une concentration finale de 2,5 mg/mL, et vortexés pour obtenir une suspension de vésicules lipidiques multilamellaires (MLVs). Pour former des SUVs, la suspension lipidique a été homogénéisée par cinq cycles de congélation/décongélation suivis d'une homogénéisation au vortex, soniquée avec un sonicateur à pointe (Model-250, Branson, USA) en mode pulsé à 18% pendant 30 min sur glace. L'échantillon a ensuite été centrifugé 10 min à 16 000 g dans une centrifugeuse Eppendorf pour éliminer les particules de titane qui ont pu se détacher de la pointe de sonication. La suspension de SUVs est conservée à 4°C avant usage.

I. Fonctionnalisation des supports de verre pour l'adhésion cellulaire

Les lamelles de verre (12 mm de diamètre) ont été nettoyées par traitement SDS 2% pendant 30 min, rincées avec de l'eau ultra pure, séchées sous azote, et exposées à un traitement UV/ozone pendant 10 min [24]. Les substrats sont alors conservés à l'air. Avant usage, ils sont réexposés à l'UV/ozone pendant 10 min, placés sur un morceau de parafilm et immédiatement couverts avec 150 µL de tampon A contenant 2 mM CaCl₂. Une SLB a été formée par déposition sur le support de verre de 150 µL de SUV à 0,1 mg/ml, dans le même tampon [23,24]. Après 20 min, l'excès de vésicules a été éliminé par échange du liquide de l'échantillon avec du tampon, par 10 cycles successifs d'addition/retrait de volumes de 100 µL. Les solutions d'Anx5 ou Anx5-peptide ont été ajoutées à une concentration finale de 20 µg/mL. Après 30 min d'incubation, temps suffisant pour la saturation de la surface, l'excès de protéine a été éliminé comme décrit précédemment. Les supports de verre fonctionnalisés ont été utilisés immédiatement.

J. Expériences d'adhésion cellulaire

Les cellules HSVE de passage 3 ou 4 ou HOP de passage 1 ont été détachées des plaques de culture par traitement à la trypsine (0,125%)-EDTA (0,0625%), collectées par centrifugation pendant 7 min à 1.200 rpm et suspendues en milieu Dulbecco's Modified

Eagel's Medium (DMEM) (Invitrogen) contenant 1,8 mM Ca^{2+} et 1 mM Mg^{2+} . Les supports de verre fonctionnalisés avec un assemblage mixte SLB-protéine ont été placés dans des plaques 12 puits recouverts d'une couche d'agarose pour prévenir l'adhésion cellulaire sur le plastique, comme décrit par Amédée et al. [82], et 200.000 cellules par puits ont étéensemencées. Les expériences d'adhésion cellulaire ont été réalisées à 37°C et 5% CO_2 pendant 3, 6 ou 24 heures.

L'adhésion cellulaire a été déterminée par un test colorimétrique décrit par Verrier et al. [83]. Brièvement, les échantillons ont été transférés, après rinçage avec du tampon Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS) (Invitrogen), dans des plaques 48 puits sans agarose. Les cellules ont été imagées par microscopie de contraste de phase et supplémentées avec 0,1% citrate de sodium, 7,5 mM de p-nitrophenyl-N-acetyl- β -D-glucosaminide, 0,5% (v/v) Triton X-100, pH 5, et placées à 37°C et 100% d'humidité [84]. Après 2 heures, la réaction enzymatique a été stoppée par addition d'une solution composée de 50 mM glycine, 5 mM EDTA, pH 10.4 et l'absorbance a été mesurée à 405 nm avec un lecteur de plaque (Dynex MRX).

La technique de dosage est la même pour les cellules humaines ostéoprogénitrices (HOP).

L'adhésion cellulaire a également été étudiée avec les cellules MES lignée R1 [79]. Les cellules ont été cultivées et passées en milieu DMEM contenant 15% sérum, 2 mM L-glutamine, 100 u/100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de pénicilline/streptomycine (pen/strept), 100 μM d'acides aminés non essentiels (Gibco-BRL/Invitrogen), 2000 u/mL de LIF (Leukemia Inhibitory Factor, Chemicon/Millipore) et 100 μM β -mercaptoethanol (Sigma). Les cellules ont été trypsinisées, comptées et 5×10^4 cellules par puits ont été déposées dans une plaque 24 puits contenant une lamelle de verre fonctionnalisée avec un assemblage mixte SLB/protéine correspondant aux différentes conditions (Anx5-RGD, Anx5-IKVAV et Anx5) et trois contrôles (plastique, verre non fonctionnalisé et 0,1% gélatine). Le milieu de référence pour la culture des cellules MES est la gélatine, qui permet une meilleure adhésion que le plastique. Les cellules R1 ont été incubées pendant une nuit à 37°C avec 5% de CO_2 , fixées avec 4% para-formaldéhyde, lavées avec du PBS et finalement incubées à température ambiante avec la sonde nucléaire 4'6'-diimidazolin-2-phenylindole (DAPI) pendant 10 min pour quantifier le nombre de cellules adhérentes sur le support dans chaque condition.

IV. Les techniques de caractérisation

A. Microbalance à cristal de quartz avec mesure de dissipation (QCM-D)

La technique de QCM-D a été développée dans les années 1990 [85] à partir de la technique plus ancienne de la microbalance à cristal de quartz (QCM). En plus de la mesure de la masse d'un composé adsorbé sur la surface du capteur de quartz, le QCM-D permet d'obtenir des informations sur les propriétés viscoélastiques de ce composé. De nombreux types d'échantillons ont été étudiés par QCM-D tels que des protéines [54], des lipides [86], de l'ADN [87] ou encore des cellules entières [88].

A1. Principe de fonctionnement

La technique de QCM-D est basée sur les propriétés piézo-électriques du quartz. L'application d'un courant alternatif aux extrémités d'un cristal de quartz par deux électrodes en or positionnées de part et d'autre du cristal (Fig. B4.1B) produit une vibration oscillatoire de celui-ci (Fig. B4.1C). Après arrêt du courant, l'amortissement de l'oscillation est mesuré. A partir de la fréquence de résonance f du cristal et de la courbe d'amortissement, on peut déduire les variations de la fréquence de résonance Δf et la dissipation ΔD , qui est l'inverse du facteur Q représentant le nombre d'oscillations du cristal jusqu'à l'arrêt final. L'adsorption de matière à la surface du cristal de quartz entraîne une variation de f et de D .

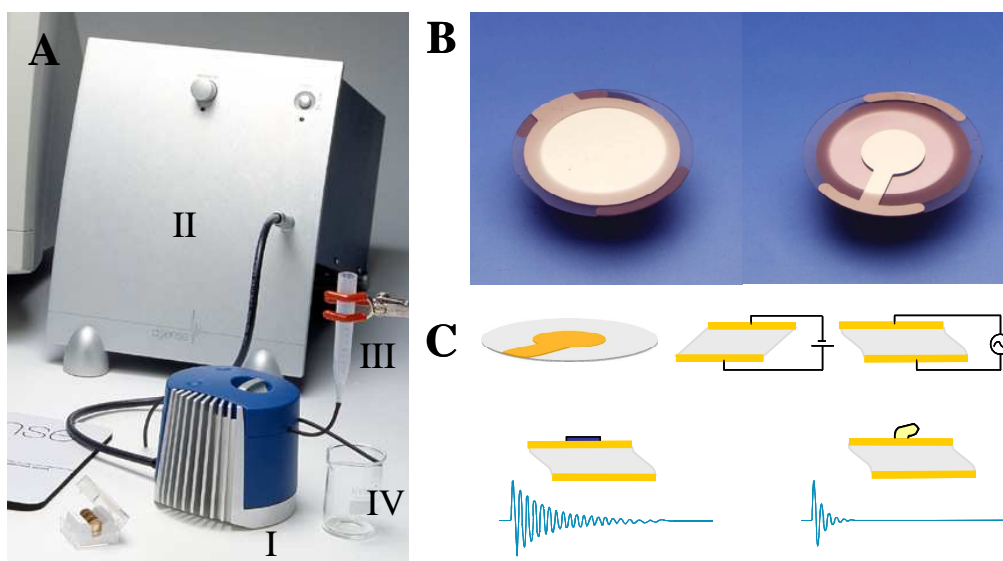


Figure B4.1 : Appareil de QCM-D (A) composé de la chambre de mesure (I), et d'un boîtier électronique (II). A l'extérieur de la chambre se trouve une seringue pour l'injection du liquide (III) et un récipient de sortie (IV). Le cristal de quartz (B) est introduit dans la chambre de mesure. C : Représentation schématique de l'excitation électrique puis de l'amortissement mesuré à gauche avec un échantillon couplé de manière rigide à la surface et à droite un échantillon couplé de manière flexible à la surface.

A2. La variation de la fréquence de résonance (Δf)

La variation de la fréquence de résonance du cristal de quartz (Δf) est proportionnelle à la masse adsorbée à la surface du cristal (Δm) selon la relation de Sauerbrey [89]:

$$\Delta m = -\frac{C \cdot \Delta f}{n} \quad (1)$$

Cette expression constitue le fondement de la technique de QCM. La constante de sensibilité de masse, C , est totalement dépendante du cristal. Pour les cristaux commerciaux de fréquence de résonance $f_0 = 5\text{MHz}$ utilisés dans ce travail, $C = 17,7 \text{ ng}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{Hz}^{-1}$. La résolution du système en routine est légèrement inférieure à 1Hz, soit quelques dizaines de nano-grammes par cm^2 . Il est également possible d'exciter le cristal avec une harmonique d'ordre n de la fréquence de résonance ($f_n = n f_0$ avec $n = 3, 5, 7$).

Il est donc possible de déterminer la masse adsorbée sur un cristal de quartz. Toutefois, l'équation (1) n'est valable que pour des masses adsorbées faibles (par rapport à la masse du cristal), rigides, adsorbées de manière homogène sur la surface et couplées au cristal sans glissement. Si ce n'est pas le cas, l'équation (1) est alors seulement une approximation. Il a été démontré que l'équation de Sauerbrey est applicable pour les espèces moléculaires de type SLB et protéines, comme celles utilisées dans ce travail [85,90].

Il faut noter que la masse adsorbée mesurée par QCM-D inclut l'eau liée à la matière adsorbée. Ceci constitue une différence importante par rapport à d'autres techniques de mesures de masse, comme la résonance plasmonique de surface (RPS) ou l'ellipsométrie. La combinaison de ces techniques avec le QCM-D est donc intéressante pour mesurer le taux d'hydratation de la matière adsorbée sur une surface [90,91].

A3. La variation de la dissipation (ΔD)

La dissipation permet d'obtenir des renseignements sur les propriétés viscoélastiques de la matière adsorbée à la surface du cristal (matière couplée de façon rigide ou flexible) et de suivre ce paramètre au cours du temps. Si l'adsorbat est couplé de manière rigide au support, l'énergie est peu ou pas dissipée à travers l'échantillon. Par contre, si l'adsorbat est couplé de manière non rigide, l'énergie est dissipée à travers l'échantillon et la dissipation d'énergie (D), déterminée en mesurant l'amortissement de l'oscillation du cristal excité, fournit une mesure directe du phénomène. La décroissance de l'oscillation est déterminée en enregistrant l'élongation temporelle $A(t)$ (évolution de l'amplitude de l'oscillation après arrêt de l'excitation du cristal) qui est décrite par l'équation (2) :

$$A(t) = A_0 e^{-\pi f D t} \sin(\pi f t + \phi) \quad (2)$$

L'équation (2) permet de calculer la fréquence propre de résonance f et la dissipation D . Le signal de dissipation permet de détecter des changements d'état de la matière ou de mettre en évidence des transitions de phase, comme par exemple la transition entre des vésicules lipidiques adsorbées et une bicouche lipidique supportée [23]. La mesure des changements de dissipation a également permis de mettre en évidence la rigidification d'une couche de protéine induite par pontage covalent [92].

A4. Les surfaces utilisées

La technique de QCM-D a un avantage par rapport à d'autres techniques de mesure de masse, à savoir que le signal dépend uniquement du cristal de quartz et non de l'interface. Il est donc possible de travailler sur différentes surfaces en recouvrant le cristal avec un matériau donné. Ainsi des études sont possibles sur de l'or (Au), de l'oxyde de Silice (SiO_2) ou de Titane (TiO_2), des polymères ou encore du mica [93]. Il y a deux limitations à l'utilisation de tels dépôts. La première est que le matériau déposé doit très bien adhérer au

cristal pour que l'ensemble constitue une seule entité vibratoire lors de l'excitation électrique et présente une seule fréquence de résonance. La deuxième limitation est l'épaisseur du dépôt. Des études ont montré que des couches rigides peuvent atteindre plus de 10 μm sans perturber le signal [94,95].

Pour ce travail, deux types de cristaux ont été utilisés. La plupart des études ont été réalisées avec des cristaux recouverts d'oxyde de silice (SiO_2). Une étude relatée dans le Chapitre IV a d'autre part été réalisée au moyen d'un cristal recouvert d'oxyde de titane (TiO_2).

A5. Exemples d'applications : formation d'une bicouche lipidique supportée et adsorption d'Anx5

L'interaction de vésicules lipidiques avec une surface de silice (SiO_2) puis la formation d'une SLB par celles-ci est un bon exemple de ce que peut apporter le QCM-D (Fig. B4.2).

Dans un premier temps, les vésicules s'adsorbent à la surface entraînant une diminution de Δf (augmentation de masse) et une augmentation de ΔD (augmentation de la perte d'énergie due à la flexibilité des vésicules). La densité de vésicules adsorbées augmente jusqu'à atteindre une valeur critique, indiquée par un minimum de Δf et un maximum de ΔD . Au-delà de cette situation, les variations de Δf et de ΔD s'inversent pour atteindre finalement des valeurs plateaux correspondant respectivement à environ 25 Hz (équivalent à 440 ng/cm^2) et à $0,2 \times 10^{-6}$. Cette seconde phase correspond à l'éclatement des vésicules qui se transforment localement en bicouche lipidique de manière coopérative et forment finalement une bicouche lipidique continue à la surface du cristal. La baisse de dissipation est due à la rigidification de l'assemblage lipidique et la perte de masse correspondant à l'augmentation de Δf est liée principalement à la perte de l'eau contenue à l'intérieur des liposomes.

L'étude du signal QCM-D associée à d'autres techniques comme l'AFM ou l'ellipsométrie a permis de mieux comprendre le processus de formation de bicouche lipidique par déposition de liposomes [26,86].

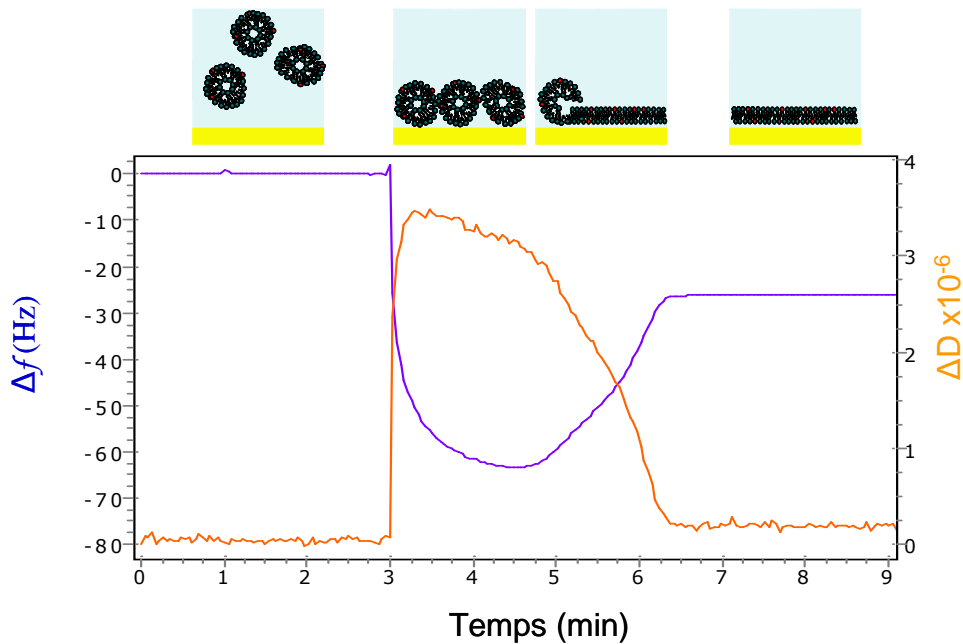


Figure B4.2 : Signal QCM-D de la formation d'une bicouche lipidique supportée sur surface de silice par dépôt de 100 $\mu\text{g/ml}$ de vésicules DOPC/DOPS (4 :1) en tampon A en présence de 2 mM Ca^{2+} . Deux phases sont visibles : adsorption des liposomes puis rupture et coalescence pour former une SLB.

L'exemple suivant illustre l'adsorption d'Anx5 à une SLB composée d'un mélange DOPC/DOPS (4/1) en présence de 2 mM Ca^{2+} . La figure B4.3 montre le signal obtenu après l'injection de 20 $\mu\text{g/ml}$ d'Anx5. On observe une baisse de Δf correspondant à la liaison de l'Anx5 à la SLB, jusqu'à saturation de la surface. L'absence d'augmentation de la dissipation indique que l'Anx5 forme une monocouche rigide sur la SLB. A saturation, la masse d'Anx5 liée correspond à 15 Hz, soit 265 ng/cm^2 . Une étude détaillée de ce processus, réalisée dans notre équipe par R. Richter, a permis de montrer que la saturation correspond à une monocouche compacte de trimères d'Anx5 et que la contribution de l'eau liée est d'environ 30% [93]. La couche d'Anx5 n'est pas déplacée par rinçage par une solution tampon dépourvue de protéine, ce qui indique qu'elle est extrêmement stable [54]. D'autre part, l'injection de sérum de veau fœtal 10%, n'est accompagnée d'aucune interaction, ce qui indique le très faible niveau de liaison non spécifique des matrices 2D d'Anx5 sur SLB. Ces deux propriétés sont critiques pour le projet de développement de plate-formes d'ancrage.

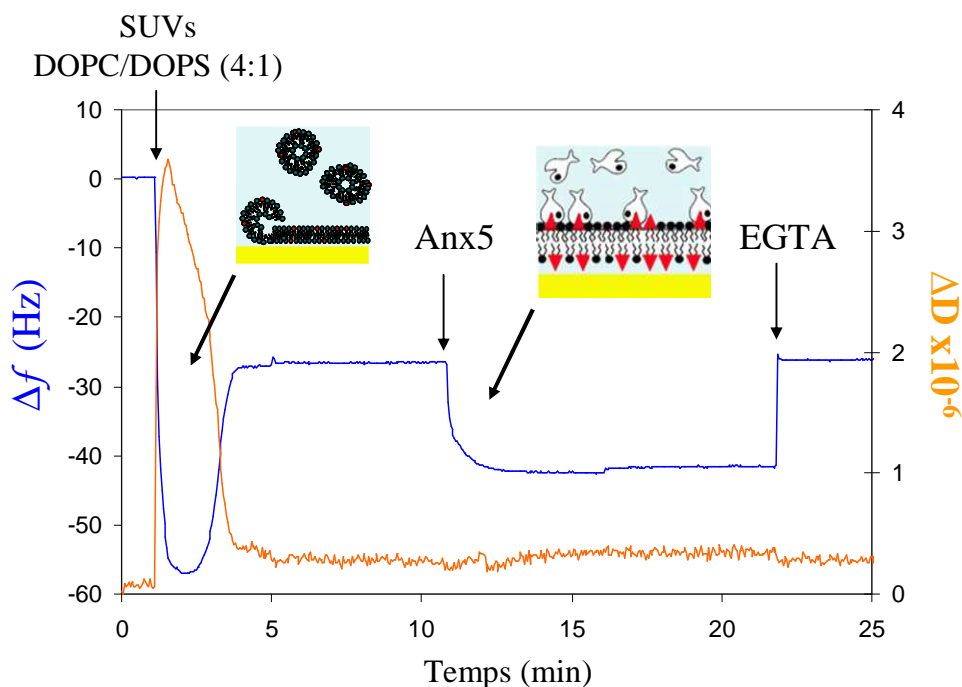


FIGURE B4.3 : Signal QCM-D de la formation d'une bicouche lipidique DOPC/DOPS (4/1) suivie de l'adsorption d'Anx5 au niveau des DOPS (triangles rouges).

B. Microscopie à force atomique (AFM)

L'AFM fait partie des techniques de « microscopie en champ proche ». Ces techniques dérivent du microscope à effet tunnel [96] qui fut inventé en 1982 par Gerd Binnig et Heinrich Rohrer à qui le prix Nobel de physique fut décerné en 1986 pour cette invention. Le principe des microscopies en champ proche consiste à balayer la surface d'un échantillon à l'aide d'une sonde pour caractériser la surface de l'échantillon : topographie, état de charge, à une échelle de l'ordre de l'Angström dans le domaine de la physique et du nanomètre dans le domaine des échantillons biologiques. L'AFM est la technique de microscopie en champ proche la plus utilisée dans le domaine des échantillons biologiques (non conducteurs) [97,98]. L'avantage unique de l'AFM en biologie est de pouvoir imager des échantillons en solution aqueuse, donnant accès à la dynamique de processus complexes en conditions quasi-naturelles.

B1. Principe de fonctionnement

La sonde utilisée en AFM est une pointe microscopique montée au bout d'un levier (Fig. B4.4 C,D). Cette pointe balaye la surface de l'échantillon et la déflexion du levier, induite par l'interaction avec l'échantillon, est détectée par un système optique de laser avec

une résolution de l'ordre de l'Angström (Å). Un système piézo-électrique permet le déplacement de l'échantillon ou de la pointe en trois dimensions avec une précision meilleure que l'Å. Avec le microscope AFM utilisé dans ce travail, la pointe (Fig. 1.8.D) est maintenue fixe alors que l'échantillon est fixé sur un support couplé au scanner piézo-électrique. Une boucle de rétrocontrôle permet d'ajuster la hauteur de l'échantillon par rapport à la pointe, de manière à réduire les forces de compression imposées à l'échantillon (Fig. B4.4.B). Ce système permet donc de déduire la topographie de la surface ainsi que les forces d'interaction entre la pointe et l'échantillon. La gamme de forces pouvant être mesurée dépend de la déflexion x du levier et de la constante de raideur k de celui-ci (0,06 à 0,58 N/m pour les leviers utilisés dans ce travail) selon la relation $F=k \cdot x$. Il est possible de mesurer des forces de l'ordre des dizaines de pico Newton (pN), ce qui est de l'ordre de grandeur des forces intermoléculaires mises en jeu en biologie. Pour ne prendre que quelques exemples, la rupture d'une liaison covalente nécessite 1nN, l'extraction d'un lipide d'une SLB de même que l'étirement d'un brin d'ADN nécessitent quelques dizaines de pN [99]. Quant à l'étirement d'une protéine, il nécessite quelques centaines de pN [100,101].

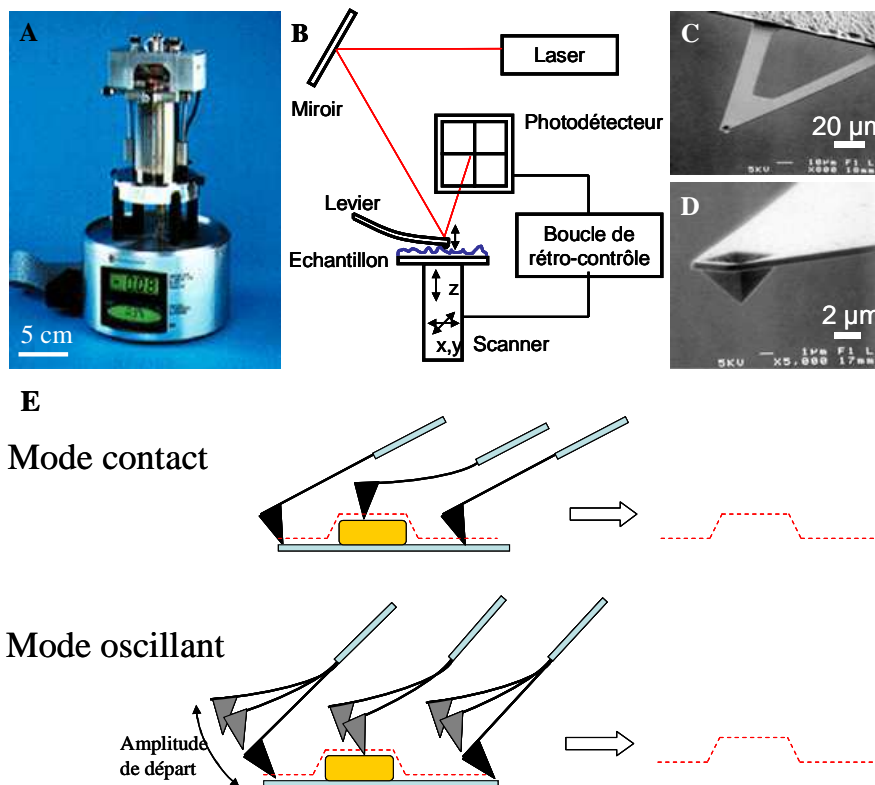


Figure B4.4 : A : Microscope à force atomique modèle Multimode (Digital Instrument, Veeco). B : Schéma de fonctionnement de l'AFM. C : Image de microscopie électronique à balayage du levier au bout duquel se trouve la pointe (D). E : Représentation schématique des deux modes d'imagerie AFM.

Il existe deux modes de fonctionnement de l'AFM : le mode contact et le mode oscillant. Dans le mode contact, le plus ancien, la pointe est en permanence en contact avec l'échantillon (Fig. B4.4.E), la boucle de rétro-contrôle maintenant une force d'interaction constante entre les deux. Ce mode nécessite une faible rugosité et des éléments immobiles à la surface de l'échantillon. Les forces exercées pouvant endommager les échantillons fragiles, notamment les échantillons biologiques, un deuxième mode est apparu : le mode oscillant. La pointe est maintenue en vibration avec une amplitude constante pendant le balayage de l'échantillon. Le mode oscillant est mieux adapté aux échantillons fragiles mais il a une résolution moindre que le mode contact [102]. Les deux modes peuvent être pratiqués à l'air ou en milieu liquide, ce qui a rendu cette méthode attractive pour les sciences du vivant.

B2. Utilisation de l'AFM en Sciences du vivant

De nombreuses structures biologiques ont pu être observées à haute résolution par AFM : des protéines [59,103], de l'ADN [104], des lipides [86], et même des cellules entières [105]. Grâce à l'AFM, des détails structuraux de l'ordre du nanomètre peuvent être observés [106] en conservant les objets biologiques en milieu liquide. Le fait de pouvoir observer les échantillons biologiques, à l'échelle de la molécule unique, dans un environnement approchant les conditions physiologiques constitue un avantage unique par rapport aux autres techniques d'analyse structurale. Ainsi, la diffraction des rayons X et la RMN fournissent une information moyennée sur un grand nombre de molécules ($> 10^{10}$ pour les RX et $> 10^{15}$ pour la RMN) et la cristallographie X nécessite des échantillons cristallisés en 3D. La microscopie électronique, quant à elle, est également capable de résoudre des molécules uniques, mais nécessite des conditions de préparation strictes en raison du vide régnant dans la colonne du microscope et des fortes interactions entre électrons et échantillon. De ce fait, les échantillons sont observés soit dans l'état déshydraté, inclus dans une résine ou dans un film de colorant, soit hydratés-congelés, figés dans un mince film de tampon. La possibilité d'imager des échantillons dans l'état hydraté par AFM permet d'avoir accès à la dynamique de processus complexes comme l'adsorption d'assemblages 2D. Une limitation majeure actuellement est le temps d'acquisition des images (environ 1 minute pour les appareils commerciaux). Toutefois, de nouveaux systèmes sont à l'étude qui devraient permettre de réduire le temps d'acquisition [107].

Une contrainte intrinsèque à l'AFM est que l'échantillon doit être immobile lors de l'interaction avec la pointe. C'est le cas des assemblages 2D ordonnés de protéines qui sont des systèmes bien adaptés à l'observation fine en AFM et ont été beaucoup étudiés [108-110]. Par contre, l'observation d'échantillons dispersés est extrêmement difficile et limitée à de rares systèmes comme par exemple la toxine du choléra [111].

C. Retour de fluorescence après photo-blanchiment (FRAP)

La technique de FRAP permet de caractériser les propriétés de diffusion latérale de molécules. Dans une première étape, une zone d'un échantillon contenant des fluorophores est irradiée de manière à éteindre, ou photo-blanchir, les fluorophores se trouvant dans cette zone. Dans une seconde étape, l'augmentation de l'intensité de fluorescence, ou retour de fluorescence, résultant de la diffusion latérale des molécules fluorescentes dans la zone préalablement photo-blanchie est mesurée, ce qui permet de déterminer le coefficient de diffusion latérale de l'espèce moléculaire fluorescente observée [112-114] (Fig. B4.5).

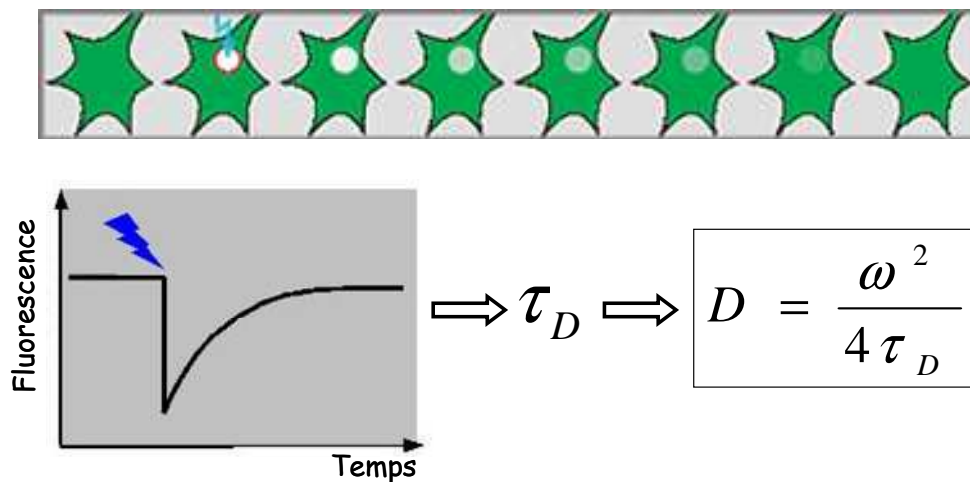


Figure B4.5 : Principe de la technique de FRAP. Une zone d'un objet fluorescent est blanchie par irradiation laser. Les molécules fluorescentes des zones non irradiées pénètrent dans la zone blanchie par diffusion latérale, entraînant un retour de la fluorescence dans cette zone. La modélisation de la courbe mesurant le retour de fluorescence permet de déterminer le paramètre τ_D nécessaire pour calculer le coefficient de diffusion latéral D de l'espèce moléculaire fluorescente [114].

La technique de FRAP est utilisée en sciences du vivant pour mesurer le coefficient de diffusion des lipides dans des systèmes de membranes modèles ou natives.

C. Résultats

I. Développement d'une plate-forme d'ancrage 2D pour l'adhésion cellulaire

A. Introduction

Un article décrivant cette étude a été accepté pour publication dans le journal *Biointerphases*.

Pour communiquer avec leur environnement, molécules et cellules voisines, les cellules présentent à la surface de leur membrane plasmique un ensemble de récepteurs et de protéines d'adhésion qui sont à la base du développement des tissus ou des liaisons intercellulaires. Les intégrines constituent une classe de protéines d'adhésion particulièrement étudiée [115]. La famille des intégrines humaines est composée de 24 protéines membranaires hétérodimériques formées par la combinaison d'une des 18 sous-unités α et d'une des 8 sous-unités β [116]. Les intégrines forment des liaisons avec des protéines de la matrice extracellulaire (MEC) et particulièrement avec celles qui présentent la séquence Arg-Gly-Asp (RGD). Cette séquence, identifiée en 1984 dans la fibronectine [117] (Fig. C1.1A), est présente dans plusieurs autres protéines de la MEC dont le collagène et la laminine [118]. Le rôle de cette séquence dans l'adhésion cellulaire a été établi [117,119,120]. La séquence RGD est la plus efficace et la plus employée pour induire l'adhésion cellulaire [121]. Une fois liées à la séquence RGD des protéines de la MEC, les intégrines forment un ancrage solide entre la MEC et le cytosquelette de la cellule, via la taline, l' α -actine, la vinculine, la paxilline et d'autres protéines cytosoliques. Les intégrines activent ainsi des voies de signalisation pour la survie de la cellule, le contrôle de la transcription, la prolifération cellulaire, la mobilité cellulaire et l'organisation du cytosquelette [122]. D'autres protéines d'adhésion cellulaire reconnaissent d'autres séquences peptidiques, dont la séquence IKVAV. Cette séquence est issue de la laminine, protéine de la MEC très abondante dans la matrice du tissu nerveux, qui possède plusieurs sites de liaison à des récepteurs cellulaires (notamment les séquences RGD et IKVAV) [123]. Le schéma de la laminine (Fig. C1.1B) montre que la séquence IKVAV se situe sur la chaîne A, dans la région PA22-2 entre les résidus 2 091 et 2 108 [123] située avant le large domaine globulaire localisé en C terminal. La séquence IKVAV est responsable de

l'adhésion des cellules neuro-progénitrices, de leur étalement, de leur migration ainsi que de la croissance de neurites [124,125].

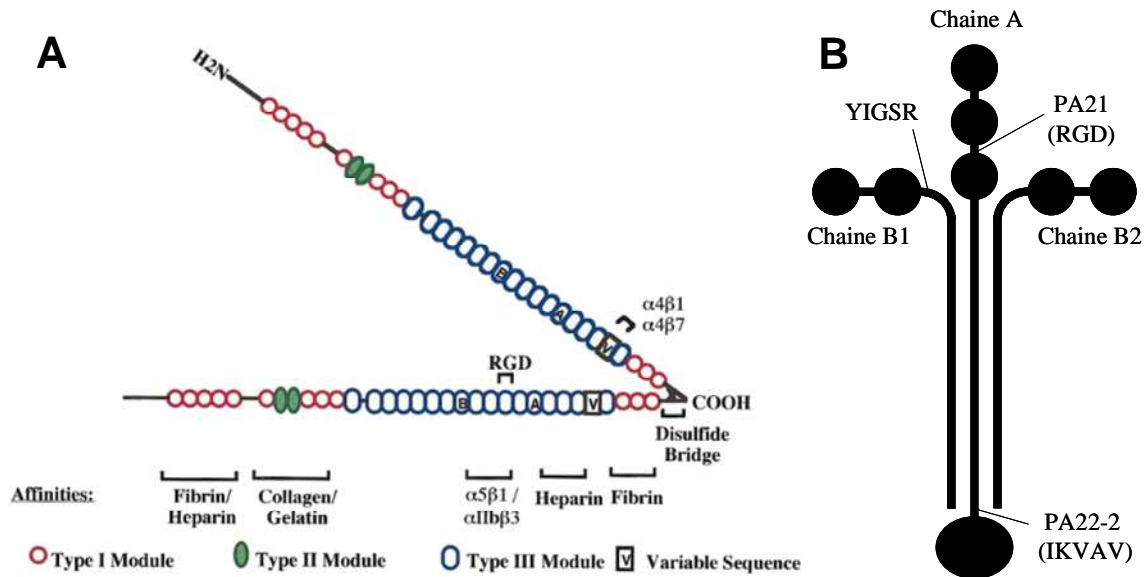


Figure C1.1 : Représentation schématique de la fibronectine (A) d'après Magnusson et Mosher [126] et de la laminine (B) d'après Sasaki et al. [123]. **A :** Deux sous-unités sont représentées et les régions impliquées dans des interactions avec d'autres protéines sont indiquées. **B :** La séquence IKVAV se situe à la fin du domaine hélicoïdal, avant la partie globulaire constituant le domaine C terminal de la chaîne A. La séquence YIGSR a également été décrite comme induisant l'adhésion cellulaire [127].

Pour vivre et proliférer, de nombreux types cellulaires doivent adhérer à un support qui est constitué physiologiquement par la MEC. Les études cellulaires « ex vivo » nécessitent donc d'induire l'adhésion cellulaire sur une surface. La compréhension et le contrôle de l'adhésion cellulaire sur les biomatériaux constituent des enjeux importants aussi bien en recherche fondamentale qu'en recherche appliquée, pour des applications comme le développement de tissus artificiels, la bio-intégration des implants médicaux ou le développement de puces à cellules pour le criblage de composés [13,128-130]. De nombreuses méthodes ont été développées pour induire l'adhésion cellulaire sur différentes surfaces [131]. Ces méthodes reposent principalement sur la fonctionnalisation biomimétique de surfaces avec des protéines ou des peptides de la MEC. Dans de nombreux cas, les molécules utilisées pour l'adhésion cellulaire contiennent le peptide RGD [119,132]. Les méthodes habituelles de couplage des molécules d'adhésion à un support solide sont basées sur l'adsorption physique, directe ou par l'intermédiaire d'un polymère [133], la liaison covalente via la formation de monocouches auto-assemblées [134], l'interaction d'affinité utilisant un système streptavidine-biotine, ou encore la formation de membranes supportées

soit par déposition de vésicules [131,135] soit par l'intermédiaire d'une couche de polymère [13,17].

Le greffage covalent de molécules sur une surface implique en général des groupements fonctionnels tels que les fonctions carboxyliques, hydroxyles, ou amines. Pour les matériaux ne possédant pas ces groupements fonctionnels à leur surface, ceux-ci peuvent être introduits par des traitements physiques ou chimiques (oxydation, réduction, ...) de la surface, ou d'un intermédiaire greffé sur la surface, comme un polymère [136,137]. L'inconvénient majeur du couplage covalent est l'utilisation de solvants spécifiques à la réaction chimique du couplage et ceci à des pH potentiellement éloignés du pH physiologique de stabilité du peptide. Ces solvants peuvent endommager le peptide greffé sur la surface et ainsi inactiver sa propriété d'induction de l'adhésion cellulaire.

Le greffage non covalent à une surface met en jeu généralement des interactions électrostatiques, qui assurent la stabilité de l'édifice. Un exemple de cette approche est fourni par la fonctionnalisation de surfaces d'oxydes métalliques, chargées négativement, à l'aide de polymères tels que le poly-L-lysine-poly-éthylène glycol (PLL-PEG), chargés positivement [133]. Une autre voie attractive est l'ancrage non covalent par l'intermédiaire de SLB. Ces systèmes sont devenus très populaires comme plate-forme d'adhésion cellulaire car les SLBs constituent un environnement naturel de la cellule dans lequel des protéines membranaires et des peptides peuvent être introduits. De plus, la formation de SLB est simple [18] et elles sont très résistantes à l'adsorption non spécifique de protéines et de cellules. Comme il est décrit auparavant, les SLBs sont formées d'une bicouche lipidique continue d'une épaisseur de 5 nm, séparée de la surface par une couche d'eau d'environ 1 nm permettant aux lipides de diffuser latéralement au sein de la SLB. Les précédentes études de l'adhésion cellulaire avec des SLB utilisent des lipides fonctionnalisés par des peptides [125,138-143]. L'influence de l'orientation [138,140,142], de l'accessibilité [139,144], de la conformation [138,140] ou de la mobilité [145] des lipopeptides sur l'attachement cellulaire et l'étalement a été étudiée grâce à l'utilisation de techniques de caractérisation de surface adaptées.

Pendant ma thèse, j'ai étudié le développement d'un nouveau type de plate-forme d'adhésion cellulaire dans laquelle des peptides sont liés de manière covalente et orientée à des protéines formant une matrice 2D rigide à la surface d'une SLB [12,59,146]. L'hypothèse de travail était que cette approche permettrait le contrôle de l'homogénéité, de l'orientation et de la densité du peptide présenté.

Deux types de peptides d'adhésion, contenant soit un motif RGD ou un motif IKVAV [124,147], ont été sélectionnés pour cette étude.

Ces travaux décrivent la caractérisation de l'adsorption et de l'organisation des complexes Anx5-peptides au niveau de SLBs et le développement d'une plate-forme d'adhésion cellulaire basée sur des matrices 2D auto-assemblées de complexes Anx5-peptide sur SLB (Fig. C1.2).

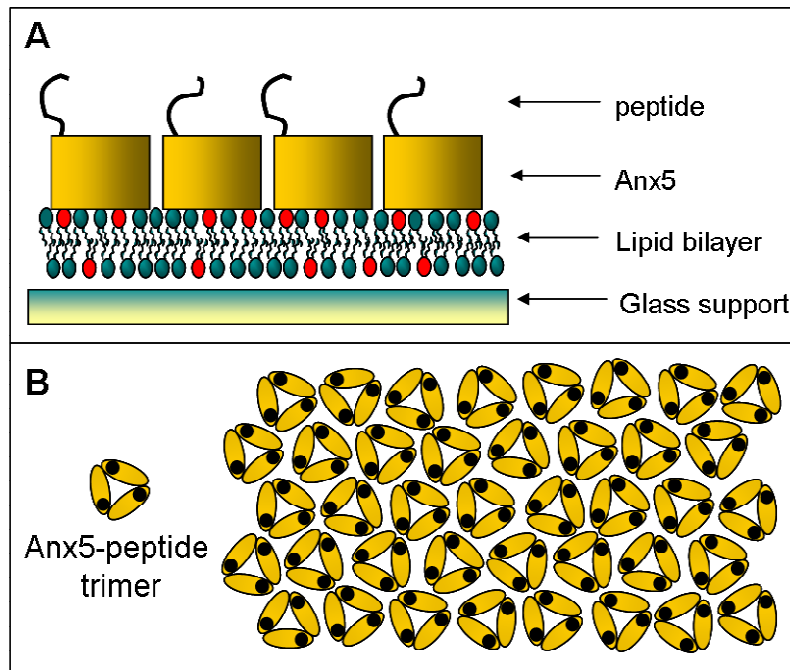


Figure C1.2 : Schéma de la plate-forme d'adhésion cellulaire basée sur les matrices 2D d'Anx5-peptide sur SLB.

A : Vue de côté : Complexe protéique Anx5-peptide auto-assemblé sur SLB formée sur support de verre. Les peptides d'adhésion cellulaire sont exposés dans un environnement aqueux.

B : Vue de dessus : assemblage compact 2D de trimères d'Anx5-peptide.

B. Résultats

B1. Synthèse des complexes Anx5-peptide d'adhésion

Pour ces expériences, deux peptides d'adhésion cellulaire, contenant soit le motif RGD soit le motif IKVAV, ont été synthétisés avec une cystéine dans leur séquence. Ces peptides ont été couplés à l'Anx5-SH, un double mutant de l'Anx5 présentant une seule cystéine, par formation d'un pont disulfure covalent entre le peptide et l'Anx5-SH. L'Anx5-SH a été conçue de manière à présenter la cystéine sur une boucle exposée au solvant sur la face concave de l'Anx5, à l'opposé de la face liant les membranes. Le raisonnement sous-

jacent était que, de cette manière, l'accessibilité des peptides (ou des éléments de couplages) serait optimisée [29,59].

Les complexes Anx5-RGD et Anx5-IKVAV (Fig. C1.3) ont été produits à une pureté proche de 100%, avec un rendement global de 20%. Les masses moléculaires de 36 738 Da et 37 608 Da ont été déterminées par spectrométrie de masse MALDI-TOF pour l'Anx5-RGD et l'Anx5-IKVAV, respectivement. Ces valeurs sont en accord avec les valeurs théoriques de 36 759 Da et 37 628 Da respectivement.

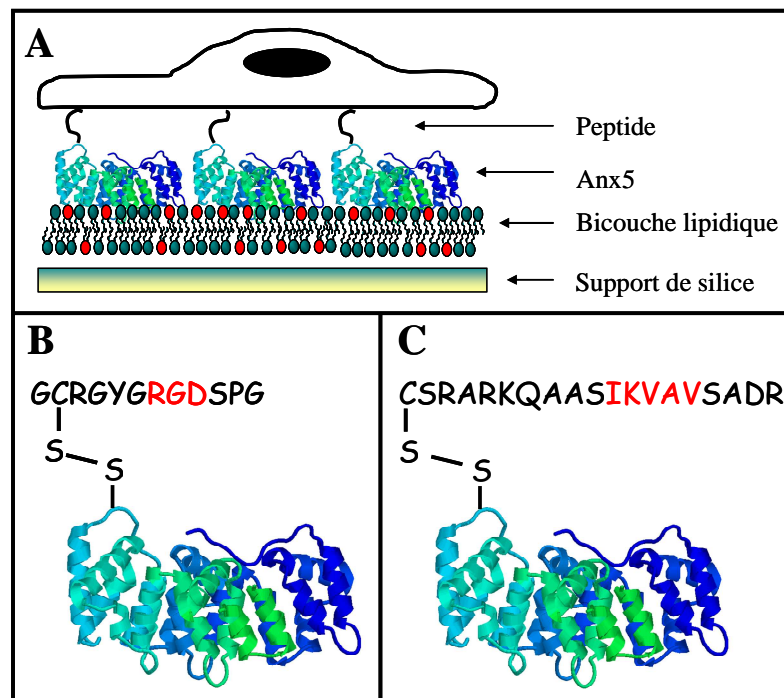


Figure C1.3 : Représentation schématique de la plate-forme d'ancrage cellulaire (A) utilisant des matrices 2D de complexes covalents entre l'Anx5 et deux peptides d'adhésion cellulaire contenant soit la séquence RGD (B) soit la séquence IKVAV (C).

B2. Liaison et organisation 2D des matrices d'Anx5-peptide sur SLB

La liaison des complexes d'Anx5-peptide à des surfaces lipidiques a été étudiée par QCM-D et AFM pour déterminer si le couplage covalent de peptides à l'Anx5 affecte ses propriétés de liaison et d'assemblage 2D [12,24,54,56,59].

B2.1. Caractérisation de l'organisation 2D des complexes d'Anx5-peptide sur SLB par QCM-D

La figure C1.4 présente les signaux d'adsorption obtenus par QCM-D pour l'Anx5-RGD et l'Anx5-IKVAV, en comparaison au signal de l'Anx5. La saturation de la surface lipidique est obtenue avec une concentration de 20 $\mu\text{g/ml}$ pour les deux complexes Anx5-peptide, de même que pour l'Anx5 [24]. A saturation, les monocouches d'Anx5-RGD et d'Anx5-IKVAV sont caractérisées par une masse d'environ 350 ng/cm^2 et une valeur de ΔD de $0,8 \times 10^{-6}$. En comparaison, une monocouche saturante d'Anx5 a une masse 280 ng/cm^2 et une valeur de ΔD de 0 [54]. Comme attendu, la liaison d'Anx5-peptide est calcium-dépendante, ainsi que le démontre le décrochage instantané du complexe Anx5-peptide après rinçage par un tampon contenant 2 mM EGTA (flèche 3, fig. C1.4). La matrice 2D d'Anx5-peptide est d'autre part liée de manière stable à la SLB, comme le démontre l'absence de décrochage après rinçage en tampon dépourvu de protéine (ligne pointillée, fig. 1.4). Cette propriété caractéristique de l'Anx5 [54] est essentielle pour l'application envisagée car les tests d'adhésion cellulaire doivent être réalisés en absence d'Anx5-peptide en solution.

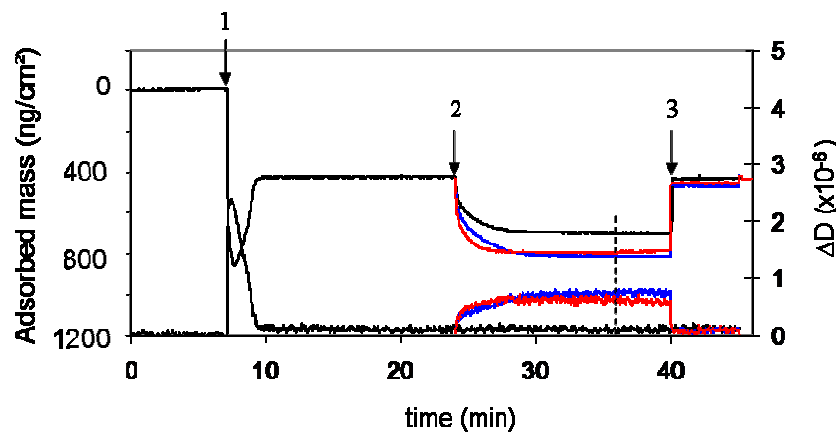


Figure C1.4 : Adsorption de l'Anx5-RGD, Anx5-IKVAV et Anx5 sur DOPC/DOPS (7/3) SLB, mesurée par QCM-D. Evolution de la masse adsorbée (courbes du haut) et de la dissipation (courbes du bas) mesurées après addition de vésicules DOPC/DOPS (7/3) (flèche 1) puis de 20 $\mu\text{g/ml}$ (flèche 2) d'Anx5 (noir), d'Anx5-RGD (bleu), et d'Anx5-IKVAV (rouge). Le rinçage de la chambre de QCM-D par du tampon sans protéine est indiqué par la ligne pointillée. A la flèche 3, la chambre de QCM-D a été rincée avec du tampon contenant 2 mM EGTA. L'aspect diphasique des courbes de masse et de dissipation après addition de vésicules lipidiques est caractéristique de la formation de SLB sur SiO₂ se stabilisant à environ 440 ng/cm^2 sans dissipation [23,86]

La différence de masse d'environ 25% observée entre les matrices d'Anx5-peptide (350 ng/cm^2) et d'Anx5 (280 ng/cm^2) est plus importante que l'incrément de masse dû au

peptide (environ 4 à 6%). Ceci, associé à la forte valeur de la variation de dissipation, indique que le peptide est flexible et fortement hydraté. Les peptides RGD et IKVAV sont donc potentiellement favorablement orientés pour l'interaction avec les intégrines.

B2.2. Caractérisation de l'organisation 2D des complexes d'Anx5-RGD par AFM

La structure des matrices 2D d'Anx5-RGD a été étudiée par AFM sur SLB en suivant les protocoles mis au point pour l'étude de la structure de la matrice d'Anx5 [56,59].

L'AFM montre que les complexes Anx5-RGD s'auto-assemblent sur SLB en domaines 2D (Fig. C1.5A). A saturation, les domaines couvrent entièrement la SLB, comme cela a été décrit précédemment pour l'Anx5. Observés à plus haute résolution, ces domaines présentent des lignes blanches (correspondant à des éléments structuraux proches de la pointe) parallèles selon deux directions à environ 120° l'une de l'autre (Fig. C1.5B,C). Cette organisation est caractéristique des cristaux 2D d'Anx5 [54,59], indiquant que les domaines d'Anx5-RGD présentent une organisation cristalline 2D avec une symétrie hexagonale (Fig. C1.5B,C). Toutefois, la structure cristalline est moins bien résolue dans les images d'Anx5-RGD que dans les images d'Anx5. Ceci doit être dû à l'interaction de la pointe d'AFM avec les peptides flexibles qui sont exposés à la surface de la matrice rigide d'Anx5.

Les complexes Anx5-IKVAV n'ont pas été étudiés par AFM, en raison de la difficulté d'obtenir des images de bonne qualité rencontrée avec l'Anx5-RGD. Par contre, des expériences complémentaires de cristallisation 2D sur monocouche lipidique, réalisées par Sisareuth Tan au LIMNT, ont montré que l'Anx5-IKVAV formait des cristaux 2D de maille et symétrie p6 similaires à l'Anx5 (données non présentées).

En conclusion, ces résultats démontrent que la présence d'un peptide lié de manière covalente sur la face concave de l'Anx5 n'affecte pas ses propriétés de liaison et d'organisation 2D sur les surfaces lipidiques. Il a donc été considéré que, sur les supports de verre utilisés pour les expériences d'adhésion cellulaire, l'Anx5-peptide se comporte comme l'Anx5 et forme des assemblages compacts de trimères [24] (Fig. C1.2).

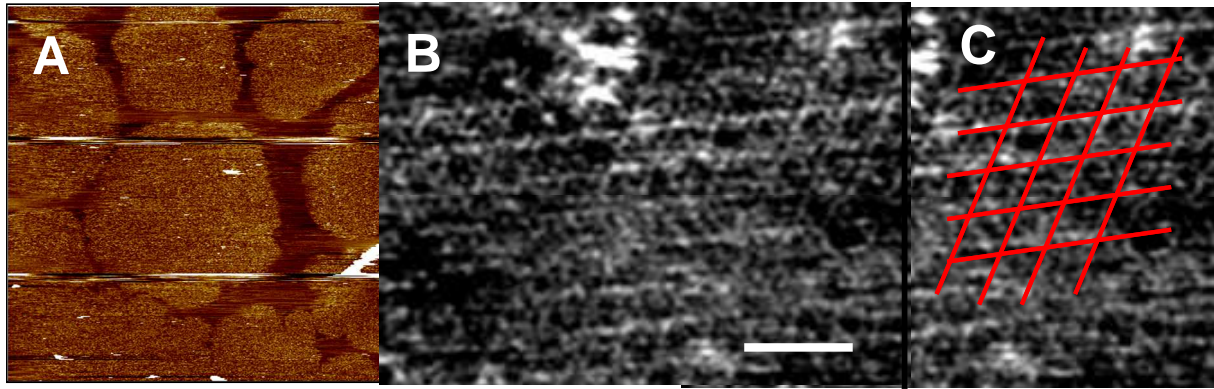


Figure C1.5 : Organisation 2D de l'Anx5-RGD sur surface lipidique observé par AFM.

A : Domaines 2D d'Anx5-RGD formés sur SLB DOPC/DOPS (7/3) sur mica. La formation des domaines est caractéristique de la formation de domaines 2D cristallins d'Anx5 sur SLB sur mica. Taille de l'image : 20 μm .

B : L'image d'AFM à fort grossissement révèle l'organisation cristalline hexagonale des molécules d'Anx5-RGD. Barre d'échelle : 40 nm.

C : Réseau hexagonal superposé à l'image AFM du réseau d'Anx5-RGD. La maille du réseau est environ 18 x 18 nm, comme pour l'Anx5 [57].

B3. Adhésion des cellules HSVE, HOP et MES sur les matrices 2D d'Anx5-peptide

L'utilisation des matrices 2D d'Anx5-peptide sur SLB comme plate-forme pour l'adhésion cellulaire a été étudiée avec trois types cellulaires : les cellules différenciées HSVE ainsi que les cellules indifférenciées MES et HOP.

Les cellules HSVE adhèrent à une matrice 2D d'Anx5-RGD, comme le montre la figure 2.6A enregistrée après 3 heures d'incubation. Les cellules sont étalées de manière homogène, avec un diamètre moyen d'environ 20 μm . Les noyaux cellulaires sont bien résolus. Des extensions cytoplasmiques avec des points de contacts focaux sont observées à la périphérie des cellules (flèches fig. C1.6A). La densité cellulaire est d'environ 1 400 cellules/ mm^2 . Cette valeur est sensiblement plus forte que les valeurs obtenues sur gélatine, qui est la surface de référence pour l'adhésion de ces cellules (Fig. C1.6B et C1.7) [148,149]. Les cellules HSVE n'adhèrent pas sur les matrices d'Anx5 pure (Fig. 2.6C) et très peu sur les matrices d'Anx5-IKVAV (Fig. C1.7). Des cellules mortes ou quiescentes sont observées présentant une forme caractéristique ronde et diffusant fortement la lumière, avec un diamètre de 2 à 5 μm (Fig. C1.6C).

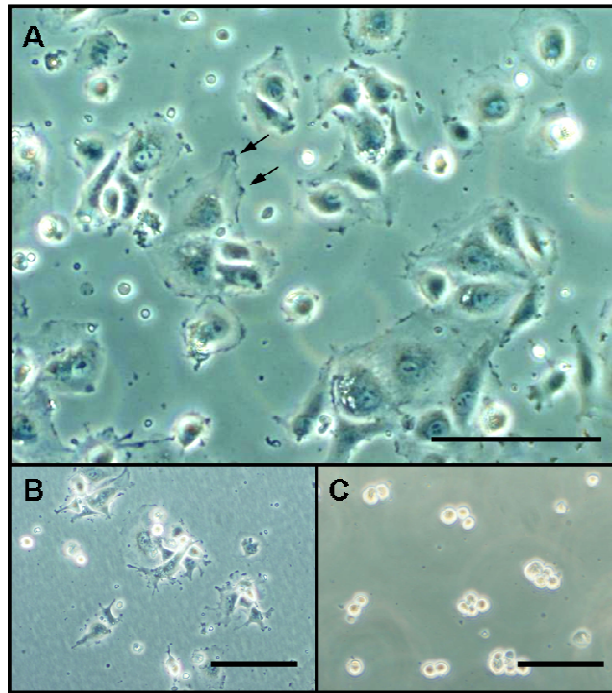


Figure C1.6 : Adhésion des cellules HSVE sur différents supports, observée par microscopie à contraste de phase après 3 hrs d'incubation. **A :** Cellules HSVE étalées de manière homogène sur une matrice 2D d'Anx5-RGD. Des points de contact focaux sont visibles à la périphérie des cellules (flèches). **B :** Cellules HSVE étalées sur gélatine; leur taille et leur morphologie sont similaires aux cellules adhérées sur Anx5-RGD. **C :** Les cellules HVE n'adh rent pas aux matrices 2D d'Anx5. Barre d'échelle : 50 nm.

L'attachement des cellules MES, le second système cellulaire étudié, à des matrices 2D d'Anx5-IKVAV a été mis en évidence (Fig. C1.7). L'attachement des cellules MES sur Anx5-IKVAV est aussi efficace que sur une surface de gélatine, qui est la surface de référence pour l'adhésion de ces cellules (Fig. C1.7). Des études précédentes ont montré que les peptides contenant la séquence IKVAV sont capables d'induire l'adhésion des cellules souches nerveuses [124,125] et d'induire leur différenciation en cellules nerveuses. Toutefois, c'est la première fois que le rôle du peptide IKVAV est décrit pour les cellules MES, pluripotentes. Ces cellules attachent également aux matrices 2D d'Anx5-RGD mais de manière moins efficace que sur Anx5-IKVAV (Fig. C1.7). Aucune adhésion n'a été observée sur des matrices d'Anx5 pure.

L'adhésion cellulaire des cellules HOP sur la plate-forme Anx5-RGD est équivalente à ce qui est observé sur support de plastique, qui est le support de référence pour ce type cellulaire (Fig. C1.7).

Ces résultats démontrent que les matrices d'Anx5-peptide constituent une plate-forme efficace pour l'adhésion cellulaire.

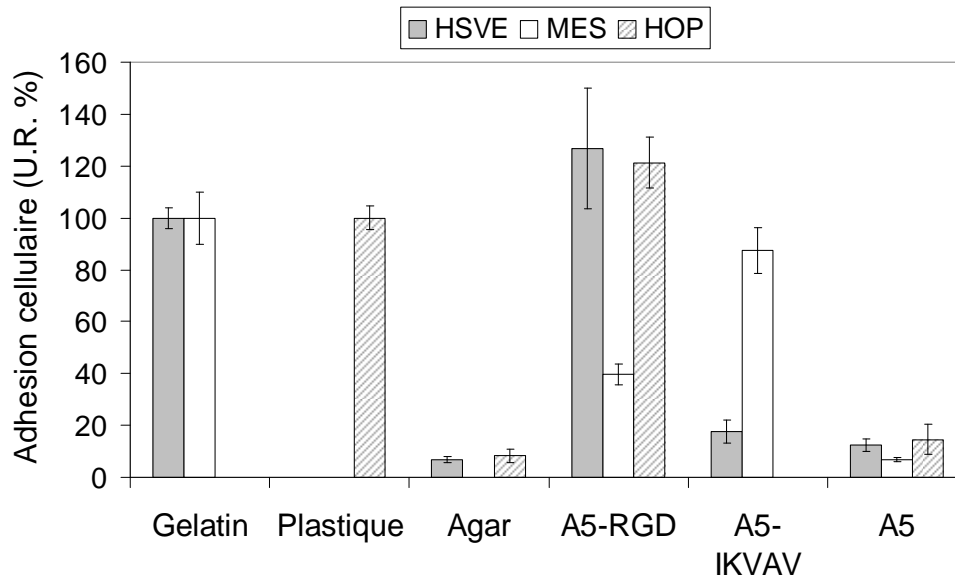


Figure C1.7 : Adhésion des cellules HSVE, HOP et MES sur différents supports. L'adhésion est exprimée en unités relatives (U.R.). La valeur 100% correspond à la valeur mesurée sur gélatine pour les cellules HSVE et MES et sur plastique pour les cellules HOP.

B4. Influence de la densité d'Anx5-peptide sur l'attachement cellulaire

L'influence de la densité de peptide sur l'adhésion cellulaire a été étudiée. Comme l'Anx5 et l'Anx5-peptide présentent des propriétés identiques de liaison et d'organisation, il a été considéré que la densité de peptide pouvait être modulée de manière contrôlée en utilisant des mélanges d'Anx5 et d'Anx5-peptide avec des rapports Anx5/Anx5-peptide connus. Pour vérifier cette hypothèse, l'expérience suivante a été réalisée : 1) des liposomes de type MLV ont été incubés en présence d'une solution lipidique contenant des rapports connus Anx5/Anx5-peptide ; 2) les liposomes sont séparés des protéines non liées par centrifugation ; 3) le taux respectif d'Anx5 et d'Anx5-peptide lié sur les liposomes est évalué par SDS-PAGE. Les résultats indiquent que, autant pour Anx5-RGD que pour Anx5-IKVAV, les rapports Anx5/Anx5-peptide liés aux liposomes sont en accord avec les rapports des solutions originales (Fig. C1.8). En conséquence, la densité d'Anx5-peptide à la surface des SLBs peut être contrôlée simplement.

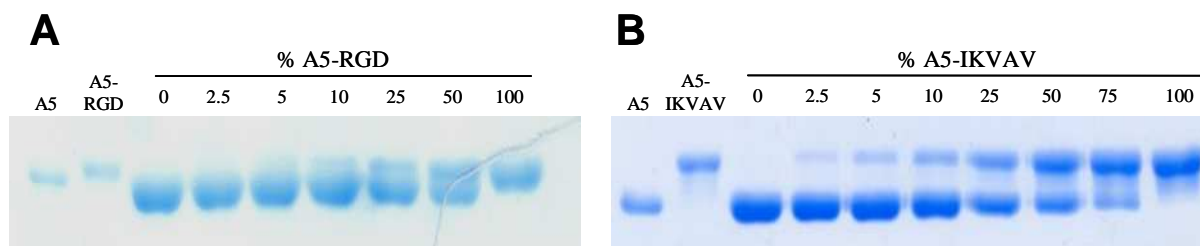


Figure C1.8 : Analyse SDS-PAGE du taux d'Anx5-peptide et d'Anx5 lié à des liposomes. **A)** Anx5-RGD ; **B)** Anx5-IKVAV. Les deux premières lignes à gauche en A) et B) correspondent à la migration d'Anx5 et d'Anx5-peptide en absence de liposomes. Les lignes suivantes correspondent à la migration des culots de liposomes obtenus après incubation avec des rapports de masse Anx5/Anx5-peptide de 0/100; 2.5/97.5; 5/95; 10/90; 25/75; 50/50; 75/25 (pour IKVAV), 100/0. L'intensité relative des bandes Anx5 et Anx5-peptide des échantillons entre 25/75 et 100/0, estimée visuellement, est en accord avec les rapports des solutions de protéine originales.

L'influence de la densité de surface d'Anx5-RGD sur l'adhésion de cellules HSVE est présentée en Fig. C1.9. La densité maximale de molécules d'Anx5-RGD dans une matrice 2D d'Anx5-RGD pure est d'environ 33 000 Anx5-RGD/ μm^2 ; ce qui correspond à une distance entre deux RGD d'environ 6 nm [54,56]. La décroissance de la densité de RGD jusqu'à 6 000 RGD/ μm^2 a un effet limité sur l'adhésion cellulaire. L'adhésion des cellules a été mesurée jusqu'à 1% d'Anx5-RGD, ce qui correspond à 300 RGD/ μm^2 .

Des résultats similaires ont été obtenus pour l'attachement des cellules MES avec des densités variables d'Anx5-IKVAV. La densité critique d'IKVAV requise pour l'adhésion cellulaire est proche de 300 IKVAV/ μm^2 .

Une densité de 300 Anx5-peptide/ μm^2 correspond à une distance moyenne entre peptide de 58 nm. Ce chiffre est très proche de la distance critique de 58 à 73 nm au-dessous de laquelle les cellules n'adhèrent plus, ainsi que l'a montré l'équipe de Spatz [150]. L'approche mise en œuvre par l'équipe de Spatz a consisté à nano-structurer une surface de manière extrêmement régulière avec des peptides RGD greffés sur des nanoparticules d'or. La distance de 58 nm déterminée dans notre étude correspond à une distance moyenne entre RGD et non à une distance absolue, comme c'est le cas pour les nanoparticules d'or fonctionnalisées avec des peptides RGD [150]. Néanmoins, la densité critique de peptide déterminée ici est significativement plus faible que les valeurs précédemment reportées avec des SLB fonctionnalisées par des lipopeptides [142]. Ces deux modes de présentation de peptide diffèrent en termes de diffusion latérale du peptide, qui est libre dans le cas des lipopeptides [142], alors que les peptides sont immobiles dans les matrices 2D d'Anx5-peptide, ainsi que dans le cas des nanoparticules d'or fonctionnalisées. D'autres différences

possibles sont l'homogénéité, l'orientation et l'accessibilité des peptides qui sont bien contrôlées dans le cas des matrices 2D de protéines.

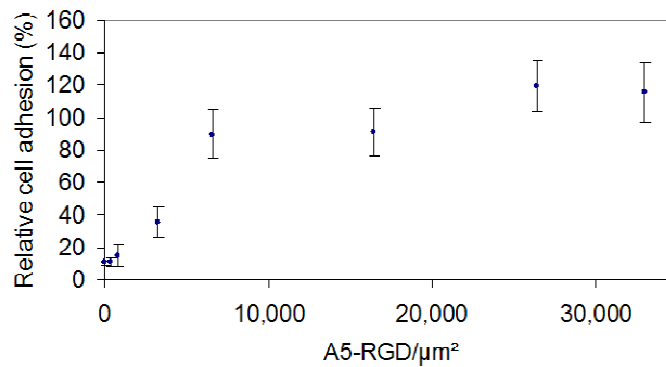


Figure C1.9 : Influence de la densité du peptide RGD sur l'adhésion des cellules HSVE. Chaque point provient de 6 expériences. 100% d'adhésion correspond à la valeur obtenue sur la gélatine.

B5. Conclusions

Ces travaux font l'objet d'un article accepté pour publication dans le journal *Biointerphases*. Ils présentent une nouvelle plate-forme pour l'adhésion cellulaire basée sur des matrices 2D auto-assemblées de complexes Anx5-peptide sur SLB. Les propriétés d'auto-assemblage de l'Anx5 sur des surfaces lipidiques sont exploitées pour présenter un peptide d'adhésion cellulaire. Les complexes Anx5-peptide présentent toutes les propriétés avantageuses de l'Anx5. L'adhésion cellulaire a été démontrée avec deux peptides différents et trois types cellulaires différents. L'efficacité de la plate-forme pour induire l'adhésion cellulaire est due à l'homogénéité, à l'orientation et à l'accessibilité des peptides présentés. Ces travaux montrent d'autre part que des cellules MES indifférenciées adhèrent spécifiquement aux peptides IKVAV, offrant ainsi des possibilités pour la séparation cellulaire.

La stratégie proposée ouvre des perspectives intéressantes, en particulier pour trier des cellules à l'aide de billes de verre fonctionnalisées par une SLB et une matrice 2D d'Anx5-peptide. D'autres applications, comme le transfert de cellules entre supports ou le développement de puces à cellules constituées de cellules adhérant sur des bicouches lipidiques suspendues sur des trous [151] mériteraient d'être considérées.

II. Développement d'une plate-forme d'ancrage 2D pour l'immobilisation contrôlée d'anticorps et de protéines

A. Introduction

La détection, l'isolation et la quantification de biomolécules constituent des enjeux importants à la fois en recherche fondamentale et dans des domaines appliqués comme le diagnostic médical. Deux grandes approches sont possibles pour détecter et doser un composé dans un mélange comme un échantillon biologique. L'une d'elles concerne les composés dotés d'une propriété spécifique intrinsèque, capable de donner naissance à un signal mesurable, telle que la présence d'un chromophore, d'une activité enzymatique, ..., que ne présentent pas les autres composés de l'échantillon. Ces cas sont non seulement relativement rares mais, de plus, le signal endogène est fréquemment trop faible pour permettre la détection de faibles quantités de composé. La seconde approche, d'application générale, repose sur le marquage spécifique du composé par une sonde fournissant un signal mesurable, telle qu'une sonde fluorescente, enzymatique ou radioactive.

La mesure du signal émis par la sonde permet alors de remonter à la quantité du composé recherché. Le prototype d'une telle approche de détection et quantification de composés biologiques est la technique très répandue de l'ELISA (Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay) [152]. La version classique, « minimale », de l'ELISA est schématisée en Figure C2.1.A) : dans une première étape le composé est fixé à la surface d'un puits en plastique, de manière non spécifique, par adsorption physique ou physisorption (Figure C2.1.A.1) ; dans une deuxième étape les sites de fixation, encore présents à la surface, sont saturés au moyen d'un composé tel que l'albumine ; dans une troisième étape, une solution contenant un anticorps reconnaissant le composé d'intérêt est ajoutée (Fig. C2.1.A.2) ; finalement, après élimination de l'excès d'anticorps, appelé anticorps primaire, l'anticorps lié est dosé au moyen d'un anticorps, appelé anticorps secondaire, porteur d'une sonde enzymatique (d'où le nom ELISA), ou fluorescente (Figure C2.1.A.4). Une version plus élaborée, appelée technique ELISA « sandwich », diffère de la précédente par le fait que la fixation du composé d'intérêt met en jeu l'interaction spécifique entre le composé et un anticorps pré-adsorbé sur les parois du puits (Figure C2.1.B.1). L'approche « sandwich » permet de capturer et de

quantifier de très faibles quantités de composés au sein de mélanges complexes. Les tests ELISA sont utilisés en routine aussi bien en laboratoire de recherche qu'en laboratoire d'analyses cliniques, en raison de leur simplicité et de leur sensibilité.

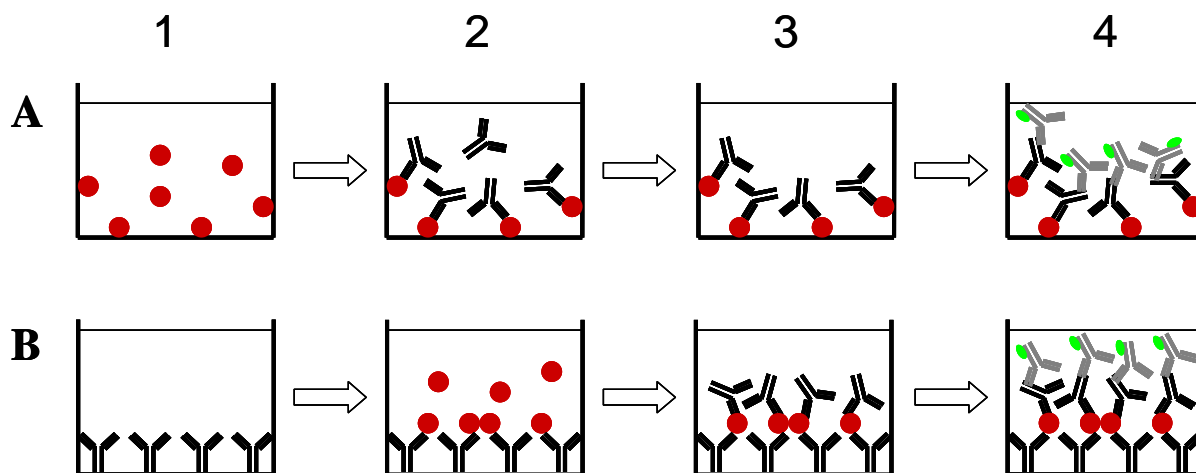


Figure C2.1 : A : Principe de la technique ELISA traditionnelle. Le composé à doser est adsorbé à la surface d'un puits (1). Après rinçage, des anticorps spécifiques du composé sont injectés dans le puits (2). Après rinçage, seuls restent les anticorps liés au composé que l'on peut doser grâce à l'addition d'un anticorps secondaire couplé à un marqueur (4). B : Principe de la technique ELISA sandwich. Le principe est quasiment le même que l'ELISA classique sauf que le composé est immobilisé à la surface des puits par des anticorps spécifiques (2). Ceci présente l'avantage d'augmenter le rendement de l'étape de couplage du composé à la surface des puits.

Les contraintes posées par la synthèse et l'utilisation de marqueurs pour la détection de molécules, conjuguées à l'émergence de techniques physico-chimiques de surface de plus en plus sensibles ont conduit au développement de méthodes de détection sans marqueurs. Les biocapteurs, constitués d'un élément de reconnaissance moléculaire, comme par exemple un anticorps adsorbé sur une surface, couplé à un transducteur constituent de tels systèmes de détection sans marqueurs. Plusieurs méthodes physico-chimiques, dites « de surface », permettent de transformer les perturbations associées à la liaison du composé d'intérêt au niveau d'un capteur en une mesure de la quantité de matériel adsorbé. Ces méthodes, dites « de surface », sont fréquemment basées sur les changements de l'indice de réfraction dans la zone proche de la surface, comme la RPS, l'ellipsométrie, ou les méthodes d'imagerie associées. D'autres méthodes, comme la microbalance à quartz (QCM) ou la microbalance à quartz avec mesure de dissipation (QCM-D) exploitent les modifications des propriétés mécaniques d'un oscillateur au niveau duquel se déroule l'adsorption pour extraire des informations quantitatives (masse, visco-élasticité) sur l'adsorbat, comme cela est décrit dans

l'Introduction. La méthode du BIAcore est la méthode la plus populaire actuellement dans le domaine des biocapteurs. Elle conjugue la résonance plasmonique de surface avec la microfluidique, permettant de mesurer des processus d'adsorption dans des faibles volumes, inférieurs à 10 μ l. Dans l'état actuel des développements, le BIAcore est capable de détecter de faibles quantités de biomolécules, de l'ordre de 0,1 à 1 ng/cm², à partir de faibles volumes (quelques μ l) de solutions contenant des concentrations de l'ordre de quelques centaines de ng/ml. Ces valeurs représentent un progrès considérable par rapport aux techniques biochimiques classiques. Toutefois, les enjeux importants en clinique concernent la détection de biomolécules à des concentrations de l'ordre de quelques ng/mL dans des mélanges complexes, très riches en autres produits. La limite de détection du QCM-D se situe plutôt dans la gamme de 1 à 10 ng/cm², en fonction de la nature des échantillons. Des méthodes mixtes, combinant l'approche biocapteur et l'approche marquage sont en train d'éclorre, comme la technique du RPS couplée à la spectroscopie de fluorescence excitée par plasmon de surface [153]. De telles approches permettront certainement d'améliorer les limites de détection, l'extrême étant bien entendu la détection de molécules uniques, pour autant que ceci ait une signification biologique. L'avènement des puces à ADN au début des années 90 constitua une révolution dans le domaine de la biochimie analytique [1]. Les biopuces sont des systèmes miniaturisés permettant une analyse multiparamétrique à haut débit d'un échantillon biologique tout en ne nécessitant qu'une petite quantité d'échantillon. Fodor et ses collègues d'Affymax eurent l'idée d'appliquer les technologies de photolithographie utilisées dans l'industrie de la microélectronique pour la nanostructuration des wafers de silicium pour générer de grandes quantités d'oligonucléotides ou de peptides [1]. Certaines des puces à ADN commercialisées par Affimetrix contiennent aujourd'hui plus de 1 million de sondes oligonucléotidiques différentes permettant d'analyser la séquence de nouveaux organismes, de caractériser le niveau d'expression des gènes dans un organisme entier ou un tissu, ou encore d'identifier les groupes de gènes caractéristiques de maladies. La conséquence directe est que les chercheurs peuvent réaliser sur un seul échantillon des milliers, voire des millions, d'expériences comparatives.

Le développement des puces à protéines [2] est en net retard par rapport à celui des puces à ADN. Ceci s'explique principalement par la différence de stabilité existant entre protéines et acides nucléiques et par la nature même de leur structure 3D. L'ADN est un polymère linéaire dont les propriétés de reconnaissance moléculaire sont contenues intégralement dans la séquence nucléotidique. Des traitements comme le chauffage ou le séchage n'altèrent pas les propriétés d'hybridation de l'ADN, qui sont à la base des puces à

ADN. Par contre, la structure 3D des protéines est éminemment plus complexe et plus diverse. L'intégrité de la structure 3D des protéines est nécessaire à l'établissement de leurs propriétés fonctionnelles et de leurs propriétés de reconnaissance moléculaire. Les protéines ne se manipulent pas comme l'ADN, elles ne résistent ni au chauffage ni au séchage. De plus, il n'existe pas de méthode analogue à la PCR pour produire en grande quantité les protéines. Les stratégies mises en œuvre pour créer des puces à protéines sont encore très classiques, consistant souvent en une simple miniaturisation de la technique ELISA. Plusieurs prototypes de puces à protéines ont été développés [154], ciblant deux applications principales : la protéomique [5,155] et le diagnostic médical [6,156]. Dans le premier cas, le but est de déterminer la fonction d'une protéine donnée en identifiant ses partenaires moléculaires. Dans le domaine du diagnostic médical, le but est de déterminer le plus finement possible la composition d'un échantillon biologique en utilisant des puces sur lesquelles un grand nombre d'anticorps a été préalablement immobilisé. Aujourd'hui, le nombre d'anticorps déposés sur une puce est encore limité, de l'ordre de la dizaine, rarement de la centaine.

La plupart des systèmes de puces à ADN ou à protéines utilise la fluorescence comme méthode de détection [2]. D'autres méthodes de détection, basées sur l'utilisation de marqueurs enzymatiques ou radioactifs, sont également employées.

Récemment, des méthodes sans marqueur dérivées des études de biocapteurs, comme l'imagerie par RPS, sont apparues dans le domaine des puces à anticorps et à protéines [157].

De manière générale, le développement de systèmes d'analyse de protéines impliquant leur immobilisation sur un support solide, des biocapteurs aux puces à protéines, rencontre plusieurs difficultés majeures. L'étape initiale d'immobilisation des protéines sur le support est en général peu ou mal maîtrisée. En conséquence, l'orientation et la densité des protéines ne sont ni contrôlées ni contrôlables. De plus, l'adsorption de protéines par physisorption sur un matériau inorganique ou polymère présente des risques importants de restructuration et de dénaturation, pouvant affecter la structure des éléments de reconnaissance moléculaire ou des sites actifs. Le couplage par liaison covalente de protéines sur un support comporte également de nombreux inconvénients potentiels. La liaison covalente de protéines est en général réalisée au moyen de marqueurs non spécifiques, comme par exemple le système EDC/NHS, qui peuvent affecter la structure native des protéines elles-mêmes. Les méthodes de couplage par affinité présentent l'avantage d'être plus douces et sont de plus en plus populaires. Ainsi les deux méthodes les plus utilisées actuellement pour greffer une protéine sur une surface

sont basées soit sur la formation de complexes « Surface-Streptavidine-Biotine-Protéine » en fonctionnalisant le support avec une couche de streptavidine avant d'y déposer la protéine biotillée [158], soit sur la formation de complexes « Surface-Nickel-(His)₆-Protéine » en fonctionnalisant la surface avec une couche de Nickel avant d'y déposer la protéine contenant un tag Histidine (His)₆ [5].

Finalement, il n'existe pas de méthode simple permettant d'inhiber, ou de limiter, la liaison non spécifique d'autres composés, ce qui constitue un enjeu extrêmement important pour tout projet de détection ou de ciblage. En conclusion, la nature des films de protéines à la surface d'un support est très mal connue, en terme de composition, de densité ou de structure. Il est évident que le développement futur des nanobiotechnologies dépend fortement des solutions qui seront trouvées à ces problèmes.

B. Présentation du projet

C'est dans ce contexte que s'inscrit le projet de développement d'une plate-forme d'ancrage 2D pour l'immobilisation contrôlée d'anticorps et de protéines, qui a constitué la partie principale de mon travail de thèse. Le concept fondamental de ce projet est de générer des protéines chimériques associant l'Anx5 à un domaine de liaison des anticorps, de manière à conférer à ces protéines chimériques les propriétés d'auto-assemblage 2D de l'Anx5 sur SLB permettant de créer une matrice 2D au niveau de laquelle les anticorps seront immobilisés (Fig. C2.2).

Les avantages attendus de cette stratégie sont les suivants, dans l'hypothèse où la protéine chimérique (appelée Anx5-ZZ par commodité pour l'instant, ZZ représentant le domaine de liaison des anticorps) conjugue les propriétés de ses deux parties, l'Anx5 et le domaine de liaison des anticorps ZZ :

- La formation de SLB sur support solide qui constitue une méthode de fonctionnalisation de surface est une méthode simple, rapide et reproductible. Le processus est bien contrôlé dans le cas de supports tels que le mica, la silice ou le verre. Les SLBs sont d'autre part des systèmes quasiment dépourvus de liaison non spécifique ;
- La liaison d'affinité de l'Anx5 à des SLBs constitue une méthode simple et efficace d'immobilisation des complexes Anx5-ZZ ;

- L'orientation de ZZ est fonction de la méthode de couplage utilisée et peut donc être optimisée pour que ZZ soit le plus accessible à la liaison des anticorps. La connaissance de la structure 3D de l'Anx5 sous ses formes solubles et liée à la membrane constitue un avantage essentiel pour prédire la structure du complexe Anx5-ZZ ;
- La formation de domaines 2D auto-assemblés d'Anx5-ZZ permet d'optimiser la densité de sites ZZ de liaison des anticorps ;
- L'ensemble des protéines : Anx5-ZZ, anticorps, ..., est séparé du support inorganique par la présence de la bicouche lipidique, minimisant les risques de dénaturation des protéines ;
- La réversibilité de liaison de l'assemblage par l'EGTA permet de vérifier les différentes étapes de construction de l'assemblage, et fournit une méthode simple de régénération des surfaces.

Pour ce projet, j'ai utilisé essentiellement deux méthodes de caractérisation, le QCM-D et l'AFM. Ces deux méthodes sont particulièrement bien adaptées à l'étude de la fabrication d'assemblages supra-moléculaires. Dans le contexte de la discussion précédente, le QCM-D, bien que moins sensible que la méthode RPS, est préférée à la RPS parce que les supports de silice utilisés en QCM-D permettent la formation de SLBs alors que les SLBs ne se forment pas sur les supports d'or qui sont requis pour la RPS.

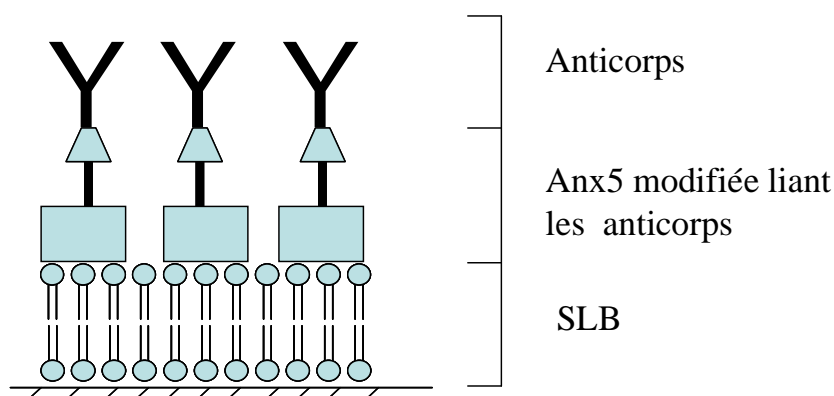


Figure C2.2 : Représentation schématique de la plate-forme d'ancrage 2D développée dans ce projet. Les anticorps sont immobilisés sur la bicouche par l'intermédiaire d'une protéine chimérique constituée de l'Anx5 couplée à un domaine liant les anticorps.

C. Présentation des partenaires moléculaires

C1. La protéine A

La paroi bactérienne de *Staphylococcus aureus* contient une protéine, appelée protéine A, capable de se lier au fragment Fc des immunoglobulines de nombreuses espèces mammifères [159]. La protéine A est constituée de deux parties structurellement et fonctionnellement différentes [160]. La partie N terminale est formée d'une répétition de 5 domaines homologues (A, B, C, D et E) de 58 acides-aminés chacun, capables de lier individuellement les immunoglobulines de type G (IgG) [161]. La partie C terminale est responsable de l'association à la paroi bactérienne par une région hydrophobe transmembranaire [162] (Figure C2.3 A). La structure cristalline du complexe entre le domaine B de la protéine A et le fragment Fc d'une IgG de souris a été résolue en 1981 par Deisenhofer [163]. L'interaction entre les deux molécules s'effectue entre deux hélices du domaine B et la région charnière située entre les domaines CH2 et CH3 de l'IgG (Fig. C2.4 B). Nilsson et ses collaborateurs ont comparé la séquence des 5 domaines homologues de la protéine A et en ont déduit une nouvelle séquence consensus de 58 acides-aminés, appelée fragment Z [164,165]. Les études d'affinité menées par la suite ont montré que la duplication de ce fragment (ZZ) liait de manière plus forte les IgG [166]. Un ensemble d'applications biotechnologiques basées sur l'utilisation du fragment ZZ ont déjà été développées [167].

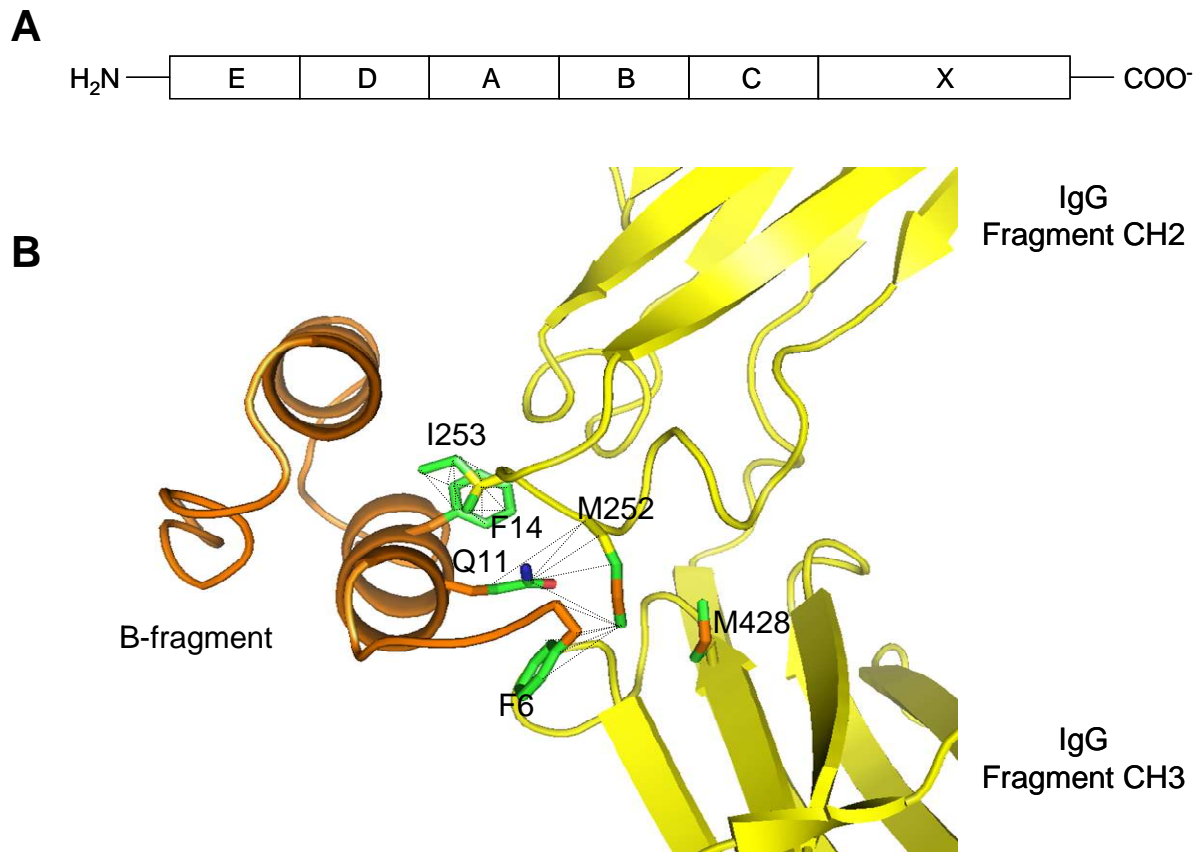


Figure C2.3 : **A :** La protéine A est constituée de 5 domaines homologues (A-E) de 58 acides-aminés liant les IgG et d'un domaine membranaire (X) pour l'association à la paroi bactérienne. **B :** Le fragment Fc des IgG et le fragment B de la protéine A interagissent via un grand nombre de liaisons hydrophobes. Les acides aminés M252, M428 et I253 situés au niveau de la région charnière entre les domaines CH2 et CH3 du Fc et les acides aminés F6, Q11 et F14 situés au niveau d'une boucle du domaine B sont les principaux résidus impliqués dans ces interactions.

C2. L'Anx5-ZZ : une protéine de fusion à double fonctionnalité

Une protéine de fusion entre l'Anx5 et le fragment ZZ a été synthétisée par génie génétique au laboratoire par C. Gounou. Cette protéine de fusion est composée de l'Anx5 en N terminal et de la répétition du fragment Z, dérivé de la protéine A, notée ZZ, en C terminal. Cette protéine de fusion est appelée Annexine A5-ZZ (Anx5-ZZ). La plupart des travaux reportés ci-dessous ont été réalisés avec Anx5-ZZ. Une seconde protéine de fusion, comprenant un seul domaine Z, appelée Anx5-Z, a été synthétisée récemment. Quelques résultats comparant les propriétés des protéines Anx5-ZZ et Anx5-Z sont également reportés ci-dessous. [159,165].

J'ai donc utilisé l'Anx5-ZZ comme base de la plate-forme 2D d'ancrage d'anticorps, présentée schématiquement en figure C2.4.

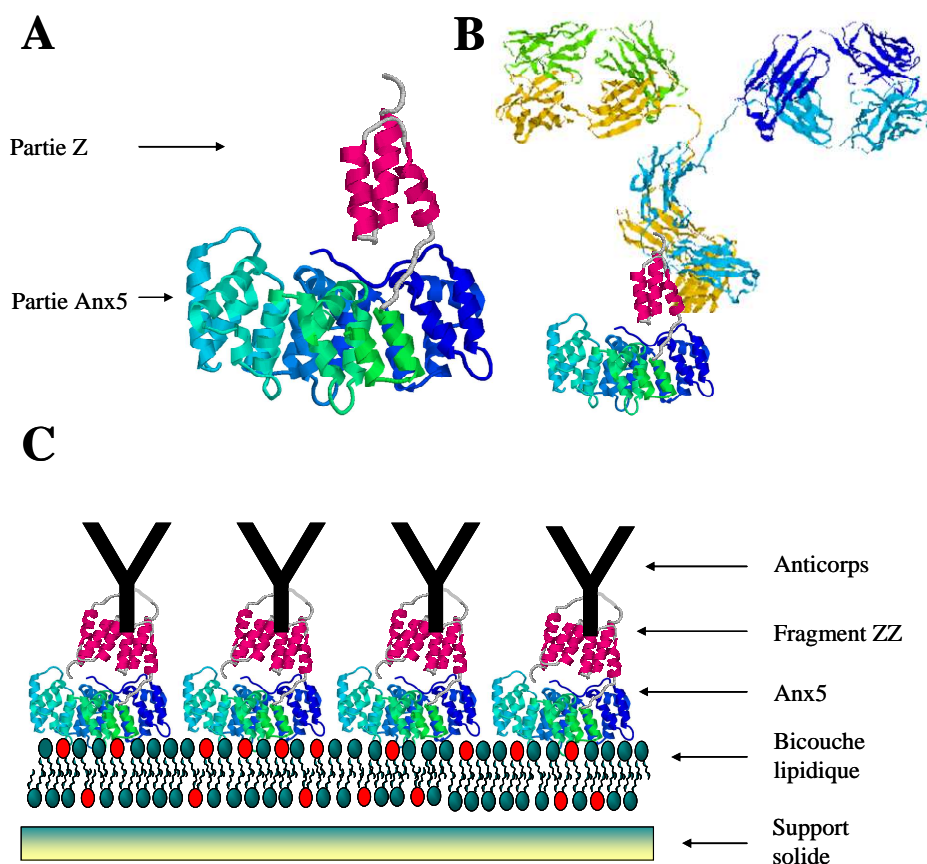


Figure C2.4 : A : Modèle de la protéine de fusion Anx5-Z. B : Anx5-Z liée à une IgG via le fragment Fc. C : Représentation schématique de la plate-forme d’ancrage et de présentation d’anticorps basée sur l’assemblage 2D de protéines Anx5-ZZ à la surface d’une bicouche lipidique.

C3. L’antigène spécifique de la prostate (PSA)

L’application de cette plate-forme 2D d’ancrage d’anticorps a été réalisée en utilisant le système PSA, qui est fréquemment utilisé pour le développement de biocapteurs [168].

Le PSA est une protéine de 32 kDa produite chez l’homme par la prostate. Le PSA sert à liquéfier le sperme afin de faciliter le déplacement des spermatozoïdes. Il est présent en faible quantité dans le sang et son dosage est utilisé pour la détection du cancer de la prostate et le suivi du traitement médical qui en découle. Un taux élevé de PSA suggère la présence d’un cancer de la prostate. Toutefois, le taux de PSA peut également être augmenté en cas d’infection de la prostate, d’irritation, d’hypertrophie bénigne de la prostate, d’éjaculation récente ou de toucher rectal. Le taux de PSA est considéré normal jusqu’à 4 ng/ml et suspect entre 4 et 10 ng/ml [169]. Le dosage du PSA ne permet pas d’affirmer la présence d’un cancer de la prostate, il donne une indication qui doit être confirmée par une biopsie. En effet le taux

de PSA peut être augmenté par les événements cités plus haut et il est fortement dépendant de l'âge. Les hommes âgés de plus de 70 ans peuvent présenter un taux physiologique de PSA atteignant 6,5 ng/ml.

Les troussees utilisées par les laboratoires d'analyse médicale pour doser le PSA sont basées sur le principe de l'ELISA sandwich (Figure C2.5A). Des billes de polystyrène fonctionnalisées par un anticorps spécifique du PSA jouent le rôle de support solide. L'échantillon sanguin mélangé à un deuxième anticorps anti-PSA marqué radioactivement est mis en contact avec la bille. Après incubation puis rinçage, la bille sur laquelle sont fixés le PSA et le deuxième anticorps radioactif est récupérée. La mesure de la radioactivité permet le dosage du PSA.

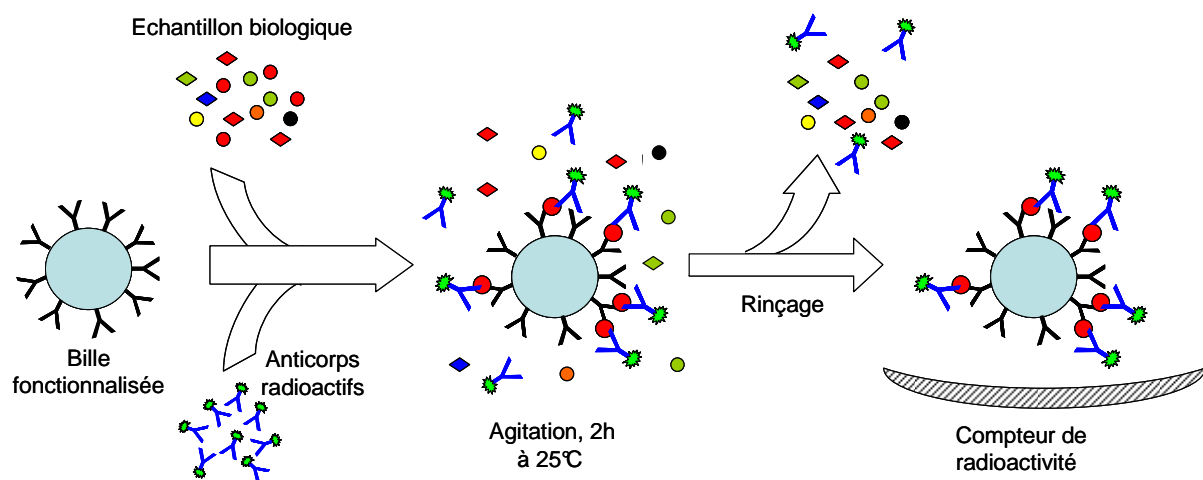


Figure C2.5 : A : Schéma du dosage du PSA. B : Schéma de la plate-forme 2D d'Anx5-ZZ pour l'ancrage du PSA.

D. Résultats

D1. Propriétés des protéines de fusion Anx5-ZZ

Nous avons étudié en premier si l'hypothèse à la base de la stratégie proposée était vérifiée, à savoir si les protéines chimériques Anx5-ZZ combinaient les propriétés de leurs molécules parentales, l'Anx5 et la protéine A.

D1.1. Propriétés de liaison de l'Anx5-ZZ à des SLBs

Les réponses QCM-D typiques obtenues pour l'adsorption d'Anx5-ZZ à un SLB composé de PC:PS 7/3 sont présentées en Figure C2.6. Cette expérience est un prototype de ce que l'on peut réaliser en QCM-D. Après formation d'une SLB (partie 1), une solution de concentration 2,5 µg/ml en Anx5-ZZ est injectée au-dessus de la bicouche. L'adsorption de l'Anx5-ZZ est suivie en temps réel, la saturation se produisant au bout d'environ 10 min. L'injection d'une solution tampon contenant 2 mM EGTA entraîne le déplacement total et immédiat de l'Anx5-ZZ. Suite à l'injection de solutions de concentrations croissantes en Anx5-ZZ, de 5 µg/ml à 40 µg/ml, on observe que la cinétique de liaison augmente, ainsi que la quantité maximale d'Anx5-ZZ liée. La saturation obtenue à partir d'environ 20 µg/ml d'Anx5-ZZ, correspond à environ 700 ng/cm² ; la valeur de ΔD est $1,5 \times 10^{-6}$ (données non présentées). La valeur de ΔD augmente également avec la masse d'Anx5-ZZ liée, pour atteindre environ 1×10^{-6} à saturation.

En comparaison, les valeurs obtenues pour une monocouche d'Anx5 à saturation, dans les mêmes conditions, sont 335 ng/cm² et 0×10^{-6} . Si on considère que la densité surfacique de l'Anx5-ZZ est la même que celle de l'Anx5, soit 33 000 molécules / µm², un simple calcul montre que la teneur en eau de la matrice 2D d'Anx5-ZZ est de l'ordre de 60% de la masse totale. Cette valeur est réaliste compte tenu du fait que le domaine ZZ est quasiment indépendant de la partie Anx5. Les molécules d'Anx5-ZZ sont liées de manière stable à la SLB, ainsi que l'absence de déplacement lors de l'addition d'un tampon contenant 2 mM Ca²⁺ mais dépourvu de protéines le démontre (triangles en Figure C2.6). Cette propriété est une caractéristique fondamentale de l'Anx5 et est essentielle pour l'application développée ici.

En conclusion, le comportement de liaison de l'Anx5-ZZ aux SLBs est entièrement similaire à celui de l'Anx5.

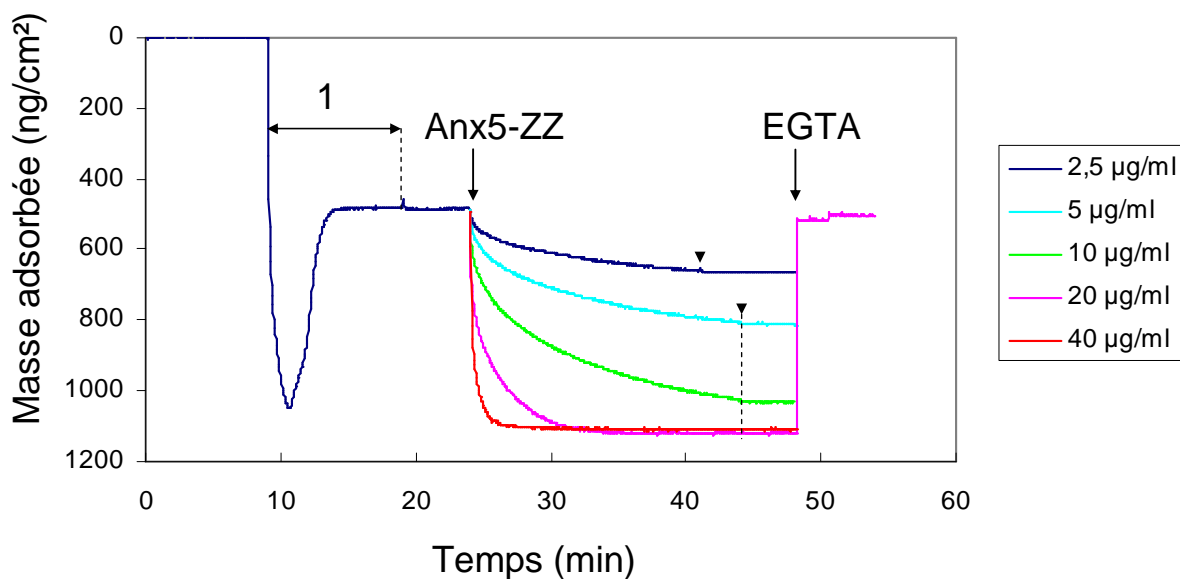


Figure C2.6 : Courbes d'adsorption de l'Anx5-ZZ sur une SLB PC:PS (7:3)

D1.2. Propriétés d'organisation 2D de l'Anx5-ZZ sur des SLBs

La structure des complexes formés par l'Anx5-ZZ sur les bicouches lipidiques fut ensuite étudiée par AFM. La Figure C2.7A montre que l'Anx5-ZZ forme des domaines 2D, dont la hauteur est d'environ 4 nm au-dessus de la surface des lipides. Ces domaines croissent radialement jusqu'à occuper toute la surface de la SLB. Ce comportement est strictement semblable à celui qui a déjà été observé auparavant avec l'Anx5 [54,59] et interprété comme représentant la croissance cristalline 2D de l'Anx5. A plus haute résolution, les images AFM ne permettent pas de résoudre cette structure cristalline, ce qui s'explique par la nature flexible des domaines ZZ et par leur interaction avec la pointe de l'AFM. Cependant, la présence de trous noirs caractéristiques des réseaux p6 d'Anx5 est très nettement visible dans les images AFM obtenues avec l'Anx5-Z (Fig. C2.7B). Ceci est suffisant pour conclure que l'Anx5-ZZ s'auto-assemble sous forme de cristaux 2D de symétrie p6, en tout point similaire à l'Anx5.

Des expériences ont été réalisées dans le but de savoir si les domaines d'Anx5 et d'Anx5-ZZ pouvaient coexister sur une même SLB. Dans un premier temps, la SLB est incubée en présence d'Anx5, jusqu'à ce que des domaines cristallins 2D d'Anx5 soient formés (Fig. C2.7B). L'excès d'Anx5 est alors éliminé et une solution de 20 µg/ml Anx5-ZZ est injectée dans la cellule AFM. Les domaines d'Anx5 sont alors entourés par une monocouche de protéines, de hauteur sensiblement supérieure d'environ 1 nm (Fig. C2.7C) qui doivent

correspondre à une monocouche d'Anx5-ZZ. Ces expériences démontrent que les propriétés d'auto-assemblage 2D de l'Anx5 ont été transmises à l'Anx5-ZZ.

Les résultats des expériences de QCM-D et d'AFM permettent de conclure que l'Anx5-ZZ interagit avec une surface lipidique contenant des PS de manière quasi-identique à l'Anx5. Les protéines de fusion Anx5-ZZ forment des trimères et s'auto-assemblent sous forme de matrices 2D stables à la surface des SLBs. Les molécules d'Anx5-ZZ sont donc orientées de manière à exposer la partie ZZ face à la solution aqueuse, selon l'objectif initial souhaité.

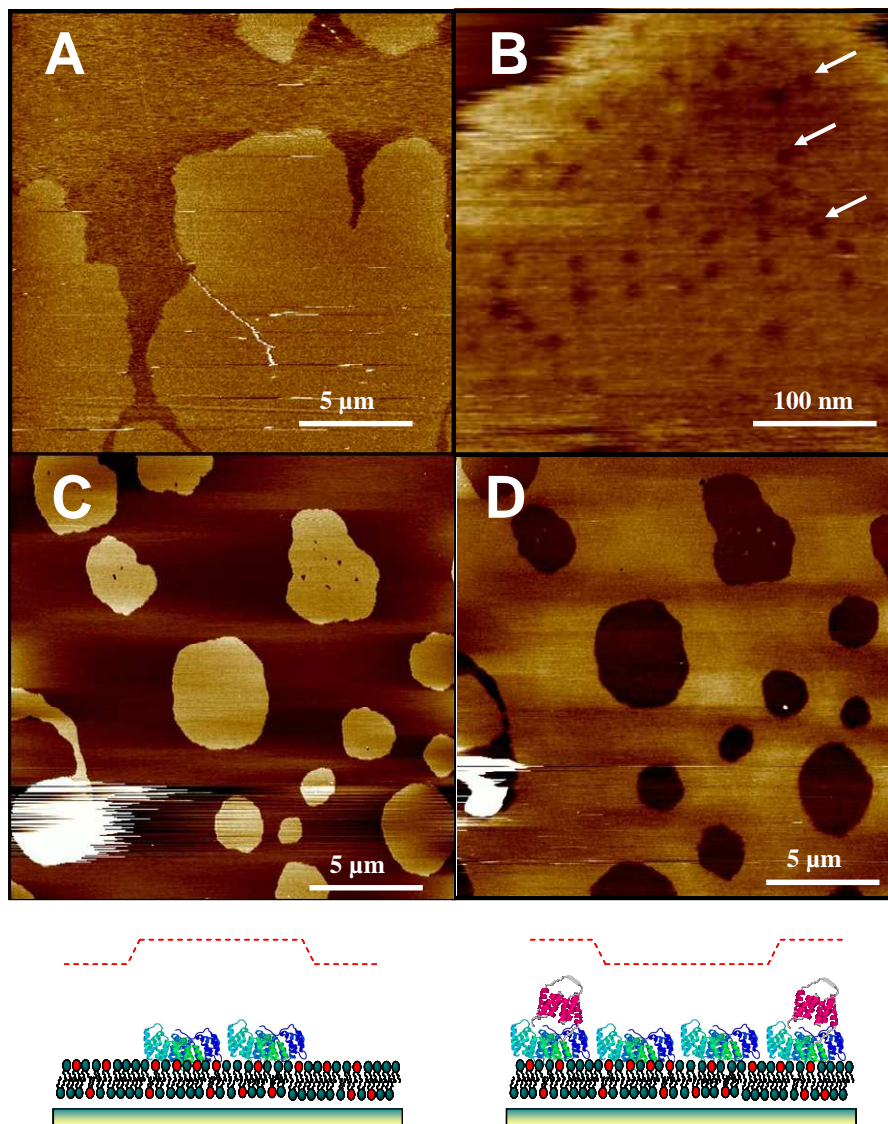


Figure C2.7 : A) Image AFM de domaines 2D d'Anx5-ZZ; B) Image AFM des domaines d'Anx5-Z. Les flèches indiquent des trous caractéristiques d'un réseau p6 d'Anx5; C) Domaines 2D d'Anx5 observés par AFM et représentés schématiquement; D) Après incubation de l'échantillon B) en présence d'Anx5-ZZ, les domaines d'Anx5 apparaissent entourés d'une couche dont la hauteur est supérieure de ~ 1 nm à celle des domaines d'Anx5.

D1.3. Liaison de l'Anx5-ZZ à des IgGs

La liaison d'IgGs au niveau des matrices 2D d'Anx5-ZZ sur SLBs a été étudiée en premier par QCM-D.

La figure C2.8 présente les courbes de liaison obtenues, à saturation, pour deux IgG, une IgG anti-BSA et une IgG anti-PSA. Le comportement de ces deux IgG est très similaire. De nombreuses IgGs ont été étudiées tout au long de cette étude ; la comparaison de leur comportement fait l'objet du paragraphe D5.

Pour les deux IgG présentées sur la figure C2.8, la saturation correspond à 54 Hz, (± 1 Hz) soit environ 950 ng/cm². La valeur de ΔD augmente également avec la masse d'Anx5-ZZ liée, pour atteindre environ 1×10^{-6} à saturation.

Un autre résultat essentiel pour cette application est que les IgG sont liées de manière stable à la plate-forme d'ancrage 2D d'Anx5-ZZ, comme le montre la quasi-absence de déplacement lorsque du tampon contenant 2mM Ca²⁺, mais dépourvu de protéines, est injecté dans la chambre.

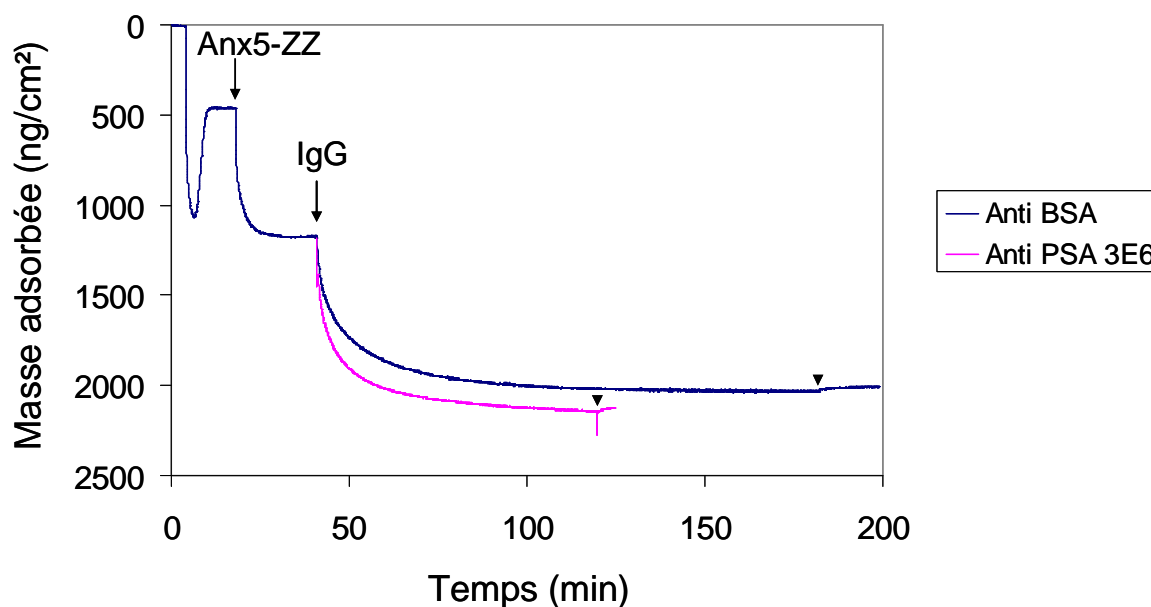


Figure C2.8 : Courbes d'adsorption de 2 IgGs, dirigées respectivement contre la BSA (bleu) et contre la PSA (rouge) à la plate-forme 2D d'Anx5-ZZ. Les courbes ont été obtenues avec 20 µg/ml d'IgG. Les triangles indiquent le rinçage avec une solution tampon sans protéine.

La masse maximale de 950 ng/cm^2 d'IgG liée à saturation mérite quelques commentaires. Si on prend uniquement en compte le fait que la densité maximale d'Anx5-ZZ (ou Anx5) est de $33\,000 \text{ molécules} / \mu\text{m}^2$, sans considérer de possibles effets d'encombrement stérique, la densité maximale d'IgG serait également de $33\,000 \text{ molécules} / \mu\text{m}^2$, ce qui correspondrait à une masse adsorbée de 825 ng/cm^2 . En fait, le signal de masse mesuré en QCM-D inclut la contribution de l'eau liée à l'échantillon. Cette contribution peut être extrêmement importante et même dominer le signal. Dans le cas de l'Anx5, la contribution de l'eau liée est connue et est d'environ 30%, ce qui est une des valeurs les plus basses reportées jusqu'à présent dans la littérature. Il est très probable que la contribution de l'eau sera plus importante dans le cas des IgG, en raison de leur structure étendue et flexible, sans que l'on puisse prédire cette valeur. Si on considère une contribution d'eau de 50%, valeur reportée pour plusieurs protéines, la densité des molécules d'IgG correspondant à 950 ng/cm^2 serait de $17\,000 / \mu\text{m}^2$. Ce calcul, quoique approximatif, fournit une indication sur la haute densité des IgGs liées à la matrice 2D d'Anx5-ZZ.

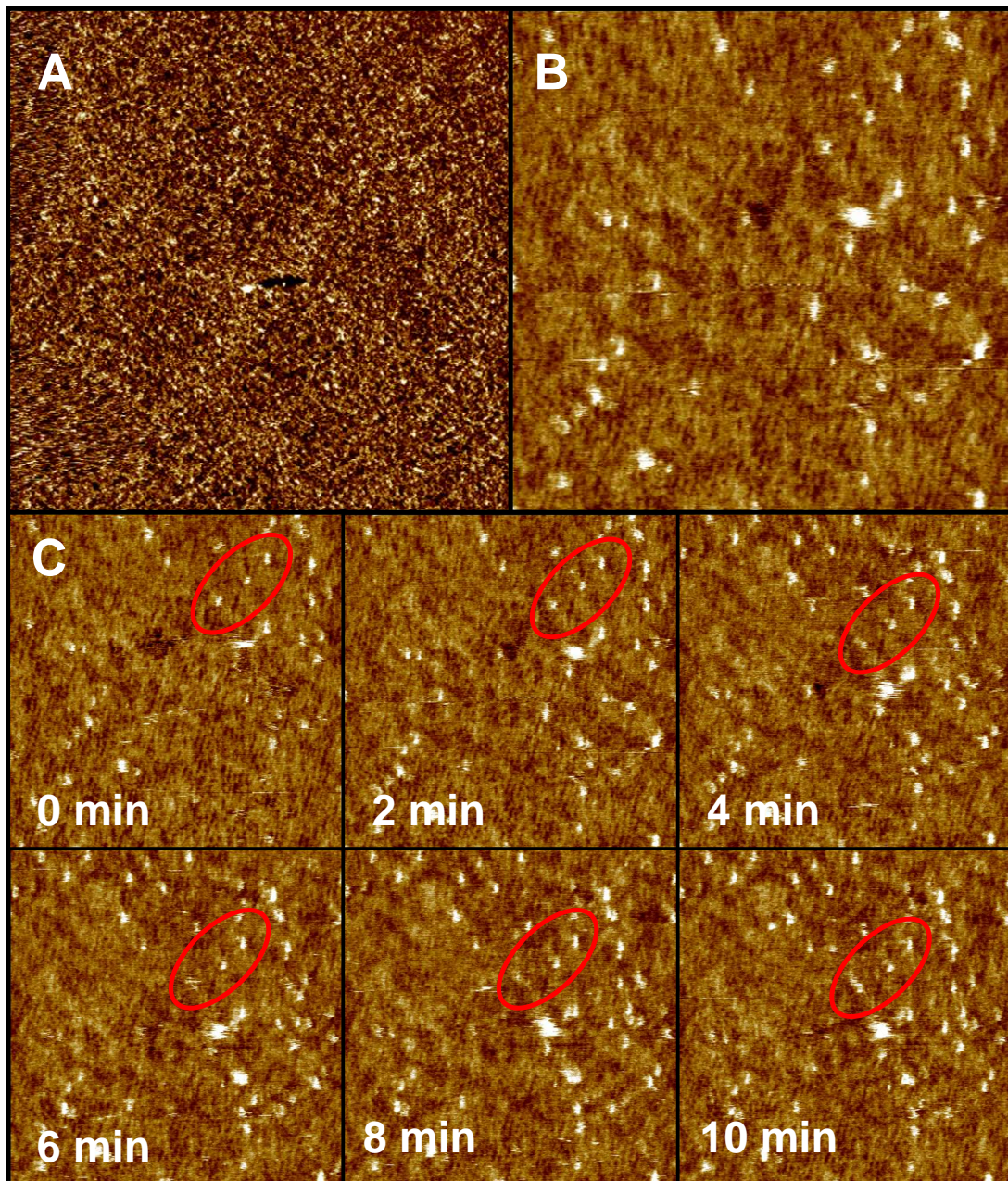


Figure C2.9 : Images AFM de plates-forme d'Anx5-ZZ après incubation en présence de solutions d'IgG. **A)** A forte concentration d'IgG, la surface paraît entièrement couverte d'un matériel homogène ayant l'aspect de points blancs. Aucun détail n'est résolu par la pointe de l'AFM; taille de l'image = 5 μm ; **B)** A faible concentration d'IgG, des points blancs individuels sont résolus. Ces points correspondent à des molécules individuelles d'IgG liées à la plate-forme; le réseau 2D des molécules d'Anx5-ZZ est (légèrement) visible sur cette image; taille de l'image = 1 μm ; **C)** Séquence d'images enregistrées sur la même zone. Les anticorps sont fermement immobilisés, par liaison d'affinité, aux molécules d'ANx5-ZZ; un groupe de 4 molécules d'IgG est entouré pour aider le lecteur; taille des images = 1 μm .

La liaison des IgGs au niveau des matrices 2D d'Anx5-ZZ a été ensuite étudiée par AFM. Dans les conditions de saturation définies en QCM-D, c'est-à-dire à 20 $\mu\text{g/mL}$ d'IgG, la

surface est entièrement couverte d'un matériel dépourvu de détails pouvant être interprétés comme une structure moléculaire (Fig. C2.9A). Lorsque la concentration d'IgG est diminuée, la couche sous-jacente d'Anx5-ZZ apparait parsemée de points blancs. Ces points blancs, d'une taille d'environ 10-30 nm, correspondent à des anticorps liés à la matrice d'Anx5-ZZ. Les anticorps sont fermement liés à la plate-forme d'ancrage, comme le montre la Figure C2.9B,C présentant des images AFM prises toutes les 2 minutes après immobilisation des anticorps sur la matrice 2D d'Anx5-ZZ.

La conclusion de cette première partie est que les protéines de fusion Anx5-ZZ se comportent quasi-idéalement, à savoir qu'elles possèdent les propriétés de chacun de leurs deux parents moléculaires, l'Anx5 et la protéine A. Par conséquent, Anx5-ZZ forme une plate-forme d'ancrage 2D permettant d'immobiliser des IgG.

D2. Etude de la densité d'IgG immobilisées

Un des avantages potentiels de notre plate-forme d'ancrage d'IgG concerne la densité des IgGs qu'il est possible d'immobiliser. En effet, en raison du mode de construction qui repose sur la reconnaissance moléculaire entre le fragment ZZ de la protéine A et le fragment Fc des IgG, la densité des IgG devrait être uniquement limitée par des problèmes d'accessibilité.

Pour répondre à cette question, j'ai fait varier la densité de surface des Anx5-ZZ et étudié l'influence de la densité de surface en AnX5-ZZ sur la quantité d'IgG liées à saturation. La densité de surface des Anx5-ZZ a été ajustée en mélangeant des solutions d'Anx5 et Anx5-ZZ pour donner des mélanges de rapport connu en Anx5/Anx5-ZZ, d'une manière identique à ce qui est présenté précédemment dans le cas des mélanges Anx5/Anx5-peptides (cf I.D).

La Figure C2.10 présente les masses adsorbées d'IgG, mesurées à saturation, en fonction de la densité de surface d'Anx5-ZZ. On observe que la masse d'IgG atteint une valeur maximale pour une densité de surface d'environ de 16 500 molécules / μm^2 , ce qui correspond en fait à 50% de la densité maximale d'Anx5-ZZ et est obtenu avec un mélange 1/1 en Anx5/Anx5-ZZ. Aux plus faibles densités en Anx5-ZZ, la masse d'IgG liées varie linéairement avec la densité de site de fixation.

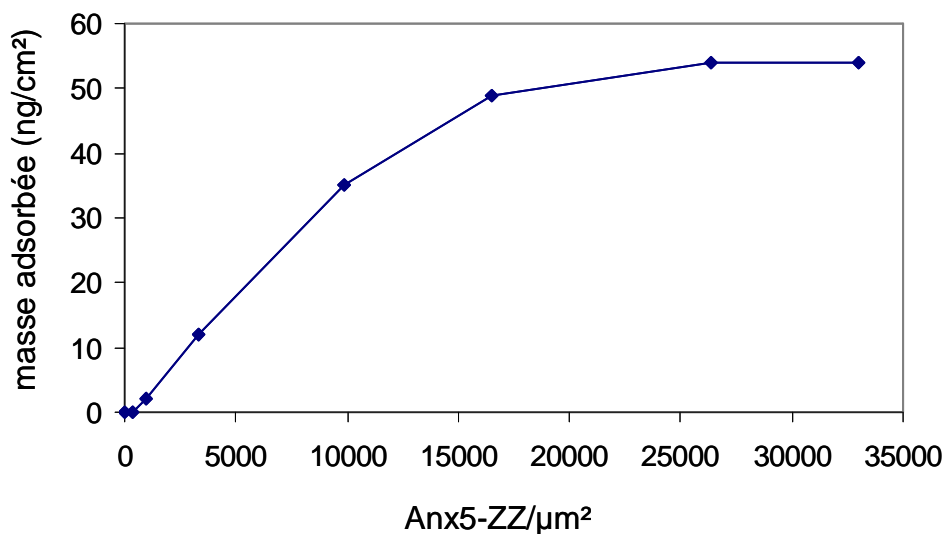


Figure C2.10 : Courbe représentant la variation de la masse d'IgG adsorbées à saturation en fonction de la densité de surface d'Anx5-ZZ.

Le fait que la saturation en IgG soit obtenue avec une densité d'Anx5-ZZ égale à 50% de la densité maximale met en évidence un effet d'encombrement stérique. Ceci s'interprète aisément étant donné que la surface projetée des IgG est supérieure à la surface projetée de l'Anx5. Si on considère, approximativement, que l'Anx5 occupe une aire moléculaire de 30 nm² (connue précisément d'après les données cristallographiques du réseau p6), et qu'une molécule d'IgG couvre une surface moléculaire d'environ 65 nm² ($\phi \sim 9$ nm), la saturation serait attendue pour une densité de 46%. Les résultats sont donc en parfait accord avec l'hypothèse d'une liaison uniquement limitée par l'encombrement stérique. En conséquence, la densité des IgG est maximale, ce qui signifie aussi que toutes les molécules de ZZ sont actives et qu'aucun effet de dénaturation n'est détectable.

La connaissance absolue de la densité maximale d'IgG liées permet a posteriori de déterminer le contenu en eau de la couche d'IgG. En effet, l'incrément de masse associé à la liaison des IgG est 54 Hz soit 956 ng/cm² et sur cette masse, la masse d'IgG sèche est d'environ 410 ng/cm² (en considérant une densité maximale de 16 500 molécules / μm^2), ce qui signifie que le contenu en eau de la couche d'IgG serait environ 550 ng/cm², soit environ 57% de la masse totale. Cette valeur est tout à fait raisonnable, et constitue une information d'intérêt dans le contexte des études d'adsorption de protéines par QCM-D.

D3. Construction d'un système sandwich IgG-I / PSA / IgG-II

Nous avons ensuite entrepris la construction, couche par couche, d'un système complet comprenant 5 étages : une SLB ; une matrice 2D d'Anx5-ZZ ; une première couche d'IgG anti-PSA, appelées IgG-I ; une couche d'antigène et une seconde couche d'IgG anti-PSA, appelées IgG-II. Six anticorps monoclonaux commerciaux ont été acquis pour ce projet ; leur choix a été basé sur plusieurs études précédentes.

Dans un premier temps, nous avons étudié la liaison des 6 IgGs à la matrice d'Anx5-ZZ, Nous avons ensuite étudié la liaison du PSA à l'IgG sélectionnée comme l'IgG-I. Nous avons ensuite étudié puis comparé le comportement des différentes IgG anti-PSA dans leur capacité à former un système sandwich IgG-I / PSA / IgG-II.

D3.1. Comparaison de la liaison d'IgG anti-PSA à la plate-forme d'ancrage d'Anx5-ZZ

La Figure C2.11A présente les courbes de liaison obtenues pour les 6 IgG. L'anticorps 3E6, présenté en figure C2.8, se distingue nettement des autres. Les autres anticorps présentent un signal de liaison plus faible pour 2 d'entre eux, et nettement plus faible pour les 3 autres. De plus, la liaison de ces 3 derniers IgG n'est pas stable, ce qui signifie ici qu'ils sont déplacés par rinçage en présence d'un tampon sans protéine. La question de l'origine de ces différences entre IgG sera développée en partie D5.

L'IgG 3E6 a donc été sélectionnée comme IgG-I pour la suite de ce projet.

D3.2. Liaison de l'antigène spécifique de la prostate à une matrice 2D d'Anx5-ZZ/IgG anti-PSA

L'injection d'une solution contenant 10 µg/ml de PSA en tampon A contenant 2 mM Ca est accompagnée d'un signal caractéristique d'adsorption, saturant à environ 350 ng/cm² (20 Hz) et montrant un léger incrément du signal de dissipation (Figure C2.11B). Le signal de variation de masse présente de manière systématique une variation biphasique, avec une rapide augmentation de masse (diminution de ΔF sur la Figure C2.11B), suivie d'une lente et légère décroissance se stabilisant à une valeur plateau. L'origine exacte de ce phénomène est encore peu claire ; cependant, il doit mettre en évidence une restructuration d'une partie de l'édifice lié au support, qui s'accompagne d'un changement du contenu en eau. Il est probable que ce changement de conformation concerne les IgG, dont la flexibilité des Fabs autour de la

région charnière centrale est connue. De même que pour les couches précédentes, les PSA sont liés de manière stable à l'édifice Anx5-ZZ/IgG-I, comme le montre l'absence de déplacement lorsque du tampon contenant 2mM Ca²⁺, mais dépourvu de protéines, est injecté dans la chambre.

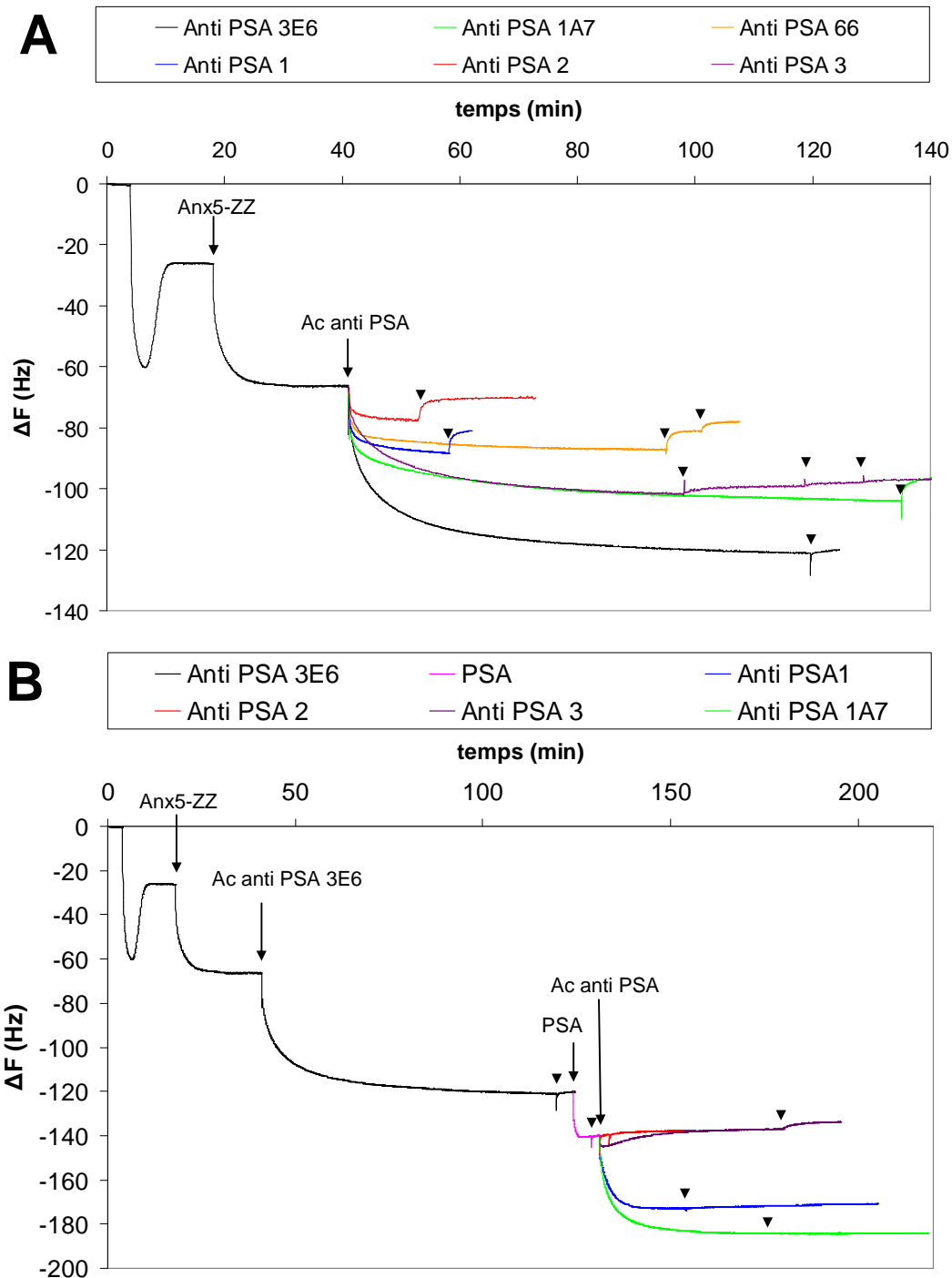


Figure C2.11 : **A** : Mesures par QCM-D de la liaison des 6 anticorps anti-PSA sur la plate-forme Anx5-ZZ. **B** : Liaison de PSA (injecté à 10 µg/ml) à une matrice 2D d'IgG-1 (IgG 3E6), suivie de la liaison des 5 IgG anti-PSA (injectés à 20 µg/ml). Les courbes obtenues avec les 5 IgG sont représentées superposées pour pouvoir comparer ces réponses. Les triangles indiquent les rinçages.

D3.3. Construction d'un système sandwich

La liaison de 4 IgG anti-PSA à un édifice Anx5-ZZ / IgG-I / PSA est présentée en Figure C2.11B. Deux IgG, appelées 1A7 et PSA-01 se lient rapidement et en grandes quantités - 700 ng/cm² (40 Hz) pour le 1A7 et 530 ng/cm² (30 Hz) pour le PSA-01. De plus, la liaison de ces anticorps est stable. Par contre, la liaison des 2 autres anticorps est faible ou quasi-nulle. Ce comportement variable des anticorps dans le contexte d'un système sandwich n'est en fait pas inattendu car nous ne connaissons pas la localisation des épitopes contre lesquels sont dirigés les anticorps et il est évident que l'accessibilité des épitopes est fonction de l'orientation dans laquelle l'antigène est fixé à l'IgG-I.

Le couple d'anticorps monoclonaux 3E6 et 1A7 a donc été sélectionné pour les études suivantes.

D4. Etude de la densité d'antigènes PSA et d'IgG-II immobilisés

Nous avons montré précédemment que la plate-forme d'ancrage 2D d'Anx5-ZZ permettait d'immobiliser une densité maximale d'IgG-I. Nous avons abordé cette question également pour l'antigène, ici le PSA et pour le second anticorps IgG-II. Plusieurs approches ont été mises en œuvre pour répondre à cette question, qui est capitale si on veut évaluer la validité de notre stratégie.

Une des approches a simplement consisté à poursuivre l'expérience présentée en Figure C2.10. La figure C2.12A montre que les courbes de liaison de l'IgG-I, de la PSA et de l'IgG-II présentent la même évolution, indiquant que les quantités de PSA et d'IgG-II liées à saturation sont proportionnelles à la quantité d'IgG-I. Le fait que la masse d'IgG-II liée corresponde à environ 75% de celle de l'IgG-I, pour l'ensemble des densités d'IgG-I, permet de proposer que la densité de l'IgG-II est quasiment maximale. Il est très probable que la légère différence soit due à un effet d'encombrement stérique entre les IgG-II, du fait de l'orientation des molécules de PSA. Quel est le nombre de molécules de PSA liées par IgG-I ? Il est difficile de répondre à cette question de manière claire. Etant donné que l'on a 1 IgG-I pour 2 Anx5-ZZ, s'il y avait 1 PSA par IgG-I, cela ferait 1 PSA pour 2 Anx5-ZZ. Prenons comme protéine de référence l'Anx5, de masse moléculaire ~ 35 kD, et pour laquelle la saturation correspond à 270 ng/cm² (15 Hz). S'il y avait 1 PSA pour 2 Anx5, et si la teneur en eau de la PSA était la même que pour l'Anx5, comme la masse moléculaire du PSA est ~ 32

kD, on attendrait une valeur de 123 ng/cm², ce qui est très différent de 350 ng/cm². Par contre, s'il y a 2 PSA par IgG-I, cela revient à 1 PSA par Anx5-ZZ, et alors le même raisonnement numérique indique que à même teneur en eau, on aurait 247 ng/cm² et que 350 ng/cm² correspondrait à une contribution du signal de l'eau de 50%. Ce résultat semble beaucoup plus réaliste et nous proposons donc qu'il y a 2 molécules de PSA par IgG-I.

Une autre approche a consisté à varier la quantité d'IgG-I liées à la matrice d'Anx5-ZZ simplement en variant les concentrations des solutions d'IgG-I. La figure C2.12B confirme le résultat précédent et montre que la densité de PSA est proportionnelle à la densité d'IgG-I.

Une troisième approche, similaire à la précédente, a consisté à varier la quantité de PSA lié à la matrice d'IgG-I simplement en variant les concentrations des solutions de PSA. La figure C2.12C confirme le résultat précédent et montre que la densité d'IgG-II est proportionnelle à la densité de PSA.

L'ensemble de ces résultats permet de conclure que la plate-forme d'ancrage d'Anx5-ZZ permet d'immobiliser des anticorps à densité maximale, ou contrôlable, et de construire des édifices supra-moléculaires pour lesquels chacune des espèces moléculaires est à densité maximale. Ceci signifie également que la structure native est préservée pour l'ensemble de la construction.

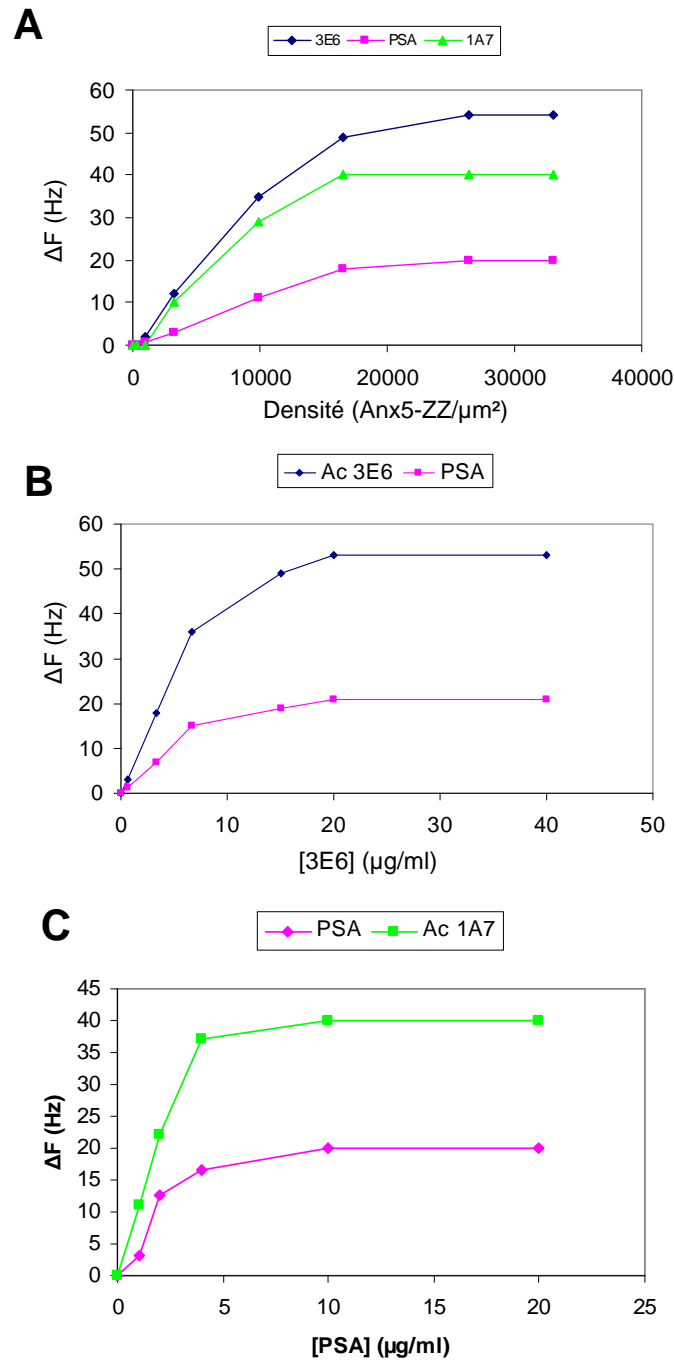


Figure C2.12 : **A :** Masses adsorbées à saturation pour l'IgG-I, le PSA et l'IgG-II, en fonction de la densité d'Anx5-ZZ liée à la SLB. Ces données correspondent à l'expérience reportée en Figure 2.10 pour la liaison de l'IgG-I. Les concentrations des solutions d'IgG-I, de PSA et d'IgG-II injectées dans la chambre sont respectivement 20, 10 et 20 $\mu\text{g/ml}$; **B)** Masses adsorbées de PSA et d'IgG-II en fonction de la concentration des solutions d'IgG-I injectées sur une plate-forme 2D à concentration maximale d'Anx5-ZZ ; **C)** Masses adsorbées de PSA et d'IgG-II en fonction de la concentration des solutions de PSA injectées sur une plate-forme d'Anx5-ZZ / IgG-I à densité de surface maximale.

D5. Spécificité de l'Anx5-ZZ pour les différentes sous-classes d'IgG

Les différences de comportement observées pour les différents IgG anti-PSA (Figure C2.13) ainsi que pour d'autres IgG étudiées (données non présentées) nous ont incités à considérer cette question avec attention. L'origine de ces différences est en fait simple et résulte de la spécificité de la protéine A pour les différentes sous-classes d'IgG. La Figure C2.13 présente les courbes de liaison enregistrées avec des anticorps monoclonaux de souris de sous-classe 2, de sous-classe 1 ainsi qu'avec des anticorps monoclonaux de rat. Les résultats sont en parfait accord avec le fait que la protéine A a une forte affinité pour les IgG₂ de souris alors qu'elle a une faible affinité pour les IgG₁ de souris et ne se lie pas à des IgG de rat. L'anticorps anti-BSA utilisé comme référence ainsi que l'anticorps 3E6 sélectionné comme IgG-I dans le système PSA sont tous deux des IgG de souris de sous-classe 2.

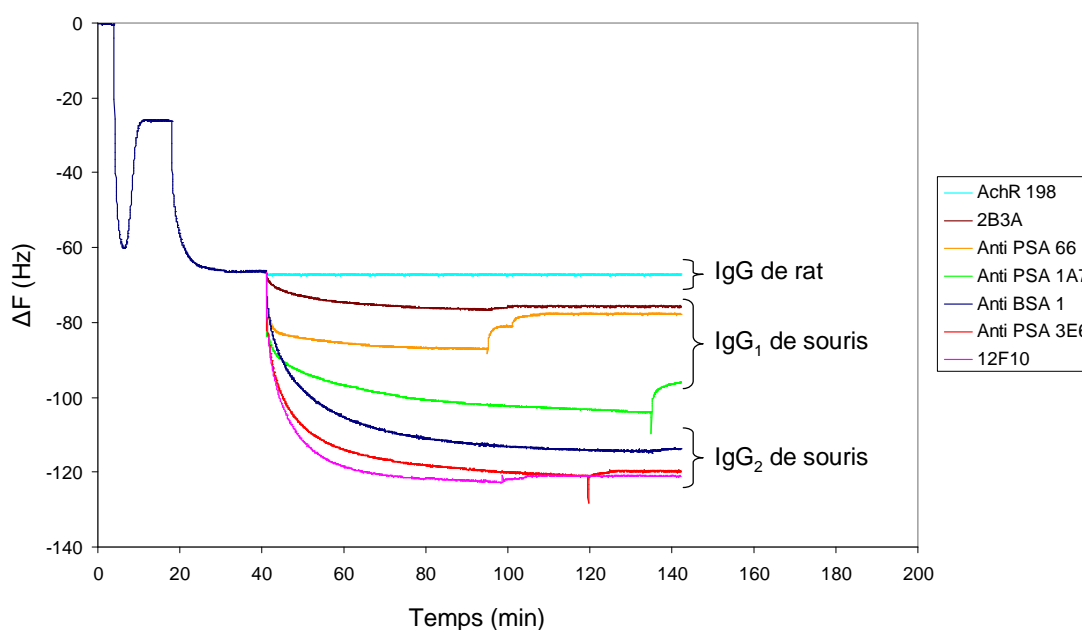


Figure C2.13 : Spécificité de l'Anx5-ZZ pour différents types d'IgG. Courbes de liaison obtenues après injection de solutions contenant 20 µg/ml pour chacun des IgGs, au-dessus d'une plate-forme d'Anx5-ZZ à saturation. La nature des différents IgGs est indiquée en encadré sur la Figure.

D6. Construction de l'édifice Anx5-ZZ / IgG / Antigène en solution

La stabilité de l'assemblage supra-moléculaire formé entre la bicouche lipidique, la plate-forme d'Anx5-ZZ, et les couches successives d'IgG-I, d'antigène et d'IgG-II reflète les

fortes affinités d'une part entre l'Anx5 et les surfaces lipidiques, d'autre part entre la protéine A et le fragment Fc des IgG, et finalement entre un antigène et des anticorps spécifiques. Le fait que les interactions soient suffisamment fortes pour résister à l'exposition à des concentrations nulles d'un des ligands nous a incité à étudier la construction de ces édifices en solution avant de les exposer au niveau d'une SLB. L'avantage potentiel d'une telle stratégie concerne l'étape de capture des anticorps ou antigènes présents en faibles concentrations.

Cette étude a été réalisée avec des IgG anti-BSA et la BSA comme antigène. La Figure C2.14 compare les masses de BSA adsorbées sur deux types d'assemblage : 1) la plateforme d'Anx5-ZZ et la couche d'IgG-I sont formées séquentiellement (courbe bleue) ; 2) les complexes entre Anx5-ZZ et IgG-I sont mélangés en solution en rapport équimolaire, incubés pendant 30 min puis le mélange est déposé sur une SLB. Les quantités de BSA adsorbées aux différentes concentrations de BSA en solution sont identiques. Ceci indique que la réaction de complexation entre Anx5-ZZ et IgG-I est quantitative, sinon la couche formée avec le mélange contiendrait des molécules d'Anx5-ZZ libres, ce qui diminuerait la quantité de BSA liée.

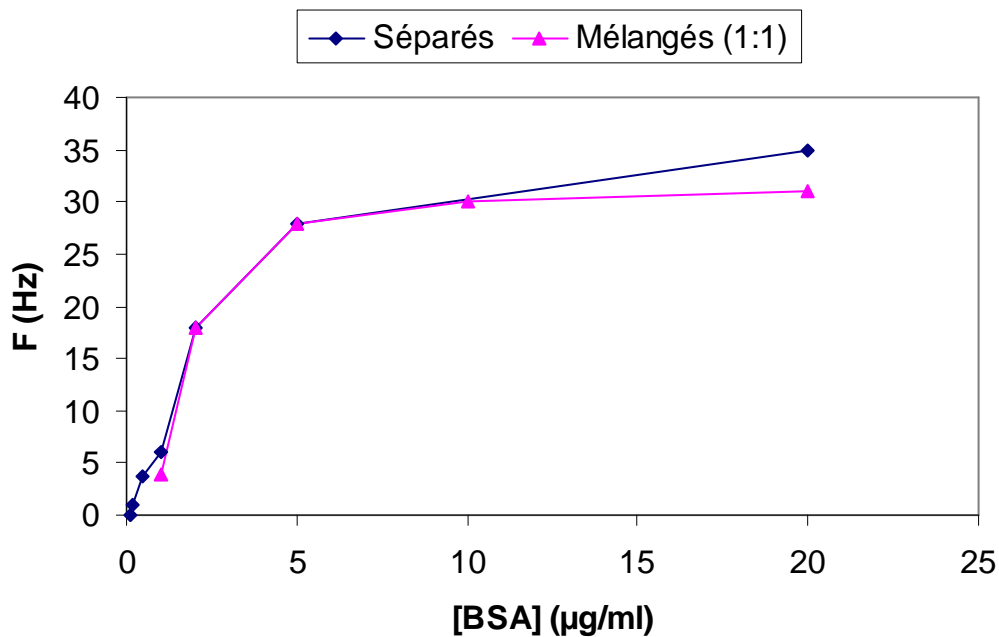


Figure C2.14 : Comparaison de la formation d'un édifice Anx5-ZZ / IgG-I en solution et en 2D. Les courbes représentent les masses adsorbées de BSA, mesurées à saturation pour différentes concentrations de BSA, soit sur un édifice Anx5-ZZ / Ig-I construit couche par couche (bleu), soit sur un édifice formé par injection d'un mélange équimolaire d'Anx5-ZZ et d'IgG-1.

D7. Considérations sur la méthode de détection

Les résultats précédents valident la stratégie d'immobilisation contrôlée d'anticorps et de protéines basée sur une plate-forme 2D auto-assemblée. Le projet entre maintenant dans une seconde phase avec pour objectif d'appliquer cette stratégie à la détection d'anticorps ou d'antigènes d'intérêt bio-médical. Le choix de la méthode de détection est par conséquent une question critique d'actualité, c'est pourquoi cette question est discutée brièvement ici. La méthode du QCM-D utilisée dans la première phase de validation de la stratégie d'immobilisation moléculaire ne constitue pas une méthode de détection adaptée, en raison de sa faible sensibilité. La sensibilité des appareils commerciaux est de l'ordre de 1 Hz, soit 17 ng/cm². Dans le cas de molécules de taille moyenne ~35 kD- se liant de manière quantitative, cette limite est atteinte pour des concentrations d'environ 1 µg/ml. Une telle concentration -1 µg/ml- est très élevée par rapport aux gammes d'intérêt pour les échantillons biologiques, de l'ordre de 1 à 10 ng/ml, voir moins. Ainsi, la gamme de concentration sanguine du PSA considérée « de légèrement à modérément élevée » est de 2,6 à 10 ng/ml.

La technique de dosage du PSA pratiquée en laboratoire d'analyse médicale a été présentée en partie 3.3. Des billes de polymère portant des IgG-I anti-PSA sont mises en contact avec l'échantillon sanguin à analyser, préincubé avec une gamme de concentration d'IgG-II marquées radioactivement à l'iode 125 (¹²⁵I). Après formation du système sandwich, la radioactivité liée à la bille est mesurée. Avec l'aide du Dr. Georges et de H. Dartiguelongue, au service de médecine nucléaire de l'Hôpital Haut-Lévêque, nous avons effectué une série de tests ayant pour objectif de réaliser le système sandwich à l'aide de notre plate-forme d'ancrage et de doser la quantité de PSA liée à l'aide de l'IgG-II* utilisée dans les trousse d'analyse médicale. Il est évident que cette approche est très grossière car nous n'avons aucune information sur les anticorps IgG-I et IgG-II* utilisés dans la trousse commerciale. En conséquence, nous ne savons pas si le couple d'IgG constitué de l'IgG-I 3E6 et de l'IgG-II* est capables de former un sandwich avec le PSA, selon les critères présentés auparavant pour le couple 3E6 / 1A7.

Malgré cela, il a été possible de détecter des concentrations de PSA aussi faibles que 10 ng/ml (Fig. C2.15A). Pour des concentrations comprises entre 10 et 500 ng/ml, la liaison du second anticorps est proportionnelle à la concentration en PSA (figure C2.15B), ce qui atteste de la spécificité du signal. La limite de détection vers 10 ng/ml est due au bruit de fond élevé, associé à la liaison non spécifique de l'anticorps radioactif sur le support de verre utilisé pour cette étude. En effet, pour des raisons pratiques, la bicouche lipidique avait été

réalisée sur une pastille de verre et lors du rinçage des échantillons, la SLB se rétracte, laissant accessible une partie du support en verre, sur lequel l'IgG-II* peut se lier non spécifiquement. Un tel problème ne se produit pas sur les supports utilisés en QCM-D qui restent totalement immergés tout au long de l'expérience.

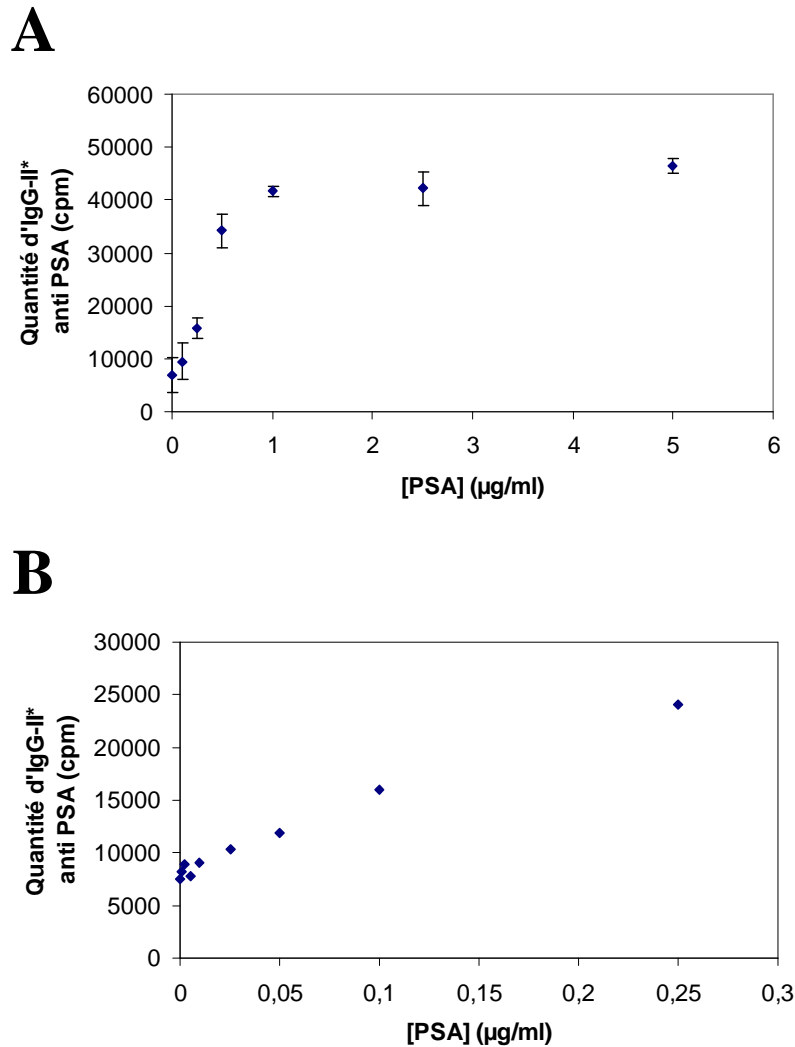


Figure C2.15 : Quantité d'IgG-II anti-PSA liée à un édifice Anx5-ZZ / IgG-I 3E6 / PSA en fonction de la concentration des solutions de PSA utilisées. La quantité d'IgG-II est déterminée par mesure de la radioactivité associée à l'édifice **A**) Courbe de dosage complète ; **B**) Vue agrandie des données correspondant aux faibles concentrations de PSA.

Ces résultats sont à considérer uniquement qualitativement. Ils suggèrent simplement que la plate-forme d'ancrage a le potentiel d'être utilisée pour la détection de faibles quantités de composé d'intérêt.

Notre équipe évalue actuellement des méthodes de détection basées sur la fluorescence, la luminescence ou l'activité enzymatique.

D8. Conclusions

La figure C2.16 ainsi que le tableau C2.1 illustrent le résultat principal de ce projet, à savoir la construction séquentielle, couche par couche, d'un édifice supra-moléculaire comprenant une SLB, une plate-forme 2D d'Anx5-ZZ, une couche d'IgG-I, une couche d'antigène et une couche d'IgG-II. Chacune des étapes de la construction a été caractérisée en détails, par QCM-D et AFM. Les résultats présentés dans ce chapitre démontrent la validité de la stratégie proposée. Les protéines de fusion Anx5-ZZ conjuguent les propriétés d'auto-assemblage 2D, de stabilité de liaison de l'Anx5 et les propriétés de liaison d'anticorps, donc de protéines (antigènes), de la protéine A. L'objectif de construire une plate-forme d'ancrage d'immobilisation moléculaire a été atteint. Des résultats essentiellement identiques à ceux présentés pour le PSA ont été obtenus avec le système de l'ovalbumine (études QCM-D réalisées par J. Lai-Kee-Him, ingénieur d'études au LIMNT

Les avantages principaux de cette stratégie sont sa simplicité, sa reproductibilité et son côté générique. La simplicité résulte du fait que chacune des étapes consiste en des processus spontanés : auto-assemblage, reconnaissance moléculaire, processus extrêmement efficaces et contrôlés. La construction complète de l'édifice est rapide, de l'ordre de une à quelques heures, ce qui est comparable aux kits de dosages utilisés en routine par les laboratoires. Cette stratégie est en principe généralisable à toute protéine X qui peut être exprimée sous forme de protéine de fusion avec l'Anx5, d'où son intérêt évident dans le domaine des puces à protéines.

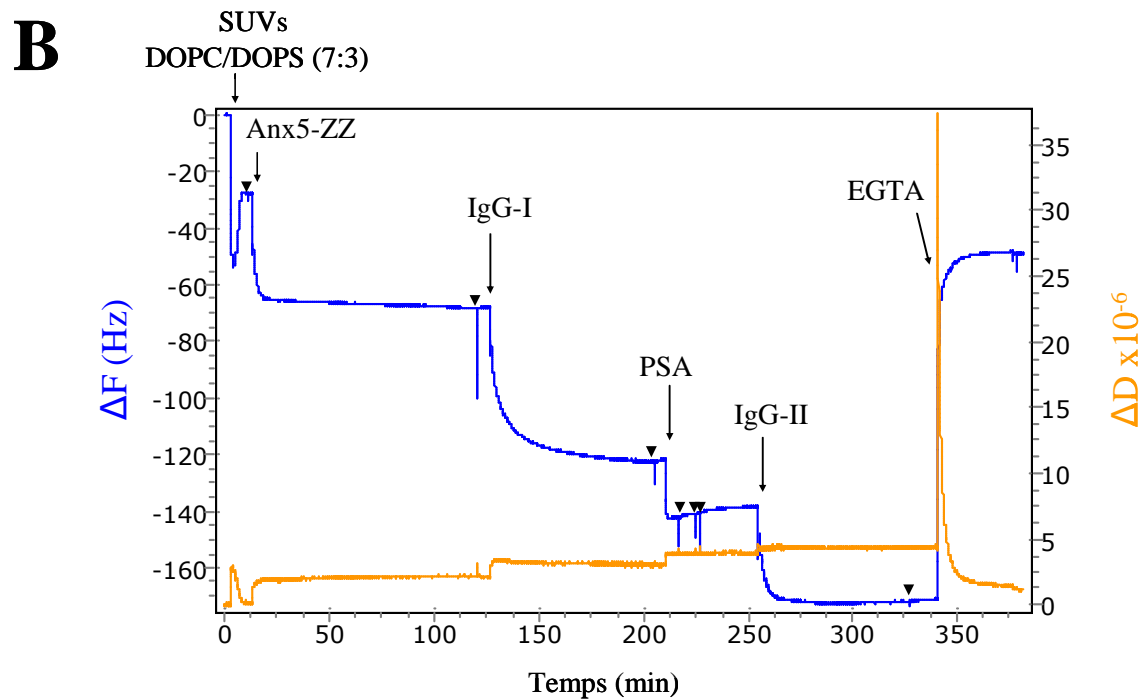
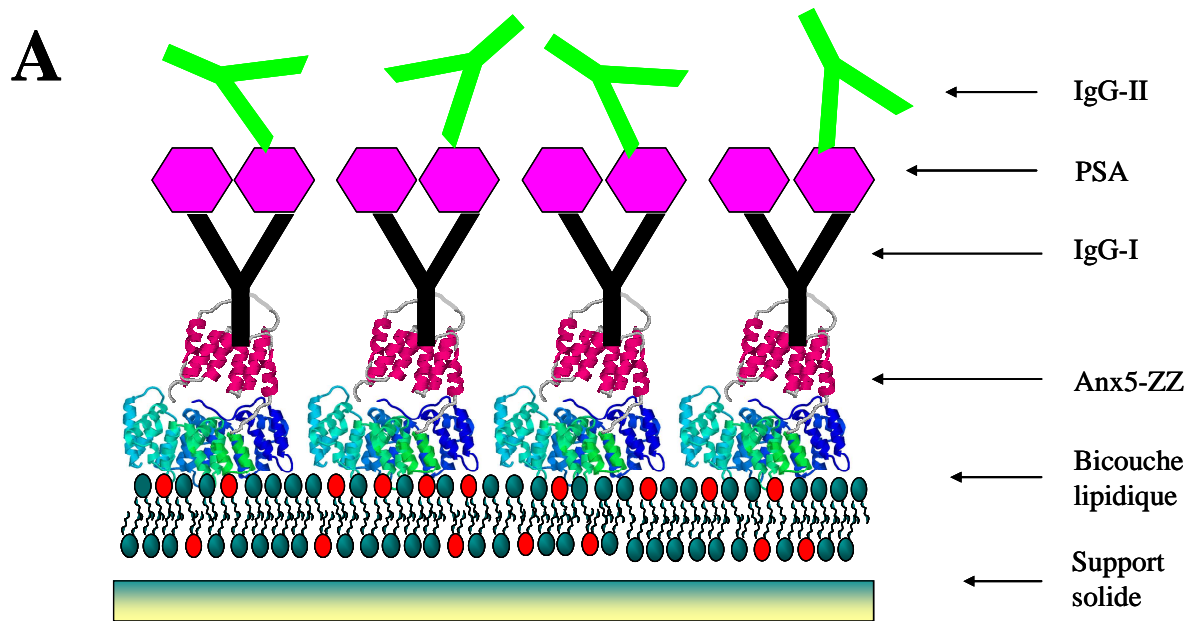


Figure C2.16 : Construction, couche par couche, d'un édifice supra-moléculaire constitué de : 1) une SLB ; 2) une matrice 2D d'Anx5-ZZ ; 3) une couche d'IgG-I anti-PSA ; 4) une couche de PSA ; 5) une couche d'IgG-II anti-PSA. Dans chacune des couches, les espèces moléculaires forment une matrice 2D à densité maximale. **A**) schéma de construction ; **B**) Exemple typique de courbes de QCM-D.

| Masse adsorbée | SLB | Anx5-ZZ | IgG-I | PSA | IgG-II |
|-----------------------------|-----|---------|-------|-----|--------|
| ΔF (Hz) | 26 | 40 | 54 | 20 | 40 |
| Masse (ng/cm ²) | 460 | 708 | 956 | 354 | 708 |

Tableau C2.1 : Masse des différentes couches de la plate-forme d’ancrage mesurées en Hz (unité du QCM-D) et converti en ng/cm².

Chacune des étapes de la construction a été caractérisée en détails, par QCM-D et AFM.

Ce projet a mis en évidence l’intérêt du QCM-D qui présente un ensemble d’avantages qui ont été essentiels pour sa réalisation. Les senseurs de quartz sont recouverts d’une couche de silice, ce qui permet de créer simplement et sous contrôle la couche de base de la plate-forme, à savoir une bicouche lipidique supportée. Il est important de noter que ceci n’est pas possible avec les puces commerciales des systèmes BIAcore (données non présentées).

III. Etudes de l'interaction entre un anticorps anti-phospholipide et les assemblages 2D d'Anx5

A. Contexte

Dans le contexte de l'hypothèse du bouclier anti-thrombotique proposé par Jacob Rand (cf. partie II.C de l'introduction), j'ai étudié l'interaction entre un anticorps anti-phospholipide et les assemblages 2D d'Anx5. L'équipe du Professeur J.-L. Pasquali de l'Institut d'Hématologie et d'Immunologie de la Faculté de Médecine de Strasbourg a isolé, chez une patiente présentant un SAP, un anticorps anti-phospholipide [170]. Par génie génétique, un anticorps de fusion possédant les mêmes domaines variables que cet anticorps humain a été produit et nommé CIC-15. Injecté chez une souris en gestation, CIC 15 déclenche un avortement spontané. Comme les anticorps caractéristiques du SAP, CIC 15 reconnaît les cardiolipides et l'Anx5.

Ce chapitre reporte l'étude que j'ai réalisée sur l'interaction de CIC-15 avec des membranes modèles de type SLB ainsi qu'avec des assemblages 2D d'Anx5. L'objectif central de ce travail était de préciser la nature des différentes interactions et éventuellement de révéler le mécanisme de destruction des assemblages 2D d'Anx5 par CIC-15.

B. Formation d'assemblages 2D d'Anx5 sur SLB contenant des cardiolipides, par QCM-D et AFM

Dans un premier temps, la liaison et l'organisation 2D de l'Anx5 sur une SLB contenant des cardiolipides a été étudiée par QCM-D et AFM, et les résultats ont été comparés à nos études précédentes de l'interaction entre l'Anx5 et les SLB contenant des PS [54]. La figure C3.1A présente les résultats d'une expérience typique de QCM-D débutant par la formation d'une SLB par déposition de SUV DOPC/CL (8/1 ; rapport molaire) sur un cristal de quartz recouvert de SiO₂ (phase 1), suivie de l'adsorption calcium-dépendante de l'Anx5 sur SLB (phase 2) et se terminant par le décrochage de l'Anx5 par ajout d'EGTA, agent chélateur du calcium (phase 3). Les résultats sont les suivants : 1) la formation de SLB DOPC/CL suit le même processus biphasique que la formation de SLB observée avec

d'autres mélanges lipidiques sur support de silice [23,86]. A l'équilibre, la bicouche DOPC/CL est caractérisée par une masse adsorbée de 440 ng/cm² et une dissipation proche de 0, indiquant une structure fortement associée au support. Ces valeurs sont identiques à celles reportées par exemple pour une bicouche formée avec des SUV DOPC/DOPS (4:1 ; poids/poids) [86]. 2) L'Anx5 se lie aux SLB DOPC/CL et forme une monocouche protéique avec une couverture maximale de 280 ng/cm² et une valeur de dissipation proche de 0. La couche d'Anx5 adsorbée est stable, comme le démontre l'absence de déplacement après rinçage de la chambre avec le tampon A contenant du Ca²⁺ mais sans protéine (R dans la Fig. C3.1A). 3) Les molécules d'Anx5 liées à la SLB sont instantanément décrochées après addition d'EGTA, confirmant la dépendance au calcium de l'adsorption de l'Anx5. En conclusion, le comportement d'adsorption de l'Anx5 sur une SLB contenant des cardiolipides est identique à ce qui est observé sur SLB contenant des PS [54].

La structure des assemblages d'Anx5 sur SLB PC/CL a été étudiée par AFM en solution. Des images AFM typiques sont présentées sur la figure. 3.1B-E montrant une SLB PC/CL sur mica (Fig. C3.1 B) et des domaines d'Anx5 formés sur une telle SLB avant saturation de la surface (Fig. C3.1 C). Sur des images enregistrées à plus haute résolution, la nature cristalline des domaines d'Anx5 est évidente (Fig. C3.1 D,E).

Un point particulier concerne la présence de trous à l'intérieur des domaines 2D cristallins d'Anx5, dans le contexte de la destruction du bouclier anti-thrombotique d'Anx5 par les anticorps anti-phospholipides [67,69]. Les cristaux d'Anx5 présentent la symétrie d'un groupe plan p6 ; ils peuvent être décrits comme six trimères d'Anx5 disposés avec une symétrie d'ordre 6 aux sommets d'un hexagone (Fig. C3.1F). La zone centrale de cet hexagone est assez large pour accueillir un septième trimère. Ce trimère central, appelé trimère non cristallographique, ne fait pas partie de l'organisation cristallographique et n'est pas indispensable à la stabilité du cristal. Le trimère central peut être présent ou absent en fonction des conditions (pour plus de détails, cf. Reviakine et al. 1998 [59]). En conclusion, les trous révélés par l'AFM (Fig. 3.1D) ne correspondent pas à des défauts cristallins mais simplement aux positions où les trimères centraux sont absents.

Les structures observées sont strictement similaires à celles obtenues sur SLB contenant des PS [54,59], établissant ainsi que l'adsorption et l'organisation 2D de l'Anx5 sur SLB contenant des CL suivent les mêmes lois que sur SLB contenant des PS.

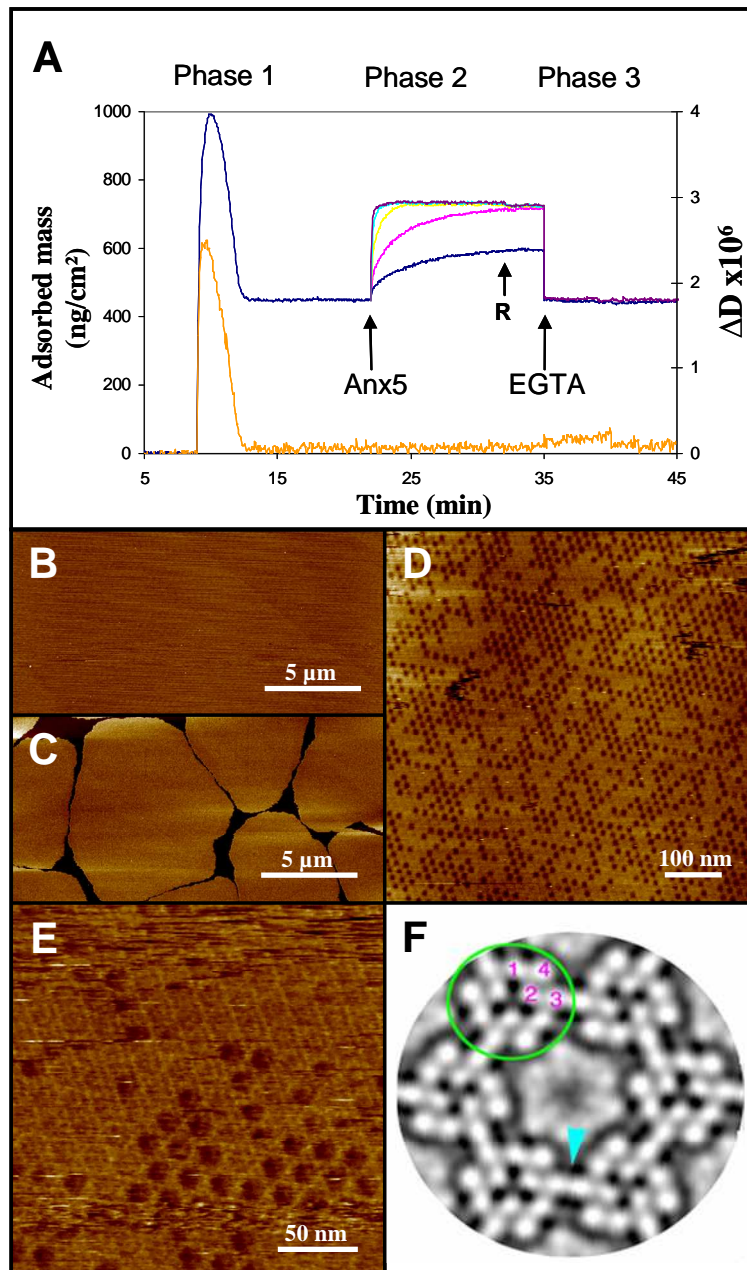


Figure C3.1: A : Interaction de différentes concentrations d'Anx5 avec une SLB DOPC/CL (8 :1) observé par QCM-D. B : Image AFM d'une SLB DOPC/CL (8 :1). C-E : Cristaux p6 d'Anx5 sur cette SLB observés par AFM. Les nombreux points noirs correspondent à des trous dans le cristal p6. F : Structure du cristal d'Anx5 observé en MET. Les quatre domaines homologues de l'Anx5 sont visibles (1-4). Les trimère d'Anx5 (entourés en vert) interagissent par les domaines 3 des Anx5 (flèche bleue).

C. Liaison de CIC-15 à des SLB PC/CL

Nous avons premièrement étudié l'interaction entre CIC-15 et une SLB PC/CL, en absence d'Anx5. Comme le montre la figure C3.2A, CIC-15 lie les SLB PC/CL (8/1) en tampon A contenant 2 mM Ca^{2+} . En conditions saturantes, une masse adsorbée de 177 ± 20

($n=2$) ng/cm^2 de CIC-15 couvre la surface d'une bicouche lipidique. L'influence de la composition lipidique et ionique sur la liaison de CIC-15 a été étudiée. CIC-15 lie les SLB PC/PS (rapport molaire 4/1) aussi efficacement que les SLB PC/CL (rapport molaire 8/1), comme attendu de part leur charge comparable (résultats non présentés). Aucune liaison de CIC-15 n'a été mesurée sur SLB PC pur (résultats non présentés). La présence de phospholipides négativement chargés est donc requise pour la liaison de CIC-15, ce qui est en accord avec les précédents résultats ELISA [170].

De plus, la liaison de CIC-15 est calcium indépendante, en effet les courbes de fixation de CIC-15 à une SLB PC/CL (8:1) en présence de 2 mM Ca^{2+} ou de 2 mM EGTA et 150 mM NaCl se superposent.

Nous avons mis en évidence que CIC-15 se lie plus fortement et de manière plus stable à faible force ionique. En présence d'un tampon B contenant 15 mM NaCl, la saturation est obtenue pour $530 \text{ ng}/\text{cm}^2$ (Fig. C3.2B). Pour la suite de cette étude, le comportement de CIC-15 a été étudié à la fois à forte force ionique (150 mM NaCl) et à faible force ionique (15 mM NaCl). Les essais pour imager les molécules de CIC-15 adsorbées à une SLB par AFM se sont avérés infructueux. Ceci est interprété comme étant dû à la mobilité des molécules de CIC-15 à la surface de la SLB, et/ou à leur flexibilité intrinsèque, étant donné que l'imagerie AFM nécessite des échantillons liés fermement au support.

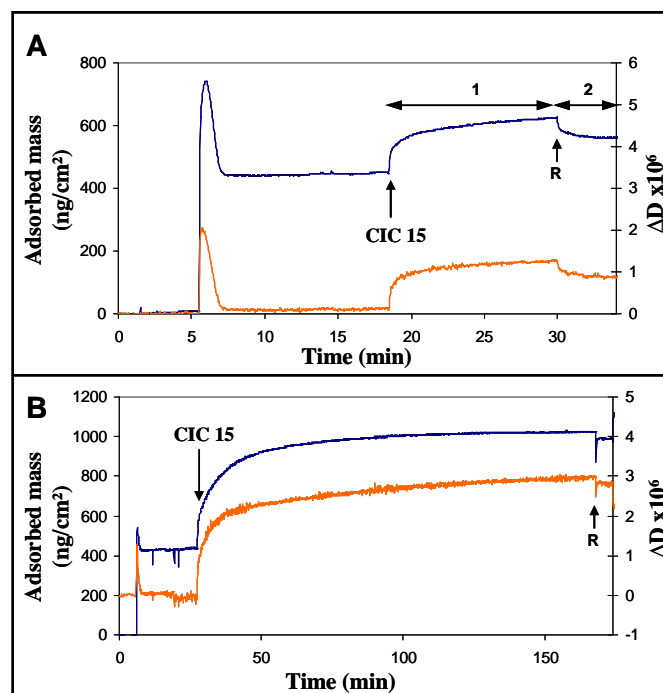


Figure C3.2 : Le signal QCM-D de la liaison de CIC-15 à une SLB PC/CL (8:1) à 150 mM NaCl montre $177 \text{ ng}/\text{cm}^2$ d'interaction (A) et à 15 mM NaCl montre $530 \text{ ng}/\text{cm}^2$ d'interaction avec la SLB.

D. Interaction entre CIC-15 et l'Anx5 sur SLB PC/CL

L'interaction entre CIC-15, l'Anx5 et une SLB PC/CL a été étudiée dans deux conditions : 1) liaison de CIC-15 à une monocouche d'Anx5 préformée sur une SLB ; et 2) liaison d'Anx5 à une monocouche de CIC-15 préformée sur une SLB.

D1. Liaison de CIC-15 à une monocouche préformée d'Anx5.

L'addition de 20 µg/ml de CIC-15 à une monocouche saturante d'Anx5 formée sur SLB à 150 mM NaCl n'a pas d'effet sur les signaux de fréquence ni de dissipation en QCM-D (fig. C3.3A). Par AFM, les images obtenues après addition de CIC-15 sont identiques à celles obtenues avec l'Anx5 seule, la surface étant couverte de cristaux 2D de symétrie p6 (données non présentées). Ces résultats indiquent que CIC-15 ne se lie pas à une monocouche saturante d'Anx5 à haute concentration en NaCl.

A 15 mM NaCl, l'addition de CIC-15 à une monocouche saturante d'Anx5 induit une augmentation de masse de la couche adsorbée d'environ 210 ng/cm² et une augmentation concomitante de dissipation (Fig. C3.3B). Après rinçage en tampon A contenant 150 mM NaCl, la masse de la couche adsorbée décroît d'environ 200 ng/cm², se stabilisant à 250 ng/cm², et la valeur de dissipation retourne à 0. Ces valeurs, $\Delta F \sim 250 \text{ ng/cm}^2$ et $\Delta D \sim 0$, sont caractéristiques d'une monocouche d'Anx5 à saturation. Ceci est confirmé par le fait que le rinçage avec le tampon A en présence de 2 mM EGTA induit un décrochage quasi-total des protéines adsorbées sur la surface lipidique. En conséquence, nous concluons que l'Anx5 n'a pas été déplacée par CIC-15 et qu'une masse additionnelle de CIC-15 (210 ng/cm²) peut coexister avec une monocouche saturante d'Anx5.

Sur les images d'AFM, l'aspect général des domaines cristallins d'Anx5 est remarquablement différent après addition de CIC-15. La surface est entièrement couverte avec du matériel imagé comme des points blancs (Fig. C3.3C). Ces points blancs doivent correspondre aux molécules de CIC-15 liées de manière stable à la surface. La structure en Y des anticorps n'est pas résolue sur ces images en mode contact, ce qui est tout à fait logique en raison de leur flexibilité intrinsèque. A plus fort grandissement, et à faible concentration de CIC-15, les molécules d'anticorps sont résolues individuellement. Les IgG sont clairement associées à l'organisation cristalline de l'Anx5, semblant être localisées au niveau des « trous » (Fig. C3.3D). Cette localisation est confirmée par les expériences de QCM-D. Lors de la cohabitation de CIC-15 avec l'Anx5 à la surface d'une SLB, l'ajout d'EGTA entraîne la

désorption de l'Anx5 laissant sur la SLB la totalité de CIC-15. L'anticorps n'est donc pas lié à l'Anx5 mais à la SLB et les trous du réseau d'Anx5 sont le seul accès possible à la SLB en présence d'Anx5. Ces images démontrent de manière claire que CIC-15 ne détruit pas l'organisation cristalline de l'Anx5.

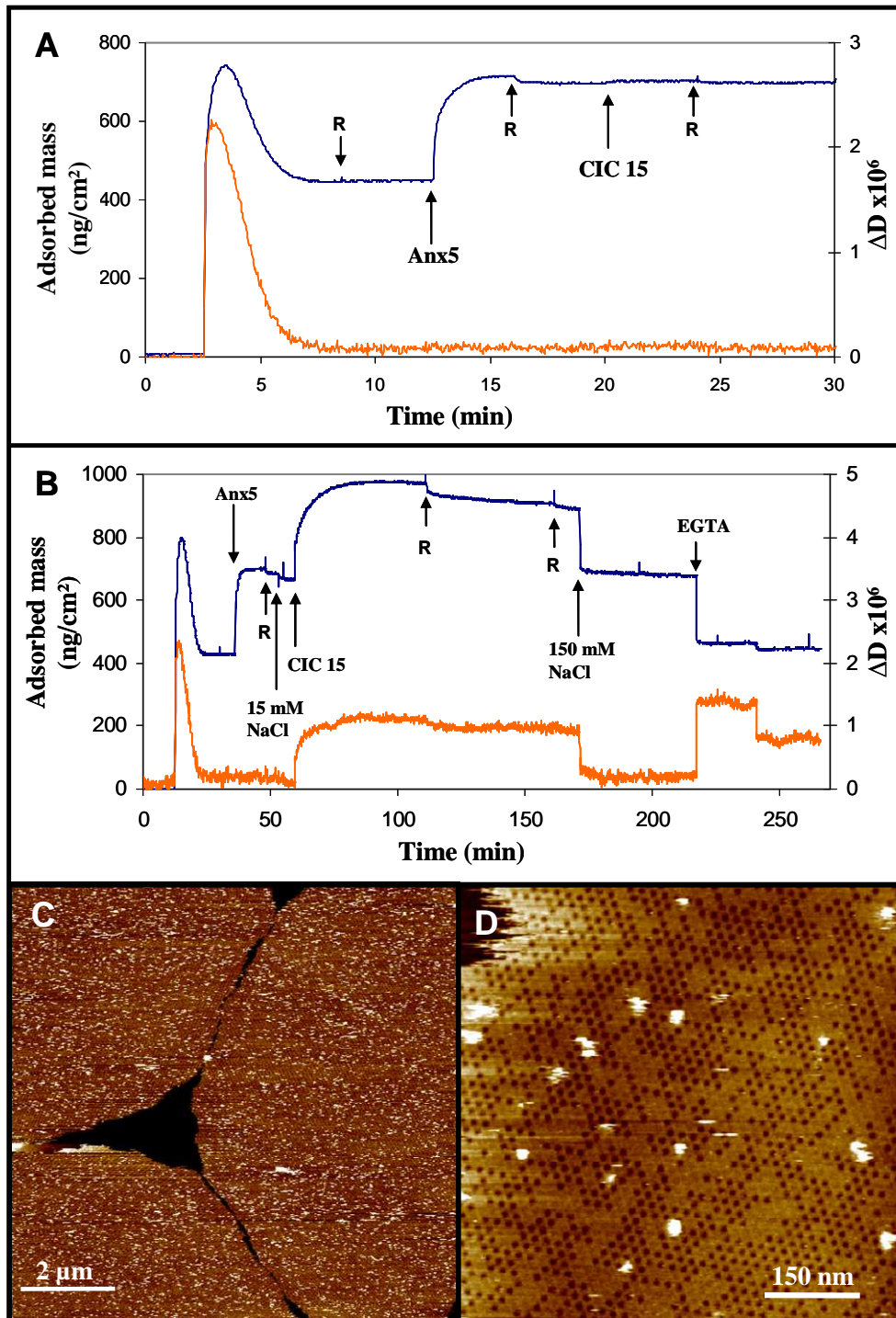


Figure C3.3 : Liaison de CIC-15 sur une monocouche d'Anx5 à 150 mM NaCl (A) et à 15 mM NaCl (B) mesurée par QCM-D. L'AFM permet d'observer les anticorps associés à l'organisation cristalline de l'Anx5 (C,D).

D2. Liaison de l'Anx5 à une monocouche préformée de CIC-15

L'addition de 20 $\mu\text{g/ml}$ d'Anx5 à une monocouche de CIC-15 formée sur une SLB à 150 mM NaCl aboutit à une augmentation de la masse adsorbée d'environ 140 ng/cm^2 et une baisse concomitante de la dissipation à 0 (Fig. C3.4A). La couche ainsi adsorbée est caractéristique en masse (266 ng/cm^2) et en dissipation (0) d'une monocouche d'Anx5 saturante et est entièrement déplacée par le tampon A contenant 2 mM EGTA. Par AFM, la surface résultante est entièrement couverte de cristaux 2D d'Anx5 (résultats non présentés). Ces résultats démontrent que l'Anx5 est capable de déplacer entièrement les molécules de CIC-15 liées à une SLB à 150 mM NaCl.

A 15 mM NaCl, l'addition de 20 $\mu\text{g/ml}$ d'Anx5 à une monocouche saturante de CIC-15 liée sur SLB aboutit à une légère augmentation de masse et à une diminution importante de la dissipation. La nature exacte des espèces moléculaires adsorbées ne peut être estimée directement car le remplacement d'une masse d'un composé par une masse équivalente d'un autre composé ne donne pas de variation de signal en fréquence, et les variations de signal de dissipation sont difficiles à interpréter de manière absolue. L'addition de tampon A contenant 2 mM EGTA permet de séparer les contributions de CIC15 et de l'Anx5, puisque CIC-15 n'est pas déplacé par l'EGTA, contrairement à l'Anx5. L'addition de tampon A contenant 2 mM EGTA est accompagnée d'une diminution de masse adsorbée de 250 ng/cm^2 (Fig. C3.4B). Ceci indique que lors de l'addition d'Anx5 à une couche préformée de CIC-15, 250 ng/cm^2 d'Anx5 se fixent et déplacent une masse sensiblement équivalente de CIC-15. Le système à l'équilibre est donc composé d'un mélange de 280 ng/cm^2 de CIC-15 et 250 ng/cm^2 d'Anx5.

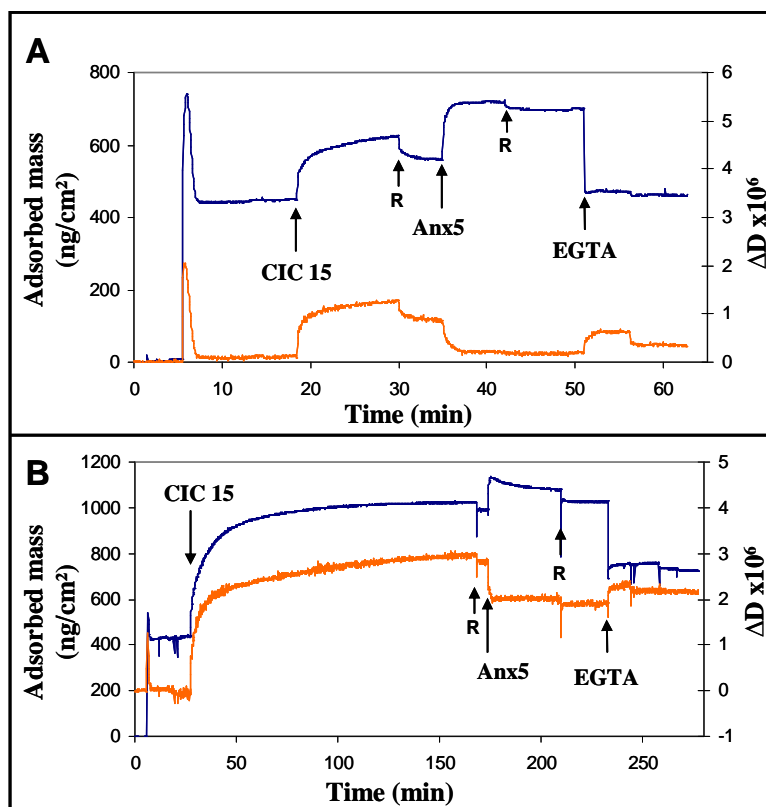


Figure C3.4 : Mesure par QCM-D de la liaison de l'Anx5 sur une monocouche préformée de CIC-15 à 150 mM NaCl (A) et 15 mM NaCl (B).

Les images AFM sont très similaires à celles présentées en figure C3.3C,D, montrant des anticorps CIC-15 associés aux domaines cristallins d'Anx5, mais ne montrant aucun signe de destruction de la structure cristalline.

Ces résultats montrent que l'ordre dans lequel CIC-15 et Anx5 sont ajoutés sur la SLB n'a pas d'influence sur le résultat final. A 150 mM NaCl, l'Anx5 occupe toute la surface, CIC-15 ne coexiste pas avec l'Anx5. A 15 mM NaCl, le système à l'équilibre est donc composé d'un mélange de CIC-15 et d'Anx5. Les valeurs obtenues (respectivement 225 ng/cm² de CIC-15 et 265 ng/cm² d'Anx5 dans le cas a) ainsi que 280 ng/cm² de CIC-15 et 250 ng/cm² d'Anx5 dans le cas b)) sont suffisamment proches pour être considérées semblables. Comment sont associées les molécules d'IgG et d'Anx5 ? S'il est logique de postuler que l'Anx5 est liée à la surface lipidique, on peut se demander si CIC-15 est lié à la surface lipidique ou à l'Anx5. Le fait que, dans les deux cas a) et b), le traitement EGTA déplace la même masse (~ 250 ng/cm²), et que cette masse est sensiblement égale à la masse déplacée en présence d'Anx5 seule, indique que la masse déplacée est composée seulement d'Anx5 et non de complexes Anx5-CIC-15. CIC-15 et Anx5 doivent donc coexister sur la

surface lipidique. L'interprétation la plus simple que nous proposons est que, dans le cas des assemblages cristallins de trimères d'Anx5, les molécules de CIC-15 sont localisées au niveau des « trous » centraux du réseau p6, comme le suggèrent les images AFM enregistrées à faible couverture en IgG (Fig. C3.3D) et les expériences de QCM-D (non présentées).

En conclusion, CIC-15 s'intègre dans les domaines 2D d'Anx5 sans induire de détérioration de l'assemblage cristallin détectable en AFM.

D3. Influence des protéines plasmatiques sur l'interaction entre CIC-15, Anx5 et une SLB PC/CL

La β 2-glycoprotéine-I ayant été décrite comme cofacteur des anticorps anti-phospholipides [67], nous avons étudié le comportement de systèmes ternaires CIC-15/Anx5/SLB en présence de cette protéine (fournie par le Prof. P. de Groot (Utrecht)). L'addition de β 2-GPI n'induit aucun changement des signaux QCM-D (données non présentées). Nous avons poursuivi cette investigation d'éventuels cofacteurs en testant l'influence de l'addition de sérum et de plasma sanguin sur l'assemblage ternaire CIC-15/Anx5/SLB. Aucun effet n'a été observé.

CIC-15 présente donc un comportement différent des autres anticorps anti-phospholipides, comme ceux pour lesquels la β 2-GPI a été proposée jouer un rôle de cofacteur essentiel dans la destruction des assemblages 2D d'Anx5 [69].

L'ensemble de cette étude ne va pas dans le sens de la théorie de Jacob Rand. En effet, contrairement aux travaux de Rand, l'anticorps anti-phospholipide CIC-15 ne perturbe pas le réseau 2D d'Anx5 et peut même cohabiter avec lui à la surface de la bicouche lipidique. Le fait que CIC-15 ne nécessite pas la β 2-GPI comme cofacteur pour interagir avec la surface lipidique laisse penser que cet anticorps anti-phospholipide a un comportement différent de l'anticorps utilisé par Rand. Peut-être existe-il plusieurs types d'anticorps anti-phospholipidiques avec des comportements différents mais résultant aux mêmes symptômes. Toutefois, nous considérons que les données d'AFM présentées par J. Rand comme preuve expérimentale de la destruction du bouclier antithrombotique [69] ne sont pas satisfaisantes ni convaincantes. Les trous sur la figure 4C,D de l'article de Rand [69] présents au niveau des trimères centraux du réseau p6 ne correspondent pas à des défauts dans le cristal. Ces trimères vacants ne font pas partie du cristal d'Anx5. Les images d'AFM de cristaux 2D d'Anx5

présentent en général des trous dans le cristal [59], leur présence dépendant de la nature de la SLB et nous avons observé un plus grand nombre de trimères vacants sur des SLB contenant des CL. De plus la stabilité de ces trimères est plus faible que la stabilité des trimères faisant partie du cristal d'Anx5, de ce fait un rinçage un peu fort peut entraîner la vacance de trimères centraux. D'autre part, si les anticorps utilisés par Rand venaient se fixer sur la SLB et détruire le réseau d'Anx5, pourquoi aucun anticorps n'est visible au niveau des zones dites détériorées sur les images d'AFM ? C'est pourquoi nous remettons en cause les preuves expérimentales apportées par J. Rand.

D4. CIC-15 se lie-t-il à des monomères ou à des trimères d'Anx5 ?

L'Anx5 ayant pour propriété intrinsèque de former des trimères au niveau de SLBs, nous avons décidé d'étudier si les molécules de CIC-15 s'associent à des monomères ou à des trimères d'Anx5. La plate-forme décrite en partie II des résultats a été utilisée pour ancrer CIC-15 sur une matrice 2D d'Anx5-ZZ afin d'orienter les molécules de CIC-15 de sorte à exposer les fragments Fab de CIC-15 de manière accessible vers la phase aqueuse. L'Anx5 a été présentée soit sous forme de monomères en solution, soit sous forme de trimères ou de réseaux 2D organisés à la surface des liposomes (Fig. C3.5).

Présentée sous forme de monomère, l'Anx5 n'est pas reconnue par CIC-15 quelque soit la force ionique (Fig. C3.5A). Par contre, CIC-15 est capable de se lier à l'Anx5 assemblée sous forme de trimères à la surface de liposomes (Fig. C3.5B). Ces résultats suggèrent que CIC-15 reconnaît l'interface entre les trimères d'Anx5 et la SLB.

L'expérience réciproque a été réalisée, dans le but de déterminer si l'orientation de l'Anx5 était importante pour l'interaction avec CIC-15. Une matrice 2D de dimères d'Anx5 a été créée à la surface de la SLB. Ce dimère symétrique d'Anx5, produit dans notre équipe, permet de lier deux membranes de manière symétrique, et donc présenter de manière accessible au solvant la face de l'Anx5 liant les membranes (Fig. C3.5C). Les résultats obtenus sont identiques à ceux obtenus pour la liaison de CIC-15 à une matrice préformée d'Anx5. Aucune interaction n'est détectée à forte force ionique, alors qu'à 15 mM NaCl, l'adsorption de 230 ng/cm² de CIC-15 est mesurée. Ces expériences suggèrent très fortement que CIC-15 reconnaît non pas le monomère d'Anx5 mais les trimères d'Anx5 ou les réseaux 2D de l'Anx5 à la surface de la bicouche.

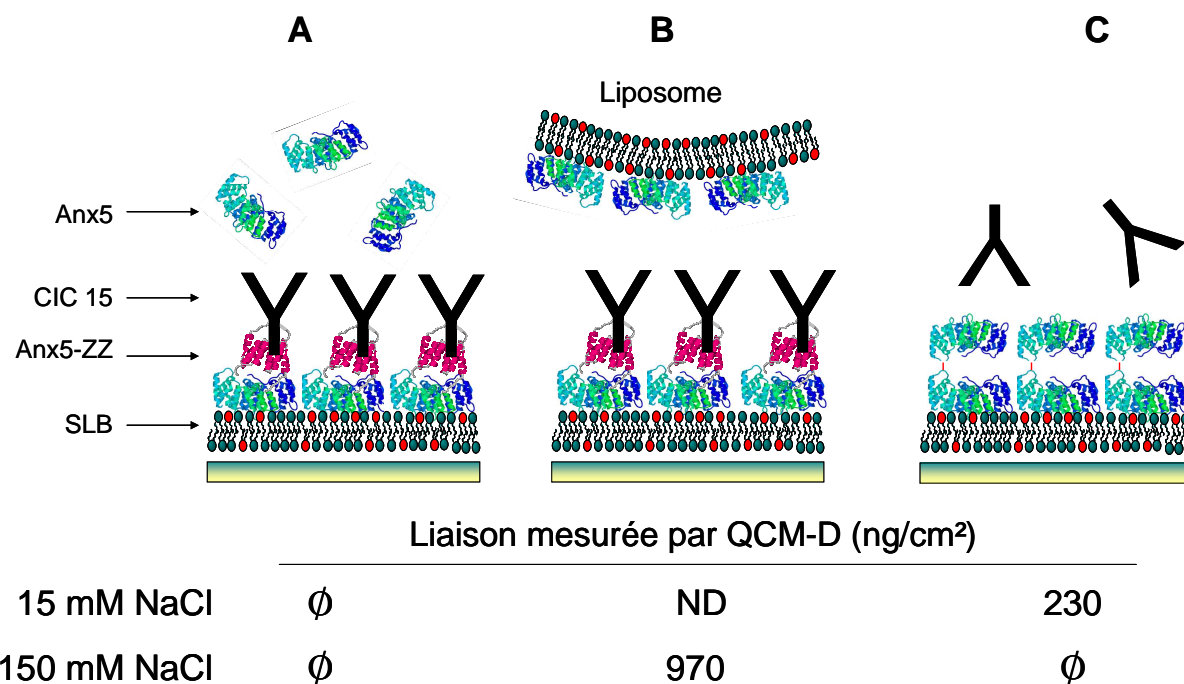


Figure C3.5 : Utilisation de la plate-forme d’ancrage basée sur l’Anx5-ZZ pour exposer au solvant les fragments Fab de CIC-15. CIC 15 ne reconnaît pas les monomère d’Anx5 en solution (A), mais reconnaît les trimères d’Anx5 fixés sur liposome (B). L’utilisation d’un dimère d’Anx5 a permis de montrer que CIC 15 a le même comportement vis-à-vis des trimères quelque soit la face de l’Anx5 qui lui est présentée, face ne liant pas la SLB ou face liant les lipides (C). Dans les deux configurations, 230 ng/cm² de CIC-15 se lie à l’Anx5 à 15 mM NaCl.

E. Conclusions

Cette étude de l’interaction de CIC-15, un anticorps monoclonal humain provenant d’une patiente atteinte du syndrome anti-phospholipide, avec des surfaces lipidiques et l’Anx5, confirme les conclusions d’études précédentes par ELISA montrant que CIC-15 reconnaît les cardiolipides et l’Anx5 [170]. La combinaison du QCM-D et de l’AFM a permis de caractériser en détails le système ternaire CIC-15/Anx5/SLB. Les principaux résultats de cette étude sont d’une part que les molécules de CIC-15 peuvent coexister avec des molécules d’Anx5 à la surface de membranes, et d’autre part que CIC-15 ne déstabilise pas l’organisation cristalline 2D de l’Anx5. Le comportement de CIC-15 diffère par conséquent de celui d’autres anticorps anti-phospholipides dont l’activité pro-thrombotique a été interprétée comme résultant de la dégradation de l’organisation cristalline 2D de l’Anx5 [69]. Les anticorps anti-phospholipides auraient donc potentiellement différents comportements. Cette étude est l’objet de la rédaction d’un article présentant ces résultats ainsi qu’une étude physiologique de CIC-15 menée par le Dr Jean- Louis Pasquali qui sera soumis début 2008.

IV. Influence des assemblages 2D d'Anx5 sur la dynamique des membranes

Les fonctions physiologiques des annexines, et de l'Anx5 en particulier, sont toujours inconnues, ou débattues, comme indiqué dans l'Introduction [27]. Une des hypothèses les plus étudiées actuellement concerne le rôle des annexines comme régulateurs de l'organisation et de la dynamique des membranes [171]. Cette hypothèse a pour origine principale un ensemble d'études qui ont mis en évidence la propriété remarquable des annexines de former des assemblages 2D à la surface des membranes [41,52,53,60]. L'hypothèse de travail de notre équipe, qui a largement contribué à ces travaux, est que les trimères d'Anx5 ou les réseaux 2D de trimères sont responsables de ses propriétés fonctionnelles.

Nous avons donc décidé d'étudier l'influence de la formation des réseaux 2D d'Anx5 sur la dynamique des membranes, par la technique de retour de fluorescence après photoblanchiment (FRAP) [112-114]. Plusieurs études ont déjà concerné l'influence de la liaison de l'Anx5 [172,173] ou de l'Anx4 [174] sur la diffusion des lipides. Un des principaux résultats de ces études est que la liaison des annexines ralentit la diffusion des lipides. L'objectif principal de notre étude est d'élucider le rôle des trimères ou des réseaux de trimères dans ce processus.

Ma contribution à ce travail a consisté principalement à initier les expériences de FRAP. Les résultats ci-dessous concernent l'étude de l'influence de la liaison d'Anx5 et d'un mutant d'Anx5 ne formant pas de trimères sur la dynamique des lipides. Ces résultats seront intégrés ultérieurement au manuscrit d'un article décrivant cette étude.

Les expériences suivantes ont été réalisées à l'ETH Zurich avec l'aide de B. Städler, alors Doctorante dans le groupe du Professeur M. Textor.

A. Mesure de la diffusion lipidique au sein de SLBs sur différents supports

La première étape de cette étude a porté sur l'étude de la diffusion des lipides sur différents supports. Des études réalisées par QCM-D avaient en effet mis en évidence l'influence de la nature des supports solides utilisés pour la formation des SLBs sur la

redistribution des lipides entre les deux feuillettes des SLBs [175,176]. Les lipides de type PS en particulier se distribuent de manière asymétrique sur des supports de mica ou d'oxyde de titane qui sont fortement chargés négativement.

La diffusion des différents lipides dans une SLB DOPC/DOPS (4/1) a été mesurée par FRAP en utilisant 2% de lipides fluorescents portant un marqueur nitro-benzoxadiazoyl (NBD) en position 12 de la chaîne aliphatique du 2^{ème} acide oléique.

La figure C4.1A présente les images de microscopie de fluorescence obtenues à différents temps après photoblanchiment d'un cercle de 18 μm de diamètre dans une SLB seule. Le retour de fluorescence à l'intérieur du cercle a été mesuré au court du temps (Fig. C4.1B).

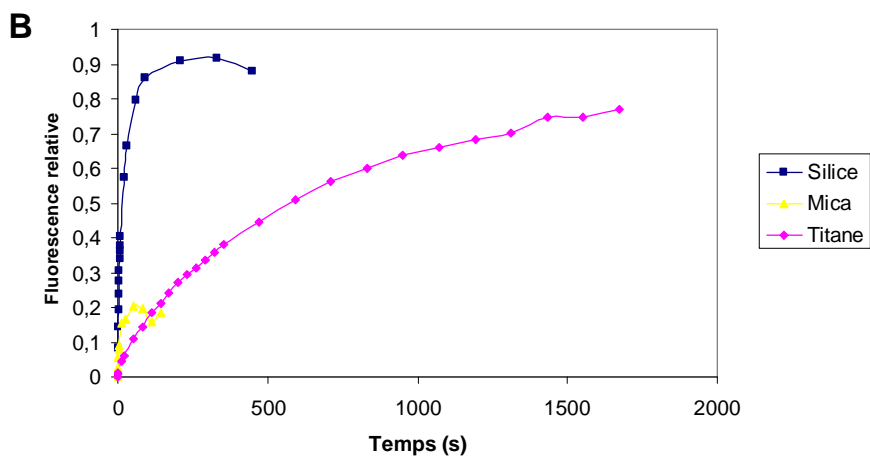
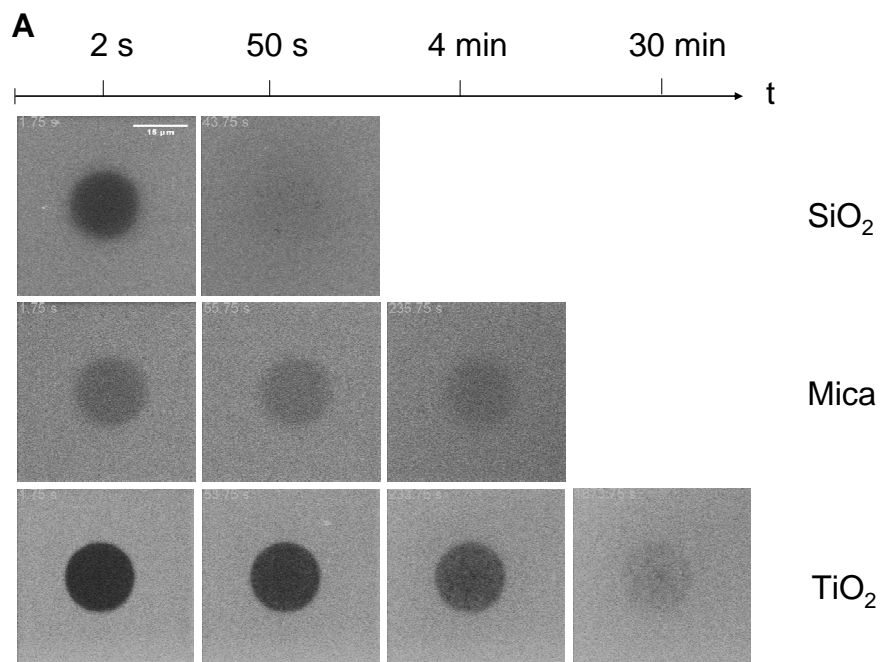


Figure C4.1 : Expérience de FRAP réalisée sur une SLB DOPC/DOPS/DOPS-NBD (80/18/2) sur trois supports différents. Le retour de fluorescence est mesuré sur les images de microscopie de fluorescence (**A**) et représenté sous forme de graphique (**B**).

La courbe de retour de fluorescence est modélisée avec l'équation décrite par Lopez et al. [114] pour en extraire le paramètre τ_D . Le coefficient de diffusion peut alors être calculé par l'équation (3) :

$$D = \frac{\omega^2}{4 \tau_D} \quad (3)$$

Ce coefficient de diffusion a été mesuré pour les deux espèces lipidiques composant la SLB sur trois supports : Oxyde de Silice (SiO_2), Mica et Oxyde de Titane (TiO_2). Les résultats sont présentés dans le tableau C4.1.

| Lipide marqué | Coefficient de diffusion (cm^2/s) | | |
|---------------|---|-----------|----------------|
| | SiO_2 | Mica | TiO_2 |
| NBD-PC | 10^{-8} | 10^{-8} | 10^{-8} |
| NBD-PS | 10^{-8} | 10^{-9} | 10^{-10} |

Tableau C4.1 : Coefficients de diffusion des lipides NBD-PC et NBD-PS mesurés dans des SLB formées sur trois supports : SiO_2 , Mica et TiO_2 .

Les valeurs des coefficients de diffusion des lipides mesurés sur silice sont comparables aux valeurs reportées dans la littérature sur surfaces de verre. Gilmanshin et al. ont obtenu des coefficients de diffusion de $1,4 \times 10^{-8} \text{ cm}^2/\text{s}$ pour les PC et $2,4 \times 10^{-8} \text{ cm}^2/\text{s}$ pour les lipides phosphatidylglycérol qui sont des lipides chargés négativement comme les PS [174]. Saurel et al. ont obtenu des coefficients de diffusion de $0,8 \times 10^{-8} \text{ cm}^2/\text{s}$ pour les PC et de $1 \times 10^{-8} \text{ cm}^2/\text{s}$ pour les PS [172].

Cette étude montre que la diffusion des lipides membranaires PS sur Titane et Mica est nettement plus faible que sur Silice. Ces résultats sont en accord avec les résultats de QCM-D discutés ci-dessus indiquant une distribution asymétrique des PS entre les deux feuillettes des SLBs, sur Mica et Titane [18,175,176]. La diminution de la diffusion latérale des lipides indique que l'anisotropie de distribution des lipides est due à une interaction forte entre les PS et le support, médiée par les ions calcium.

Les travaux sur l'étude de l'asymétrie des PS dans les SLB sur titane constituent une étude ponctuelle qui s'intègre dans un projet général sur l'étude de la formation des SLB menée au LIMNT. Ce travail est intégré à un article de revue publié en 2006 dans le journal Langmuir [18] et inséré en annexe sous sa forme originale.

Ces travaux intervenaient dans le contexte de l'étude de l'asymétrie lipidique des PS existante entre les deux feuillettes des SLB en fonction du support sur lequel elles reposent. En effet, il a été décrit que, sur mica, la quantité de prothrombine se liant à la SLB pour un taux de PS donné, était plus faible que sur une SLB formée sur silice. Ceci a été interprété comme résultant du fait que le taux de PS accessible sur le feuillet externe de la bicouche était inférieur au taux global de PS dans la bicouche [175]. J'ai effectué les mêmes expériences sur TiO_2 pour positionner le comportement de ce support par rapport à la silice (symétrie des PS) et au mica (asymétrie des PS) en utilisant l'Anx5 comme rapporteur du taux de PS accessible sur le feuillet externe de la SLB. Il s'avère que le titane entraîne une asymétrie encore plus forte que le mica. En effet, pour un taux donné de PS, la quantité d'Anx5 liée à la SLB est encore plus faible que sur mica (Fig. C4.2). Cette asymétrie a été observée au même moment par Rosetti et al. de l'ETH Zurich [176].

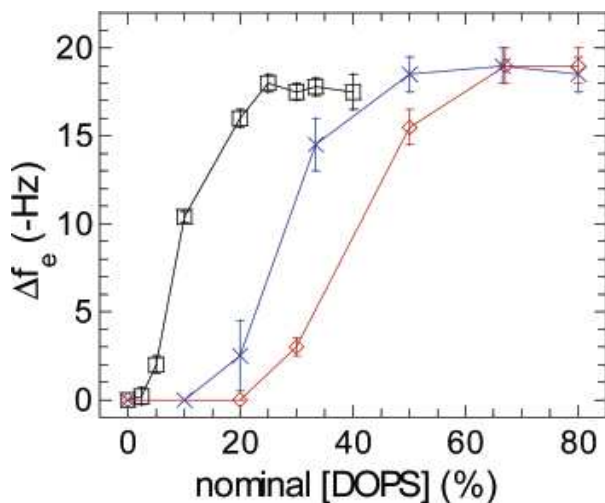


Figure C4.2 : Fixation de l'Anx5, protéine se liant aux DOPS de manière calcium dépendante (cf. chapitre IV de l'introduction), sur une SLB contenant différents taux de DOPS formées sur support de silice (noir, -□-), de mica (bleu, -x-), et de titane (rouge, -◇-).

L'article de revue dans lequel sont publiés ces résultats [18] traite de la formation de bicouche lipidique sur support solide. Cette revue décrit les différentes étapes de formation

des SLB sur support solide et les caractéristiques de la bicouche formée (distribution lipidique inter-feuillet, défauts potentiels), faisant le point sur dix ans d'étude sur ce sujet.

B. Influence de la formation d'assemblages 2D d'Anx5 sur la dynamique des membranes

L'influence de la formation d'assemblages 2D d'Anx5 sur la diffusion des lipides au sein de SLB sur support de silice a été étudiée par la technique du FRAP. Cette étude a porté essentiellement sur la comparaison du comportement de l'Anx5 et d'un quadruple mutant de l'Anx5, appelé ci-dessous mutant SPLI ou SPLI. Le mutant SPLI, développé par le Dr. L. Bystrykh (Université de Groningen, Pays-Bas) se comporte comme l'Anx5 en ce qui concerne sa fixation aux membranes, mais il est incapable de former des trimères et de s'auto-assembler en réseaux 2D de trimères. Des études précédentes réalisées en collaboration avec le Dr. J.-M. Freyssinet (ULP, Strasbourg) ont montré que le mutant SPLI présente un effet d'inhibition de la coagulation sanguine très fortement amoindri par rapport à l'Anx5 (Manuscrit en préparation).

Des expériences de FRAP ont été réalisées au niveau de SLBs contenant des lipides PS marqués, en présence soit d'Anx5, soit de SPLI. Les images de microscopie de fluorescence et les courbes de retour de fluorescence sont présentées en figure C4.3. Les valeurs des coefficients de diffusion calculés à partir de ces données de FRAP sont présentées dans le tableau C4.2.

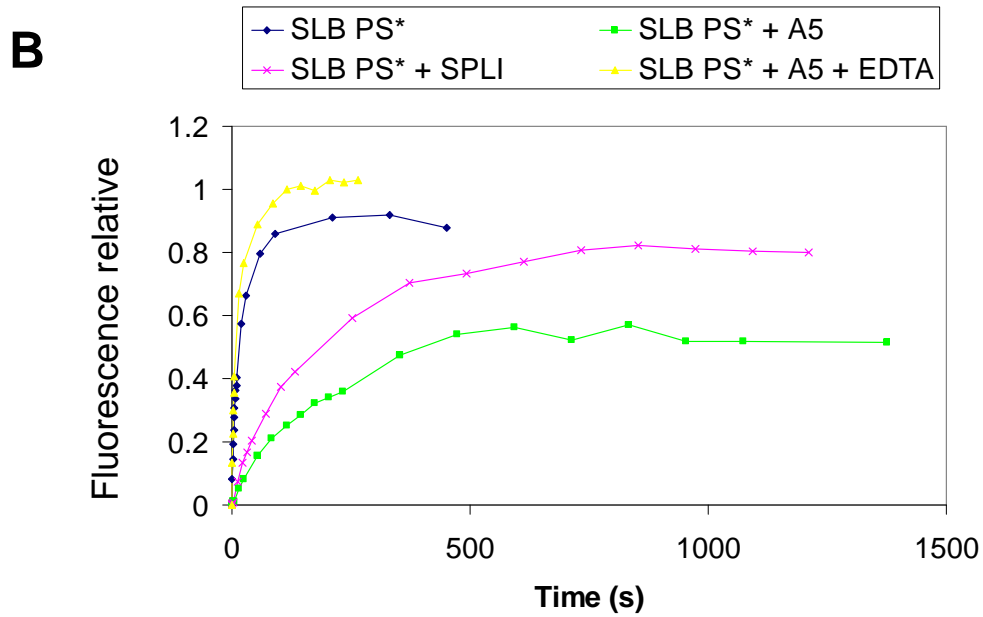
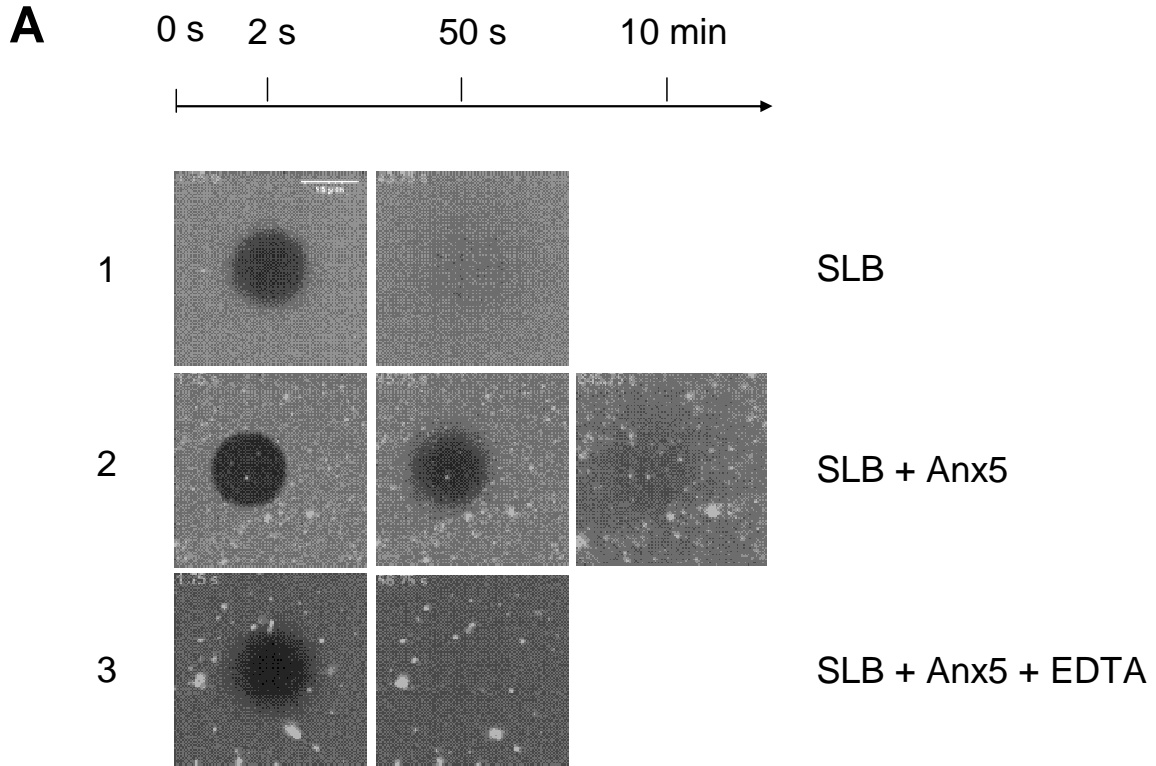


Figure C4.3 : Expérience de FRAP réalisée sur une SLB composée d'un mélange DOPC/DOPS/DOPS-NBD (80/18/2), formée sur support de silice. A) Images de fluorescence ; B) Variation de l'intensité de fluorescence dans la zone blanchie en fonction du temps. 1) Lipides seuls ; le retour de fluorescence est rapide ; 2) La présence d'Anx5 ou de mutant SPLI ralentit le retour de fluorescence ; 3) Après ajout d'EDTA, le retour de fluorescence a une cinétique similaire à celle des lipides seuls.

| Lipide marqué | Coefficient de diffusion (cm ² /s) | | |
|---------------|---|-------------------|------------------|
| | ∅ | + Anx5 | + SPLI |
| NBD-PC | 10 ⁻⁸ | 10 ⁻⁹ | 10 ⁻⁹ |
| NBD-PS | 10 ⁻⁸ | 10 ⁻¹⁰ | 10 ⁻⁹ |

Tableau C4.2 : Coefficients de diffusion des deux lipides membranaires marqués en présence d'Anx5 ou du mutant SPLI sur une SLB formée sur silice.

La diffusion des lipides NBD-PC est ralentie d'un facteur 10 aussi bien par la présence d'Anx5 que de SPLI. En revanche, la diffusion des lipides NBD-PS est ralentie d'un facteur 100 par la présence de l'Anx5 alors qu'il n'est seulement ralenti que d'un facteur 10 par le mutant SPLI. Cette étude confirme d'une part que la fixation d'Anx5 sur une bicouche lipidique en présence de calcium ralentit fortement la diffusion des lipides anioniques, en accord avec les travaux de l'équipe de J.-F. Tocanne [172,173]. D'autre part, l'effet restreint du mutant indique que l'organisation 2D de l'Anx5 à la surface des bicouches lipidiques joue un rôle important dans la diminution de la diffusion des lipides membranaires en présence d'Anx5.

Cette étude permet d'établir une corrélation directe entre la formation de trimères d'Anx5, ou d'assemblages 2D de trimères d'Anx5, et l'effet inhibiteur de la coagulation sanguine reporté ci-dessus. Il est logique de proposer que le ralentissement de la dynamique des lipides dû à la formation (d'assemblages 2D) de trimères d'Anx5 diminue la probabilité de rencontre des facteurs de la coagulation sanguine, la formation de complexes prothrombinase et l'activité prothrombinase. Il est légitime de poser la question de la validité physiologique de ce mécanisme. Le rôle fonctionnel de l'Anx5 pourrait résulter de la propriété de l'Anx5 de former des assemblages 2D qui induisent un ralentissement de la dynamique des membranes.

D. Conclusions et perspectives

Ce travail de thèse introduit une nouvelle plate-forme d'ancrage 2D et valide son utilisation dans le contexte de deux applications : l'induction de l'adhésion cellulaire et l'immobilisation contrôlée d'anticorps et de protéines pour la réalisation de biosenseurs. Cette plate-forme est basée sur les matrices 2D que forment la protéine Anx5 à la surface de SLB chargées négativement en présence de calcium.

Pour développer la plate-forme d'adhésion cellulaire (Chapitre C-I), j'ai utilisé des complexes Anx5-peptide synthétisés au LIMNT. J'ai fonctionnalisé des supports de verre par des édifices composés d'une SLB au-dessus de laquelle la plate-forme 2D d'Anx5-peptide se construit spontanément. J'ai validé la stratégie de plate-forme d'adhésion cellulaire sur plusieurs systèmes cellulaires. Cette plate-forme permet d'optimiser et de contrôler l'homogénéité, la densité et l'orientation des peptides d'adhésion. La rigidité 2D de l'assemblage joue certainement un rôle important dans l'adhésion des cellules. Cette stratégie d'adhésion cellulaire présente plusieurs applications potentielles, comme le tri de cellules par sélection du peptide greffé, le transfert de cellules entre deux supports (grâce à l'effet calcium/EGTA), le développement de puces à cellules ou la couverture pré-implantatoire de prothèse médicale. Pour pouvoir réaliser de telles applications, des développements restent à faire. Premièrement, il faudrait stabiliser la plateforme pour permettre la prolifération cellulaire. D'après les premières expériences réalisées, les cellules se détachent de la surface au bout de deux jours. Deux hypothèses sont envisageables : soit la plate-forme se détériore naturellement au cours du temps dans le milieu de culture, soit les cellules détruisent la plate-forme. La première hypothèse peut avoir deux origines : la dégradation naturelle de la SLB qui ne serait pas stable dans le milieu de culture ou le décrochage de la couche d'Anx5-peptide de la SLB, causée par une diminution de la quantité de calcium dans le milieu de culture. La deuxième hypothèse pourrait s'expliquer par l'internalisation des peptides (donc de la matrice 2D Anx5-peptide) par les cellules, comme cela a déjà été décrit pour des cellules endothéliales [177]. En plus de la stabilité temporelle, il faut vérifier que les forces d'adhésion soient assez importantes. Par exemple, dans le cas d'une pré-endothélialisation de capillaires artificiels, l'adhésion cellulaire doit résister aux forces de cisaillement imposées par le flux sanguin.

Pour développer la plate-forme 2D d'immobilisation d'anticorps et de protéines (Chapitre C-II), j'ai utilisé une protéine de fusion Anx5-ZZ, produite au LIMNT pour ce projet. Cette protéine comporte deux parties qui lui confèrent deux propriétés distinctes : sa partie Anx5 lui confère des propriétés uniques de liaison et d'organisation 2D à la surface des

SLB, et sa partie ZZ, dérivée de la protéine A, lui confère la possibilité de lier le fragment Fc des IgG avec une forte affinité (avec la même spécificité que la protéine A de *Staphylococcus aureus*). Mon travail a contribué à valider l'hypothèse initiale de travail, mettant en évidence que la plate-forme 2D d'Anx5-ZZ permet d'immobiliser de manière contrôlée des IgG et de construire des édifices supra-moléculaires complexes, comme des systèmes anticorps/antigènes de type sandwich. Cette plate-forme d'ancrage possède un intérêt certain dans le domaine des puces à protéines et des puces à anticorps et, à plus long terme, pour le développement de systèmes de diagnostic auprès du malade. Des développements sont à envisager dans plusieurs directions. Le choix de la méthode de détection est maintenant essentiel, car il entraînera des décisions sur le format final du senseur. Le deuxième axe de développement est l'évolution vers un système de puces à anticorps. La plate-forme réalisée à l'échelle unique doit maintenant être développée à l'échelle de dizaines, centaines ou milliers de plates-formes de quelques centaines de μm^2 , arrangées en réseaux et capables de présenter un anticorps différent. Pour cela, il est également nécessaire de décider du mode de dépôt.

L'étude fonctionnelle de l'Anx5 réalisée dans ce travail de thèse a porté principalement sur le mode d'action d'un anticorps anti-phospholipide dans le contexte du SAP (Chapitre C-III). Cette étude a révélé que l'anticorps anti-phospholipide CIC-15 pouvait coexister avec le réseau 2D d'Anx5 à la surface d'une membrane. Aucun effet perturbateur de la structure des réseaux 2D d'Anx5 n'a été mis en évidence, contrairement à ce qui a été proposé pour d'autres anticorps anti-phospholipides. En conséquence, cette étude met en évidence la diversité des modes d'action des anticorps anti-phospholipides. Enfin, j'ai montré que la formation des réseaux 2D d'Anx5 régulait la dynamique des membranes, en ralentissant la diffusion des lipides (Chapitre C-IV). Ces travaux contribuent à notre compréhension des propriétés des auto-assemblages 2D d'Anx5. L'étape suivante concerne évidemment l'élucidation du rôle, éventuel, de ces assemblages au niveau cellulaire et *in vivo*.

Références

- [1] Chee M, Yang R, Hubbell E, Berno A, Huang XC, Stern D, Winkler J, Lockhart DJ, Morris MS, Fodor SP. Accessing genetic information with high-density DNA arrays. *Science* 1996;274 (5287):610-4.
- [2] Hall D, Ptacek J, Snyder M. Protein microarray technology. *Mechanisms of Ageing and Development* 2007;128 (1):161-7.
- [3] Grosjean L, Cherif B, Mercey E, Roget A, Levy Y, Marche PN, Villiers MB, Livache T. A polypyrrole protein microarray for antibody-antigen interaction studies using a label-free detection process. *Anal Biochem* 2005;347 (2):193-200.
- [4] Bertone P, Snyder M. Advances in functional protein microarray technology. *FEBS Journal* 2005;272:5400-11.
- [5] Zhu H, Bilgin M, Bangham R, Hall D, Casamayor A, Bertone P, Lan N, Jansen R, Bidlingmaier S, Houfek T, Mitchell T, Miller P, Dean RA, Gerstein M, Snyder M. Global Analysis of Protein Activities Using Proteome Chips. *Science* 2001;293 (5537):2101-5.
- [6] Renault NK, Mirotti L, Alcocer MJC. Biotechnologies in new high-throughput food allergy tests: why we need them. *Biotechnol. Lett.* 2007;29:333-9.
- [7] Edidin M. Lipids on the Frontier: a Century of Cell-Membrane Bilayers. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2003;4:414-8.
- [8] Singer SJ, Nicolson GL. The Fluid Mosaic Model of the Structure of Cell Membranes. *Science* 1972;175:720-31.
- [9] Simons K, Meers Gv. Lipid Sorting in Epithelial Cells. *Biochemistry* 1988;27 (17):6197-202.
- [10] Simons K, Ikonen E. Functional rafts in cell membranes. *Nature* 1997;387:569-72.
- [11] Lorin A, Flore C, Thomas A, Brasseur R. Les liposomes : description, fabrication et applications. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 2004;8 (3):163-76.
- [12] Brisson A, Bergsma-Schutter W, Oling F, Lambert O, Reviakine I. Two-dimensional crystallization of proteins on lipid monolayers at the air-water interface and transfer to an electron microscopy grid. *Journal of Crystal Growth* 1999;196 (2-4):456-70.
- [13] Tanaka M, Sackman E. Polymer-supported membranes as models of the cell surface. *Nature* 2005;437:656-63.
- [14] Römer W, Lam YH, Fischer D, Watts A, Fischer WB, Göring P, Wehrspohn RB, Gösele U, Steinem C. Channel Activity of a Viral Transmembrane Peptide in Micro-BLMs: Vpu1-32 from HIV-1. *JACS* 2004;126 (49):16267-74.
- [15] Römer W, Steinem C. Impedance Analysis and Single-Channel Recordings on Nano-Black Lipid Membranes Based on Porous Alumina. *Biophys. J.* 2004;86 (2):955-65.
- [16] Brian AA, McConnell HM. Allogeneic stimulation of cytotoxic T cells by supported planar membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984;81 (19):6159-63.
- [17] Sackmann E. Supported Membranes: Scientific and Practical Applications. *Science* 1996;271 (5245):43-8.
- [18] Richter RP, Bérat R, Brisson AR. Formation of Solid-Supported Lipid Bilayers: An Integrated View. *Langmuir* 2006;22 (8):3497-505.
- [19] Niggemann G, Kummrow M, Helfrich W. The bending Rigidity of Phosphatidylcholine Bilayer: Dependances on Experimental Method, Sample Cell Sealing and Temperature. *J. Phys. II France* 1995;5:413-25.
- [20] Seifert U. Configuration of fluid membranes and vesicles. *Adv. Phys.* 1997;46:13-137.

- [21] Lipowsky R, Seifert U. Adhesion of Membranes: A Theoretical Perspective. *Langmuir* 1991;7 (9):1867-73.
- [22] Seifert U, Lipowsky R. Adhesion of vesicles. *Physical Review A* 1990;42 (8):4768-71.
- [23] Keller CA, Kasemo B. Surface Specific Kinetics of Lipid Vesicle Adsorption Measured with a Quartz Crystal Microbalance. *Biophys. J.* 1998;75 (3):1397-402.
- [24] Richter RP, Brisson A. Characterization of lipid bilayers and protein assemblies supported on rough surfaces by atomic force microscopy. *Langmuir* 2003;19:1632-40.
- [25] Nollert P, Kriefer H, Jähnig F. Lipid vesicle adsorption versus formation of planar bilayers on solid surfaces. *Biophys. J.* 1995;69 (4):1447.
- [26] Richter RP. The formation of Solid-Supported Lipid Membranes and Two-Dimensional Assembly of Proteins. Bordeaux: University Bordeaux 1, 2004.
- [27] Gerke V, Creutz CE, Moss SE. Annexins: linking Ca²⁺ signalling to membrane dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005;6 (6):449-61.
- [28] Seaton BA, Dedman JR. Annexins. *BioMetals* 1998;11:399-404.
- [29] Huber R, Römisch J, Paques E-P. The crystal and molecular structure of human annexin V, an anticoagulant protein that binds to calcium and membranes. *EMBO* 1990;9 (12):3867-74.
- [30] Raynal P, Pollard HB. Annexins: the problem of assessing the biological role for a gene family of multifunctional calcium- and phospholipid-binding proteins. *Biochim Biophys Acta* 1994;1197 (1):63-93.
- [31] Gerke V, Moss SE. Annexins: From Structure to Function. *Physiol. Rev.* 2002;82:331-71.
- [32] Gerke V, Moss SE. Annexins and membrane dynamics. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1997;1357:129-54.
- [33] Dachary-Prigent J, Freyssinet JM, Pasquet JM, Carron JC, Nurden AT. Annexin V as a probe of aminophospholipid exposure and platelet membrane vesiculation: a flow cytometry study showing a role for free sulfhydryl groups. *Blood* 1993;81 (10):2554-65.
- [34] Christmas P, Callaway J, Fallon J, Jones J, Haigler H. Selective secretion of annexin 1, a protein without a signal sequence, by the human prostate gland. *J. Biol. Chem.* 1991;266 (4):2499-507.
- [35] Flaherty M, West S, Heimark R, Fujikawa K, Tait J. Placental anticoagulant protein-I: measurement in extracellular fluids and cells of the hemostatic system. *J Lab Clin Med.* 1990;115 (2):174-81.
- [36] Perretti M, Gavins FN. Annexin 1: an endogenous anti-inflammatory protein. *News Physiol Sci* 2003;18:60-4.
- [37] Perretti M, Flower RJ. Annexin 1 and the biology of the neutrophil. *J Leukoc Biol* 2004;76 (1):25-9.
- [38] Moss SE, Morgan RO. The annexins. *Genome Biology* 2004;5 (4):219.
- [39] Donato R. Intracellular and extracellular roles of S100 proteins. *Microsc Res Tech* 2003;60 (6):540-51.
- [40] Drust DS, Creutz CE. Aggregation of chromaffin granules by calpactin at micromolar levels of calcium. *Nature* 1988;331 (6151):88-91.
- [41] Lambert O, Gerke V, Bader MF, Porte F, Brisson A. Structural analysis of junctions formed between lipid membranes and several annexins by cryo-electron microscopy. *J Mol Biol* 1997;272 (1):42-55.
- [42] Rescher U, Ruhe D, Ludwig C, Zobiack N, Gerke V. Annexin 2 is a phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate binding protein recruited to actin assembly sites at cellular membranes. *J Cell Sci* 2004;117 (Pt 16):3473-80.

- [43] Hayes MJ, Rescher U, Gerke V, Moss SE. Annexin-actin interactions. *Traffic* 2004;5 (8):571-6.
- [44] Hajjar KA, Jacovina AT, Chacko J. An endothelial cell receptor for plasminogen/tissue plasminogen activator. I. Identity with annexin II. *J Biol Chem* 1994;269 (33):21191-7.
- [45] Kim J, Hajjar KA. Annexin II: a plasminogen-plasminogen activator co-receptor. *Front Biosci* 2002;7:d341-8.
- [46] Oling F, Sopkova-de Oliveira Santos J, Govorukhina N, Mazères-Dubut C, Bergsma-Schutter W, Oostergetel G, Keegstra W, Lambert O, Lewit-Bentley A, Brisson A. Structure of Membrane-Bound Annexin A5 Trimers: A Hybrid Cryo-EM - X-ray Crystallography Study. *Journal of molecular biology* 2000;304:561-73.
- [47] Meers P. Location of tryptophans in membrane-bound annexins. *Biochemistry* 1990;29 (13):3325-30.
- [48] Meers P, Mealy T. Relationship between annexin V tryptophan exposure, calcium, and phospholipid binding. *Biochemistry* 1993;32 (20):5411-8.
- [49] Pigault C, Follenius-Wund A, Chabbert M. Role of Trp-187 in the annexin V-membrane interaction: a molecular mechanics analysis. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;254 (2):484-9.
- [50] Sopkova J, Renouard M, Lewit-Bentley A. The crystal structure of a new high-calcium form of annexin V. *J Mol Biol* 1993;234 (3):816-25.
- [51] Seaton BA. *Annexins: Molecular Structure to Cellular Function*. New-York: R.G. Landes Company and Chapman & Hall, 1996.
- [52] Brisson A, Olofsson A, Ringler P, Schmutz M, Stoylova S. Two-dimensional crystallization of proteins on planar lipid films and structure determination by electron crystallography. *Biology of the Cell* 1994;80:221-8.
- [53] Reviakine I, Bergsma-Schutter W, Mazerès-Dubut C, Govorukhina N, Brisson A. Surface Topography of the p3 and p6 Annexin V Crystal Forms Determined by Atomic Force Microscopy. *Journal of Structural Biology* 2000;131 (3):234-9.
- [54] Richter RP, Lai Kee Him J, Tessier B, Tessier C, Brisson AR. On the Kinetics of Adsorption and Two-Dimensional Self-Assembly of Annexin A5 on Supported Lipid Bilayers. *Biophys. J.* 2005;89 (5):3372-85.
- [55] Brisson A, Lewit-Bentley A. A Common Trimer of Annexin V as a Basic Unit in 2D and 3D Crystal Forms. In: Company RGL, editor. *Annexins: Molecular Structure to Cellular Function*: Seaton, B., 1996.
- [56] Oling F, Bergsma-Schutter W, Brisson A. Trimers, Dimers of Trimers, and Trimers of Trimers Are Common Building Blocks of Annexin A5 Two-Dimensional Crystals. *Journal of Structural Biology* 2001;133:55-63.
- [57] Reviakine I, Bergsma-Schutter W, Morozov A, Brisson A. Two dimensional crystallization of Annexin A5 on phospholipid bilayer and monolayer: a solid-solid phase transition between crystal form. *Langmuir* 2001;17 (5):1680-6.
- [58] Govorukhina N, Bergsma-Schutter W, Mazerès-Dubut C, Mazerès S, Drakopoulou E, Bystrykh L, Oling F, Mukhopadhyay A, Reviakine I, Lai Kee Him J, Brisson A. Self-Assembly of Annexin A5 on Lipid Membranes. In: Bioscience L, editor. *Annexins: Biological importance and annexin-related pathologies*: Bandorowicz-Pikula, J., 2003. pp. 61-78 (Chapter 4).
- [59] Reviakine I, Bergsma-Schutter W, Brisson A. Growth of Protein 2-D Crystals on Supported Planar Lipid Bilayers Imaged *in situ* by AFM. *Journal of Structural Biology* 1998;121:356-62.

- [60] Funakoshi T, Heimark RL, Hendrickson LE, McMullen BA, Fujikawa K. Human Placental Anticoagulant Protein: Isolation and Characterization. *Biochemistry* 1987;26 (17):5572-8.
- [61] Reutelingsperger C, Hornstra G, Hemker H. Isolation and partial purification of a novel anticoagulant from arteries of human umbilical cord. *Eur J Biochem.* 1985;151 (3):625-9.
- [62] van Heerde WL, Poort S, van 't Veer C, Reutelingsperger CP, de Groot PG. Binding of recombinant annexin V to endothelial cells: effect of annexin V binding on endothelial-cell-mediated thrombin formation. *Biochem J* 1994;302 (Pt 1):305-12.
- [63] Davidson F, Lister M, Dennies E. Binding and inhibition studies on lipocortine using phosphatidylcholine and phospholipase A2, pancreas and a macrophage-like cell line. *J. Biol. Chem.* 1990;265 (10):5602-9.
- [64] Harris EN, Pierangeli SS. 'Equivocal' antiphospholipid syndrome. *J Autoimmun* 2000;15 (2):81-5.
- [65] Roubey R. Autoantibodies to phospholipid-binding plasma proteins: a new view of lupus anticoagulants and other "antiphospholipid" autoantibodies. *Blood* 1994;84:2854-67.
- [66] Rand JH. Antiphospholipid antibody-mediated disruption of the annexin-V antithrombotic shield: a thrombogenic mechanism for the antiphospholipid syndrome. *J Autoimmun* 2000;15 (2):107-11.
- [67] Rand JH, Wu X-X, Andree HAM, Ross JBA, Rusinova E, Gascon-Lema MG, Calandri C, Harpel PC. Antiphospholipid Antibodies Accelerate Plasma Coagulation by Inhibiting Annexin V Binding to Phospholipids: A "Lupus Procoagulant" Phenomenon. *Blood* 1998;92 (5):1652-60.
- [68] Rand JH, Wu X-X. Antibody-mediated disruption of the Annexin-V anticoagulant shield: a new mechanism for thrombosis in the antiphospholipid syndrome. *Thromb Haemost* 1999;82:649-55.
- [69] Rand JH, Wu X-X, Quinn AS, Chen PP, McCrae KR, Bovill EG, Taatjes DJ. Human monoclonal antiphospholipid antibodies disrupt the annexin A5 anticoagulant crystal shield on phospholipid bilayer. Evidence from atomic force microscopy and functional assay. *American Journal of Pathology* 2003;163 (3):1193-200.
- [70] Kenis H, van Genderen H, Bennaghmouch A, Rinia H, Frederik P, Narula J, Hofstra L, Reutelingsperger C. Cell surface-expressed phosphatidylserine and annexin A5 open a novel portal of cell entry. *J. Biol. Chem.* 2004;279 (50):52623-9.
- [71] Reutelingsperger CP. Annexins: key regulators of haemostasis, thrombosis, and apoptosis. *Thromb Haemost* 2001;86 (1):413-9.
- [72] Kenis H, van Genderen H, Deckers NM, Lux PA, Hofstra L, Narula J, Reutelingsperger CP. Annexin A5 inhibits engulfment through internalization of PS-expressing cell membrane patches. *Exp Cell Res* 2006;312 (6):719-26.
- [73] Munoz LE, Franz S, Pausch F, Furnrohr B, Sheriff A, Vogt B, Kern PM, Baum W, Stach C, von Laer D, Brachvogel B, Poschl E, Herrmann M, Gaipf US. The influence on the immunomodulatory effects of dying and dead cells of Annexin V. *J Leukoc Biol* 2007;81 (1):6-14.
- [74] Gidon-Jeangirard C, Hugel B, Holl V, Toti F, Laplanche JL, Meyer D, Freyssinet JM. Annexin V delays apoptosis while exerting an external constraint preventing the release of CD4+ and PrPc+ membrane particles in a human T lymphocyte model. *J Immunol* 1999;162 (10):5712-8.
- [75] Monceau V, Belikova Y, Kratassiouk G, Charue D, Camors E, Communal C, Trouve P, Russo-Marie F, Charlemagne D. Externalization of endogenous annexin A5 participates in apoptosis of rat cardiomyocytes. *Cardiovasc Res* 2004;64 (3):496-506.

- [76] Fernandez P, Deguet A, Pothuau L, Belleannée G, Coste P, Bordenave L. Quality control assessment of ePTFE precoating procedure for in vitro endothelial cell seeding. *Biomaterials* 2005;26 (24):5042-7.
- [77] Vilamitjana-Amedee J, Bareille R, Rouais F, Caplan AI, Harmand MF. Human bone marrow stromal cells express an osteoblastic phenotype in culture. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 1993;29A (9):699-707.
- [78] Faucheux C, Ulysse F, Bareille R, Reddi AH, Amedee J. Opposing actions of BMP3 and TGF beta 1 in human bone marrow stromal cell growth and differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;241 (3):787-93.
- [79] Nagy A, Rossant J, Nagy R, Abramow-Newerly W, Roder JC. Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90 (18):424-8428.
- [80] Barany G, Merrifield RB. *The Peptides*. New York: E. Gross and J. Meienhofer Academic Press, 1979. pp. 1-284.
- [81] Golledge J, Turner RJ, Harley SL, Powell JT. Development of an in vitro model to study the response of saphenous vein endothelium to pulsatile arterial flow and circumferential deformation. *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery* 1997;13:605-12.
- [82] Amedee J, Bareille R, Jeandot R, Bordenave L, Remy M, Rouais F, Baquey C. Evaluation of cell colonization on biomaterials: preventing cell attachment to plastic containers. *Biomaterials* 1994;15 (12):1029-31.
- [83] Verrier S, Pallu S, Bareille R, Jonczyk A, Meyer J, M. D, Amédée J. Function of linear and cyclic RGD-containing peptides in osteoprogenitor cells adhesion process. *Biomaterials* 2002;23 (2):585-96.
- [84] Landegren U. Measurement of Cell Numbers by Means of the Endogenous Enzyme Hexosaminidase. Applications to Detection of Lymphokines and Cell Surface Antigens. *Journal of Immunological Methods* 1984;67:379-88.
- [85] Rodahl M, Höök F, Krozer A, Brzezinski P, Kasemo B. Quartz crystal microbalance setup for frequency and Q-factor measurements in gaseous and liquid environments. *Review of Scientific Instruments* 1995;66 (7):3924-30.
- [86] Richter R, Mukhopadhyay A, Brisson A. Pathways of vesicle deposition on solid surfaces: a combined QCM-D and AFM. *Biophysical Journal* 2003;85:3035-47.
- [87] Larsson C, Rodahl M, Höök F. Characterization of DNA Immobilization and Subsequent Hybridization on a 2D Arrangement of Streptavidin on a Biotin-Modified Lipid Bilayer Supported on SiO₂. *analytical Chemistry* 2003;75 (19):5080-7.
- [88] Fredricksson C, Kihlman S, Rodahl M, Kasemo B. The Piezoelectric Quartz Crystal Mass and Dissipation Sensor: A Means of Studying Cell Adhesion. *Langmuir* 1998;14:248-51.
- [89] Sauerbrey G. Verwendung von Schwingquarzen zur Wägung dünner Schichten und zur Mikrowägung. *Zeitschrift für Physik A Hadrons and Nuclei* 1959;155 (2):206-22.
- [90] Höök F, Kasemo B, Nylander T, Fant C, Sott K, Elwing H. Variations in Coupled Water, Viscoelastic Properties, and Film Thickness of a Mefp-1 Protein Film during Adsorption and Cross-Linking: A Quartz Crystal Microbalance with Dissipation Monitoring, Ellipsometry, and Surface Plasmon Resonance Study. *Analytical Chemistry* 2001;73 (24):5796-804.
- [91] Höök F, Vörös J, Rodahl M, Kurrat R, Bonni P, Ramsden JJ, Textor M, Spencer ND, Tengvall P, Gold J, Kasemo B. A comparative study of protein adsorption on titanium oxide surface using in situ ellipsometry, optical waveguide lightmode spectroscopy, and quartz crystal microbalance/dissipation. *Colloids and Surfaces B* 2002;24:155-70.

- [92] Fant C, Elwing H, Höök F. The Influence of Cross-Linking on Protein-Protein Interactions in a Marine Adhesive: The Case of Two Byssus Plaque Proteins from the Blue Mussel. *Biomacromolecules* 2002;3 (4):732-41.
- [93] Richter RP, Brisson A. QCM-D on Mica for Parallel QCM-D-AFM Studies. *Langmuir* 2004;20 (11):4609-13.
- [94] Richter RP, Brisson AR. Following the Formation of Supported Lipid Bilayers on Mica: A Study Combining AFM, QCM-D, and Ellipsometry. *Biophys. J.* 2005;88 (5):3422-33.
- [95] Bucur RV, Carlsson J-O, Mecea MV. Quartz-crystal mass sensors with glued foil electrodes. *Sensors and Actuators B: Chemical* 1996;37 (1-2):91-5.
- [96] Binnig G, Rohrer H. Scanning tunneling microscopy - from birth to adolescence. *Reviews of Modern Physics* 1987;59 (3):615-25.
- [97] Binnig G, Quate CF, Gerber C. Atomic Force Microscope. *Physical Review Letter* 1986;56 (9):930-3.
- [98] Binnig G. Force microscopy. *Ultramicroscopy* 1992;42-44:7-15.
- [99] Rief M, Clausen-Schaumann H, Gaub HE. Sequence-dependent mechanics of single DNA molecules. *Nature Structural Biology* 1999;6:346 - 9.
- [100] Rief M, Gautel M, Oesterhelt F, Fernandez JM, Gaub HE. Reversible Unfolding of Individual Titin Immunoglobulin Domains by AFM. *Science* 1997;276:1109-12.
- [101] Williams PM, Fowler SB, Best RB, Toca-Herrera JL, Scott KA, Steward A, Clarke J. Hidden complexity in the mechanical properties of titin. *Nature* 2003;422:446 - 9.
- [102] Möller C, Allen M, Elings V, Engel A, Müller DJ. Tapping-Mode Atomic Force Microscopy Produces Faithful High-Resolution Images of Protein Surfaces. *Biophys. J.* 1999;77:1150-8.
- [103] Bahatyrova S, Frese RN, Siebert CA, Olsen JD, Van der Werf KO, Van Grondelle R, Niederman RA, Bullough PA, Otto C, Hunter CN. The native architecture of a photosynthetic membrane. *Nature* 2004;430:1058-62.
- [104] Rothmund PWK. Folding DNA to create nanoscale shapes and patterns. *Nature* 2006;440:297-302.
- [105] Simon A, Durrieu M-C. Strategies and results of atomic force microscopy in the study of cellular adhesion. *Micron* 2005;In Press, Corrected Proof.
- [106] Müller DJ, Schoenenberger C-A, Schabert F, Engel A. Structural Changes in Native Membrane Proteins Monitored at Subnanometer Resolution with the Atomic Force Microscope: A Review. *Journal of Structural Biology* 1997;119 (2):149-57.
- [107] Ando T, Kodera N, Takai E, Maruyama D, Saito K, Toda A. A high-speed atomic force microscope for studying biological macromolecules. *PNAS* 2001;98 (22):12468-72.
- [108] Müller DJ, Dencher NA, Meier T, Dimroth P, Suda K, Stahlberg H, Engel A, Seelert H, Matthey U. ATP synthase: constrained stoichiometry of the transmembrane rotor. *FEBS Letters* 2001;504 (3):219-22.
- [109] Györvary ES, Stein O, Pum D, Sleytr UB. Self-assembly and recrystallization of bacterial S-layer proteins at silicon supports imaged in real time by atomic force microscopy. *Journal of Microscopy* 2003;212 (3):300-6.
- [110] Scheuring S, Müller DJ, Ringler P, Heymann JB, Engel A. Imaging streptavidin 2D crystals on biotinylated lipid monolayers at high resolution with the atomic force microscope. *Journal of Microscopy* 1999;193 (1):28-35.
- [111] Mou J, Yang J, Shao Z. Atomic force microscopy of cholera toxin B oligomers bound to bilayers of biologically relevant lipids. *J Mol Biol* 1995;248:507-12.

- [112] Axelrod D, Koppel DE, Schlessinger J, Elson E, Webb W. Mobility Measurement by Analysis of Fluorescence Photobleaching Recovery Kinetics. *Biophys. J.* 1976;16:1055-69.
- [113] Soumpasis DM. Theoretical Analysis of Fluorescence Photobleaching Recovery Experiments. *Biophys. J.* 1983;41:95-7.
- [114] Lopez A, Dupou L, Altibelli A, Trotard J. Fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) experiments under conditions of uniform disk illumination. *Biophys. J.* 1988;53:963.
- [115] Hynes RO. Integrins : Bidirectional, Allosteric Signaling Machines. *Cell* 2002;110 (6):673-87.
- [116] van der Flier A, Sonnenberg A. Function and interactions of integrins. *Cell Tissue Res.* 2001;305 (3):285-98.
- [117] Pierschbacher MD, Ruoslahti E. Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule. *Nature* 1984;309 (5963):30-3.
- [118] Plow E, Haas T, Zhang L, Loftus J, Smith J. Ligand binding to integrins. *J Biol Chem* 2000;275 (29):21785-8.
- [119] Ruoslahti E. RGD and other recognition sequences for integrins. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 1996;12:697-715.
- [120] Pierschbacher MD, Ruoslahti E. Variants of the Cell Recognition Site of Fibronectin That Retain Attachment-Promoting Activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1984;81 (19):5985-8.
- [121] Durrieu M-C. Conception, elaboration et caracterisation de materiaux bioactifs. *ITBM-RBM* 2005;26 (3):229-37.
- [122] Hynes RO. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 1992;69 (1):11-25.
- [123] Sasaki M, Kleinman H, Huber H, R D, Yamada Y. Laminin, a multidomain protein. The A chain has a unique globular domain and homology with the basement membrane proteoglycan and the laminin B chains. *J. Biol. Chem.* 1988;263 (32):16536-44.
- [124] Tashiro K, Sephel G, Weeks B, Sasaki M, Martin G, Kleinman H, Yamada Y. A synthetic peptide containing the IKVAV sequence from the A chain of laminin mediates cell attachment, migration, and neurite outgrowth. *J. Biol. Chem.* 1989;264 (27):16174-82.
- [125] Svedhem S, Dahlborg D, Ekeröth J, Kelly J, Höök F, Gold J. In Situ Peptide-Modified Supported Lipid Bilayers for Controlled Cell Attachment. *Langmuir* 2003;19 (17):6730-6.
- [126] Magnusson MK, Mosher DF. Fibronectin : Structure, Assembly, and Cardiovascular Implications. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1998;18:1363-70.
- [127] Graf J, Iwamoto Y, Sasaki M, Martin GR, Kleinman HK, Robey FA, Yamada Y. Identification of an amino acid sequence in laminin mediating cell attachment, chemotaxis, and receptor binding. *Cell* 1987;48 (6):989-96.
- [128] Kikuchi A, Okano T. Nanostructured designs of biomedical materials: applications of cell sheet engineering to functional regenerative tissues and organs. *Journal of Controlled Release* 2005;101 (1-3):69-84.
- [129] Dillow AK, Tirrell M. Targeted cellular adhesion at biomaterial interfaces. *Current Opinion in Solid State and Materials Science* 1998;3 (3):252-9.
- [130] Hubbell JA. Bioactive biomaterials. *Current Opinion in Biotechnology* 1999;10 (2):123-9.

- [131] Tirrell M, Kokkoli E, Biesalski M. The role of surface science in bioengineered materials. *Surface Science* 2002;500 (1-3):61-83.
- [132] Hersel U, Claudia D, Horst K. RGD modified polymers: biomaterials for stimulated cell adhesion and beyond. *Biomaterials* 2003;24 (24):4385-415.
- [133] Schuler M, Owen G, Hamilton D, de Wild M, Textor M, DM B, Tosatti S. Biomimetic modification of titanium dental implant model surfaces using the RGDSP-peptide sequence: a cell morphology study. *Biomaterials* 2006;27 (21):4003-15.
- [134] Houseman BT, Gawalt ES, Mrksich M. Maleimide-Functionalized Self-Assembled Monolayers for the Preparation of Peptide and Carbohydrate Biochips. *Langmuir* 2003;19 (5):1522-31.
- [135] Groves JT, Dustin ML. Supported planar bilayers in studies on immune cell adhesion and communication. *Journal of Immunological Methods* 2003;278 (1-2):19-32.
- [136] Walluscheck K, Steinhoff G, Kelm S, Haverich A. Improved endothelial cell attachment on ePTFE vascular grafts pretreated with synthetic RGD-containing peptides. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 1996;12 (3):321-30.
- [137] Yang XB, Roach HI, Clarke NMP, Howdle SM, Quirk R, Shakesheff KM, Oreffo ROC. Human osteoprogenitor growth and differentiation on synthetic biodegradable structures after surface modification. *Bone* 2001;29 (6):523-31.
- [138] Ochsenhirt SE, Kokkoli E, McCarthy JB, Tirrell M. Effect of RGD secondary structure and synergy site PHSRN on cell adhesion, spreading and specific integrin engagement. *Biomaterials* 2006;27:3863-74.
- [139] Stroumpoulis D, Zhang H, Rubalcava L, Gliem J, Tirrell M. Cell Adhesion and Growth to Peptide-Patterned Supported Lipid Membranes. *Langmuir* 2007;23:3849-56.
- [140] Jensen T, Hu B, Delatore S, Garcia A, Messersmith P, Miller W. Lipopeptides incorporated into supported phospholipid monolayers have high specific activity at low incorporation levels. *J Am Chem Soc.* 2004;126 (46):15223-30.
- [141] Marchi-Artzner V, Lorz B, Hellerer U, Kantlehner M, Kessler H, Sackmann E. Selective adhesion of endothelial cells to artificial membranes with a synthetic RGD-lipopeptide. *Chemistry* 2001;7 (5):1095-101.
- [142] Pakalns T, Haverstick KL, Fields GB, McCarthy JB, Mooradian DL, Tirrell M. Cellular recognition of synthetic peptide amphiphiles in self-assembled monolayer films. *Biomaterials* 1999;20:2265-79.
- [143] Thid D, Holm K, Eriksson PS, Ekeröth J, Kasemo B, Gold J. Supported phospholipid bilayers as a platform for neural progenitor cell culture. *J. Biomed. Mater. Res. A* 2007.
- [144] Dori Y, Bianco-Peled H, Satija S, Fields G, McCarthy J, Tirrell M. Ligand accessibility as means to control cell response to bioactive bilayer membranes. *J Biomed Mater Res.* 2000;50 (1):75-81.
- [145] Thid D. Functionalization and characterization of surface supported lipid membranes and their application in cell culture. Department of Applied Physics. Göteborg: Chalmers University of Technology, 2007.
- [146] Uzgiris E, Kornberg R. Two-dimensional crystallization technique for imaging macromolecules, with application to antigen--antibody--complement complexes. *Nature* 1983;301 (5896):125-9.
- [147] Patel N, Padera R, Sanders G, Cannizzaro S, Davies M, Langer R, Roberts C, Tendler S, Williams P, Shakesheff K. Spatially controlled cell engineering on biodegradable polymer surfaces. *FASEB J.* 1998;12 (14):1447-54.
- [148] Jarrell B, Levine E, Shapiro S, Williams S, Carabasi RA, Mueller S, Thornton S. Human adult endothelial cell growth in culture. *J. Vasc. Surg.* 1984;1 (6):757-64.

- [149] Relou IAM, Damen CA, van der Schaft DWJ, Groenewegen G, Griffioen AW. Effect of culture conditions on endothelial cell growth and responsiveness. *Tissue and Cell* 1998;30 (5):525-30.
- [150] Arnold M, Cavalcanti-Adam EA, Glass R, Blümmel J, Eck W, Kantele M, Kessler H, Spatz JP. Activation of integrin function by nanopatterned adhesive interfaces. *ChemPhysChem* 2004;5 (3):383 - 8.
- [151] Janshoff A, Steinem C. Transport across artificial membranes-an analytical perspective. *Anal Bioanal Chem.* 2006;385 (3):433-51.
- [152] Engvall E, Perlman P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry* 1971;8 (9):871-4.
- [153] Tawa K, Knoll W. Mismatching base-pair dependence of the kinetics of DNA-DNA hybridization studied by surface plasmon fluorescence spectroscopy. *Nucleic Acids Res* 2004;32 (8):2372-7.
- [154] Tremplin MF, Stoll D, Schrenk M, Traub PC, Vöhringer CF, Joos TO. Protein microarray technology. *Trends in Biotechnology* 2002;20 (4):160-6.
- [155] LaBaer J, Ramachandran N. Protein microarrays as tools for functional proteomics. *Current Opinion in Chemical Biology* 2005;9 (1):14-9.
- [156] Kusnezow W, Jacob A, Walijew A, Diehl F, Hoheisel JD. Antibody microarrays: An evaluation of production parameters. *Proteomics* 2003;3:254-64.
- [157] Suraniti E, Sollier E, Calemczuk R, Livache T, Marche PN, Villiers MB, Roupioz Y. Real-time detection of lymphocytes binding on an antibody chip using SPR imaging. *Lab Chip* 2007;7 (9):1206-8.
- [158] Peluso P, Wilson DS, Do D, Tran H, Venkatasubbaiah M, Quincy D, Heidecker B, Poindexter K, Tolani N, Phelan M, Witte K, Jung LS, Wagner P, Nock S. Optimizing antibody immobilization strategies for the construction of protein microarrays. *Anal Biochem* 2003;312 (2):113-24.
- [159] Forsgren A, Sjöquist J. "Protein A" from *S. Aureus*: I. Pseudo-Immune Reaction with Human $\{\gamma\}$ -Globulin. *J Immunol* 1966;97 (6):822-7.
- [160] Uhlén M, Guss B, Nilsson B, Gatenbeck S, Philipson L, Lindberg M. Complete sequence of the staphylococcal gene encoding protein A. A gene evolved through multiple duplications. *The journal of Biological Chemistry* 1984;259 (3):1695-702.
- [161] Moks T, Abrahmsén L, Nilsson B, Hellman U, Sjöquist J, Uhlén M. Staphylococcal protein A consists of five IgG-binding domains. *Eur. J. Biochem* 1986;156:637-43.
- [162] Uhlén M, Lindberg M, Philipson L. The gene for staphylococcal protein A and its use in immunology. *Immunol. Today* 1984;5:244-8.
- [163] Deisenhofer J. Crystallographic Refinement and atomic models of a human Fc fragment and its complex with fragment B of Protein A from *Staphylococcus aureus* at 2.9- and 2.8-Å resolution. *Biochemistry* 1981;20 (9):2361-70.
- [164] Nilsson B, Moks T, Jansson B, Abrahmsén L, Elmblad A, Holmgren E, Henrichson C, Jones TA, Uhlén M. A synthetic IgG-binding domain based on staphylococcal protein A. *Protein Engineering* 1987;1 (2):107-13.
- [165] Harlow, Lane. *Antibodies: A Laboratory Manual*. N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory, 1988.
- [166] Jendeberg L, Persson B, Andersson R, Karlsson R, Uhlén M, Nilsson B. Kinetic analysis of the interaction between protein A domain variants and human Fc using plasmon resonance detection. *J Mol Recognit.* 1995;8 (4):270-8.
- [167] Nizard P, Liger D, Gaillard C, Gillet D. Anchoring antibodies to membranes using a diphtheria toxin T domain-ZZ fusion protein as a pH sensitive membrane anchor. *FEBS Letters* 1998;433 (1-2):83-8.

- [168] Huang L, Reekmans G, Saerens D, Friedt J-M, Frederix F, Francis L, Muyldermans S, Campitelli A, Hoof CV. Prostate-specific antigen immunosensing based on mixed self-assembled monolayers, camel antibodies and colloidal gold enhanced sandwich assays. *Biosensors and Bioelectronics* 2005;21 (3):483-90.
- [169] Catalona W, Richie J, Ahmann F, Hudson M, Scardino P, Flanigan R, deKernion J, Ratliff T, Kavoussi L, Dalkin B. Comparison of digital rectal examination and serum prostate specific antigen in the early detection of prostate cancer: results of a multicenter clinical trial of 6,630 men. *The journal of Urology* 1994;151 (5):1283-90.
- [170] Lieby P, Poindron V, Roussi S, Klein C, Knapp A-M, Garaud J-C, Cerutti M, Martin T, Pasquali J-L. Pathogenic antiphospholipid antibody: an antigen-selected needle in a haystack. *Blood* 2004;104 (6):1711-5.
- [171] Babiychuk EB, Draeger A. Annexins in cell membrane dynamics. Ca(2+)-regulated association of lipid microdomains. *J Cell Biol* 2000;150 (5):1113-24.
- [172] Saurel O, Cezanne L, Milon A, Tocanne J-F, Demange P. Influence of Annexin V on the Structure and Dynamics of Phosphatidylcholine/Phosphatidylserine Bilayers: A Fluorescence and NMR Study. *Biochemistry* 1998;37 (5):1403-10.
- [173] Cezanne L, Lopez A, Loste F, Parnaud G, Saurel O, Demange P, Tocanne J-F. Organization and Dynamics of the Proteolipid Complexes Formed by Annexin V and Lipids in Planar Supported Lipid Bilayers. *Biochemistry* 1999;38 (9):2779-86.
- [174] Gilmanshin R, Creutz CE, Tamm LK. Annexin IV Reduces the Rate of Lateral Lipid Diffusion and Changes the Fluid Phase Structure of the Lipid Bilayer When It Binds to Negatively Charged Membranes in the Presence of Calcium. *Biochemistry* 1994;33 (27):8225.
- [175] Richter RP, Maury N, Brisson AR. On the Effect of the Solid Support on the Interleaflet Distribution of Lipids in Supported Lipid Bilayers. *Langmuir* 2005;21 (1):299-304.
- [176] Rossetti FF, Textor M, Reviakine I. Asymmetric distribution of phosphatidyl serine in supported phospholipid bilayers on titanium dioxide. *Langmuir* 2006;22 (8):3467-73.
- [177] Schraa AJ, Kok RJ, Berendsen AD, Moorlag HE, Bos EJ, Meijer DKF, de Leij LFMH, Molema G. Endothelial cells internalize and degrade RGD-modified proteins developed for tumor vasculature targeting. *Journal of Controlled Release* 2002;83 (2):241-51.

Article I

Richter RP, Bérat R, Brisson AR.

Formation of Solid-Supported Lipid Bilayers: An Integrated View

Langmuir 2006, **22** (8), p. 3497-3505

Formation of Solid-Supported Lipid Bilayers: An Integrated View

Ralf P. Richter,^{*,†} Rémi Bérat, and Alain R. Brisson

Laboratoire d'Imagerie Moléculaire et Nanobiotechnologie, IECB, UMR-CNRS 5471, Université Bordeaux I, 2 Rue Robert Escarpit, 33607 Pessac Cedex, France

Received October 4, 2005. In Final Form: November 22, 2005

Supported lipid bilayers (SLBs) are popular models of cell membranes with potential bio-technological applications. A qualitative understanding of the process of SLB formation after exposure of small lipid vesicles to a hydrophilic support is now emerging. Recent studies have revealed a stunning variety of effects that can take place during this self-organization process. The ensemble of results in our group has revealed unprecedented insight into intermediates of the SLB-formation process and has helped to identify a number of parameters that are determinant for the lipid deposition on solid supports. The pathway of lipid deposition can be tuned by electrostatic interactions and by the presence of calcium. We emphasize the importance of the solid support in the SLB-formation process. Our results suggest that the molecular-level interaction between lipids and the solid support needs to be considered explicitly, to understand the rupture of vesicles and the formation of SLBs as well as to predict the properties of the resulting SLB. The impact of the SLB-formation process on the quality and the physical properties of the resulting SLB as well as implications for other types of surface-confined lipid bilayers are discussed.

Introduction

Biological membranes play key roles in cell life, controlling the transfer of information and the transport of ions and molecules between the inside and outside cellular worlds and participating in various intra- and extracellular processes. These highly complex and dynamic assemblies, only a few nanometers thick, consist of two main components: a two-dimensional space made of lipid molecules held together by hydrophobic interactions and self-assembled as a continuous bilayer and proteins embedded within the membrane or transiently associated with it.

Our current knowledge of the molecular processes occurring at biological membranes is based on studies performed both on integrated and on reconstituted systems using models of biological membranes. The deposition of model membranes on solid supports has become very popular,^{1–3} both for studying basic membrane processes and for possible biotechnological applications.^{4–16} The growing interest in confining lipid membranes on

surfaces has been nourished by the emergence of a multitude of surface-sensitive characterization techniques,^{5,17–19} advanced surface patterning methods,^{5,20–24} and liquid handling systems (microfluidics).¹⁰

During the past decade the conceptual base of surface-confined membrane systems has grown considerably. A large number of systems has been described, including solid-supported lipid bilayers,^{9,11,15,25,26} polymer-cushioned lipid bilayers,^{27–29} hybrid bilayers,^{30,31} tethered lipid bilayers,³² suspended lipid bilayers,^{33,34} or supported vesicular layers^{22,35} (Figure 1). In parallel, a multitude of methods has been proposed to create such biomimetic edifices, including Langmuir-type approaches (Langmuir–Blodgett or Langmuir–Schäfer deposition)^{36–39} and the spreading of vesicles on various preconditioned supports.^{20,38,40–44}

- (17) Shao, Z.; Mou, J.; Czajkowsky, D. M.; Yang, J.; Yuan, J.-Y. *Adv. Phys.* **1996**, *45*, 1–86.
- (18) Knoll, W. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **1998**, *49*, 569–638.
- (19) Höök, F.; Larsson, C.; Fant, C. In *Encyclopedia of Surface and Colloid Science*; Marcel Dekker: New York, 2002; pp 774–791.
- (20) Srinivasan, M. P.; Ratto, T. V.; Stroeve, P.; Longo, M. L. *Langmuir* **2001**, *17*, 7951–7954.
- (21) Michel, R.; Reviakine, I.; Sutherland, D.; Fokas, C.; Csucs, G.; Danuser, G.; Spencer, N. D.; Textor, M. *Langmuir* **2002**, *18*, 8580–8586.
- (22) Svedhem, S.; Pfeiffer, I.; Larsson, C.; Wingren, C.; Borrebaeck, C.; Höök, F. *ChemBioChem* **2003**, *4*, 339–343.
- (23) Morigaki, K.; Kiyosue, K.; Taguchi, T. *Langmuir* **2004**, *20*, 7729–7735.
- (24) Jackson, B. L.; Groves, J. T. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 13878–13879.
- (25) Brian, A. A.; McConnell, H. M. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1984**, *81*, 6159–6163.
- (26) Lenz, P.; Ajo-Franklin, C. M.; Boxer, S. G. *Langmuir* **2004**, *20*, 11092–11099.
- (27) Goennenwein, S.; Tanaka, M.; Hu, B.; Moroder, L.; Sackmann, E. *Biophys. J.* **2003**, *85*, 646–655.
- (28) Wagner, M. L.; Tamm, L. K. *Biophys. J.* **2001**, *81*, 266–275.
- (29) Munro, J. C.; Frank, C. W. *Langmuir* **2004**, *20*, 10567–10575.
- (30) Silin, V. I.; Wieder, H.; Woodward, J. T.; Valincius, G.; Offenhausser, A.; Plant, A. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 14676–14683.
- (31) Terretaz, S.; Mayer, M.; Vogel, H. *Langmuir* **2003**, *19*, 5567–5569.
- (32) Purrucker, O.; Förtig, A.; Jordan, R.; Tanaka, M. *ChemPhysChem* **2004**, *5*, 327–335.
- (33) Römer, W.; Lam, Y. H.; Fischer, D.; Watts, A.; Fischer, W. B.; Göring, P.; Wehrspohn, R. B.; Gösele, U.; Steinem, C. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 16267–16274.
- (34) Römer, W.; Steinem, C. *Biophys. J.* **2004**, *86*, 955–965.
- (35) Yoshina-Ishii, C.; Boxer, S. G. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 3696–3697.
- (36) Swart, R. M. In *Langmuir–Blodgett Films*; Roberts, G., Ed.; Plenum Press: New York, 1990; pp 273–316.
- (37) Grandbois, M.; Clausen-Schaumann, H.; Gaub, H. E. *Biophys. J.* **1998**, *74*, 2398–2404.

* Corresponding author. E-mail: ralf.richter@urz.uni-heidelberg.de.

† Current address: Department of Biophysical Chemistry, Institute of Physical Chemistry, Heidelberg University, Im Neuenheimer Feld 253, 69120 Heidelberg, Germany.

- (1) Sackmann, E. *Science* **1996**, *271*, 43–48.
- (2) Boxer, S. G. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2000**, *4*, 704–709.
- (3) Knoll, W.; Frank, C. W.; Heibel, C.; Naumann, R.; Offenhausser, A.; Rühle, J.; Schmidt, E. K.; Shen, W. W.; Sinner, A. *Rev. Mol. Biotechnol.* **2000**, *74*, 137–158.
- (4) Bieri, C.; Ernst, O. P.; Heyse, S.; Hofmann, K. P.; Vogel, H. *Nat. Biotechnol.* **1999**, *17*, 1105–1108.
- (5) Kung, L. A.; Kam, L.; Hovis, J. S.; Boxer, S. G. *Langmuir* **2000**, *16*, 6773–6776.
- (6) Sapuri, A. R.; Baksh, M. M.; Groves, J. T. *Langmuir* **2003**, *19*, 1606–1619.
- (7) Sackmann, E.; Tanaka, M. *Trends Biotechnol.* **2000**, *18*, 58–64.
- (8) Knoll, W.; Park, H.; Sinner, E. K.; Yao, D.; Yu, F. *Surf. Sci.* **2004**, *570*, 30–42.
- (9) Reviakine, I.; Brisson, A. *Langmuir* **2001**, *17*, 8293–8299.
- (10) Kam, L.; Boxer, S. G. *Langmuir* **2003**, *19*, 1624–1631.
- (11) Larsson, C.; Rodahl, M.; Höök, F. *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 5080–5087.
- (12) Milhiet, P. E.; Giocondi, M.-C.; Baghdadi, O.; Ronzon, F.; Roux, B.; le Grimellec, C. *EMBO Rep.* **2002**, *3*, 485–490.
- (13) Yip, C. M.; Darabie, A. A.; McLaurin, J. *J. Mol. Biol.* **2002**, *318*, 97–107.
- (14) Salafsky, J.; Groves, J. T.; Boxer, S. G. *Biochemistry* **1996**, *35*, 5, 14773–14781.
- (15) Reviakine, I.; Bergsma-Schutter, W.; Brisson, A. *J. Struct. Biol.* **1998**, *121*, 356–361.
- (16) Watts, T. H.; Brian, A. A.; Kappler, J. W.; Marrack, P.; McConnell, H. M. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1984**, *81*, 7564–7568.

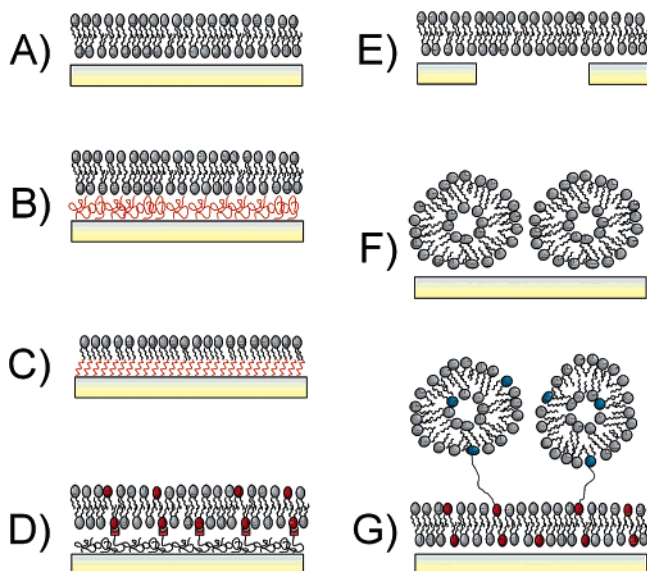


Figure 1. Surface-confined membrane models: (A) solid-supported lipid bilayer; (B) polymer-cushioned lipid bilayer; (C) hybrid bilayer, consisting of a self-assembled monolayer (e.g., thiols on Au or silanes on glass or silica) and a lipid monolayer; (D) tethered lipid bilayer; (E) freely suspended lipid bilayer; (F–G) supported vesicular layers.

The spreading of small lipid vesicles on hydrophilic solid supports, pioneered by McConnell et al.,²⁵ presents an attractive and simple route to form supported lipid bilayers (SLBs). The one-step procedure allows creating SLBs of different lipid mixtures.^{45,46} The fact that such SLBs form a fluid two-dimensional space allowing free diffusion in translation and rotation of lipid molecules and lipid-associated proteins makes them well suited to analyze lipid domain formation,^{13,47–54} intermembrane interactions,^{55–57} or membrane processes such as protein adsorption,^{58,59} protein self-assembly,^{13,48,60} protein localization at lipid phase boundaries,¹² or protein function.³⁷

(38) Wong, J. Y.; Majewski, J.; Seitz, M.; Park, C. K.; Israelachvili, J.; Smith, G. S. *Biophys. J.* **1999**, *77*, 1445–1457.

(39) Ross, M.; Steinem, C.; Galla, H.-J.; Janshoff, A. *Langmuir* **2001**, *17*, 2437–2445.

(40) Steinem, C.; Janshoff, A.; Ulrich, W.-P.; Sieber, M.; Galla, H.-J. *Biochim. Biophys. Acta* **1996**, *1279*, 169–180.

(41) Keller, C. A.; Kasemo, B. *Biophys. J.* **1998**, *75*, 1397–1402.

(42) Starr, T. E.; Thompson, N. L. *Langmuir* **2000**, *16*, 10301–10308.

(43) Zhao, J.; Tamm, L. K. *Langmuir* **2003**, *19*, 1838–1846.

(44) Baumgart, T.; Offenhäuser, A. *Langmuir* **2003**, *19*, 1730–1737.

(45) Richter, R. P.; Mukhopadhyay, A.; Brisson, A. *Biophys. J.* **2003**, *85*, 3035–3047.

(46) Richter, R. P.; Brisson, A. *Biophys. J.* **2005**, *88*, 3422–3433.

(47) Mou, J.; Yang, J.; Shao, Z. *J. Mol. Biol.* **1995**, *248*, 507–512.

(48) Reviakine, I.; Simon, A.; Brisson, A. *Langmuir* **2000**, *16*, 1473–1477.

(49) Schneider, J.; Dufrière, Y. F.; Barger, W. R., Jr.; Lee, G. U. *Biophys. J.* **2000**, *79*, 1107–1118.

(50) Rinia, H. A.; Kruijff, B. d. *FEBS Lett.* **2001**, *504*, 194–199.

(51) Lawrence, J. C.; Saslow, D. E.; Edwardson, J. M.; Henderson, R. M. *Biophys. J.* **2003**, *84*, 1827–1832.

(52) Tokumasu, F.; Jin, A. J.; Feigenson, G. W.; Dvorak, J. A. *Biophys. J.* **2003**, *84*, 2609–2618.

(53) Giocondi, M.-C.; Milhiet, P. E.; Dosset, P.; le Grimellec, C. *Biophys. J.* **2004**, *86*, 861–869.

(54) Janshoff, A.; Bong, D. T.; Steinem, C.; Johnson, J. E.; Ghadiri, M. R. *Biochemistry* **1999**, *38*, 5328–5336.

(55) Kaizuka, Y.; Groves, J. T. *Biophys. J.* **2004**, *86*, 905–912.

(56) Parthasarathy, R.; Groves, J. T. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2004**, *101*, 12798–12803.

(57) Fix, M.; Melia, T. J.; Jaiswal, J. K.; Rappoport, J. Z.; You, D.; Söllner, T. H.; Rothman, J. E.; Simon, S. M. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2004**, *101*, 7311–7316.

(58) Corsel, J. W.; Willems, G. M.; Kop, J. M. M.; Cuyper, P. A.; Hermens, W. T. *J. Colloid Interface Sci.* **1986**, *111*, 544–554.

(59) Andree, H. A. M.; Stuart, M. C. A.; Hermens, W. T.; Reutelingsperger, C. P. M.; Hemker, H. C.; Frederik, P. M.; Willems, G. M. *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 17907–17912.

(60) Czaikowsky, D. M.; Shao, Z. *FEBS Lett.* **1998**, *430*, 51–54.

The self-organization steps involved in this method—vesicle adsorption, rupture, and spreading into planar membranes—present fundamental interest in colloidal and interfacial science. Both theoretical^{61–63} and experimental work^{41,45,64–70} during the past decade have considerably improved the general understanding of this process, and a detailed image of the structural intermediates and the driving forces is now emerging. Figure 2 shows four archetypes of lipid deposition processes, as followed by quartz crystal microbalance with dissipation monitoring (QCM-D). The QCM-D technique has proven very valuable to screen the overall properties of the lipid deposition,⁴¹ thanks to the dissipation parameter that allows distinguishing between intact, adsorbed vesicles (high dissipation) and bilayer patches (low dissipation). As shown in the schemes in Figure 2, vesicles either do not adsorb (Figure 2A), adsorb and remain intact, giving rise to a supported vesicular layer (SVL) (Figure 2B), or form an SLB (Figure 2, panels C and D). Notably, SLB formation can occur via two scenarios with distinctly different kinetics. In one case, vesicles rupture quickly upon interaction with the solid support (Figure 2D), whereas in the other, a large amount of intact vesicles is adsorbed at an intermediate state of the process (Figure 2C).

Recent technical developments, combining QCM-D and atomic force microscopy (AFM), have allowed us to characterize the intermediate states leading to SLB formation in unprecedented detail. Here we present an overview of work performed in our group that sheds light on the mechanisms and critical parameters involved in the formation of SLBs as well as on the properties and the quality of the resulting SLB.

Mechanism of SLB Formation

To satisfactorily describe the mechanism of SLB formation, two critical steps in this process need to be understood: (i) the adhesion and rupture of vesicles on the support and (ii) the evolution of the supported bilayer patches thus formed into a complete SLB. Figure 3 provides an overview of mechanisms of vesicle rupture that have been reported or suggested in the literature.

Stability of Adsorbed Vesicles. A simple rationale to evaluate the binding and the stability of surface-bound vesicles was provided by the theory of Seifert and Lipowsky.^{62,71} In their continuum approach, where the bilayer is treated as a thin two-dimensional sheet embedded in three-dimensional space, the balance between the gain in adhesion energy (as given by the adhesion area) and the cost in the vesicles' curvature energy (as given by the bilayer's bending rigidity) is determinant for the adsorption, deformation, and rupture of vesicles. Initial data in our group provided support for this model for egg-PC on mica.⁶⁷ The examples given in Figure 2, panels A, B, and D, exemplify the scenarios where vesicles do not adsorb, adsorb intact, and rupture spontaneously, respectively.

However, recent experimental data have provided evidence that this continuum approach does not convey the whole answer

(61) Seifert, U.; Lipowsky, R. *Phys. Rev. A* **1990**, *42*, 4768–4771.

(62) Seifert, U. *Adv. Phys.* **1997**, *46*, 13–137.

(63) Zhdanov, V. P.; Keller, C. A.; Glasmästar, K.; Kasemo, B. *J. Chem. Phys.* **2000**, *112*, 900–909.

(64) Rädler, J.; Strey, H.; Sackmann, E. *Langmuir* **1995**, *11*, 4539–4548.

(65) Keller, C. A.; Glasmästar, K.; Zhdanov, V. P.; Kasemo, B. *Phys. Rev. Lett.* **2000**, *84*, 5443–5446.

(66) Jass, J.; Tjärnhage, T.; Puu, G. *Biophys. J.* **2000**, *79*, 3153–3163.

(67) Reviakine, I.; Brisson, A. *Langmuir* **2000**, *16*, 1806–1815.

(68) Johnson, J. M.; Taekjip, H.; Chu, S.; Boxer, S. G. *Biophys. J.* **2002**, *83*, 3371–3379.

(69) Reimhult, E.; Höök, F.; Kasemo, B. *Langmuir* **2003**, *19*, 1681–1691.

(70) Benes, M.; Billy, D.; Benda, A.; Speijer, H.; Hof, M.; Hermens, W. T. *Langmuir* **2004**, *20*, 10129–10137.

(71) Lipowsky, R.; Seifert, U. *Mol. Cryst. Liq. Cryst.* **1991**, *202*, 17–25.

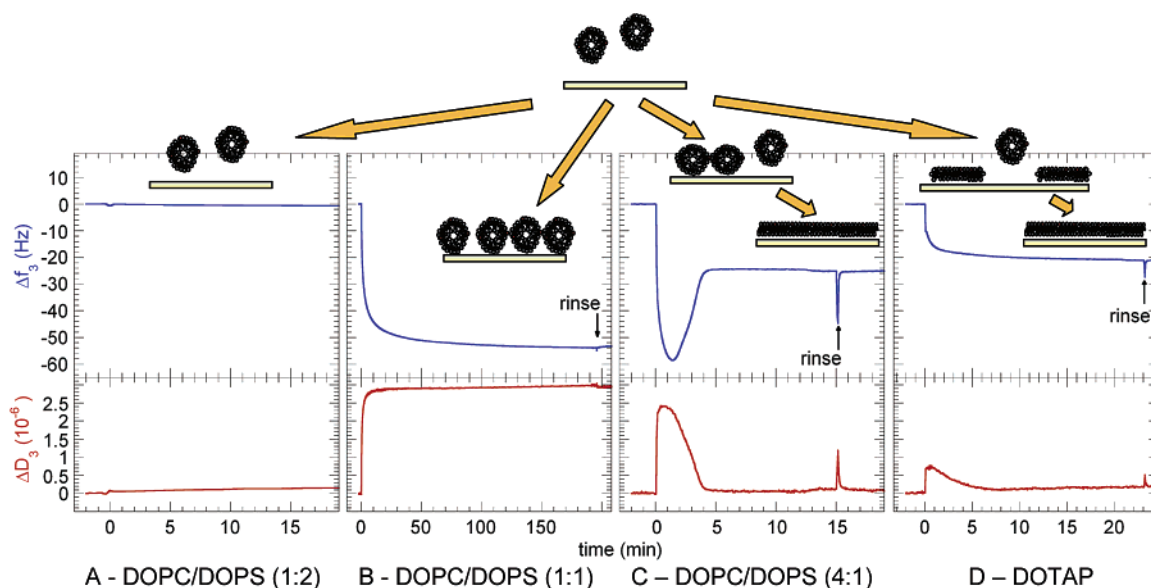


Figure 2. Lipid deposition pathways measured by QCM-D on silica. (A) Vesicles do not adsorb. (B) Vesicles adsorb and remain intact, forming a supported vesicular layer (SVL). (C) Vesicles adsorb and remain initially intact. At high vesicular coverage an SLB is formed. (D) Vesicles adsorb and rupture instantaneously, to form an SLB. The dissipation, ΔD , allows distinguishing between the morphological state of the adsorbed lipids: intact vesicles exhibit high dissipation while bilayer (patches) show low dissipation. The legends indicate the lipids used—dioleoyltrimethylammonium-propane (DOTAP), dioleoylphosphatidylcholine (DOPC), and dioleoylphosphatidylserine (DOPS)—with their molar mixing ratios.⁴⁵

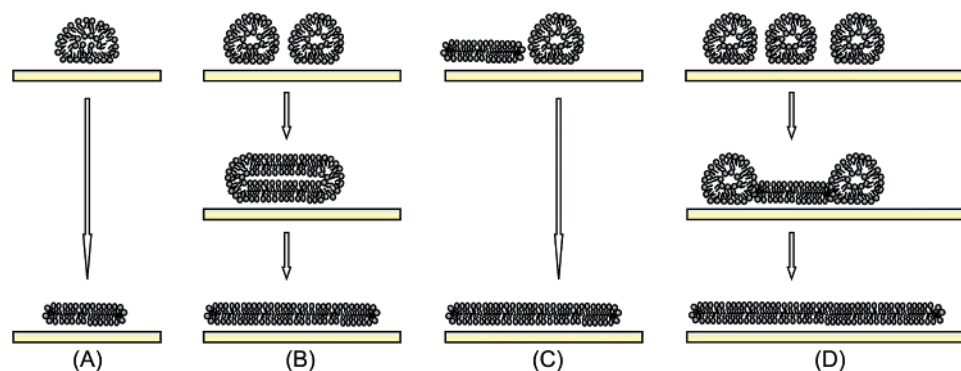


Figure 3. Mechanisms of vesicle rupture: (A) an isolated adsorbed vesicle ruptures spontaneously, driven by its support-induced deformation; (B) neighboring adsorbed vesicles fuse and eventually rupture; (C) the active edge of a supported bilayer patch induces the rupture of a neighboring vesicle; (D) the cooperative action of several neighboring vesicles leads to the rupture of a first vesicle (at the critical vesicular coverage). The active edge thereby exposed triggers the rupture of adjacent vesicles.

to the question of vesicular stability under conditions commonly employed for SLB formation. Cooperative effects of neighboring vesicles as well as the dynamic distribution of different lipid species in a vesicle have to be taken into account for a better description of the rupture propensity of surface-bound vesicles.

Critical Vesicular Coverage. An intriguing effect of the cooperative action of surface-bound vesicles was first reported by Kasemo and co-workers. By combining measurements by QCM-D and surface plasmon resonance (SPR)⁶⁵ together with computer simulations,⁶³ the group could show (i) that isolated vesicles of egg-PC remain intact when bound to a silica support and (ii) that a certain surface density of vesicles (henceforward denoted the critical vesicular coverage) is required to initiate the decomposition of surface-bound vesicles into bilayer patches. Zhdanov and Kasemo⁷² proposed that the support-induced stress (or deformation) of an adsorbed vesicle is further enhanced by the adsorption of vesicles in its vicinity. When a certain confinement of neighboring vesicles, corresponding to the critical coverage, is reached, the stress on the vesicle becomes sufficient to induce its rupture (Figure 3D).

Figure 2C exemplifies the response obtained by QCM-D, when the critical vesicular coverage is involved. As techniques such as QCM-D and SPR give average information about the adsorbed material, a small fraction of prematurely ruptured vesicles may potentially go undetected.⁷³ Our images by atomic force microscopy (AFM) provide direct evidence that silica wafers can indeed be covered with vesicles that remain stable for days, being devoid of bilayer patches over areas of several square micrometers (Figure 4).⁴⁵ These images also demonstrate the strength of the AFM to resolve the local morphology of the lipid assemblies down to nanometer resolution.

Long-Term Stability of Adsorbed Vesicles. We observed a peculiar effect for vesicles containing a mixture of DOPC and DOPS when exposed to mica in a calcium-containing solution: when adsorbing vesicles at low surface density (i.e., the interaction of neighboring vesicles is negligible), they initially remained intact but ruptured individually over a time range of minutes to hours (Figure 5).⁷⁴ This strongly contrasted our common

(72) Zhdanov, V. P.; Kasemo, B. *Langmuir* **2001**, *17*, 3518–3521.

(73) Reimhult, E.; Höök, F.; Kasemo, B. *J. Chem. Phys.* **2002**, *117*, 7401–7404.

(74) Richter, R. P.; Brisson, A. *Biophys. J.* **2005**, *88*, 3422–3433.

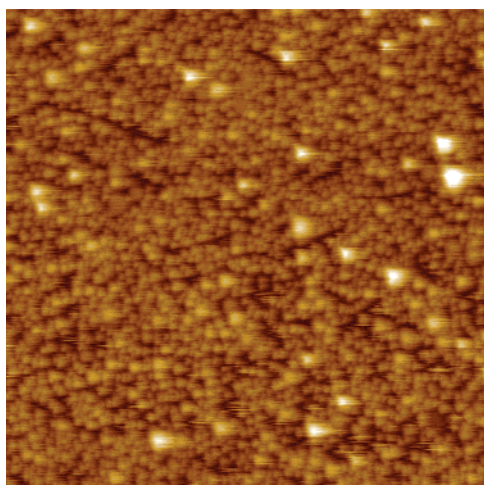


Figure 4. Imaging an intermediate of the SLB-formation process by AFM. Vesicles made of DOPC/DOPS (4:1) were exposed to a silica wafer. Spherical objects, identified as vesicles, densely populate the surface. No bilayer patches are visible, indicating that the critical vesicular coverage is not attained. Image size (z scale): $2\ \mu\text{m}$ (50 nm). Adapted from ref 45. Copyright 2003 Biophysical Society.

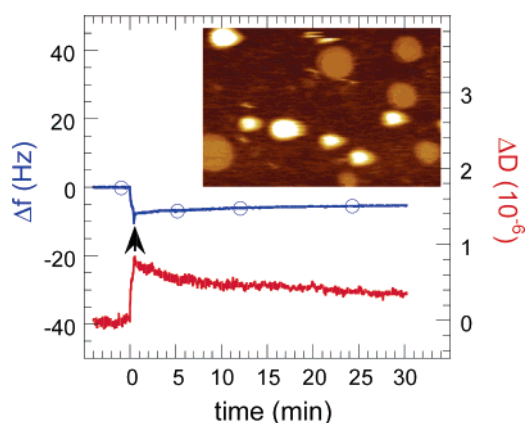


Figure 5. Tracing vesicle rupture kinetics by QCM-D. Vesicles initially adsorb intact but rupture into bilayer patches over the time range of 30 min and more, as indicated by the decrease in dissipation (---) and the increase in frequency (—○—), after rinsing away vesicles in solution (arrow). The AFM image (inset, image size: $750\ \text{nm} \times 500\ \text{nm}$), taken after the QCM-D measurement, confirms the coexistence of vesicles and bilayer patches. Adapted from ref 46. Copyright 2005 Biophysical Society.

observation on silica supports that isolated vesicles either rupture immediately (i.e., within less than a second) after adsorption or remain intact for days.

What is the origin of such particular rupture kinetics? It appears reasonable that a support-induced reorganization of the two lipid species within the adsorbed vesicle may lead to dynamic changes in the vesicle–support interaction and in the stability of the vesicles. The observed time range for rupture is, however, much slower than the time needed for lipids within a single lipid leaflet to reorganize.⁷⁵ We therefore propose that the translocation of lipids between the two leaflets of the vesicle is the parameter responsible for the slow vesicle rupture. The suggested rupture mechanism correlates with our observation that mica induces an asymmetric inter-leaflet lipid distribution in SLBs,⁷⁶ an issue that will be discussed in detail later on.

Growth and Coalescence of Supported Lipid Bilayers. Once a vesicle has ruptured, the resulting bilayer patch exposes an

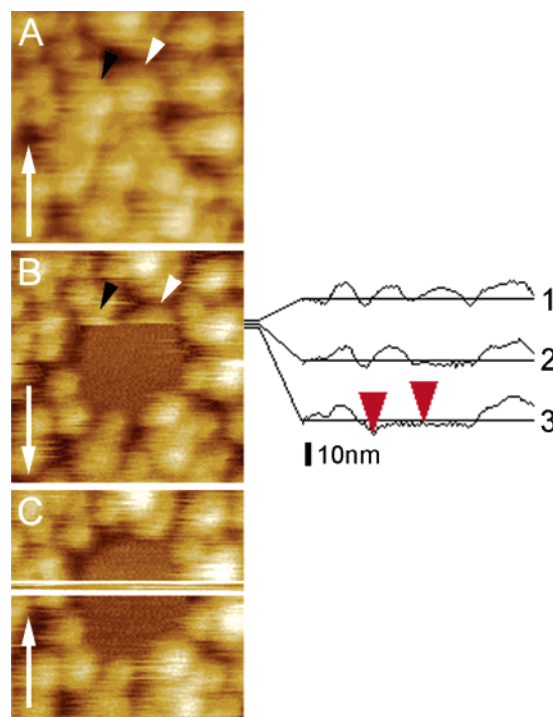


Figure 6. Tracking the propagation of bilayer patch formation by AFM. (A) All vesicles are intact. (B) Two vesicle segments are resolved (arrowheads) followed by an extended bilayer domain, indicating the rupture of vesicles. The cross sections of three successive scan lines (right) reveals that the two vesicles do not rupture simultaneously: The right vesicle (white arrowhead) ruptures first (between scan line 1 and 2), likely induced by the AFM-tip. At scan line 3, the left vesicle (black arrowhead) is ruptured, likely induced by the “active edge” of the bilayer patch that is formed from the right vesicle. (C) The rupture of a single vesicle induces the transformation of several adjacent vesicles into a stable bilayer patch. A small gap (a few nanometers) separates the patch edge from neighboring intact vesicles. A part of the image is distorted because the tip was accidentally retracted from the surface. Image size: 250 nm. The slow scan direction is indicated with white arrows. Adapted from ref 45. Copyright 2003 Biophysical Society.

edge.^{77,78} These edges are energetically unfavorable and, at least from a thermodynamic perspective, expected to promote the interaction with adjacent lipid material, such as the rupture of surface-bound vesicles (Figure 3C) or vesicles from solution. Provided the density of adsorbed vesicles is sufficiently high, such a process can propagate in a cascade of rupture events across several neighboring vesicles and leads to the formation of extended bilayer patches.^{45,63} The intermediate steps in this process can be traced by AFM, as illustrated in Figure 6, and suggest that the propagation speed is in the range of seconds.⁴⁵ Furthermore, adjacent bilayer patches usually coalesce in order to minimize their edge length.^{45,46,67} Taken together, these effects increase the size of individual bilayer patches and the overall bilayer coverage and will, in the ideal case, lead to a complete SLB.^{45,46}

Some of the vesicles imaged in Figure 6 remain intact even though they are situated as close as a few nanometers to the edge of a bilayer patch.⁴⁵ This suggests that the edge almost needs to contact a vesicle to induce its rupture and illustrates that the efficiency of edge-induced processes relies strongly on the spatial arrangement of vesicles and bilayer patches.

(75) Bernard, A.-L.; Guedeau-Boudeville, M.-A.; Jullien, L.; de Meglio, J.-M. *Langmuir* **2000**, *16*, 6809–6820.

(76) Richter, R. P.; Maury, N.; Brisson, A. *Langmuir* **2005**, *21*, 299–304.

(77) Kasson, P. M.; Pande, V. S. *Biophys. J.* **2004**, *86*, 3744–3749.

(78) Jiang, F. Y.; Bouret, Y.; Kindt, J. H. *Biophys. J.* **2004**, *87*, 182–192.

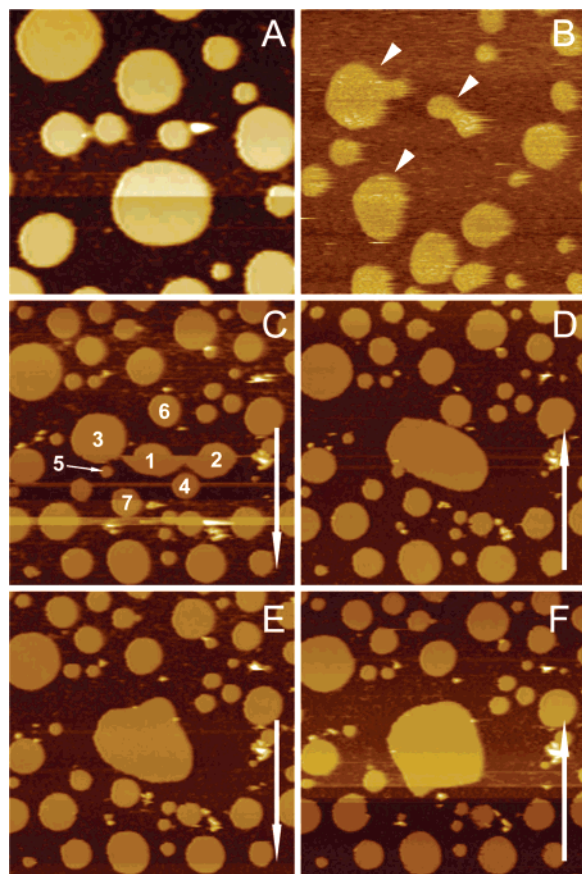


Figure 7. (A) Incomplete SLB made from DOPC/DOPS (4:1) vesicles on mica: bilayer patches are predominantly circular, indicating that they are laterally mobile. Image size: $1\ \mu\text{m}$. (B) Incomplete SLB made from DOTAP-vesicles on silica. Some bilayer patches (arrowheads) exhibit stable, strongly noncircular shapes. Image size: $1\ \mu\text{m}$. (C–F) Sequential images of patch coalescence induced by dynamic changes in the shape of a bilayer patch. After the merger of patches 1–3 (C), induced by the AFM-tip, the coalescence with patches 4 (D), 5–6 (E), and 7 (F) is generated by movements of the reshaping patch. Image size: $1.75\ \mu\text{m}$. Adapted from ref 46. Copyright 2005 Biophysical Society.

Lateral Mobility of Vesicles and Bilayer Patches. Lipid assemblies as a whole can be laterally mobile and undergo collective shape changes, an effect not to be confused with the lateral diffusion of individual lipid molecules. The shape of bilayer patches on the solid support provides a first indication about their mobility. Laterally mobile patches tend to reshape into circular patches to minimize their line tension, an effect that we observed on mica surfaces (Figure 7A).⁴⁶ In contrast, bilayer patches on silica frequently retained a strongly noncircular shape (Figure 7B), providing evidence for the lack of mobility.⁴⁵

It is instructive to compare our observations on the mobility of lipid assemblies on mica and on silica with data previously reported by Rädler et al.^{64,79,80} With reflection interference contrast microscopy (RICM), they observed that lipid bilayers, continuously formed from a deposited blob of concentrated DOPC in water, easily slide over surfaces of both types of support. The kinetics of the sliding motion on mica could be described quantitatively by the shear flow of a thin water film that is sandwiched between the solid support and the bilayer^{81,82} and

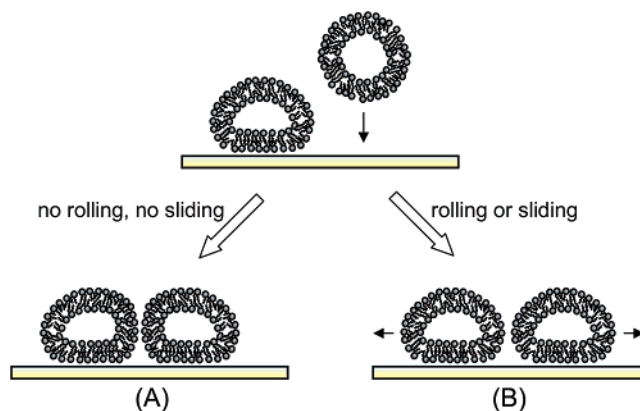


Figure 8. Possible scenarios of the mutual interaction of neighboring vesicles. The surface-induced flattening of a newly adsorbing vesicle induces the deformation of a neighboring one. If sliding and rolling are inhibited (A), the deformation represents a persisting stress for the vesicles, and facilitates their rupture. Sliding or rolling along the surface can release the stress (B). Thus, if sliding or rolling is enabled, neighboring vesicles can only induce added stress (and thereby rupture) when a high overall packing of vesicles on the surface is attained.

rather high spreading coefficients of up to $40\ \mu\text{m}^2/\text{s}$ were obtained.⁷⁹

In light of the results by Rädler and co-workers, it was surprising that we found lipid assemblies to be immobile on silica. Also, the shape changes observed by us and others⁸³ on mica seem considerably slower than postulated from the action of a lubricating water film.⁸³ Variations in the employed experimental conditions, in particular the presence of divalent ions^{45,74,83} versus pure water,^{64,79} may well be at the origin of the observed differences. However, the large range of variations in mobility remains intriguing and points toward a current lack in understanding the coupling between the bilayer and the solid support.

What kind of effects can be induced by the lateral mobility of lipid assemblies? The series of AFM images in Figure 7C–F demonstrates how dynamic changes of the patch shape can enhance the coalescence of neighboring bilayer patches.⁴⁶ Similarly, vesicles are expected to rupture, induced by the active edge of an approaching bilayer patch.

The mobility of surface-bound vesicles also has important implications for the nature of the critical vesicular coverage. Mobile vesicles can avoid stress from neighboring vesicles by displacement along the surface (Figure 8B). Consequently, stress due to intervesicle interactions can build up only when the overall vesicular coverage is high enough to force the vesicles to interact. The critical vesicular coverage is thus directly determined by the overall density of adsorbed vesicles. Given that intervesicle interactions are commonly short-ranged, this implies that the critical coverage must be elevated.⁷² In contrast, the shape relaxation of immobile vesicles is constrained to the local environment (Figure 8A), and hence, the critical coverage originates in a local effect that involves a limited number of neighboring vesicles. In the minimal configuration, two immobilized neighboring vesicles may be sufficient to induce rupture. Due to the statistical distribution of vesicles over the surface, the local effect, however, translates into an apparent critical coverage of the ensemble. In this case the critical vesicular coverage can thus span from very low to very high values, as we could demonstrate for silica surfaces.⁴⁵

(79) Nissen, J.; Gritsch, S.; Wiegand, G.; Rädler, J. O. *Eur. Phys. J. B* **1999**, *10*, 335–344.

(80) Nissen, J.; Jacobs, K.; Rädler, J. O. *Phys. Rev. Lett.* **2001**, *86*, 1904–1907.

(81) Bayerl, T. M.; Bloom, M. *Biophys. J.* **1990**, *58*, 357–362.

(82) Johnson, S. J.; Bayerl, T. M.; McDermott, D. C.; Adam, W. A.; Rennie, A. R.; Thomas, R. K.; Sackmann, E. *Biophys. J.* **1991**, *59*, 289–294.

(83) Muresan, A. S.; Lee, K. Y. C. *J. Phys. Chem. B* **2001**, *105*, 852–855.

Parameters that Govern SLB Formation

Which pathway of vesicle deposition will be taken is essentially determined by the interplay of bilayer-support, interbilayer, and intrabilayer interactions. In principle, the relative contribution of these interactions will be susceptible to the nature of the support (its surface charge, chemical composition and roughness), the lipid vesicles (their composition, charge, size, and physical state), as well as the aqueous environment (its composition, pH and ionic strength). In the following, we will outline some essential experimental parameters that appear to control SLB formation.

Electrostatic Interactions. Several studies have pointed out the influence of the charge of support and lipids as well as the ionic strength of the solution on the adsorption of vesicles.^{64,84–86} In systematic studies on silica⁴⁵ and mica,⁴⁶ we provided evidence that all four pathways of vesicle deposition outlined in Figure 2 can actually be generated by varying one experimental parameter only: the vesicle charge. These studies demonstrate that the SLB-formation process will be strongly influenced by electrostatic interactions. Consequently, adjustments in the pH or in the ionic strength are expected to constitute relatively simple means to optimize the formation of SLBs for a given surface and a given lipid composition.⁸⁵

Calcium Ions. The influence of divalent ions in general and calcium in particular appears notoriously surprising. The ions do not only participate in the screening of charges, thereby modifying the electrostatic interactions, but they also directly interact, in often subtle ways, with surfaces and lipids.^{48,87} As a general trend, calcium was found to promote the adsorption and rupture of vesicles and SLB formation.^{45,67,84,88} Effects are particularly strong on mica.^{46,67,70} Often minor concentrations (mM and below) of the ion are sufficient to generate significant effects.

Solid Support. The role of the solid support in the process of SLB formation cannot be underestimated. It is probably the most complex and still the most enigmatic parameter.

Work on different supports has pointed out that hydrophilicity is a necessary²⁶ but not a sufficient condition to promote the rupture of vesicles and subsequent SLB formation. A number of reports has actually revealed difficulties to form SLBs on surfaces such as gold,⁴¹ SrTiO₂,⁴² TiO₂,^{42,73} or platinum,⁶⁹ leaving mica and silicon-based materials, such as glass, Si₃N₄, or silica, as the most common surfaces used for the preparation of SLBs. Progress on TiO₂ has though recently been reported,⁸⁹ again confirming the importance of electrostatic interactions and calcium.

Although surface roughness in general was reported to have considerable effects on the spreading of bilayers on solid supports,^{64,85} we experienced that SLB formation is only little affected by roughness in the nanometer range.^{45,90,91} It is remarkable that SLBs can even be formed on silica films exhibiting extreme roughness and porosity at the nanoscale, such as aerogels or xerogels,⁹² even though the kinetics of SLB formation and the quality of the final bilayer seem substantially affected under such conditions. An obvious question is to what extent the SLB follows the support's corrugations. An answer to this question has recently been given by imaging, by

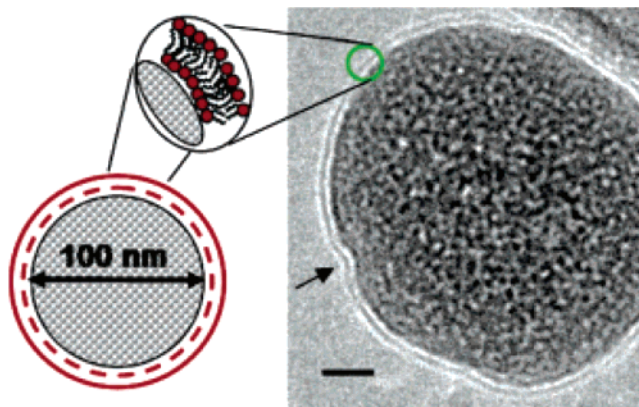


Figure 9. Transmission electron cryo-microscopy image of a silica nanoparticle covered by a nanoSLB. The silica nanoparticle appears as a sphere of uneven density with a rough surface. The surrounding ring of electron-dense material (green circle) corresponds to the outer lipid layer of an SLB covering the particle surface. The SLB tightly follows the particle's corrugations (arrow) and does not leave solvent-rich pockets. Scale bar: 20 nm. Adapted from ref 91 with permission. Copyright 2005 American Chemical Society.

transmission electron cryo-microscopy, of lipid vesicles adsorbed to and lipid bilayers surrounding silica nanoparticles. Membrane-coated nanoparticles (Figure 9) illustrate that the lipid membrane follows very intimately the topography of the underlying support.⁹¹ The attraction between the solid support and the lipid membrane is obviously strong enough to overcome the bilayer's bending energy, inhibiting the formation of solvent-rich pockets between SLB and support.

Although relatively little acknowledged in the literature, the surface preparation may considerably influence the kinetics of lipid deposition and the nature of the lipid assembly that is ultimately formed.⁴⁵ The hydroxylation state of silica surfaces, for example, can vary considerably, as a function of the manufacturing procedure, exposure to high temperature or to basic solutions⁹³ and thus influence the charge⁹⁴ and other physicochemical properties of the support. Apart from effects on the physicochemical state of the surface as a whole, surface manufacturing and preparation are susceptible to creating lateral heterogeneities in the surface properties. Some responses in the SLB formation have indeed been attributed to surface defects ("hot spots").⁶⁸ The AFM images in Figure 10 present some examples of lipid deposits on several glass surfaces provided by different manufacturers. Even though all surfaces are essentially silica-like, substantial variability in the morphology of the lipid deposits can be observed.

The interaction between lipids and solid support can also strongly affect the properties^{95,96} and the quality of the final SLB. Some aspects will be discussed below.

Interleaflet Distribution of Lipids in the SLBs

Let us consider SLBs that are formed from vesicles containing a mixture of different lipid species. How are lipids distributed between the two SLB leaflets? This question, even though highly relevant for many applications, has until recently received rather little consideration. The interleaflet distribution is commonly assumed to be symmetrical.

(93) Iler, R. K. *The Chemistry of Silica. Solubility, Polymerization, Colloid and Surface Properties, and Biochemistry*; Wiley-Interscience: New York, 1979.

(94) Toikka, G.; Hayes, R. A. *J. Colloid Interface Sci.* **1997**, *191*, 102–109.

(95) Hetzer, M.; Heinz, S.; Grage, S.; Bayerl, T. M. *Langmuir* **1998**, *14*, 982–984.

(96) Feng, Z. V.; Spurlin, T. A.; Gewirth, A. A. *Biophys. J.* **2005**, *88*, 2154–2164.

(84) Nollert, P.; Kiefer, H.; Jähnig, F. *Biophys. J.* **1995**, *69*, 1447–1455.

(85) Cremer, P. S.; Boxer, S. G. *J. Phys. Chem. B* **1999**, *103*, 2554–2559.

(86) Hennesthal, C.; Steinem, C. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 8085–8086.

(87) Wilschut, J.; Hoekstra, D. *Trends Biochem. Sci.* **1984**, 479–483.

(88) Ekeröth, J.; Konradsson, P.; Höök, F. *Langmuir* **2002**, *18*, 7923–7929.

(89) Rossetti, F. F.; Bally, M.; Michel, R.; Textor, M.; Reviakine, I. *Langmuir* **2005**, *21*, 6443–6450.

(90) Richter, R. P.; Brisson, A. *Langmuir* **2003**, *19*, 1632–1640.

(91) Mornet, S.; Lambert, O.; Dugué, E.; Brisson, A. *Nano Lett.* **2005**, *5*, 281–285.

(92) Weng, K. C.; Stålgren, J. J. R.; Duval, D. J.; Risbud, S. H.; Frank, C. W. *Langmuir* **2004**, *20*, 7232–7239.

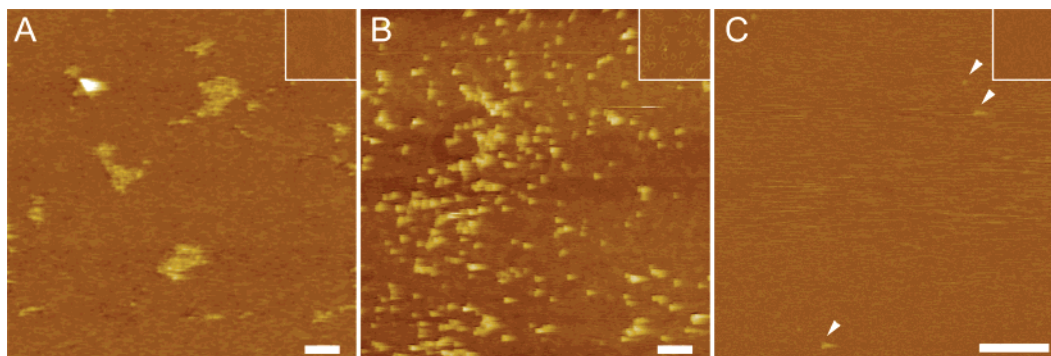


Figure 10. Quality of the final SLB on different supports as imaged by AFM. (A) Glass cover slip (Deckgläser Nr. 1, Marienfeld GmbH, Lauda-Königshofen, Germany): islands of many adsorbed vesicles remain stable for hours within the SLB. (B) Glass slide (Objektträger mit Mattrand, Knittel Gläser GmbH, Braunschweig, Germany): many individual vesicles remain intact within the SLB. (C) Silicon wafer: the SLB is homogeneous over areas of several μm^2 . Only a few defects, trapped vesicles, are visible (arrowheads). Surfaces, after cleaning with SDS and UV/ozone,⁴⁵ were incubated with DOPC/DOPS (4:1)-vesicles at 2 mM CaCl_2 . The insets show respective surfaces prior to vesicle exposure at the same magnification. Imaging was performed as described in ref 46.

Table 1. Amount of DOPS in the Bulk-Facing Leaflet of SLBs Made of DOPC and DOPS

| nominal DOPS content (%) ^a | DOPS-content in the bulk-facing leaflet (%) | | |
|---------------------------------------|---|----------------------|--------------------------------|
| | on SiO_2 ^b | on mica ^c | on TiO_2 ^d |
| 0 | 0 | 0 | 0 |
| 10 | 10 | 3 ± 1 | <3 |
| 20 | 20 | 7 ± 1 | <3 |
| 30 | 30 | | 6 ± 1 |
| 33 | 33 | 13 ± 2 | |
| 50 | | 20 ± 2 | 17 ± 2 |
| 67 | | >55 | >33 |
| 80 | | >60 | >60 |

^a As determined by the mixing ratio of DOPS and DOPC in the vesicles. ^b From ref 97. ^c From ref 76. ^d From Figure 11.

We have investigated the adsorption behavior of prothrombin and annexin A5, two proteins that bind specifically to DOPS, to quantify the amount of DOPS in the bulk-facing lipid leaflet of SLBs containing both DOPC and DOPS. The ensemble of our results^{76,97} provides evidence for a substantial degree of asymmetry in the interleaflet distribution of DOPS on mica. For example, an SLB that is formed from vesicles containing 20% DOPS exhibits a DOPS content in the bulk-facing leaflet of only 7% (Table 1). In contrast, we found the distribution of DOPS on silica to be symmetrical, within experimental error. The asymmetry on mica was suggested to originate from a specific calcium-mediated interaction between the support and DOPS.^{46,76}

Such an interaction is not restricted to mica. Recent studies on titanium oxide provide evidence for a similar, yet even stronger asymmetry in the distribution of DOPS (Figure 11, Table 1). These results suggest that an asymmetrical lipid distribution of lipids in SLBs may be more prominent than commonly appreciated.

Integrity of the Final SLBs

Direct or indirect evidence for the presence of defects in SLBs has frequently been reported. Defects were attributed to the choice of the employed lipids⁴⁵ and their mixture,⁹ the preparation of the liposomes, or the preparation of the solid support. The AFM images on glass samples in Figure 10, panels A and B, illustrate that the formation of ideal SLBs cannot be taken for granted and that the integrity of the final SLB needs to be validated.

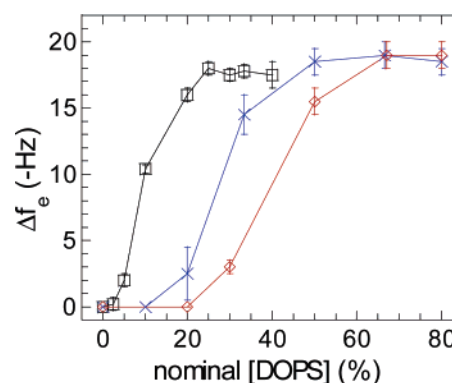


Figure 11. Adsorbed amounts of annexin A5, a protein that binds to DOPS in a calcium-dependent manner, to SLBs made of different ratios of DOPS and DOPC on silica ($-\square-$), mica ($-\times-$) and titanium oxide ($-\diamond-$). Annexin A5 was incubated at 2 mM CaCl_2 . The responses, given by the shifts, Δf_e , in QCM-D frequency, indicate the amounts that remain bound after removing excess annexin A5 from solution. The sigmoidal curves are shifted toward higher nominal DOPS contents for mica and titanium oxide, indicating that less DOPS is accessible in the SLB's bulk-facing leaflets on these supports.

The importance of defects in an SLB will depend on the envisaged application. The action of lipases (i.e., lipid digesting enzymes), for example, was proposed to be triggered by the presence of point-defects in the membrane.³⁷ A few such defects, even though they cover much less than one percent of the surface, may thus considerably affect the lipase activity. On the other hand, membranes that contain discontinuities that cover a few percent of the surface may be acceptable for other applications, such as protein adsorption studies.

Methods to Characterize Defects. Whatever the application, appropriate characterization methods are required to determine the density and the nature of the defects in the SLB. In this context, bulk methods such as QCM-D or ellipsometry can provide an overall characterization of the state of the SLB and the intermediates in the SLB-formation process. However, local defects that cover less than a few percent of the surface are difficult to detect. A similar statement holds true for fluorescence recovery after photobleaching (FRAP): the immobile fraction of molecules can rarely be determined to better than 1% and the detection of defects by fluorescence microscopy is limited by the optical resolution which exceeds the size of vesicles commonly used to form SLBs. Only AFM appears capable of directly visualizing defects such as single holes or intact vesicles with a resolution in the range of a few nanometers. We note, however,

(97) Richter, R. P.; Lai Kee Him, J.; Tessier, B.; Tessier, C.; Brisson, A. *Biophys. J.* **2005**, *89*, 3372–3385.

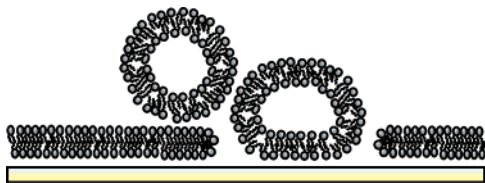


Figure 12. “Trapped” vesicle. The surface-bound vesicle is located sufficiently far away to remain unaffected by the bilayer edges though close enough to prevent the edge-induced rupture of other vesicles from solution. We propose that such an arrangement inhibits the further propagation of bilayer growth, leaving trapped vesicles as defects.

that a careful control of the imaging conditions is required in order to obtain reliable results, as AFM images may erroneously present ideal bilayers, due to imaging artifacts.^{74,90}

Apart from the effects that are due to the preparation of lipids and support, one may wonder whether some of the above-discussed mechanisms, which underlie the SLB formation, could inherently be insufficient to generate a complete defect-free SLB. The AFM image in Figure 10C demonstrates that SLBs of high quality can be created on solid supports via the pathway in which vesicle rupture is triggered by the critical vesicular coverage. The same is considered likely for the pathway in which vesicles rupture individually, though conclusive evidence is yet lacking as our measurements were obstructed by contamination of the lipid sample.

Investigations by Rädler et al. gave rise to the idea that sliding-promoting (or “self-healing”) surfaces should be ideal for the formation of defect-free SLBs.^{1,64} However, we found SLBs of high quality under conditions where bilayer patches and vesicles were virtually pinned to the surface.⁴⁵ This indicates that the mobility of lipid assemblies is not strictly necessary to form close to ideal SLBs.

Notwithstanding the indications that close to ideal SLBs can be formed via the pathway of critical vesicular coverage, the spatial arrangement of surface bound vesicles and bilayer patches may in some cases inhibit further propagation of bilayer growth. For example, a vesicle that is located sufficiently distant from an edge to remain undisturbed may still prevent the encounter of other vesicles from the solution with the edge (Figure 12). Such a vesicle, trapped in a bilayer hole, will thus stop bilayer growth. From simple geometrical considerations, such an effect would be expected to be more pronounced for larger vesicles. Indeed, a considerable amount of residual vesicles has been reported in the case of larger vesicles on silica.⁷³ However, SLB formation from the smallest available vesicles seems to be largely devoid of this effect.

One application for which the quality of supported lipid membranes has been a matter of recurrent discussion may be mentioned here: the action of a few defects in the membrane potentially creates short circuits that disturb the measurement of ion transport through membranes or membrane-incorporated proteins by electroensing methods.^{31,98} Despite frequently reported problems with the electrical properties of surface-confined membranes, no study has to the best of the authors’ knowledge been undertaken to characterize the nature of the defects in detail. To date it remains therefore unclear how far the supported lipid bilayers used in the relevant studies correspond to the quality of the bilayers that we have reported here. Combined

approaches with AFM, QCM-D, and electroensing methods may provide valuable insight, to what extent SLBs can constitute suitable membrane-mimics for the investigation of the channel properties of membrane proteins.

Conclusions and Perspectives

We have described recent advancements in understanding the process of self-organization that leads from small vesicles in aqueous solution to a solid-supported lipid bilayer. Systematic studies have allowed a number of mechanisms underlying SLB formation to be elucidated. Important insight in the involved interactions on the mesoscopic level has been gained, and parameters that are critical for the SLB-formation process have been identified.

AFM and QCM-D, the main techniques employed in our studies, provide topographical information at the nanometer level and quantitative physicochemical characterization of surface-confined lipid assemblies, respectively. The combination of both techniques on identical supports has allowed for a considerable improvement of our qualitative understanding of the SLB formation and opens up for a more quantitative assessment of this process.

AFM, QCM-D, other methods, such as ellipsometry, SPR, fluorescence, electroensing methods, and combinations thereof, constitute now an established toolbox for the detailed characterization of SLB formation. These tools may help to elucidate a number of apparently simple, but still debated questions, including the orientation of the lipid layers after vesicle rupture as well as the role of vesicle fusion (Figure 3B) in the SLB-formation process. AFM has emerged as a unique tool to investigate defects in SLBs down to the nanometer level. A detailed and yet quick characterization of the quality of SLBs, however, remains a challenge.

The experimental approaches described here and the present understanding of the mechanisms involved in SLB formation on solid supports can easily be extended to more complex systems, such as the formation of SLBs from protein-containing liposomes as well as polymer-cushioned, tethered, or pore-spanning lipid bilayers. It is hoped that, thanks to the recent maturation in understanding the SLB-formation process, formerly rather “artistic” approaches to SLB formation will be replaced by a well-controlled technology, thereby extending the applicability of surface-confined lipid membranes.

We have pointed out the important role of the solid support in the SLB-formation process. The interaction between lipids and support appears complex and a good understanding on the molecular level is still lacking. It is intriguing that the solid support does not only affect the properties of the SLBs but also the two-dimensional organization of proteins bound to it.^{90,97} Future work will need to elucidate the nature of the thin solvent layer that separates the lipid bilayer from the solid support^{81,82} and its effect on the diffusion of lipid molecules in each of the two bilayer leaflets.

Acknowledgment. The authors acknowledge the contributions of their collaborators in Bordeaux and A.R.B.’s former group in Groningen. We thank Aleš Benda (Heyrovský Institute, Prague, Czech Republic) for discussions and providing the glass slides (Figure 10). This research was supported by the Conseil Régional d’Aquitaine (France), the Fonds Européen de Développement Régional, and European Community Grant FP6-NMP4-CT2003-505868 “Nanocues”.

(98) Naumann, R.; Schiller, S. M.; Giess, F.; Grohe, B.; Hartmann, K. B.; Kärcher, I.; Köper, I.; Lübken, J.; Vasilev, K.; Knoll, W. *Langmuir* **2003**, *19*, 5435–5443.

Article II

Rémi Bérat, Murielle Rémy-Zolghadry, Céline Gounou, Claude Manigand, Sisareuth Tan, Carmen Saltó, Ernest Arenas, Laurence Bordenave, and Alain R. Brisson

**Peptide-presenting two-dimensional protein matrix on supported lipid bilayers:
An efficient platform for cell adhesion**

Biointerphases 2007, **2** (4), p.165-172

Peptide-presenting two-dimensional protein matrix on supported lipid bilayers: An efficient platform for cell adhesion

Rémi Bérat

Laboratoire d'Imagerie Moléculaire et NanoBioTechnologie, IECEB, UMR-CNRS 5248, Université Bordeaux, Avenue des Facultés, F-33405 Talence, France

Murielle Rémy-Zolghadry

INSERM-U 577, Université Bordeaux, F-33076 Bordeaux, France

Céline Gounou, Claude Manigand, and Sisareuth Tan

Laboratoire d'Imagerie Moléculaire et NanoBioTechnologie, IECEB, UMR-CNRS 5248, Université Bordeaux, Avenue des Facultés, F-33405 Talence, France

Carmen Saltó and Ernest Arenas

Department of Medical Biochemistry and Biophysics, Karolinska Institute, 17177, Stockholm, Sweden

Laurence Bordenave

INSERM-U 577, Université Bordeaux, F-33076 Bordeaux, France

Alain R. Brisson^{a)}

Laboratoire d'Imagerie Moléculaire et NanoBioTechnologie, IECEB, UMR-CNRS 5248, Université Bordeaux, Avenue des Facultés, F-33405 Talence, France

(Received 24 September 2007; accepted 13 November 2007; published 21 December 2007)

Understanding and controlling cell adhesion to biomaterials and synthetic materials are important issues in basic research and applied sciences. Supported lipid bilayers (SLBs) functionalized with cell adhesion peptides linked to lipid molecules are popular platforms of cell adhesion. In this paper, an alternative approach of peptide presentation is presented in which peptides are stereo-selectively linked to proteins self-assembling in a rigid two-dimensional (2D) matrix on SLBs. Annexin-A5 (Anx5) was used as prototype protein for its known properties of forming stable and rigid 2D matrices on lipid surfaces. Two types of Anx5-peptide complexes, containing either a RGD or an IKVAV sequence, were synthesized. The authors show that both Anx5-peptide complexes present the same properties of binding and 2D organization on lipid surfaces as Anx5, when investigated by quartz crystal microbalance with dissipation monitoring, atomic force microscopy, and transmission electron microscopy techniques. Anx5-RGD and Anx5-IKVAV 2D matrices were found to promote specific adhesion of human saphenous vein endothelial cells and mouse embryonic stem cells, respectively. The influence of the surface density of exposed peptides on cell adhesion was investigated, showing that cells attach to Anx5-peptide matrices when the average distance between peptides is smaller than about 60 nm. This cell adhesion platform provides control of the orientation and density of cell ligands, opening interesting possibilities for future applications. © 2007 American Vacuum Society. [DOI: 10.1116/1.2821954]

I. INTRODUCTION

Understanding and controlling cell adhesion to biomaterials and synthetic materials are important issues in basic research and applied sciences, e.g., for the development of artificial tissues, the biointegration of medical implants, or the development of cell chips for drug screening assays.¹⁻⁴ A wide range of methods has been developed for inducing cell adhesion on a variety of substrates (see the review in Ref. 5). These methods rely principally on biomimetic functionalization of substrates with extracellular matrix proteins or peptides. The most commonly used cell adhesion ligand is the Arg-Gly-Asp (RGD) peptide,^{6,7} which is present in several extracellular matrix proteins and is recognized by integrins.^{8,9} Typical procedures for coupling cell recognition

ligands to solid substrates involve physical adsorption, either directly or via polymer linking,¹⁰ covalent coupling via self-assembled monolayers,¹¹ affinity interaction using the streptavidin-biotin system, or supported membranes formed either by vesicle deposition^{5,12} or above a polymer cushion.^{4,13}

Functionalized supported lipid bilayers (SLBs) have become increasingly popular as a cell adhesion platform, because they constitute a natural cell environment in which membrane proteins and peptides can be incorporated. In addition, the formation of SLBs is simple¹⁴ and they are highly resistant to nonspecific adsorption by proteins or cells.^{12,15-18} SLBs consist of a continuous lipid bilayer, 5 nm thick, separated from the substrate by a ~1 nm thin water cushion. Previous studies of cell adhesion with SLBs have relied on the use of lipids functionalized with peptides.¹⁸⁻²⁶ The influence of the orientation,^{20,22,23} accessibility,^{18,26}

^{a)}Author to whom correspondence should be addressed. Electronic mail: a.brisson@iecb.u-bordeaux.fr

conformation,^{20,22} or mobility²⁷ of lipo-peptides on cell attachment and spreading have been characterized, thanks to the availability of a wealth of surface-sensitive techniques adapted to the SLB format.

In this paper, we present a novel type of cell adhesion platform, in which peptides are linked stereo-selectively to proteins forming a rigid 2D matrix on a SLB surface. The basic concept was to exploit the property presented by several proteins of self-assembling in 2D matrices on a lipid surface.^{28–30} The main potential advantages of this mode of peptide presentation are the control of the orientation and of the density of peptides. In addition, this system allows addressing questions of interest in cell adhesion, such as the influence of the mobility of the ligands, by comparing the behavior of immobile protein-peptides with mobile lipo-peptides on SLBs.

This approach is presented here with Annexin-A5 (Anx5) as a prototype of 2D matrix-forming protein. Anx5 is known to self-assemble and form 2D matrices covering lipid surfaces containing anionic phospholipids, in the presence of Ca²⁺ ions.^{30–36} The structure of Anx5 2D crystalline assemblies has been extensively characterized, both by transmission electron microscopy (TEM) (Refs. 31–33 and 36) and atomic force microscopy (AFM).^{30,34,35} We have shown that Anx5 forms 2D crystals of trimers on lipid monolayers and on SLBs prepared on mica, and 2D close-packed assemblies of trimers on SLBs prepared on glass substrates.^{34,37} The surface density of Anx5 molecules in crystalline or close-packed assemblies is basically the same, about 33 000 molecules/ μm^2 , which corresponds to a distance of about 6 nm between adjacent Anx5 molecules.³⁵

This paper describes first the synthesis and the characterization of the binding and 2D organization properties of two types of Anx5-peptide complexes, containing either a RGD or an IKVAV motif.^{38,39} The IKVAV sequence is found in laminin,⁴⁰ and it has been shown that IKVAV peptides were able to promote cell adhesion.^{24,38} Then, we show that the 2D matrices of Anx5-peptides are able to promote cell adhesion with two cell types, namely human saphenous vein endothelial cells (HSVE cells) and mouse embryonic stem cells (MES cells), which are pluripotent cells that can give rise to any cell type.⁴¹ Finally, we show how the surface density of Anx5-peptides influences cell attachment.

II. MATERIALS AND METHODS

A. Materials

1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DOPC) and 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-[phospho-L-serine] (DOPS) were purchased from Avanti Polar Lipids (AL, USA). All other chemicals were of ultrapure grade. Water was purified with a RiOs system (Millipore, France).

Muscovite mica plates of 12 mm diameter were purchased from Metafix (Montdidier, France). Glass cover slips of 12 mm diameter were from Fisher Scientific (Illkirch, France). QCM-D sensor crystals, covered with 100-nm evaporated

gold and reactively sputter-coated with 50-nm silicon oxide, were purchased from Q-Sense (Gothenburg, Sweden).

B. Expression and purification of recombinant rat Anx5-SH and Anx5-SS-Anx5 dimers

The rat Anx5 coding sequence was excised by NcoI digestion from the pKK233–2-Anx5 expression vector⁴² and cloned into the pGELAF+ expression vector⁴³ between two NcoI restriction sites, resulting in the pGEF-A5 expression vector. A double mutant (C314S, T163C) was constructed, in which the single cysteine-SH residue present in native rat Anx5 was deleted (C314S), while a cysteine-SH was introduced in position 163 (T163C), resulting in the pGEF-A5B expression vector. The protein coding sequence of the double-mutant Anx5 (C314S, T163C), referred to hereafter as Anx5-SH, was amplified by PCR, excised by NcoI/BamHI digestion, and cloned into the expression vector pET11b (GE-Healthcare), resulting in the pET11b-Anx5-SH expression vector. *Escherichia coli* BL21(DE3) cells were transformed by heat shock with pET11b-Anx5-SH plasmid.

Cells were plated on LB medium containing 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ampicillin and incubated overnight at 37 °C. A single colony was collected and grown in 25 ml LB-ampicillin medium overnight at 37 °C. An aliquot was diluted with 400 mL LB-ampicillin medium to give an OD₆₀₀ of 0.1. The culture was incubated at 30 °C until OD₆₀₀ reached 0.7. Protein expression was then induced by addition of 0.4 mM IPTG and growth was continued for 16 h at 30 °C.

Cells were harvested by centrifugation (10 min, 4.5 krpm, 4 °C). The pellet was resuspended in an appropriate volume of 10 mM Tris, 1 mM EGTA, 0.01% NaN₃, pH 7.5, to give a calculated OD₆₀₀ of 60. The cell suspension was sonicated at 4 °C with a model 250 Branson sonicator operated in a pulse mode consisting of five steps of sonication at 13 W for 1 min with 15 s intervals. Membrane fragments and large debris were removed by centrifugation at 12 000g for 2 h at 4 °C. The supernatant, referred to as a soluble extract, was collected and stored at 4 °C until use.

For purification, the soluble extract was filtered over 0.22 μm filters and applied in 4 mL fractions on a Superdex-200 column (GE-Healthcare) pre-equilibrated and eluted with a buffer containing 20 mM Tris, pH 8, and 0.02% NaN₃ (buffer A). The fractions containing Anx5-SH were pooled and purified by anion-exchange chromatography with a MonoQ HR5/5 column (GE-Healthcare) pre-equilibrated with buffer A. Elution was performed with a linear NaCl gradient in buffer A. Anx5-SH eluted at approximately 230 mM NaCl. The yield was about 25 mg pure Anx5-SH protein per 400 mL of culture.

Although Anx5-SH proteins have a natural tendency to oxidize and form Anx5-SS-Anx5 dimers, called hereafter (Anx5-S)₂ dimers, the yield in (Anx5-S)₂ dimers by spontaneous oxidation was highly variable. An optimized method of production of (Anx5-S)₂ dimers was developed, consisting of mixing Anx5-SH with dithiodipyridine (DTDP) (Sigma Aldrich) at an Anx5-SH/DTDP molar ratio of 2/1, followed by overnight incubation at room temperature.

(Anx5-S)₂ dimers were purified on a MonoQ column eluted with a NaCl gradient in buffer A, and stored at 4 °C until use.

C. Synthesis of Anx5-RGD and Anx5-IKVAV complexes

The RGD peptide (sequence: GCRGYGRGDSPG) and IKVAV peptide (sequence: CSRARKQAASIKVAVSADR) were synthesized by solid phase Fmoc chemistry⁴⁴ with an Applied Biosystems 431A synthesizer (Courtaboeuf, France). They were purified by reverse phase chromatography on a C-18 column eluted with a water/acetonitrile gradient containing 0.1% trifluoroacetic acid (TFA) and lyophilized.

The covalent coupling of each peptide to Anx5-SH involved the formation of a disulfide bond between the sulfhydryl group of Anx5-SH and the sulfhydryl group from the cysteine residue contained within either the RGD or IKVAV peptide; it was realized as follows: 75 nmol (Anx5-S)₂ dimers were reduced by addition of 10 mM dithiothreitol (DTT) for 30 min at room temperature. Reduced Anx5-SH was purified on a HiTrap desalting column (GE-Healthcare) eluted with buffer A. 63.5 nmol An5-SH in buffer A were mixed with 254 nmol adhesion peptide in 0.1% TFA and then with 63.5 nmol DTDP. The mixture was incubated overnight at room temperature. The Anx5-peptide complexes were purified on a MonoQ column, eluted with a NaCl gradient in buffer A. Their purity and mass were analyzed by SDS-PAGE and MALDI-TOF mass spectrometry, respectively.

D. Preparation of small unilamellar lipid vesicles

DOPC and DOPS lipids were dissolved in chloroform, mixed in desired amounts to give a DOPC/DOPS mixture of 7:3 (w:w), dried in a rotary evaporator, resuspended at 2.5 mg/mL final lipid concentration in a buffer solution made of 10 mM Hepes, 150 mM NaCl, 2 mM NaN₃, pH 7.4 (buffer B), and vortexed. To form small unilamellar vesicles (SUVs), the lipid suspension was first homogenized by five cycles of freeze-thawing and vortexing, and then sonicated with a tipsonicator (model-250, Branson, USA) operated in a pulse mode at 18% duty cycle for 30 min with refrigeration over ice. The sample was centrifuged for 10 min at 16 000 g in an Eppendorf centrifuge in order to remove titanium particles. SUV suspensions were stored at 4 °C until use.

E. Functionalization of glass supports for cell adhesion

Glass cover slips (12 mm diameter) were cleaned by exposure to 2% SDS for 30 min, then rinsed with ultrapure water, blow-dried with nitrogen, and exposed to UV/ozone for 10 min.³⁴ Substrates cleaned in this way were stored in air. Prior to use, they were re-exposed to UV/ozone for 10 min, placed over a piece of parafilm, and immediately covered with 150 μL of a buffer containing 10 mM Hepes, 150 mM NaCl, 2 mM CaCl₂, 2 mM NaN₃, pH 7.4 (buffer C). A

SLB was formed by deposition of 150 μL of 0.1 mg/mL SUVs, diluted in buffer C, over the glass substrate.^{34,45} After 20 min, the excess of vesicles was removed by gently exchanging the chamber liquid with buffer C by ten cycles of addition/withdrawal of 100 μL aliquots. Anx5 or Anx5-peptide solutions were added at 20 μg/mL final protein concentration. After 30 min incubation, time sufficient for saturation, the excess of protein was removed as described before. The functionalized glass supports were used extemporaneously.

F. Cell adhesion experiments

Primary HSVE cells were harvested, amplified, and characterized as described by Fernandez *et al.*,⁴⁶ slightly modified from Golledge *et al.*⁴⁷ Cells grew in M199 medium (Invitrogen Corp, Cergy Pontoise, France) supplemented with 20% fetal calf serum (Eurobio, Les Ulis, France), 50 IU/mL heparin (Sanofi Aventis, Paris, France), 10 ng/mL bFGF (Sigma Aldrich, St Quentin Fallavier, France), and 50 μg/mL gentamycin (Biomedica, Boussens, France).

HSVE cells from passages 3 to 4 were detached from culture flasks by trypsin (0.125%)-EDTA (0.0625%), collected by centrifugation for 7 min at 1200 rpm, and suspended in Dulbecco's modified eagle's medium (Invitrogen) containing 1.8 mM Ca²⁺ and 1 mM Mg²⁺. The protein-SLB-functionalized glass supports were placed in a 12-well plate coated with an agarose layer to prevent cell adhesion to the plastic according to Amédée *et al.*,⁴⁸ and 200 000 cells/well were seeded. Cell adhesion experiments were performed at 37 °C and 5% CO₂ for 3, 6, or 24 h.

The extent of cell adhesion was determined by means of a colorimetric assay according to Verrier *et al.*⁴⁹ Briefly, the samples were transferred, after rinsing with Hanks' balanced salt solution (Invitrogen) to a 48-well plate without agarose. The cells were imaged by phase contrast microscopy and then supplemented with 0.1 M sodium citrate, 7.5 mM *p*-nitrophenyl-*N*-acetyl- β -*D*-glucosaminide, 0.5% (v/v) Triton X-100, pH 5, and placed at 37 °C and 100% humidity.⁵⁰ After 2 h, the enzymatic reaction was stopped by addition of a solution composed of 50 mM glycine, 5 mM EDTA, pH 10.4, and absorbance was measured at 405 nm using a microplate reader (Dynex MRX).

Cell adhesion was also investigated with an R1 MES cell line.⁴¹ Cells were grown and passaged for few days in the following medium: knockout DMEM, knockout serum replacement 15%, *L*-glutamine 2mM, pen/strept 100 u/100 μg/mL, nonessential amino acids 100 μM (Gibco-BRL/Invitrogen), 2000 u/mL LIF (Leukemia Inhibitory Factor, Chemicon/Millipore), and 100 μM β -mercaptoethanol (Sigma). Cells were trypsinized, counted, and 5 × 10⁴ cells in 0.4 mL were seeded per well in a 24-well plate containing SLB-functionalized glass slides corresponding to the different conditions to analyze (Anx5-RGD, Anx5-IKVAV, Anx5 alone), and three control conditions (plastic, nontreated glass, and 0.1% gelatinized glass). MES cells are routinely cultured on gelatin to increase adhesion to the plastic surface. E14 and R1 ES cells were incubated overnight at

37 °C with 5% CO₂, fixed the next day with 4% paraformaldehyde, washed with PBS, and finally incubated at room temperature with the nuclear dye 4'6'-diimidazolin-2-phenylindole (DAPI) for 10 min to quantify the number of cells attached in each condition.

G. Liposome binding assay

DOPC/DOPS (4:1, w:w) multilamellar lipid vesicles (MLVs) were prepared as follows: the desired amounts of lipids dissolved in chloroform were mixed, the solvent was eliminated in a rotary evaporator, a volume of buffer B was added to give a 10 mg/mL lipid suspension, and the suspension was homogenized by vortexing. Aliquots of 100 μg MLVs were incubated for 20 min with mixtures of known Anx5/Anx5-peptide ratio containing a total amount of 40 μg protein (expressed in the equivalent amount of Anx5) in a total volume of 200 μL buffer C. Unbound proteins were separated from MLV-bound proteins by centrifugation at 100 000 rpm for 45 min in a Beckmann Ultima centrifuge. The pellet was resuspended in 300 μL buffer C and a second centrifugation step was carried out to wash the pellet. The final pellet was resuspended in a total volume of 40 μL buffer C. The relative amount of Anx5 and Anx5-peptide was analyzed by SDS-PAGE.

H. Quartz crystal microbalance with dissipation monitoring

QCM-D measurements were performed with a Q-SENSE D300 system equipped with a QAFC 302 axial flow chamber (Q-SENSE, Gothenburg, Sweden), as described in detail elsewhere.⁵¹ In brief, the adsorption of matter at the surface of a sensor crystal induces changes in the resonance frequency, F , of the crystal and in the energy dissipation, D . The frequency change, ΔF , is related to the adsorbed mass, including coupled water, and the dissipation change, ΔD , is related to energy losses in the adsorbed layer and provides information on its viscoelastic properties. The adsorbed mass, m , can be deduced from the Sauerbrey equation,⁵² $m = -C \times \Delta F$, with $C = 17.7 \text{ ng cm}^{-2} \text{ Hz}^{-1}$, which has been demonstrated to be valid for SLBs and protein assemblies on SLBs.⁴⁵ In the QCM-D curves presented in the figures, the ΔF and ΔD jumps associated with buffer exchanges were corrected for.

I. Atomic force microscopy

AFM experiments were performed in liquid using a Nanoscope IV-Multimode (Veeco, Dourdan, France), equipped with a J -scanner (120 μm). Oxide-sharpened silicon nitride cantilevers with a nominal spring constant of 0.06 N/m (Digital Instruments, CA) were exposed to UV/ozone (BHK, CA, USA) for 10 min prior to use.³⁴ The liquid-covered substrates were installed in a contact mode fluid cell equipped with an O-ring, and a sample solution or buffer was injected with a syringe. Contact mode images were recorded at a scanning rate of 4–6 Hz and a scanning angle of 0°. Images were flattened.

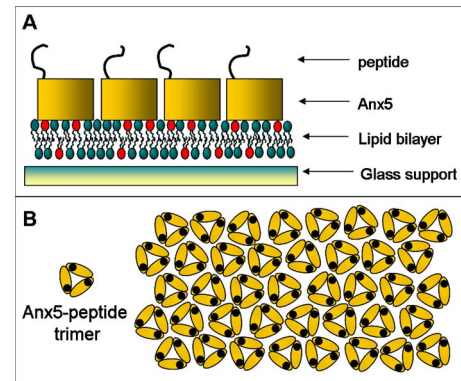


FIG. 1. Scheme of the cell adhesion platform based on a 2D matrix of Anx5-peptides on a SLB. (A) Side view: Anx5-peptide protein complexes self-assembled in a rigid 2D matrix over a SLB formed on a glass support. Cell-adhesion peptides are exposed to the aqueous solution. (B) top view: 2D close-packed assembly of trimers of Anx5-peptides.

J. Transmission electron microscopy

Protein 2D crystallization experiments were performed as described in detail in Ref. 29. Briefly, a lipid monolayer was formed by applying 0.6 μL of a lipid mixture containing 250 μM DOPC and 125 μM DOPS dissolved in chloroform:hexane (1:1, v/v) over a 17 μL droplet of 25 μg/mL Anx5-peptide in buffer C. After 1 h incubation necessary for crystallization, the material present at the air-water interface was transferred onto a perforated carbon-coated 200-mesh copper EM grid by horizontal lifting. The grid was washed with water, negatively stained with 1% uranyl acetate, and coated with a thin layer of carbon to increase stability. TEM observations were performed with a CM-120 FEI microscope operated at 120 kV. Images were recorded on a 2k × 2k USC-1000 slow-scan CCD camera (Gatan, CA, USA) at a nominal magnification of ×40 000. Images were processed with the image processing GRIP software.⁵³

III. RESULTS AND DISCUSSION

Our goal was to develop a platform for cell adhesion consisting of a 2D matrix of Anx5-peptide complexes self-assembled on a SLB, as illustrated in Fig. 1.

A. Synthesis of Anx5-peptide complexes

Two cell-adhesion peptides, containing either a RGD or an IKVAV motif, were synthesized. Both sequences contained in addition a cysteine residue, in order to form a covalent disulfide-bond between the peptides and Anx5-SH, a double mutant of Anx5. The single cysteine residue of Anx5-SH was stereo-selectively inserted in a solvent-exposed loop on the concave face of Anx5, opposite to the membrane-binding face, in order to ensure high accessibility of the coupled elements.^{54,55}

The Anx5-RGD and Anx5-IKVAV disulfide-linked complexes were produced at close to 100% purity with an overall yield of 20% (data not shown). Molecular masses of 36 738 and 37 608 Da were determined by MALDI-TOF mass spec-

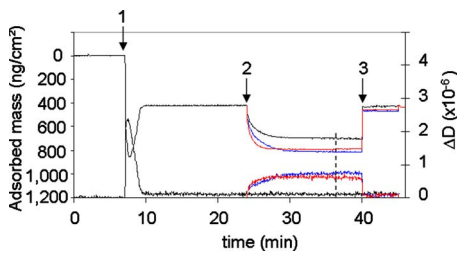


FIG. 2. Adsorption of Anx5-RGD, Anx5-IKVAV, and Anx5 on DOPC/DOPS (7/3) SLBs, by QCM-D. Changes in adsorbed mass (upper curves; increasing values downwards) and dissipation (bottom curves) measured upon addition of DOPC/DOPS (7/3) vesicles (arrow 1), followed by the addition of 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Anx5-RGD (blue), Anx5-IKVAV (red), or Anx5 (black) (arrow 2). Rinsing the QCM-D chamber with protein-free buffer is indicated by a dashed line. At arrow 3, the chamber was rinsed with an EGTA-containing buffer. Biphasic aspect of the mass and dissipation curves observed after the addition of lipid vesicles is characteristic of the formation of a SLB on SiO_2 , stabilizing at about 440 ng/cm^2 and exhibiting no dissipation.^{45,60}

trometry for Anx5-RGD and Anx5-IKVAV, respectively. These values are in good agreement with the theoretical values of 36 759 and 37 628 Da, respectively.

B. Binding and organization of Anx5-peptide 2D matrices on SLBs

The behavior of Anx5-peptide complexes on lipid surfaces was investigated by QCM-D, AFM and TEM, in order to check whether the covalent coupling of peptides to Anx5-SH affected Anx5 properties of binding and 2D self-assembly on SLBs.^{29,30,33–35}

1. Characterization of the binding of Anx5-peptide complexes to SLBs, by QCM-D

Figure 2 presents the QCM-D adsorption responses obtained with both Anx5-RGD and Anx5-IKVAV, as well as with Anx5, on SLBs. Saturation of the SLB surface was obtained with about 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Anx5-RGD, similarly to Anx5.³⁵ At saturation, Anx5-RGD and Anx5-IKVAV adsorbed monolayers are characterized by mass and ΔD values of ~ 350 ng/cm^2 and $\sim 0.8 \times 10^{-6}$, respectively. In comparison, a saturating monolayer of Anx5 has a mass of 280 ng/cm^2 and a ΔD value close to 0.³⁵ As expected, binding of Anx5-peptide complexes is Ca^{2+} -dependent, as shown by the instantaneous and complete release of Anx5-peptide upon rinsing with a buffer containing 2 mM EGTA (arrow 3 in Fig. 2). The 2D Anx5-peptide matrices are stably bound to the SLB, as shown by the absence of release upon rinsing with a protein-free solution (dashed line in Fig. 2). This property, which is characteristic of Anx5,³⁵ is essential for the present application as cell adhesion experiments must be performed in the absence of Anx5-peptide in solution.

The relative mass difference of $\sim 25\%$ observed between Anx5-peptide (~ 350 ng/cm^2) and Anx5 (280 ng/cm^2) matrices is large in comparison with the relative mass increment of the peptides (~ 4 – 6%). This, together with the high dissipation values of Anx5-peptide matrices as compared to

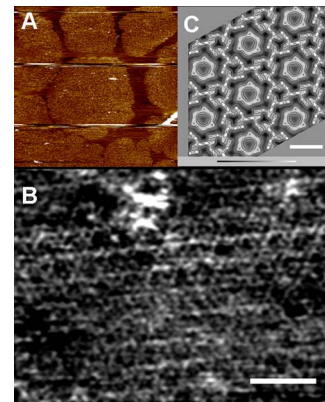


FIG. 3. 2D organization of Anx5-RGD on lipid surfaces, by AFM (A), (B), and TEM (C). A) Domains of Anx5-RGD formed on a DOPC/DOPS (7/3) SLB on mica. Formation of domains is characteristic of the formation of 2D crystalline domains of Anx5 on mica-SLBs.²⁹ Image size: 20 μm . (B) High-magnification AFM image revealing the hexagonal crystalline organization of Anx5-RGD molecules. Scale bar: 40 nm. (C) 2D projection map of an Anx5-RGD 2D crystalline area from a TEM image, calculated at 2.5 nm resolution, with $p3$ symmetry imposed ($a=b=17.7$ nm, $\gamma=120^\circ$).

Anx5, indicates that the peptides are flexible and highly hydrated. The RGD and IKVAV peptides are thus favorably exposed for interacting with integrins.

2. Characterization of the 2D organization of Anx5-peptide matrices by AFM and TEM

The structure of Anx5-peptide 2D matrices was further studied by AFM on SLBs and by TEM on lipid monolayers, following procedures established with Anx5.^{30,33} The results obtained with both peptides were strictly similar; for simplicity, the results obtained with Anx5-RGD are presented here.

Anx5-RGD complexes self-assemble on SLBs in 2D domains, as shown by AFM [Fig. 3(A)]. At saturation, the domains cover entirely the SLB surface (data not shown), as previously observed for Anx5. Observed at higher resolution, these domains present a 2D crystalline organization with hexagonal symmetry [Fig. 3(B)], which is characteristic of Anx5 2D crystals.^{30,35} However, the crystalline order is less clear in images of Anx5-RGD crystals than on Anx5 crystals' images. This is most likely due to the interaction of the AFM tip with RGD peptides, which are flexible and protrude above the rigid Anx5 matrix.

High-resolution structural information was obtained by TEM on Anx5-RGD 2D assemblies formed on lipid monolayers. Two-dimensional crystals of Anx5-RGD were obtained in the same conditions as for Anx5.^{29,33} Figure 3(C) presents a 2D projection map of an Anx5-RGD 2D crystal, calculated by Fourier analysis at 2.5 nm resolution. The 2D crystals of Anx5-RGD are made of trimers arranged with $p6$ symmetry (unit cell dimensions: $a=b=17.7$ nm, $\gamma=120^\circ$), as Anx5 2D crystals.³³

In conclusion, these results demonstrate that the presence of a peptide covalently linked on the concave face of Anx5 opposite to the membrane-binding face does not affect its properties of binding and 2D organization on lipid surfaces. We consider therefore most likely that on glass substrates,

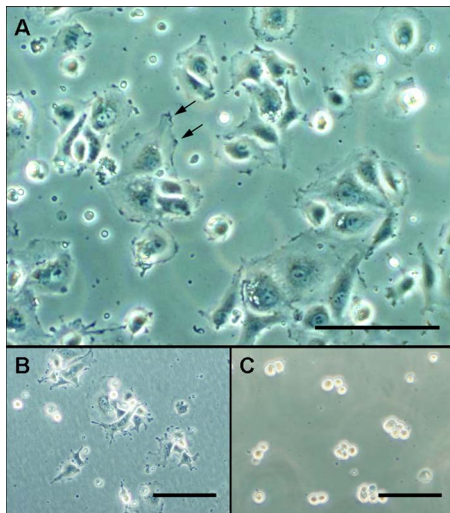


FIG. 4. Adhesion of HSVE cells on various supports. Phase contrast micrographs recorded after 3 h seeding HSVE cells. (A) HSVE cells homogeneously spread on a 2D matrix of Anx5-RGD (at a maximal density of 33 000 Anx5-RGD/ μm^2). Dense focal contact points are observed at the cell periphery (arrows). (B) Cells spread on gelatin, exhibiting similar size and morphology as on Anx5-RGD. (C) HSVE cells do not adhere to an Anx5 matrix and exhibit a rounded shape. Scale bars: 50 μm .

which were used in cell adhesion experiments, Anx5-peptides behave also like Anx5 and form close-packed trimers³⁴ (Fig. 1).

C. Adhesion of HSVE cells and MES cells on 2D matrices of Anx5-peptides

The use of Anx5-peptide 2D matrices on SLBs as a platform for cell adhesion was then investigated with two cell types, HSVE cells and undifferentiated MES cells.

HSVE cells were found to adhere to 2D matrices of Anx5-RGD, as shown in Fig. 4(A) recorded after 3 h incubation. The cells were homogeneously spread, with an average diameter of about 20 μm . The cell nuclei were well-resolved and cytoplasmic extensions with focal contact points observed at the cell periphery [arrows in Fig. 4(A)]. The cell density was about 1400 cells/ mm^2 . This value is slightly higher than the value obtained on gelatin, which is the reference substrate for these cells [Figs. 4(B)].^{56,57} HSVE cells do not adhere to pure Anx5 matrices [Fig. 4(C)] and only

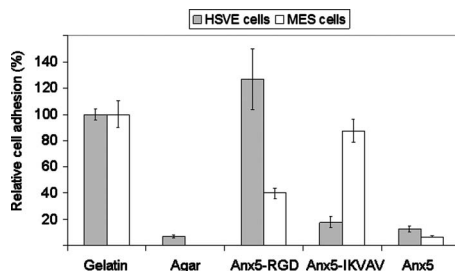


FIG. 5. Adhesion of HSVE cells and MES cells on various supports. The 100% relative adhesion values correspond to values measured on gelatin, which is the reference substrate for both cell types.

weakly to Anx5-IKVAV matrices (Fig. 5). On these substrates, quiescent cells were observed, presenting a characteristic rounded shape and intense light scattering, with a diameter of 2–5 μm [Fig. 4(C)].

With MES cells, we found that Anx5-IKVAV 2D matrices promote cell attachment almost as efficiently as gelatin, which is the reference substrate for these cells (Fig. 5). Previous reports have shown that peptides containing the IKVAV sequence were able to promote the adhesion of neural stem cells,^{24,38} stem cells committed to differentiate only into neural cell types, yet this is the first time that this effect is described for MES cells, pluripotent cells that can give rise to any cell type. MES cells were also observed to attach to Anx5-RGD 2D matrices, yet to a lesser extent than to Anx5-IKVAV (Fig. 5). No attachment was detected on pure Anx5 matrices.

These results demonstrate that the Anx5-peptide 2D matrices constitute an efficient platform for cell adhesion.

D. Influence of the density of Anx5-peptide complexes on cell attachment

We investigated then the influence of the peptide density on cell adhesion. As Anx5 and Anx5-peptides present almost identical properties of binding and 2D organization, we considered that the peptide density could be varied in a controlled manner by using mixtures of Anx5 and Anx5-peptides of known Anx5/Anx5-peptide ratios. To verify this hypothesis, we developed the following liposome-binding assay: (1) liposomes were incubated in the presence of protein solutions containing known Anx5/Anx5-peptide ratios, with an excess of Anx5 moieties with respect to the available lipid surface; (2) liposomes were separated from unbound proteins by centrifugation; (3) the respective amount of liposome-bound Anx5 and Anx5-peptide was evaluated by SDS-PAGE. The results presented in Fig. 6 show qualitatively that, for both RGD and IKVAV peptides, the respective amount of Anx5 and Anx5-peptide bound to liposomes was indeed in agreement with the original Anx5/Anx5-peptide ratio.

The surface density of Anx5-RGD peptides was shown to influence the adhesion of HSVE cells (Fig. 7). The maximal density of Anx5-RGD molecules in a 2D matrix made of pure Anx5-RGD is about 33 000 Anx5-RGD/ μm^2 ; the corresponding RGD-to-RGD distance is about 6 nm.^{33,35} Decreasing the RGD density down to 6000 RGD/ μm^2 had only a minor effect on cell adhesion. Cell attachment was observed down to 1% Anx5-RGD, which corresponds to 300 RGD/ μm^2 .

Similar results were obtained when the attachment of MES cells was studied at various densities of Anx5-IKVAV peptides. The critical IKVAV density required for initial cell attachment was close to 300 IKVAV/ μm^2 (data not shown).

A density of 300 Anx5-peptide/ μm^2 corresponds to an average distance of 58 nm between ligands. This number is strikingly close to the critical distance of 58–73 nm determined by Spatz and colleagues⁵⁸ with nanopatterned RGD-linked gold particles, below which cells do not adhere. We

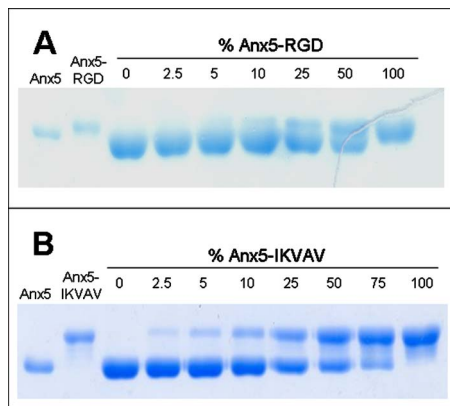


FIG. 6. SDS-PAGE analysis of the relative amount of Anx5-peptides and Anx5 bound to liposomes. Two left lanes correspond to pure Anx5 and Anx5-peptides [RGD in (A), IKVAV in (B)] in the absence of liposomes. The other lanes correspond to liposome pellets obtained after incubation with the following (Anx5-peptide/Anx5) mass ratios: 0/100; 2.5/97.5; 5/95; 10/90; 25/75; 50/50; 75/25 (for IKVAV), 100/0. Relative intensities of the Anx5-peptide and Anx5 bands in samples ranging from 25/75 to 100/0, estimated visually, are in good agreement with the protein ratios. For the three lower ratios (2.5/97.5, 5/95, and 10/90), the large difference in the absolute amounts of deposited proteins prevents direct quantitative estimation. Amount of Anx5-peptide was estimated by comparison with reference gels of known Anx5-peptide amounts (data not shown).

must say however that the 58-nm distance determined in our study corresponds to an average distance between ligands, and not an absolute distance as in the case of RGD-gold particles.⁵⁸ Nevertheless, the critical ligand density determined in our study is significantly lower than values previously reported with SLBs functionalized with lipo-peptides.²³ These two modes of peptide presentation differ mainly in terms of lateral mobility of ligands, as ligands diffuse freely in 2D in the case of lipo-peptides incorporated in SLBs,²³ while they are immobile in Anx5-peptide matrices, and also in the case of nanopatterned gold colloids. Other possible differences are the homogeneity, orientation, and/or accessibility of the peptides, which are well controlled in the case of a protein 2D matrix.

IV. CONCLUSIONS

This paper presents a platform for cell adhesion, consisting of a 2D matrix of Anx5-peptide complexes self-assembled on a SLB. The property of Anx5 to self-assemble at lipid surfaces into a rigid platform is exploited for present-

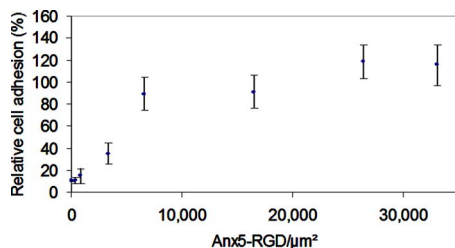


FIG. 7. Influence of the RGD peptide density on the adhesion of HSVE cells. Mean values and SD from six experiments. The 100% relative adhesion values correspond to values measured on gelatin.

ing cell adhesion peptides. All known advantageous properties of Anx5 are shown to be conserved in Anx5-peptide complexes. Cell attachment is demonstrated with two different peptides and two different cell types. The efficiency of the platform in promoting cell adhesion is likely to result from the homogeneity, orientation, and accessibility with which peptides are presented. This paper also shows that undifferentiated MES cells attach specifically to IKVAV peptides, opening up the possibility of cell separation.

The proposed strategy opens promising perspectives, for example for the sorting of cells via Anx5-peptide-SLB-functionalized glass beads, for the transfer of cells between supports, e.g., via Langmuir-Blodgett techniques, or for the development of cell chips via lipid bilayers suspended over holes.⁵⁹ Anx5 2D matrices may also be used for presenting other molecular entities, e.g., antibodies or proteins for the development of biosensors or microarray systems.

ACKNOWLEDGMENTS

The contribution of Christine Mazères-Dubut and Natalia Govorukhina to the early phase of Anx5-SH studies is greatly acknowledged. The authors thank Jean-Marie Schmitter and Katel Bathany (IECB, University of Bordeaux) for performing mass spectrometry experiments, and Stephane Mornet (ICMCB, Bordeaux) for fruitful discussions. The authors are grateful to Reine Bareille (INSERM-U 577, Bordeaux) for her technical assistance with cell culture. R. Bérat is the recipient of a Ph.D. fellowship from the Conseil Régional d'Aquitaine. This research was supported by funds from the Conseil Régional d'Aquitaine, the CNRS, and EC grant FP6-NMP4-CT2003-505868 "Nanocues" project.

- ¹A. Kikuchi and T. Okano, *J. Control. Release* **101**, 69 (2005).
- ²A. K. Dillow and M. Tirrell, *Curr. Opin. Solid State Mater. Sci.* **3**, 252 (1998).
- ³J. A. Hubbell, *Curr. Opin. Biotechnol.* **10**, 123 (1999).
- ⁴M. Tanaka and E. Sackman, *Nature (London)* **437**, 656 (2005).
- ⁵M. Tirrell, E. Kokkoli, and M. Biesalski, *Surf. Sci.* **500**, 61 (2002).
- ⁶E. Ruoslahti, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **12**, 697 (1996).
- ⁷U. Hersel, D. Claudia, and K. Horst, *Biomaterials* **24**, 4385 (2003).
- ⁸S. Miyamoto, S. K. Akiyama, and K. M. Yamada, *Science* **267**, 883 (1995).
- ⁹N. Q. Balaban, U. S. Schwarz, D. Riveline, P. Goichberg, G. Tzur, I. Sabanay, D. Mahalu, S. Safran, A. Bershadsky, L. Addadi, and B. Geiger, *Nat. Cell Biol.* **3**, 466 (2001).
- ¹⁰M. Schuler, G. Owen, D. Hamilton, M. de Wild, M. Textor, D. M. Brunette, and S. Tosatti, *Biomaterials* **27**, 4003 (2006).
- ¹¹B. T. Houseman, E. S. Gawalt, and M. Mrksich, *Langmuir* **19**, 1522 (2003).
- ¹²J. T. Groves and M. L. Dustin, *J. Immunol. Methods* **278**, 19 (2003).
- ¹³E. Sackmann, *Science* **271**, 43 (1996).
- ¹⁴R. P. Richter, R. Berat, and A. R. Brisson, *Langmuir* **22**, 3497 (2006).
- ¹⁵A.-S. Andersson, K. Glasmästar, D. Sutherland, U. Lidberg, and B. Kasemo, *J. Biomed. Mater. Res.* **64A**, 622 (2003).
- ¹⁶L. Kam and S. G. Boxer, *J. Biomed. Mater. Res.* **55**, 487 (2001).
- ¹⁷L. Ruiz, E. Fine, J. Vörös, S. Makohliso, D. Léonard, D. Johnston, M. Textor, and H. Mathieu, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **10**, 931 (1999).
- ¹⁸Y. Dori, H. Bianco-Peled, S. Satija, G. Fields, J. McCarthy, and M. Tirrell, *J. Biomed. Mater. Res.* **50**, 75 (2000).
- ¹⁹M. Biesalski, A. Knaebel, R. Tu, and M. Tirrell, *Biomaterials* **27**, 1259 (2006).
- ²⁰T. Jensen, B. Hu, S. Delatore, A. Garcia, P. Messersmith, and W. Miller,

- J. Am. Chem. Soc. **126**, 15223 (2004).
- ²¹R. V. Marchi-Artzne, B. Lorz, U. Hellerer, M. Kantelehner, H. Kessler, and E. Sackmann, *Chemistry (Easton)* **7**, 1095 (2001).
- ²²S. E. Ochsenhirt, E. Kokkoli, J. B. McCarthy, and M. Tirrell, *Biomaterials* **27**, 3863 (2006).
- ²³T. Pakalns, K. L. Haverstick, G. B. Fields, J. B. McCarthy, D. L. Mooradian, and M. Tirrell, *Biomaterials* **20**, 2265 (1999).
- ²⁴S. Svedhem, D. Dahlborg, J. Ekeröth, J. Kelly, F. Hook, and J. Gold, *Langmuir* **19**, 6730 (2003).
- ²⁵D. Thid, K. Holm, P. S. Eriksson, J. Ekeröth, B. Kasemo, and J. Gold, *J. Biomed. Mater. Res. A* (2007).
- ²⁶D. Stroumpoulis, H. Zhang, L. Rubalcava, J. Gliem, and M. Tirrell, *Langmuir* **23**, 3849 (2007).
- ²⁷D. Thid, Ph.D. thesis, Chalmers University of Technology, 2007.
- ²⁸E. Uzgiris and R. Kornberg, *Nature (London)* **301**, 125 (1983).
- ²⁹A. Brisson, W. Bergsma-Schutter, F. Oling, O. Lambert, and I. Reviakine, *J. Cryst. Growth* **196**, 456 (1999).
- ³⁰I. Reviakine, W. Bergsma-Schutter, and A. Brisson, *J. Struct. Biol.* **121**, 356 (1998).
- ³¹G. Mosser, C. Ravanat, J.-M. Freyssinet, and A. Brisson, *J. Mol. Biol.* **217**, 241 (1991).
- ³²D. Voges, R. Berendes, A. Burger, P. Demange, W. Baumeister, and R. Huber, *J. Mol. Biol.* **238**, 199 (1994).
- ³³F. Oling, W. Bergsma-Schutter, and A. Brisson, *J. Struct. Biol.* **133**, 55 (2001).
- ³⁴R. P. Richter and A. Brisson, *Langmuir* **19**, 1632 (2003).
- ³⁵R. P. Richter, J. Lai Kee Him, B. Tessier, C. Tessier, and A. R. Brisson, *Biophys. J.* **89**, 3372 (2005).
- ³⁶N. Govorukhina, W. Bergsma-Schutter, C. Mazeres-Dubut, S. Mazeres, E. Drakopoulou, L. Bystrykh, F. Oling, A. Mukhopadhyay, I. Reviakine, J. Lai Kee Him, and A. Brisson, in *Annexins: Biological Importance and Annexin-related Pathologies*, edited by J. Bandorowicz-Pikula (Landes Bioscience, Austin, TX, 2003), p. 61.
- ³⁷R. P. Richter, Ph.D. thesis, University Bordeaux 1, 2004.
- ³⁸K. Tashiro, G. Sephel, B. Weeks, M. Sasaki, G. Martin, H. Kleinman, and Y. Yamada, *J. Biol. Chem.* **264**, 16174 (1989).
- ³⁹N. Patel, R. Padera, G. Sanders, S. Cannizzaro, M. Davies, R. Langer, C. Roberts, S. Tendler, P. Williams, and K. Shakesheff, *FASEB J.* **12**, 1447 (1998).
- ⁴⁰M. Sasaki, H. Kleinman, H. Huber, R. Deutzmann, and Y. Yamada, *J. Biol. Chem.* **263**, 16536 (1988).
- ⁴¹A. Nagy, J. Rossant, R. Nagy, W. Abramow-Newerly, and J. C. Roder, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90**, 424 (1993).
- ⁴²R. Pepinsky, R. Tizard, R. Mattaliano, L. Sinclair, G. Miller, J. Browning, E. Chow, C. Burne, K. Huang, and D. Pratt, *J. Biol. Chem.* **263**, 10799 (1988).
- ⁴³J. P. Schanstra, R. Rink, F. Pries, and D. B. Janssen, *Protein Expr. Purif.* **4**, 479 (1993).
- ⁴⁴G. Barany and R. B. Merrifield, in *The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology*, edited by E. Gross and J. Meienhofer (Academic, New York, 1979), p. 1.
- ⁴⁵C. A. Keller and B. Kasemo, *Biophys. J.* **75**, 1397 (1998).
- ⁴⁶P. Fernandez, A. Deguet, L. Pothuau, G. Belleannée, P. Coste, and L. Bordenave, *Biomaterials* **26**, 5042 (2005).
- ⁴⁷J. Golledge, R. J. Turner, S. L. Harley, and J. T. Powell, *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.* **13**, 605 (1997).
- ⁴⁸J. Amedee, R. Bareille, R. Jeandot, L. Bordenave, M. Remy, F. Rouais, and C. Baquey, *Biomaterials* **15**, 1029 (1994).
- ⁴⁹S. Verrier, S. Pallu, R. Bareille, A. Jonczyk, J. Meyer, M. Dard, and J. Amédée, *Biomaterials* **23**, 585 (2002).
- ⁵⁰U. Landegren, *J. Immunol. Methods* **67**, 379 (1984).
- ⁵¹M. Rodahl, F. Höök, A. Krozer, P. Brzezinski, and B. Kasemo, *Rev. Sci. Instrum.* **66**, 3924 (1995).
- ⁵²G. Sauerbrey, *Z. Phys. A: Hadrons Nucl.* **155**, 206 (1959).
- ⁵³G. T. Oostergetel, W. Keegstra, and A. Brisson, *J. Mol. Biol.* **314**, 245 (2001).
- ⁵⁴R. Huber, J. Römisch, and E.-P. Paques, *EMBO J.* **9**, 3867 (1990).
- ⁵⁵I. Reviakine, W. Bergsma-Schutter, C. Mazeres-Dubut, N. Govorukhina, and A. Brisson, *J. Struct. Biol.* **131**, 234 (2000).
- ⁵⁶B. Jarrell, E. Levine, S. Shapiro, S. Williams, R. A. Carabasi, S. Mueller, and S. Thornton, *J. Vasc. Surg.* **1**, 757 (1984).
- ⁵⁷I. A. M. Relou, C. A. Damen, D. W. J. van der Schaft, G. Groenewegen, and A. W. Griffioen, *Tissue Cell* **30**, 525 (1998).
- ⁵⁸M. Arnold, E. A. Cavalcanti-Adam, R. Glass, J. Blümmel, W. Eck, M. Kantelehner, H. Kessler, and J. P. Spatz, *ChemPhysChem* **5**, 383 (2004).
- ⁵⁹A. Janshoff and C. Steinem, *Anal. Bioanal. Chem.* **385**, 433 (2006).
- ⁶⁰R. Richter, A. Mukhopadhyay, and A. Brisson, *Biophys. J.* **85**, 3035 (2003).