



HAL
open science

Interaction colloïdes - cellules : étude de l'adhésion spécifique

Cécile Poirier

► **To cite this version:**

Cécile Poirier. Interaction colloïdes - cellules : étude de l'adhésion spécifique. Biologie cellulaire. Université Sciences et Technologies - Bordeaux I, 2005. Français. NNT : . tel-00012076

HAL Id: tel-00012076

<https://theses.hal.science/tel-00012076>

Submitted on 3 Apr 2006

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 : 3026

THESE

présentée à

L'UNIVERSITE BORDEAUX 1

ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES CHIMIQUES

par Cécile POIRIER

POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR

SPECIALITE : Physico-Chimie de la Matière Condensée

**INTERACTION COLLOIDES – CELLULES :
Etude de l'adhésion spécifique**

Soutenue le 10 octobre 2005

Après avis de :

Mme. Patricia BASSEREAU
Mme. Laurence SALOME

Rapporteur
Rapporteur

Devant la commission d'examen formée de :

M. Philippe BAROIS
Mme. Patricia BASSEREAU
MM. Ludger JOHANNES
Jochen LANG
Didier ROUX
Mme Laurence SALOME

Président
Rapporteur
Examineur
Examineur
Directeur de thèse
Rapporteur

Membre invité :

M. Frédéric PINCET

A mes parents.

A Ventenat.

Remerciements

Ces trois années au CRPP ont été pour moi un vrai plaisir et un réel épanouissement et je remercie chaleureusement tous ceux qui y ont contribué de près ou de loin.

Pour commencer, je remercie vivement Didier pour la direction de ce travail. Je voudrais lui exprimer ici toute ma gratitude pour m'avoir fait découvrir cette discipline, pour ses conseils toujours avisés, son enthousiasme et sa confiance.

Damien et Brigitte, tous mes remerciements ne suffiront pas ! Nous avons constitué une équipe de choc, de « manips du siècle », de fous rires et de complicité. Je ne peux qu'être profondément reconnaissante de votre appui et de votre aide. Rien n'aurait eu la même saveur sans vous...

Je tiens également à remercier tout particulièrement l'ensemble des membres du jury pour l'intérêt qu'ils ont porté à ce travail ainsi que le Centre de Recherche Paul Pascal et l'ensemble de ses membres pour l'environnement enrichissant et formateur qu'ils offrent aux étudiants. Merci à toute l'équipe « Biotech » et en particulier à Laurence pour m'avoir accueilli au laboratoire avec dynamisme et sympathie ; à l'équipe des « Tackeurs », à Cyprien pour nos quelques réflexions polymériques communes, à Frédo et aux occupants du bureau 123 pour avoir apprécié (et parfois supporté !) mes essais pâtisseries.

Ces trois années m'ont également donné la chance de pouvoir développer de nombreuses collaborations; elles m'ont beaucoup appris et ont été des aides précieuses dans le déroulement de ce travail. Merci à Line et à Pascale de l'Institut de Biologie de Lille, à Ludger de l'Institut Curie. Une gratitude toute particulière pour Frédéric et Julien qui ont partagé avec Damien et moi leur deuxième sous-sol de l'Ecole Normale : ces voyages réguliers « au centre de la terre », les escaliers obscurs et les tartes au chocolat du V^{ème} arrondissement sont des souvenirs qui resteront !

Un grand merci à Sylwia pour nos discussions canapés toujours interminables, à Patrick pour ses réflexions souvent très justes (mais bisounours je reste!). Toute ma reconnaissance à Jérémie pour son écoute attentive et nos interrogations existentielles partagées. A Pascale pour son optimisme, ses attentions réconfortantes et son marabout toujours efficace ! A Brigitte, pour son soutien quotidien, sa disponibilité et nos heures sportives. A Damien, pour avoir su me guider (mais oui, je la prends en main cette thèse !!!), pour avoir partagé les réussites et les petits tracas, pour tous nos délires de « Kiches »... merci d'avoir été là.

Je n'oublie pas tous les autres, famille et amis qui en dehors du labo à un moment ou à un autre ont su m'apporter soutien, rires et bon moments ; merci à Fabienne pour notre duo complice de plus de quinze ans, à Cécile pour avoir, en toutes circonstances, toujours su m'épauler de son amitié sincère.

Enfin, je ne peux qu'offrir ma plus profonde reconnaissance à ceux qui m'ont aidé à grandir et supportent avec indulgence mes impatiences et ma mauvaise humeur depuis maintenant plus de 26 ans, mes parents et un petit coin de Charente...

Table des matières

Introduction générale	11
-----------------------------	----

Chapitre 1 : Contexte général	13
-------------------------------------	----

I. Introduction	14
I.1. La cellule et le milieu extérieur	14
I.2. La membrane plasmique	16
I.3. L'endocytose	18
I.4. Infection de la cellule par des agents pathogènes : exemple des virus	19
I.5. Vectorisation	22
I.6. Bilan	24
II. Des colloïdes lipidiques multilamellaires comme vecteurs modèles	25
II.1. Des colloïdes multilamellaires	25
II.2. De nouveaux vecteurs biologiques	28
II.3. Des colloïdes modèles	30
III. Ciblage des colloïdes : stratégie de fonctionnalisation	31
III.1. Colloïdes fonctionnalisés par la sous unité B de la toxine de Shiga	31
III.2. Colloïdes fonctionnalisés par une séquence peptidique GRGDSP	37
III.3. Des colloïdes fonctionnalisés fluorescents	42
IV. Modèle cellulaire utilisé : la cellule HeLa	44
IV.1. Notion de lignée cellulaire	44
IV.2. La cellule HeLa : une cellule tumorale épithéliale	45
IV.3. Remarques sur l'utilisation de lignées cellulaires	45
V. Problématique générale	46

Chapitre 2 : Adhésion sur des récepteurs cellulaires. Suivi cinétique	49
---	----

A. Mesure de l'adhésion par cytométrie de flux	51
I. Une technique quantitative basée sur la fluorescence	51
I.1. Principe de la mesure	51
I.2. Traitement statistique des données	52
II. Protocole expérimental	54
III. Remarques importantes	55
III.1. Des grandeurs relatives	55
III.2. Fluorescence du milieu environnant et lavage	56
III.3. Reproductibilité des mesures – erreurs expérimentales	57

B. Cinétique d'adhésion de colloïdes	58
I. Colloïdes Shiga et récepteurs Gb3	58
I.1. Prérequis et premiers résultats	58
I.2. Spécificité de l'interaction	62
I.3. Etude cinétique.....	64
I.4. Perturbation de l'équilibre	68
I.5. Des résultats étonnants et contradictoires	71
II. Comparaison avec d'autres systèmes	72
II.A. Ligand Shiga seul	72
II.A.1. Sous unité B de la toxine de Shiga libre en solution	72
II.A.2. Spécificité de l'interaction	72
II.A.3. Etude cinétique	73
II.B. Colloïdes cationiques : cas d'une adhésion non spécifique	78
II.C. Colloïdes RGD – Récepteurs intégrines	79
II.C.1. Résultats antérieurs	79
II.C.2. Etude cinétique.....	80
II.C.3. Paramètres et constantes d'équilibre.....	81
II.C.4. Perturbations de l'équilibre.....	83
II.D. Conclusion	84
C. Discussion sur l'adhésion des colloïdes	85
I. Modèle d'équilibre à une seule étape	85
II. Modèle cinétique irréversible avec diffusion des récepteurs	86
II.1. Présentation du modèle.....	87
II.2. Résultats du modèle.....	88
II.3. Comparaison avec les expériences et discussion.....	89
III. Modèle d'équilibre à plusieurs étapes successives	90
III.1. Présentation	90
III.2. Résultats	91
III.3. Discussion	95
III.4. Validité d'une description de type équilibre à une seule étape	96
III.5. Conclusion.....	99
Chapitre 3 : Modification des colloïdes : Effets sur l'adhésion	101
A. Ajout de polymères à la surface des colloïdes	102
I. Pourquoi et comment ajouter des polymères	102
I.1. Contexte général	102
I.2. Le polymère utilisé : un lipide-PEG 2000	102
I.3. Formulation de colloïdes pegylés	103
I.4. Géométrie du système.....	104
I.5. Des colloïdes ciblant et pegylés	107
II. Adhésion de colloïdes Shiga-PEG	107
II.1. Introduction et rappels	107
II.2. Effet de la densité de polymères	108
II.3. Etude cinétique	108
II.4. Représentations en terme de barrières énergétiques.....	110
III. Interprétations proposées	113
III.1. Quelques considérations géométriques et ordres de grandeurs.....	113

III.2. Interprétation proposée : pression osmotique des polymères.....	114
III.3. Discussion	117
B. Variation de la densité de ligands à la surface des colloïdes Shiga.....	118
I. Etude cinétique	118
I.1. Densité surfacique de ligands Shiga	118
I.2. Résultats.....	118
II. Discussion	120
II.1. Interprétation des résultats.....	120
II.2. Discussion.....	121
 Chapitre 4 : Cas des colloïdes RGD : Adhésion - Ajout de polymères - Modification de la longueur du ligand.....	 123
I. Adhésion des colloïdes RGD.....	124
I.1. Nécessité de la centrifugation	124
I.2. Spécificité de l'effet.....	126
I.3. Interprétations proposées	127
I.4. Discussion : Comparaison entre colloïdes Shiga et colloïdes RGD	130
I.5. Conclusion	132
II. Ajout de polymères : colloïdes RGD-PEG	132
II.1. Protocole expérimental	132
II.2. Résultats.....	133
III. Modification de la longueur du ligand RGD	135
III.1. Contexte et motivations de l'étude.....	135
III.2. Systèmes de ciblage utilisés	135
III.3. Résultats obtenus.....	137
III.4. Conclusion.....	139
 Chapitre 5 : Mesure de force locale sur colloïde unique. Micromanipulation par Biomembrane Force Probe.....	 141
I. Introduction et intérêt de la technique.....	142
I.1. La technique de Biomembrane Force Probe.....	142
I.2. Intérêt de la BFP	142
II. L'expérience de Biomembrane Force Probe	145
II.1. Dispositif expérimental.....	145
II.2. Principe de la mesure.....	150
II.3. Notion de force de rupture.....	153
III. Résultats expérimentaux et discussion	156
III.1. Faisabilité et mise au point expérimentale	156
III.2. Spécificité de l'interaction	157
III.3. Des distributions de forces quantifiées.....	158
III.4. Variation du temps de contact.....	162
III.5. Conclusion et Perspectives.....	164
 Chapitre 6 : Quelques perspectives sur l'internalisation des colloïdes	 167

I. Internalisation des colloïdes	168
I.1. Observation en microscopie confocale de fluorescence	168
I.2. Cinétiques d'internalisation	171
II. Devenir des objets dans la cellule : notions de trafic intracellulaire et perspectives d'étude	173
II.1. Des voies d'entrées et des parcours intracellulaires variés pour les ligands	173
II.2. Problématique : devenir intracellulaire de colloïdes ciblant	176
II.3. Premiers résultats exploratoires	177
II.4. Perspectives	179
<i>Conclusion générale</i>	181
<i>Annexes</i>	183
<i>Bibliographie</i>	211

Introduction générale

Ce travail se situe dans la continuité d'une problématique générale de vectorisation développée depuis dix ans au Centre de Recherche Paul Pascal. Afin d'enrichir la compréhension de cette thématique très vaste, le sujet présenté ici s'est tourné vers l'étude plus fondamentale de **l'interaction entre colloïdes et cellules**. A l'interface entre la physique et la biologie, cette étude a été l'occasion de développer d'étroites collaborations avec des équipes de biologistes d'une part (Ludger Johannes - UMR 144 CNRS/Institut Curie, Paris) et de physiciens d'autre part (Frédéric Pincet - LPS, ENS, Paris), collaborations sur lesquelles le travail présenté ici s'appuie très largement.

Le sujet s'intéresse à **l'adhésion de particules lipidiques sur la surface cellulaire**. En particulier, l'interaction **spécifique** que nous étudions repose sur le *ciblage* des colloïdes, opération qui permet l'accrochage de l'objet sur sa cible cellulaire via un mécanisme de reconnaissance ligand – récepteur. En s'appuyant essentiellement sur des mesures statistiques quantitatives, nous proposons dans ce travail de décrire les mécanismes impliqués dans l'interaction en mettant en évidence les différents paramètres qui affectent le lien colloïde – cellule. Nous soulignons notamment les effets coopératifs mis en jeu dans la rencontre d'une population de cellules et d'une dispersion colloïdale ; nous montrons par ailleurs des effets de répulsion non spécifique qui révèlent l'importance de l'environnement membranaire.

Dans le premier chapitre, nous présenterons le cadre général du travail et ses connections avec l'accrochage sur cellules de particules colloïdales telles que des virus, des complexes protéiques ou des vecteurs synthétiques. Nous décrirons ensuite les caractéristiques des colloïdes que nous utilisons en soulignant les différents types de ciblage mis en place.

Le cœur du travail qui repose sur **une étude cinétique quantitative de l'adhésion** de ces objets sur des cellules en culture, sera développé dans les chapitres 2, 3 et 4. Après avoir détaillé la méthode de mesure mise au point, nous essaierons en particulier de proposer et de discuter des modèles permettant d'interpréter les résultats obtenus; **nous verrons ainsi de quelle façon ces mesures cinétiques menées sur une population de cellules peuvent rendre compte des mécanismes microscopiques pourtant complexes mis en jeu dans l'adhésion** (2). Nous soulignerons par ailleurs de quelle manière les paramètres physico-chimiques de ces objets synthétiques contrôlent leur comportement sur cellules (3 et 4). Puis, nous compléterons notre étude dans le chapitre 5 par une approche biophysique de mesure locale de force sur colloïde unique. Enfin, le dernier chapitre ouvrira la voie à l'étude de l'entrée et du devenir des particules à l'intérieur même des cellules.

Chapitre 1

Contexte général

Ce chapitre a pour objectif de replacer la problématique de ce travail dans un contexte général de biologie cellulaire et de présenter l'angle d'approche plus physique que nous adoptons pour tenter d'y répondre. Nous essaierons en particulier de montrer en quoi l'étude de l'interaction spécifique entre des colloïdes lipidiques synthétiques et des cellules peut constituer une situation modèle pour la compréhension plus globale des mécanismes d'adhésion d'agents biologiques (virus, complexes protéiques...) sur cellules.

Dans une première partie introductive, nous reviendrons sur les notions de biologie cellulaire indispensables pour appréhender cette étude. Nous détaillerons ensuite les caractéristiques des colloïdes particuliers que nous utilisons ; il s'agit en effet de vésicules lipidiques multilamellaires jusqu'au centre préparées par un procédé de fabrication découvert au laboratoire en 1993. Nous verrons dans un troisième volet de quelle façon il est possible de fonctionnaliser leur surface en y greffant un motif de reconnaissance (un ligand) permettant de créer une affinité spécifique pour des récepteurs situés sur la membrane cellulaire. Enfin, nous introduirons la problématique générale et nous présenterons le plan de l'étude développé dans la suite de ce manuscrit.

I. Introduction

Cette première partie se propose de rappeler de manière très simplifiée quelques notions de biologie cellulaire qui seront nécessaires au lecteur non initié pour la compréhension de la suite. Nous reviendrons en particulier sur la morphologie de la membrane plasmique. Nous essaierons, en nous appuyant sur l'exemple des virus et de la vectorisation, de souligner l'intérêt de la problématique d'interaction colloïdes – cellules.

I.1. La cellule et le milieu extérieur

Le fonctionnement de la cellule repose sur sa capacité à échanger avec l'extérieur différents éléments essentiels à son développement. De surcroît, la très grande majorité des êtres vivants sont pluricellulaires et donc constitués de plusieurs cellules qui s'organisent pour former des unités structurales et fonctionnelles (tissus, organes). Cette organisation à grande échelle nécessite un système de communication et de transport coordonné. La cellule est donc structurée pour répondre à ces contraintes.

I.1.1. La cellule eucaryote animale : un assemblage organisé de compartiments aux fonctions spécifiques

La cellule constitue l'unité structurale la plus simple capable de vivre en tant qu'organisme. Séparée du milieu extérieur par sa membrane plasmique, elle est dotée d'une machinerie complexe qui lui permet de se reproduire, de se déplacer, de communiquer. Ces fonctions bien définies sont assurées par différents compartiments intracellulaires, permettant ainsi le développement global de l'unité.

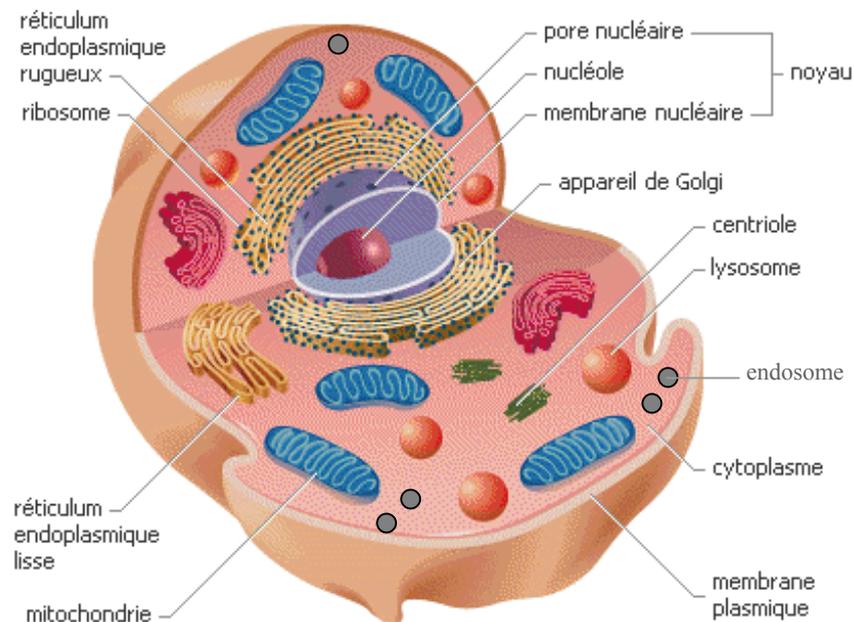


Figure 1 : Les principaux éléments d'une cellule eucaryote animale

Nous retiendrons ici les principaux éléments qui constituent la cellule eucaryote animale. La **membrane plasmique** assure son intégrité en maintenant les différences fondamentales qui existent entre le milieu intérieur et le milieu extérieur. Elle délimite ainsi le **cytoplasme**, constitué d'un grand volume aqueux (le **cytosol**) et divisé en plusieurs compartiments:

- le **noyau** contient le génome ; c'est le principal site de synthèse de l'ADN et de l'ARN.
- le **réticulum endoplasmique** (noté **RE**) et les ribosomes synthétisent les protéines et la plupart des lipides après décodage de l'information génétique.
- l'**appareil de Golgi** reçoit les protéines et les lipides synthétisés dans le RE et les distribue vers leurs destinations respectives (l'extérieur de la cellule, la membrane plasmique ou d'autres compartiments cellulaires)
- les **mitochondries** synthétisent la plupart de l'ATP utilisé par la cellule pour actionner les réactions qui nécessitent un apport d'énergie libre.
- les **lysosomes** contiennent des enzymes digestives ; ce sont des compartiments de dégradation.
- de nombreuses **vésicules** assurent le transport entre ces différents éléments (endosomes, vésicules de sécrétion).

Par ailleurs, un ensemble de protéines polymérisées sous forme de filaments appelé **cytosquelette** assure le lien entre les compartiments et la cohésion mécanique de la structure. Filaments intermédiaires, filaments d'actine et microtubules permettent ainsi à la cellule de résister au cisaillement, assurent sa locomotion et dirigent le transport intracellulaire.

I.1.2. Un trafic intracellulaire complexe mais organisé

Pour croître et se reproduire, la cellule doit :

- importer les matériaux bruts et les nutriments qui lui sont nécessaires
- exporter les produits qu'elle synthétise et ses déchets

Il y a donc en permanence entrée, déplacement et sortie de produits au sein de la cellule. C'est ce que l'on appelle **trafic intracellulaire**. Nous pouvons retenir qu'essentiellement trois voies distinctes cohabitent :

- la voie de biosynthèse sécrétion (**voie sécrétoire**) consiste à exporter vers l'extérieur les produits de synthèse de la cellule ; il s'agit par exemple de protéines synthétisées dans le RE puis distribuées dans le milieu extracellulaire.
- la voie d'entrée, l'**endocytose**, qui permet de faire pénétrer à l'intérieur de la cellule les éléments qui lui sont nécessaires.
- la voie de **dégradation** qui élimine les déchets et les éléments indésirables qui seraient parvenus à entrer dans la cellule; ce sont des compartiments particuliers, les lysosomes, qui assurent cette fonction.

De nombreux éléments (protéines, compartiments cellulaires, filaments du cytosquelette...) sont impliqués en cascade dans ces déplacements mettant en jeu des processus coopératifs complexes. En particulier, les cellules possèdent dans leur membrane des protéines spécialisées qui servent entre autre à transporter des molécules spécifiques d'un côté à l'autre. Ces protéines membranaires ou **récepteurs** reconnaissent spécifiquement la molécule **ligand** qui leur est destinée ; elles agissent alors comme des capteurs de signaux externes permettant à la cellule de modifier son comportement en réponse aux stimuli de l'environnement. **Ce mécanisme de reconnaissance, appelé ligand-récepteur, permet ainsi d'assurer le transfert d'une substance ou d'une information** (par activation des voies de transduction du signal) à travers la membrane.

La membrane plasmique joue ainsi, via les récepteurs qu'elle contient, un rôle actif et fondamental d'interface. Nous allons dans la suite donner quelques détails complémentaires sur son organisation, sa composition et son fonctionnement.

I.2. La membrane plasmique

I.2.1. Une bicouche de phospholipides qui contient de nombreuses protéines

Toutes les membranes cellulaires ont une **structure globale commune autour d'une double couche lipidique** d'environ 5nm d'épaisseur. On y trouve majoritairement trois grandes classes de lipides. Tout d'abord, les **phospholipides** (phosphatidylcholine, sphingomyéline, phosphatidylsérine et phosphatidyléthanolamine) sont les principaux constituants. Puis, le **cholestérol** est également présent en quantité importante dans les cellules eucaryotes. Enfin, on recense des **glycolipides**. Minoritaires, ils jouent pourtant un rôle important dans les interactions entre la cellule et son entourage. Ainsi, certains fournissent des points d'entrée pour des toxines bactériennes. C'est le cas du ganglioside GM1 par exemple qui agit comme un récepteur cellulaire de surface pour la toxine du choléra ou encore du globotriaosylcéramide (Gb3) qui permet la fixation de la toxine de Shiga¹. Il semble de plus que ces molécules ne soient pas réparties de façon homogène mais qu'elles se concentrent préférentiellement dans des microdomaines lipidiques (« rafts »).

Bien que la structure de base des membranes soit essentiellement dominée par les propriétés de la double couche lipidique, de très **nombreuses protéines*** sont également présentes. Transmembranaires pour la plupart, elles servent d'intermédiaires à presque toutes les fonctions de la cellule. Elles permettent par exemple la traversée de molécules spécifiques, catalysent des réactions associées à la membrane ou servent de récepteurs qui détectent et transmettent les signaux chimiques dans l'environnement cellulaire.

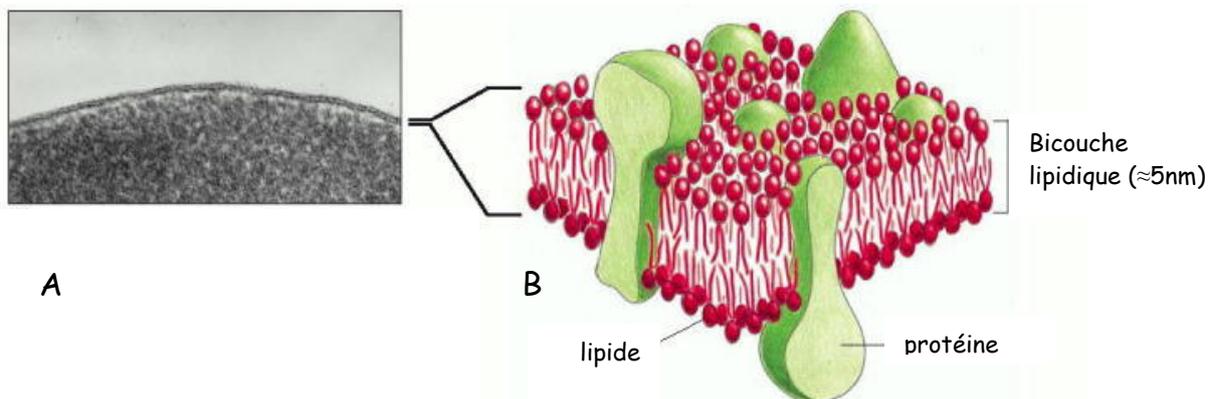


Figure 2:

A. Photographie en microscopie électronique d'une membrane plasmique d'une hématie humaine observée en coupe.

B. Représentation tridimensionnelle d'une membrane cellulaire

Photographie et schéma extraits de « Biologie Moléculaire de La Cellule » 4^{ème} édition [2].

¹ MAJOUL *et al.* Journal of Cell Science, 2002, 115, p. 817-826.

* Environ 30% des protéines codées dans le génome d'une cellule animale sont des protéines membranaires.

I.2.2. Une structure fluide

La bicouche est une structure dynamique et fluide. La plupart des molécules qui la composent (lipides et protéines) sont libres de se déplacer dans le plan membranaire. Les coefficients de diffusion bidimensionnels de ces espèces ne dépendent que logarithmiquement de leur taille ; par conséquent, qu'il s'agisse de lipides ou de protéines, ils sont tous du même ordre de grandeur, typiquement autour de $10^{-9} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$.

I.2.3. Enveloppe cellulaire / glycocalyx

En règle générale la surface de toutes les cellules eucaryotes est couverte de glucides. Ce sont des chaînes d'oligosaccharides reliées de façon covalente aux protéines membranaires (glycoprotéines) et aux lipides membranaires (glycolipides). Ces modifications post traductionnelles appelées glycosylation, sont apportées dans l'appareil de Golgi. Le terme de manteau cellulaire ou **glycocalyx** (du grec *glukus* sucré et *kalux* enveloppe de fleur) est ainsi souvent utilisé pour décrire cette zone riche en glucides de la surface cellulaire.

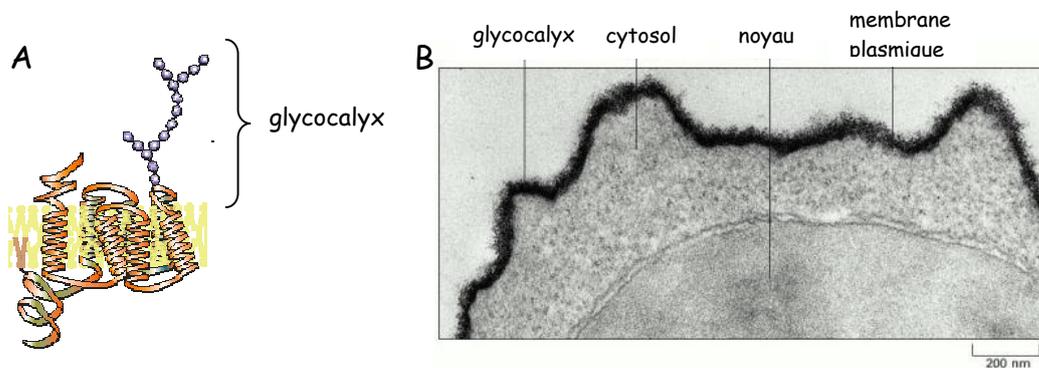


Figure 3 :

A. Représentation d'une protéine transmembranaire glycosylée

B. Surface d'un lymphocyte coloré avec du rouge de ruthénium.

Photographie en microscopie électronique extraite de « Biologie Moléculaire de La Cellule » 4^{ème} édition [2].

Il faut noter l'importance de la distribution asymétrique des motifs glucidiques qui sont toujours exclusivement tournés vers le milieu extracellulaire. Cette géographie laisse penser que la fonction de cette enveloppe cellulaire, si elle est encore mal définie reste toutefois importante dans le rapport des cellules à leurs voisines. On suppose ainsi qu'un de ces rôles principaux « pourrait être de protéger la cellule contre les agressions mécaniques ou chimiques et de tenir à distance les objets étrangers et les autres cellules, évitant ainsi des interactions protéine-protéine indésirables »². Des études récentes vont également dans ce sens ; Ruponen *et al* montrent ainsi que les glycoaminoglycans de la surface de cellules CHO inhibent fortement le transfert de gène³. De plus, le glycocalyx semble impliqué dans la régulation de certains mécanismes internes. Il a ainsi été mis en évidence de nombreuses modifications du glycocalyx dans les cellules cancéreuses. Par ailleurs, de nombreux travaux expérimentaux tendent à démontrer son implication dans la régulation de l'adhésion cellulaire⁴.

² Citation extraite de l'ouvrage « Biologie Moléculaire de La Cellule » 4^{ème} édition, Flammarion, 2004

³ RUPONEN *et al.* J Gene Med. 2004, 6, p. 405-414.

⁴ SABRI *et al.* J of Cell Science, 2000, 113, p. 1589-1600.

Ainsi nous retiendrons que la membrane plasmique est un élément essentiel qui gouverne l'interaction de la cellule avec son milieu. De nombreuses protéines la composent jouant le rôle de récepteurs et assurant la communication entre intérieur et extérieur via la reconnaissance de ligands spécifiques.

Du point de vue du physicien, c'est une structure fluide et dynamique au sein de laquelle les récepteurs jouent le rôle de sites spécifiques d'accrochage. Le glycocalyx constitue un réseau polymérique de surface à prendre en compte dans la description des interactions de la membrane avec l'extérieur.

Schématiquement nous pourrions garder en mémoire la représentation suivante de la surface cellulaire:

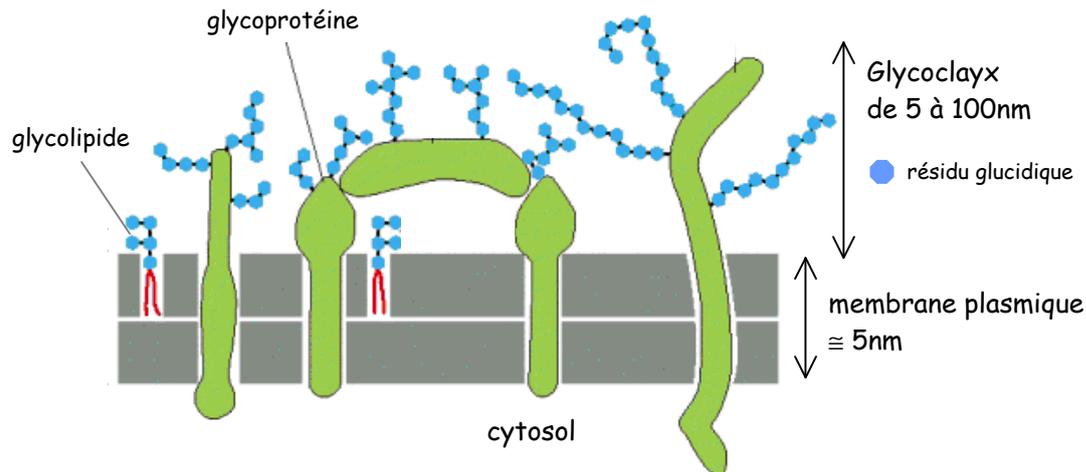


Figure 4 : Schéma simplifié de la surface cellulaire. Il faut retenir l'encombrement stérique de la membrane par ce manteau glucidique qui se comporte comme un réseau de polymères. Extrait de « Biologie Moléculaire de La Cellule » 4^{ème} édition [2].

I.3. L'endocytose

Le passage de la surface vers l'intérieur de la cellule dépend d'un processus appelé **endocytose** au cours duquel les cellules absorbent les substances qui leur sont nécessaires. Ce processus naturel nécessite le franchissement de la membrane plasmique ; pour cela, les matériaux ingérés sont progressivement enfermés par une petite portion de la membrane plasmique qui s'invagine puis se détache pour former **une vésicule d'endocytose** qui contient la substance ingérée. En fonction de la taille des vésicules formées, on parle de phagocytose (au-delà de 300nm) ou de pinocytose. La phagocytose est réservée à des cellules spécialisées, principalement des cellules du système immunitaire (macrophages, neutrophiles...) tandis que la plupart des cellules eucaryotes forment de petites vésicules d'endocytose souvent à partir de puits recouverts (« *coated pits* ») de la membrane plasmique. Ces vésicules recouvertes généralement de clathrine* fusionnent ensuite rapidement avec des compartiments spécialisés appelés **endosomes précoces**. Dans ces compartiments acides, les molécules ingérées sont « triées ». Certaines sont recyclées vers la membrane plasmique ; les autres restent dans le compartiment endosomal (alors appelé endosome tardif) et sont finalement dégradés dans les

* La clathrine est une protéine qui s'assemble sous forme d'une cage du côté cytosolique d'une membrane pour former un puit recouvert de clathrine. Celui-ci se sépare par bourgeonnement pendant l'endocytose pour former une vésicule intracellulaire recouverte d'un manteau de clathrine.

lysosomes sous l'action d'enzymes digestives. Les produits d'intérêt sont libérés dans le cytosol, les autres éliminés.

Dans un grand nombre de cas, comme nous l'avons vu, les molécules ou les macromolécules se fixent sur des récepteurs protéiques souvent spécialement synthétisés pour assurer cette fonction. Ce sont alors des complexes ligands-récepteurs qui s'accumulent dans les puits recouverts de clathrine puis dans les endosomes précoces. On parle alors d'**endocytose couplée à des récepteurs**. Pour exemple, les LDL* (« *low density protéines* ») ou la transferrine sont absorbés par la cellule par un processus de ce type.

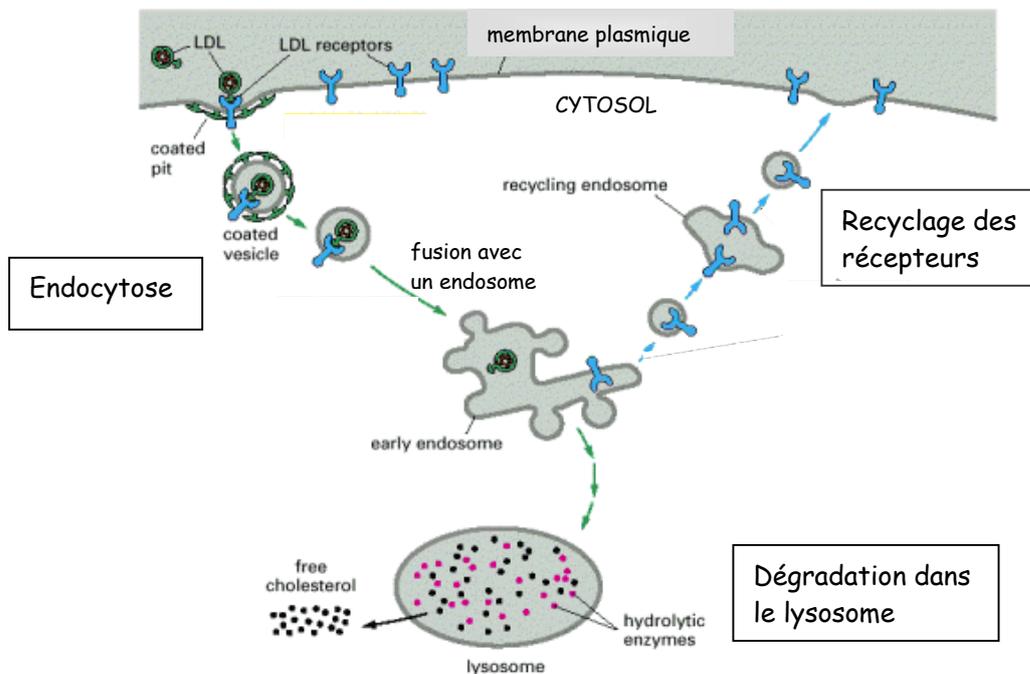


Figure 5 : Endocytose par l'intermédiaire des récepteurs des LDL. Les LDL se fixent sur leur récepteur ; le complexe est internalisé dans des vésicules recouvertes de clathrine qui fusionnent avec un endosome. Le LDL se dissocie alors de son récepteur qui retourne vers la membrane par une voie de recyclage. Il finit dans le lysosome où la dégradation permet de libérer le cholestérol libre dans le cytosol. Extrait de « *Biologie Moléculaire de La Cellule* » 4^{ème} édition [2].

Notons également qu'il existe d'autres processus naturels d'entrée dans la cellule ; certains sont indépendants de la clathrine (les cavéoles par exemple) et beaucoup sont encore mal identifiés. Nous n'irons pas plus loin dans la description de ces mécanismes cellulaires naturels ; pour autant, nous allons voir que des éléments pathogènes sont capables de les modifier à leur profit.

I.4. Infection de la cellule par des agents pathogènes : exemple des virus

Nous avons vu comment la membrane plasmique joue un rôle de barrière active préservant l'intégrité de l'unité cellulaire tout en permettant des échanges avec le milieu extérieur (endocytose, exocytose). Dans cette partie, l'objectif est de montrer qu'il est

* Les LDL sont des complexes composés d'une molécule protéique et de nombreuses molécules de cholestérol estérifiées, associées à d'autres lipides. C'est sous cette forme que le cholestérol est transporté dans le sang et est absorbé par les cellules.

possible de contourner ou de détourner ce filtre naturel de défense pourtant puissant : c'est ce que font l'ensemble des agents pathogènes susceptibles d'infecter la cellule. L'enjeu est de souligner et de mieux comprendre les mécanismes mis en œuvre par ces pathogènes pour atteindre leur cible. Nous y trouverons de nombreux points communs avec notre sujet d'étude.

Les agents pathogènes les plus familiers susceptibles d'infecter une cellule sont les virus et les bactéries. Concernant les bactéries, seules une minorité est pathogène. Dans ce cas, elles sont porteuses de gènes de virulence qui leur sont propres ou ont été importés par des bactériophages mobiles (virus bactériens). Pour *Vibrio cholerae* par exemple, la bactérie qui provoque le choléra, seules les souches elles mêmes infectées par un bactériophage sont virulentes : ce sont deux des gènes transportés par le phage qui codent alors pour les deux sous-unités de la toxine cholérique. Quant aux virus, ce sont essentiellement des fragments d'acides nucléiques (ADN ou ARN) entourés d'une enveloppe protectrice de protéines et dans certains cas d'une membrane. Après avoir pénétrés dans la cellule, ils utilisent sa machinerie de transcription et de traduction fondamentale pour leur réplication provoquant un éventail de maladies qui s'étend du SIDA (virus VIH) et de la variole au rhume.

Dans les deux cas, qu'il s'agisse d'infections bactérienne ou virale, les éléments étrangers doivent traverser les barrières protectrices de la cellule hôte pour la coloniser et s'y multiplier. Prenons le cas des virus à ADN (ou à ARN) ; comme l'illustre la figure 6, ils doivent :

- 1 : entrer dans la cellule hôte
- 2 : libérer leur matériel génétique et l'intégrer dans le génome de la cellule
- 3 : se répliquer : multiplier leur ADN et produire des protéines d'enveloppe
- 4 : être libéré en grand nombre à l'extérieur pour infecter de nouvelles cellules

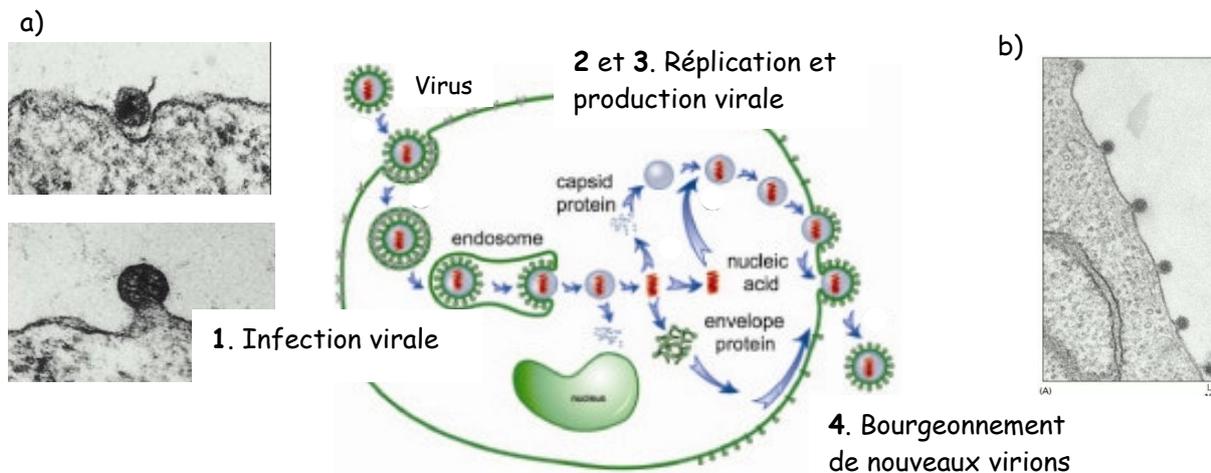


Figure 6 : Cycle viral schématisé simplifié extrait de ⁵.

a). Entrée du VIH par fusion de sa membrane avec la membrane plasmique.

b). Bourgeonnement de six copies d'un virus enveloppé (virus de la forêt de Semliki)*.

Photos de microscopie électronique extraites de « Biologie Moléculaire de La Cellule » 4^{ème} édition

Attardons nous sur **la première étape qui consiste à se fixer à la surface de la cellule cible**. Elle s'accomplit par l'association entre une protéine de surface virale et un récepteur spécifique situé sur la cellule. Les virus utilisent en général comme molécules des récepteurs cellulaires de surface qui sont soit très abondants (comme les oligosaccharides à acide sialique utilisés par le virus de la grippe) soit très spécifiques des types cellulaires à

⁵ Gao *et al.* PNAS. 2005, vol.102, n°27, p. 9469-9474.

* On peut noter sur ce cliché la longueur d'onde entre les 6 copies de virus qui bourgeonnent. Cette régularité apparaît frappante ; elle démontre des effets collectifs.

l'intérieur desquels les virus peuvent se répliquer. Le VIH par exemple se fixe sur le récepteur CD4 présent à la surface des lymphocytes T et des macrophages.

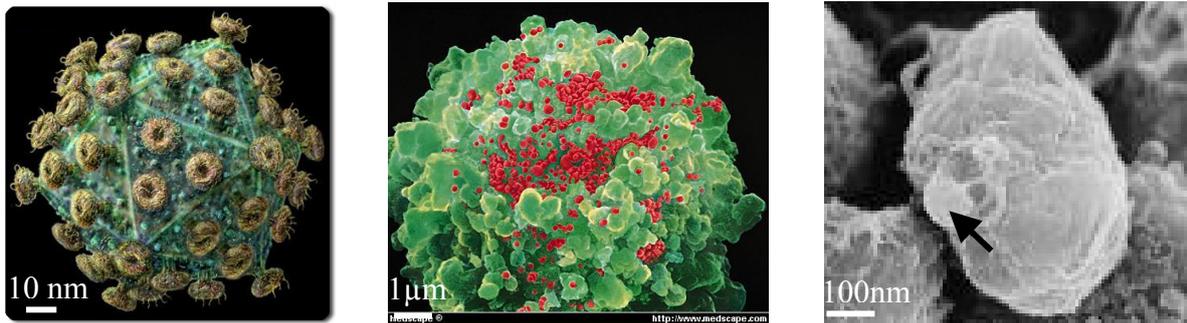


Figure 7 :

- a). Virus VIH. L'enveloppe externe (capside) porte de nombreuses protéines qui permettent la fixation du virus.
 b). Représentation d'un lymphocyte T4 (vert) infecté par le VIH (rouge). Microscopie électronique en fausses couleurs. Source : © NIBSC/Science Photo Library
 c). Virus VIH sur des lymphocytes en culture. Les virions sont visibles en surface sous forme de petites sphères.

Une fois fixé à la surface, le virus doit encore **pénétrer à l'intérieur du cytosol**. De nombreuses stratégies d'endocytose existent comme nous l'avons vu précédemment ; dans le cas des virus on peut citer entre autres:

- l'endocytose médiée par des récepteurs (virus de la grippe, adénovirus)
- la fusion membranaire comme c'est le cas du VIH
- la formation de pores (poliovirus)

Elles conduisent en général à la formation d'un compartiment endosomal emprisonnant le virus et qui doit normalement fusionner avec les lysosomes pour être éliminé.

L'étape suivante consiste donc pour le virus à **éviter l'élimination** par ces voies de dégradation lysosomales. Pour cela, beaucoup d'agents pathogènes modifient le transport membranaire ; il y a alors plusieurs possibilités imaginées sur le dessin ci-dessous:

- soit s'échapper de ce compartiment avant d'être digérés (voie 1 suivie par la majorité des virus) : des modifications du pH par exemple peuvent être induites, provoquant la rupture de l'endosome et la fuite du virus.
- soit modifier le comportement de l'endosome pour éviter sa fusion et sa dégradation grâce à des protéines d'adressage par exemple (voie 2 utilisée par beaucoup de bactéries et de parasites).
- soit trouver les moyens de survivre dans l'environnement hostile du lysosome (voie 3)

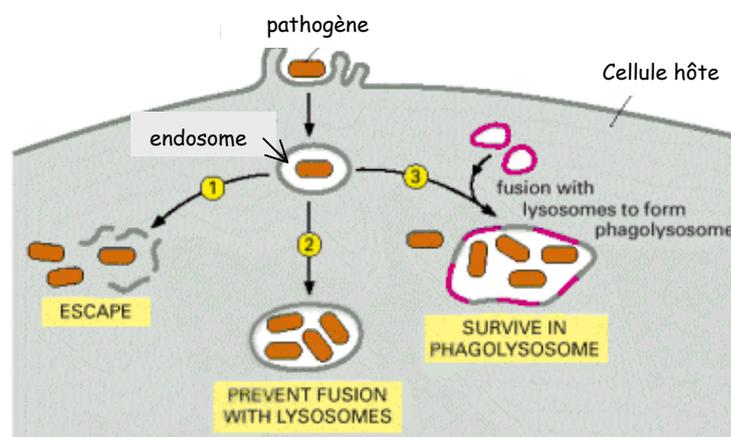


Figure 8 : Devenir d'un pathogène pénétrant dans une cellule hôte

Les agents pathogènes sont donc capables de modifier ou de détourner une partie du trafic intracellulaire normal de la cellule. Ils peuvent ainsi emprunter des voies tout à fait atypiques. C'est le cas de la toxine de Shiga par exemple, qui évite la dégradation lysosomale en empruntant une voie dite rétrograde qui lui permet d'atteindre directement le réticulum endoplasmique. Nous reviendrons sur cette voie originale et d'intérêt dans la suite de ce chapitre.

De façon générale, ces stratégies illustrent les méthodes sophistiquées développées par ces agents pour utiliser la biologie cellulaire fondamentale de leur hôte. Elles sont des exemples très riches d'enseignements pour toute une communauté de scientifiques qui cherchent aujourd'hui de quelle façon faire pénétrer dans les cellules des éléments d'intérêt thérapeutique puisqu'il s'agit là aussi de franchir les barrières naturelles de la cellule. Ces recherches en vectorisation, auxquelles nous allons nous intéresser maintenant, sont aujourd'hui porteuses de larges espoirs ; elles ont de notre point de vue tout à gagner à mieux comprendre ces mécanismes cellulaires pour mieux les contrôler et s'en inspirer très largement.

I.5. Vectorisation

I.5.1. Définitions

La distribution d'un principe actif vers l'organe, le tissu ou la cellule malade constitue aujourd'hui un défi majeur. En effet, certaines molécules, bien qu'elles possèdent une activité thérapeutique potentielle forte, présentent des caractéristiques physico-chimiques peu favorables au passage des barrières biologiques (épithélium^{*1}, endothélium^{*2}, membrane plasmique) ou sont particulièrement fragiles. Dans ces conditions, leur adsorption et leur diffusion dans l'organisme sont mauvaises, entraînant une déperdition importante ou des effets toxiques parfois rédhibitoires. Pour rendre efficace ces molécules actives, il est nécessaire de préserver leur intégrité et de contrôler leur acheminement du site d'administration vers le site d'action. C'est ce que l'on nomme **vectorisation**. L'amélioration du transport des actifs dans l'organisme se fait alors par le couplage de leur *encapsulation* et leur *ciblage*. L'encapsulation consiste à enfermer un actif dans un édifice macromoléculaire (un objet colloïdal nommé *vecteur*) qui le concentre et le protège. Le ciblage permet de diriger l'actif vers son lieu d'action afin d'en augmenter la distribution tissulaire et donc l'efficacité.

I.5.2. Les enjeux thérapeutiques de la vectorisation

Trois domaines thérapeutiques sont particulièrement concernés aujourd'hui :

- la vaccination

Jusqu'à un passé récent, la plupart des vaccins étaient préparés à partir de microorganismes vivants atténués ayant perdu leur pouvoir pathogène. Une telle approche, si elle a été à la base du succès de la vaccination, se heurte aujourd'hui à des difficultés liées à la fois aux méthodes

^{*1} On appelle **épithélium** un feuillet de cellules formé à partir d'une ou de plusieurs couches de cellules recouvrant une surface externe ou tapissant une cavité. L'épiderme par exemple est un épithélium.

^{*2} L'**endothélium** est la couche de cellules endothéliales qui forment le revêtement de tout le système vasculaire (les vaisseaux sanguins).

de préparation, à l'efficacité et à la sécurité des produits. La vectorisation de l'antigène vaccinal représente à ce titre un des domaines d'actualité des recherches en vaccinologie moderne.

- **la thérapie génique**

Elle consiste à introduire dans une cellule cible, un gène médicament (ADN) pour corriger ou pallier un dysfonctionnement génétique impliqué dans le développement d'une pathologie. L'ADN ne pénétrant pas naturellement dans les cellules, il est nécessaire de concevoir une stratégie adaptée pour qu'il atteigne son but. La complexation des acides nucléiques avec des lipides cationiques (lipoplexes) permet de réaliser des transfections *in vitro*. Néanmoins, ces systèmes, parce qu'ils sont chargés, restent inexploitablement pour des applications *in vivo*. Dans ces conditions, la conception d'un vecteur d'ADN compatible *in vivo* est un enjeu de taille.

- **les thérapies anticancéreuses** qui utilisent des molécules toxiques destinées à détruire les cellules tumorales et pour lesquelles la réduction des concentrations au niveau des tissus non ciblés serait une avancée considérable permettant la diminution de la toxicité et des effets secondaires de ces thérapeutiques très lourdes.

I.5.3. Différents types de vecteurs

Dans ce contexte, le développement de vecteurs de médicaments a connu, malgré de grandes difficultés, un réel essor au cours des trente dernières années. Dans ce domaine, deux types d'approches cohabitent :

- l'utilisation de **vecteurs viraux**.

Comme nous l'avons vu, les virus constituent d'excellents vecteurs (naturels) qui ont acquis la capacité d'éviter d'être détruits par le système immunitaire et d'insérer leur matériel génétique dans des cellules. Les virus utilisés comme vecteurs sont alors « désactivés », leurs gènes délétères remplacés par des gènes d'intérêt. Le virus de la leucémie murine est ainsi un rétrovirus utilisé en thérapie génique.

- la mise au point de **vecteurs synthétiques** biocompatibles et biodégradables.

Concernant ce dernier point, la recherche galénique a permis d'imaginer de nombreux systèmes supramoléculaires capables d'encapsuler le principe actif et d'en augmenter la distribution tissulaire. Entre autres, on peut citer ⁶:

- les *liposomes* : ce sont des vésicules lipidiques composées d'une ou de plusieurs couches de phospholipides délimitant un cœur aqueux susceptible d'encapsuler une molécule hydrophile. La stabilité et les propriétés physico-chimiques de ces édifices lipidiques ont été largement étudiées⁷.
- les *nano particules* : elles sont généralement formées de polymères ; il peut s'agir d'une matrice polymérique dans laquelle est dissous le principe actif (nano sphères) ou bien d'une cavité réservoir liquide entouré d'une paroi polymère (nano capsules).

I.5.4. Vecteurs ciblant, furtifs et capables de libérer leur contenu

L'encapsulation dans ces structures moléculaires peut suffire à obtenir des effets thérapeutiques intéressants. Ainsi, des études cliniques ont montré que la toxicité cardiaque de la doxorubicine (un anticancéreux) est réduite après encapsulation dans des liposomes ^{8,9}. De

⁶ Patrick COUVREUR et Didier ROUX. « Nanotechnologies et nouveaux médicaments »

⁷ HEURTAULT *et al.* Biomaterials, 2003, 24, p. 4283-4300

⁸ BATIST *et al.* Journal of Clinical Oncology, 2001, vol 19, n° 5, p. 1444-1454

la même manière, la toxicité rénale de l'amphotéricine B (un antifongique puissant) est fortement diminuée après son administration sous une forme liposomale. Des médicaments issus de ces concepts existent sur le marché.

Néanmoins, de façon plus générale, tout comme les virus, les vecteurs synthétiques doivent être capables de franchir les barrières biologiques que sont les membranes. Pour cela, il est nécessaire de les rendre **ciblants** en créant une reconnaissance spécifique entre l'objet et le tissu visé. La fonctionnalisation de la surface des objets par un ligand est ainsi une étape essentielle. Différentes stratégies peuvent être développées¹⁰ (greffages covalents ou non, de natures diverses). De plus, le choix du ligand greffé est crucial : il doit être avant tout pertinent pour l'usage thérapeutique envisagé (c'est-à-dire spécifique du type cellulaire à traiter) mais également pas ou faiblement immunogène. De très nombreux essais ont été menés dans ce sens sur des liposomes ou des nanoparticules. On peut citer entre autres l'utilisation comme ligands sur des liposomes :

- de peptides ou de protéines : la transferrine par exemple¹¹
- d'antigènes pour la préparation d'immunoliposomes¹²

Par ailleurs, les recherches dans l'élaboration de techniques performantes de vectorisation tendent à optimiser la stabilité et la longévité des vecteurs utilisés *in vivo*. Dans le cas de l'injection intraveineuse par exemple, l'adsorption superficielle de protéines sur les vésicules, ou « opsonisation » est un phénomène très précoce capable d'entraîner la phagocytose et l'élimination des particules colloïdales. Pour prolonger la durée de vie des vecteurs dans la circulation sanguine, il faut donc réduire les interactions avec les protéines plasmatiques et rendre les vecteurs « **furtifs** », c'est-à-dire invisibles pour le système immunitaire. En ce sens, des liposomes portant en surface des polymères (de type PEG) sont développés dans le cadre de thérapies anti-angiogéniques par exemple^{13, 14}. Nous reviendrons sur cette notion dans le chapitre 3.

Enfin, une fois le vecteur capturé par sa cible, il doit être capable d'y libérer le principe actif qu'il encapsule. Des systèmes pH-sensibles, des peptides fusio-gènes (les peptides GALA ou « pénétratine »¹⁵ permettent ainsi par fusion membranaire la formation de pores) peuvent ainsi être utilisés pour contrôler le site et la cinétique de relargage.

Compte tenu des enjeux considérables, de très nombreux travaux tant *in vitro* qu'*in vivo* sont menés aujourd'hui de part le monde pour mettre au point des vecteur efficaces.

I.6. Bilan

Dans cette première partie, nous avons rappelé les principales caractéristiques de la cellule et montré que sa membrane constitue un élément essentiel qui gère l'ensemble des interactions avec l'extérieur. Les agents pathogènes et les virus en particulier sont capables de franchir ces barrières naturelles de la cellule et de détourner ses fonctions à leur profit. L'étude de tels processus qui mettent en contact des cellules vivantes et un ensemble de particules virales ou bactériennes est riche d'informations. Ainsi, la vectorisation qui vise à

⁹ O.LYASS, A.HUBERT, and A.A.GABIZON Clinical Cancer Research, 2001. vol. 7, p. 3040–3046.

¹⁰ NOBS *et al.* J Pharm Sci. 2004, 93, p. 1980-1992.

¹¹ ZHONG MING QUIAN *et al.* Pharmacol Rev. 2002, 54, p. 561-587

¹² MASTROBATTISTA *et al.* Advanced Drug Delivery Reviews. 1999, 40, p. 103–127

¹³ JANSSEN *et al.* International Journal of Pharmaceutics. 2003, 254, p. 55-58

¹⁴ MAEDA *et al.* Journal of Controlled Release. 2004, 100, p. 41-52.

¹⁵ D.PERSSON *et al.* Biochemistry. 2004, 43, p. 11045-11055

faire pénétrer dans les cellules, à des fins thérapeutiques, des molécules qui ne le peuvent pas de manière indépendante s'en inspire largement. Ce sont alors dans ce cas des vecteurs lipidiques pouvant se lier à des récepteurs membranaires (par le ciblage) que l'on cherche à faire interagir avec les cellules cibles.

Dans les deux cas, des objets de taille submicronique et donc browniens (pathogènes naturels ou vecteurs synthétiques), portant à leur surface des protéines ayant une affinité pour la membrane cellulaire, viennent adhérer à la surface, y pénètrent et délivrent leur contenu.

Outre l'enjeu médical de grande envergure qui lui est associé, l'étude de telles situations, sous contrôle, peut aider à la compréhension de ces processus biologiques qui mettent en jeu de nombreux mécanismes physico-chimiques qui demeurent encore mal identifiés. Cette thématique rencontre ainsi les intérêts des physico chimistes, qui apportent leur compréhension des édifices macromoléculaires et des systèmes auto organisés et ceux des biologistes, pour mettre à profit leurs connaissances des mécanismes cellulaires et moléculaires. **C'est dans ce contexte que notre étude se propose de décrire les interactions entre des colloïdes synthétiques et contrôlés, utilisés comme des « virus ou des vecteurs modèles », et des cellules vivantes en culture.** Il faut souligner qu'il existe, à notre connaissance, peu d'études quantitatives de ce type ; elles sont en général davantage centrées sur la mesure directe d'effets biologiques et s'attardent peu sur les mécanismes intermédiaires.

Dans la suite, nous allons nous attacher à décrire les colloïdes particuliers que nous utilisons. Nous soulignerons notamment leurs propriétés physico-chimiques qui en font des outils adaptés au travail en milieu biologique. La surface de ces objets lipidiques étant fonctionnalisable, nous détaillerons ensuite les stratégies de ciblage utilisées.

II. Des colloïdes lipidiques multilamellaires comme vecteurs modèles

Dans cette partie, nous allons décrire les colloïdes que nous utilisons. Nous détaillerons en particulier leur structure, leur mode de préparation et leurs applications potentielles en tant que vecteurs biologiques. Enfin, versatiles et diversement fonctionnalisables, nous verrons qu'ils constituent de bons outils dans l'approche plus fondamentale qui est la nôtre.

II.1. Des colloïdes multilamellaires

II.1.1. Phases lamellaires de tensioactifs

Un tensioactif est une molécule amphiphile comportant une partie hydrophobe et une partie hydrophile.

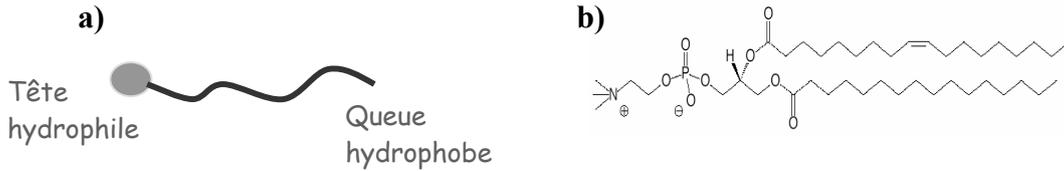


Figure 9 :

a). Représentation schématique d'une molécule de tensioactif

b). Formule développée d'un tensioactif particulier : la phosphatidylcholine (PC)

En présence d'eau, l'association microscopique entre les domaines hydrophobes d'une part et hydrophiles de l'autre, conduit le système à s'organiser selon diverses géométries (micelles, cylindres, plans...) en fonction de la concentration (on parle alors de **systèmes lyotropes**). Ces objets peuvent à leur tour s'organiser dans l'espace tridimensionnel créant des phases plus ou moins organisées en fonction des contraintes entropiques et stériques auxquelles sont soumises les molécules de tensioactifs.

Le diagramme de phase d'un mélange phosphatidylcholine / eau est représenté ci-dessous. Il présente plusieurs de ces phases cristal liquide suivant la température et la composition du mélange.

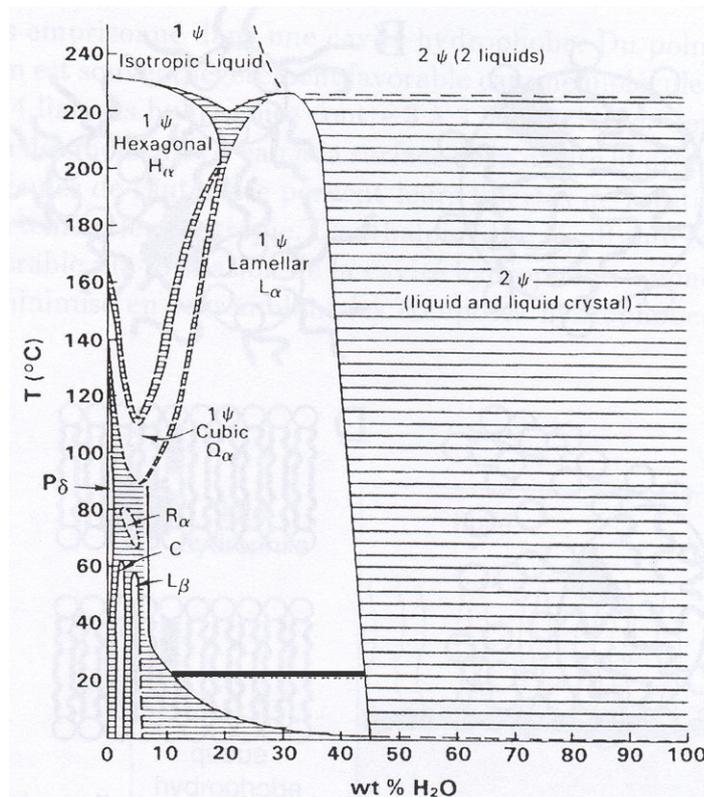


Figure 10 : Diagramme de phases à l'équilibre thermodynamique du mélange phosphatidylcholine de jaune d'œuf egg PC/eau en fonction de la température.

C = phase cristalline

H _{α} = phase hexagonale de micelles inverses

L _{α} et L _{β} = phases lamellaires

Q _{α} = phase cubique de micelles

R _{α} = phase rhomboédrique

Figure extraite de Handbook of lipid research 4 : the physical chemistry of lipids. D.M.Small. Plenum Press, 1986

Nous constatons qu'à température ambiante, **la phase lamellaire** (marquée par le trait gras) est présente dans une large gamme de concentration (pourcentage massique en eau compris entre 12 et 45%). Elle est constituée d'un empilement régulier (périodicité d) de membranes bidimensionnelles appelées bicouches (d'épaisseur δ) séparées par une couche de solvant. Cette structure, caractéristique d'une phase cristal liquide de type smectique, est à l'équilibre thermodynamique.

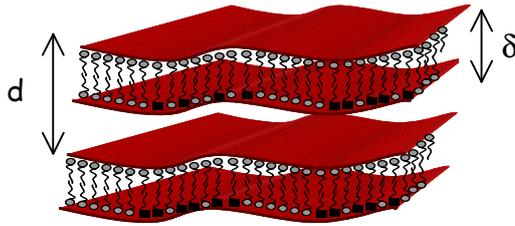


Figure 11 :
Représentation schématique d'une phase lamellaire de périodicité d .

II.1.2. Instabilité des phases lamellaires lyotropes sous cisaillement

La phase lamellaire est un système à l'équilibre thermodynamique. Néanmoins, il est possible de créer des instabilités hydrodynamiques en portant ces systèmes hors d'équilibre par des contraintes d'écoulement telles que le cisaillement. Ce point a été largement étudié par Olivier Diat durant sa thèse ¹⁶. Il montre que des phases lamellaires lyotropes peuvent s'organiser à l'échelle mésoscopique sous diverses formes selon le taux de cisaillement appliqué. En particulier, Diat *et al* ¹⁷, ont mis en évidence une phase constituée par l'empilement d'objets sphériques multilamellaires jusqu'au centre qui apparaît pour des taux de cisaillement intermédiaire (phase notée II sur le diagramme suivant).

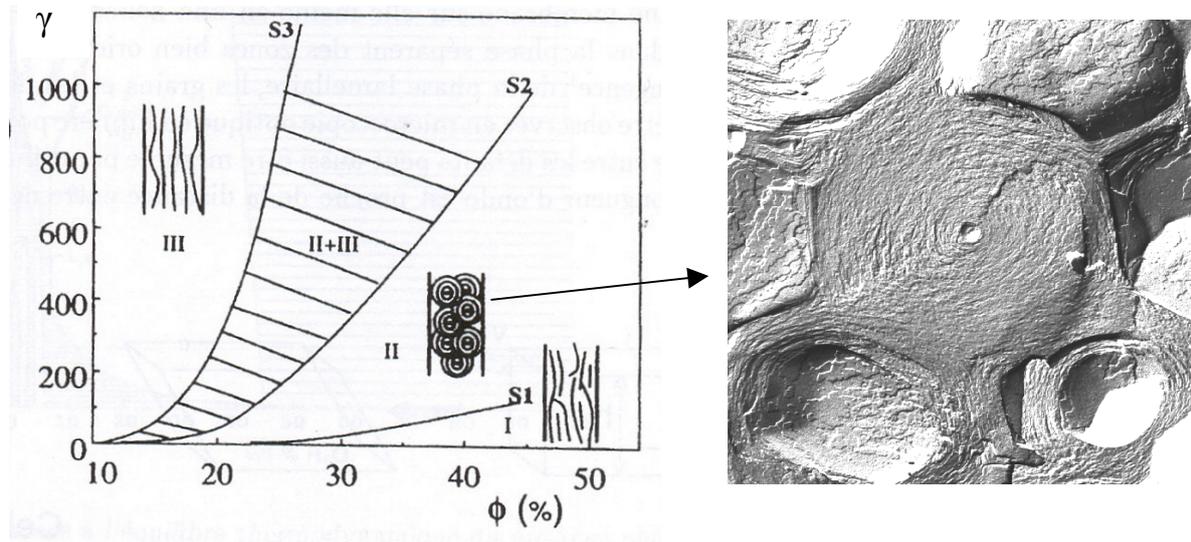


Figure 12 :

a). Diagramme de phase hors d'équilibre pour la phase lamellaire du système quaternaire SDS/pentanol/dodécane/eau en fonction de la fraction volumique de membrane (notée Φ) et du taux de cisaillement (noté γ). On note en particulier la phase compacte d'objets sphériques (II). D'après [17].

b). Photo de cryofracture d'une phase compacte d'oignons. D'après ¹⁸.

II.1.3. Des colloïdes multilamellaires

Cette structure compacte est stable après arrêt du cisaillement. Mise en contact avec un excès de solvant, elle se disperse en une suspension colloïdale d'objets. Ces objets sont appelés sphérulites® ou encore « oignons » en raison de leur structure sous forme de pelures

¹⁶ O.DIAT « Effet du cisaillement sur des phases lamellaires lyotropes ». Thèse de doctorat, Université de Bordeaux 1, 1992.

¹⁷ DIAT, ROUX and NALLET. J.Phys.II France 3, 1993, p. 1427-1452

¹⁸ T.GULIK-KRZYWICKI *et al.* Langmuir, 1996, 12, p. 4668-4671.

concentriques. Leur taille est variable et dépend du taux de cisaillement appliqué. Par ailleurs, de tels objets peuvent être préparés avec de nombreuses compositions de tensioactifs.

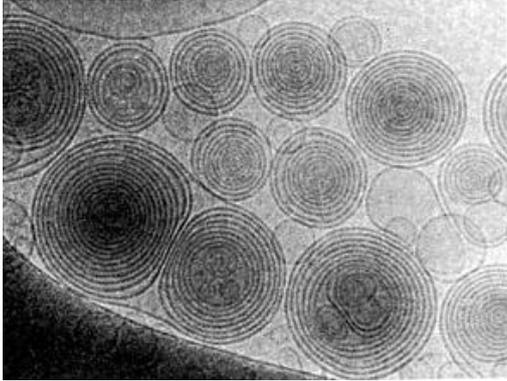


Figure 13 : Photo de cryomicroscopie électronique à transmission (cryoTEM) d'une suspension d'oignons.
O. Mondain Monval, O. Regev et L. Navailles [22].

II.2. De nouveaux vecteurs biologiques

L'application de ce procédé à des phases lamellaires constituées de phospholipides a permis d'envisager l'utilisation de ces vésicules innovantes comme vecteurs synthétiques. En effet, les caractéristiques propres des sphérulites® en font des candidates particulièrement intéressantes en vue d'applications thérapeutiques :

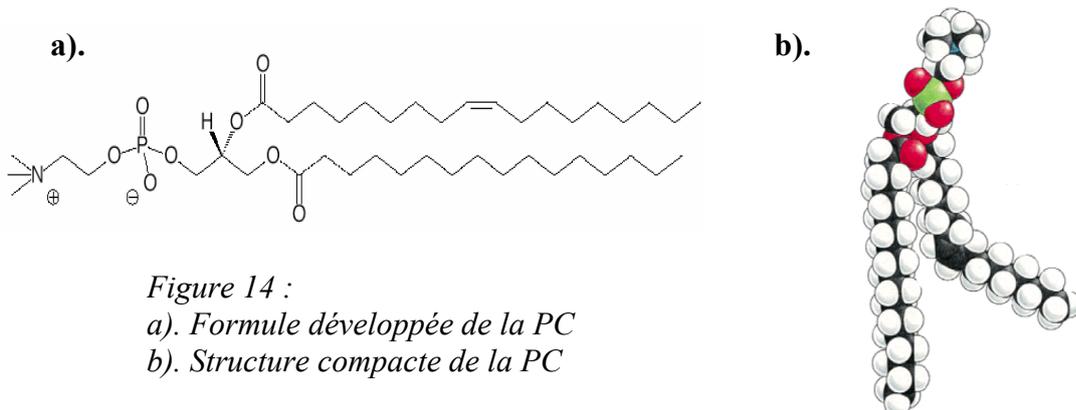
- très grande stabilité
- taille modulable en fonction de la formulation (de 100nm à quelques μm)
- capacité d'encapsuler une grande quantité d'actifs aussi bien hydrophiles qu'hydrophobes
- formulation biocompatible et modulable
- protection du principe actif grâce aux multicouches successives
- possibilité de les fonctionnaliser pour en faire des vecteurs ciblant.

Malgré de nombreuses similitudes, il faut noter que deux points essentiels distinguent ces objets des liposomes classiquement utilisés :

- la simplicité de leur mode de préparation
- leur résistance en raison de leur structure compacte à moitié lipidique.

II.2.1. Des colloïdes biocompatibles – Formulation et mode de préparation

Pour des applications biologiques, les vésicules multilamellaires peuvent aussi être formulées à partir de tensioactifs biocompatibles autorisés par la pharmacopée. C'est le cas de la phosphatidylcholine (notée PC), un lipide naturel constituant majoritaire des membranes biologiques comme nous l'avons vu dans le début de ce chapitre. Il faut noter qu'il s'agit d'un lipide globalement neutre (zwitterionique). Les structures formées sont donc non chargées. La structure chimique de la PC est rappelée ci-dessous.



Plus précisément, la phosphatidylcholine que nous utilisons est extraite du soja (lécithine S100 de chez Lipoid). Il s'agit en fait, comme tous les lipides naturels, d'un mélange de molécules de chaînes grasses variables. Leur longueur est un nombre pair de carbone (16 ou 18) avec en moyenne une à deux insaturations (mélange DLPC (18-2), DPPC (18-1), DOPC (16-0)). Par ailleurs, la formulation peut être affinée par ajout de quelques % d'un cotensioactif (monooléylglycérol ou simulsol 2599) ; il permet de modifier légèrement les propriétés de la membrane pour apporter par exemple davantage de courbure ou la rendre plus fluide.

Un protocole détaillé du mode de préparation de la phase lamellaire puis des colloïdes est proposé dans les annexes n° 2 et 3. Nous reprenons ici les points essentiels.

Les phases lamellaires sont réhydratées à la limite de gonflement par de l'eau pure (48% en masse pour notre mélange). Il faut noter qu'au-delà, l'échantillon contient deux phases en équilibre, une phase lamellaire dont le taux d'hydratation est égal à la limite de gonflement et une phase aqueuse. L'état biphasique conduisant à un changement net du comportement sous cisaillement, nous ne dépasserons jamais cette limite de gonflement.

Après réhydratation, les phases lamellaires sont cisailées manuellement dans des tubes en plastique à l'aide de petits pistons adaptés comme l'illustre la figure ci-dessous.

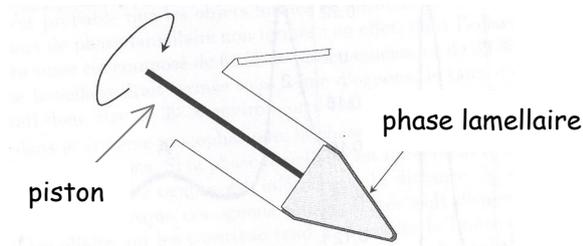


Figure 15 : Cisaillement manuel de la phase lamellaire

Remarquons que des essais de cisaillement plus contrôlé à l'aide d'une cellule de Couette ont été réalisés¹⁹. Néanmoins, deux obstacles majeurs s'opposent pour le moment à l'utilisation en routine de cette technique. En effet, elle n'est pas adaptée au cisaillement de très petites quantités (moins de 10mg) et ne permet pas de travailler en conditions stériles.

La phase lamellaire cisailée est ensuite dispersée dans un tampon aqueux physiologique (PBS ou milieu blanc). La suspension colloïdale obtenue est polydisperse avec deux populations d'objets centrées autour de 0.2 et de 1 μ m. Une simple étape de centrifugation permet si nécessaire d'éliminer les plus gros objets et d'obtenir une distribution plus homogène autour d'un diamètre moyen de 200 à 300nm.

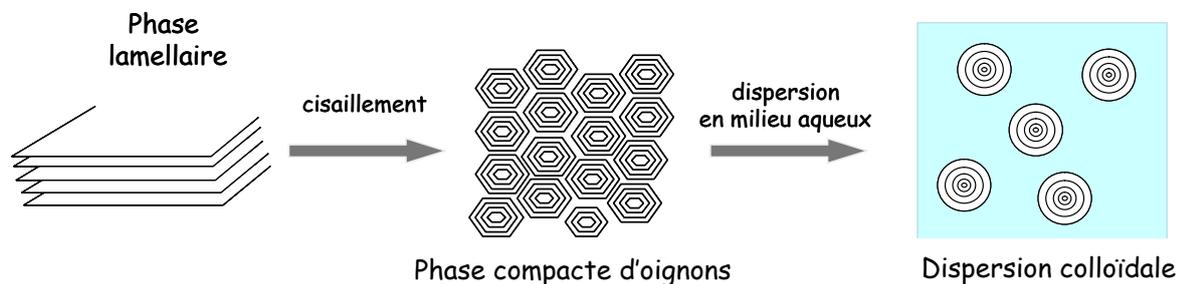


Figure 16 : Schéma résumé du mode de préparation d'une dispersion de colloïdes de type « oignons » par cisaillement d'une phase lamellaire lyotrope.

¹⁹ Pascale CHENEVIER. « Vésicules multilamellaires de type oignons comme vecteurs biologiques ciblés ». Thèse de doctorat Université de Bordeaux 1, 2001.

II.2.2. Encapsulation d'actifs et essais de vectorisation

L'idée d'utiliser ces objets multilamellaires pour encapsuler des molécules actives découle directement de leur structure. L'alternance de bicouches lipidiques et de couches d'eau permet en effet d'encapsuler aussi bien des molécules hydrosolubles qu'hydrophobes. Pour cela, la phase lamellaire est préparée avec l'actif à encapsuler : il est ajouté à la phase aqueuse si il est hydrophile ou mélangé et solubilisé avec les lipides si il est lipophile. Après cisaillement, la majeure partie de l'actif est enfermée dans les membranes concentriques et reste encapsulée dans les colloïdes après dispersion. Une faible proportion se répartit à l'extérieur. Un taux d'encapsulation peut ainsi être déterminé après dosage. Une petite molécule fluorescente hydrophile, comme la calcéïne, peut ainsi être encapsulée avec des rendements de l'ordre de 80%. La succession des bicouches lipidiques permet par ailleurs de limiter (voir d'empêcher) la fuite de l'actif.

Des essais ont également été menés avec des molécules d'intérêt. L'incorporation d'ADN dans les phases lamellaires a ainsi été largement étudiée par Tanja Pott. Elle montre que de fortes concentrations d'ADN plasmidique peuvent être incorporées dans des phases lamellaires de lipides neutres^{20, 21}; ces phases lamellaires peuvent être cisillées et il est possible après dispersion dans un milieu salin hyperosmotique d'obtenir des suspensions colloïdales contenant de l'ADN²². Des oligonucléotides ont également pu être encapsulés et délivrés avec succès pour des essais de transfections (gène rapporteur luciférase) sur des cellules lymphocytaires et des cellules d'hépatocarcinomes de rat²³. Par ailleurs, dans une approche vaccinale, Gaubert *et al* ont montré que l'encapsulation d'un antigène dans ces structures augmente fortement son pouvoir immunogène²⁴.

Plus récemment, Brigitte Delord a réalisé au laboratoire des essais d'encapsulation et de vectorisation d'une molécule cytotoxique (anticancéreux de type camptothécine). Les tests réalisés *in vitro* se sont révélés prometteurs²⁵.

II.2.3. Des vecteurs fonctionnalisables : ciblage

Nous avons pu mettre au point différentes stratégies de fonctionnalisation sur ces objets de formulation modulable. Il est ainsi possible de décorer leur surface avec un ligand (un peptide, une protéine, un anticorps...) ou des polymères hydrophiles. Comme pour les liposomes, nous sommes capables de les rendre **ciblants** et **furtifs**.

La partie III de ce chapitre sera consacrée aux différentes méthodes de fonctionnalisation utilisées. Nous verrons que nous disposons aujourd'hui de deux systèmes de ciblage.

II.3. Des colloïdes modèles

En dehors de ces approches biologiques qui offrent de riches potentialités, ces objets peuvent également faire l'objet d'études et d'applications plus fondamentales.

Ils peuvent par exemple être utilisés comme microréacteurs chimiques. Ainsi, dans son travail de thèse²⁶, Fabienne Gauffre a encapsulé à l'intérieur de fortes quantités d'ions Cu²⁺. Leur

²⁰ T.POTT, R.LAVERSANNE et D.ROUX Brevet FR.9916191. Dépôt PCT 21/12/99, 1999.

²¹ T.POTT and D.ROUX. Febs Letters, 2001, 511, p. 150-154.

²² D.ROUX *et al*. Current Med Chem 2004, 10, p. 1241-125.

²³ N.MIGNET, A.BRUN, C.DEGERT *et al*. Nucleic Acids Research, 2000, vol.28, n°16.

²⁴ S.GAUBERT, B.DELORD, J.AMEDEE *et al*. Drug Delivery, 2004

²⁵ Résultats confidentiels- non publiés

réduction en milieu confiné concentré permet de former des micoparticules de Cu_2O . Formulés avec des lipides chargés et placés dans un champ électrique, ils peuvent également être utilisés pour réaliser des dépôts organisés²⁷.

Dans le cadre de notre étude, ils constituent des vecteurs modèles. Leur caractère biocompatible permet de les utiliser en contact avec des cellules vivantes ; fonctionnalisables, il est possible de modifier leur surface et donc leur affinité pour la membrane cellulaire.

III. Ciblage des colloïdes : stratégie de fonctionnalisation

Nous appelons fonctionnalisation, l'étape qui consiste à greffer sur la surface du colloïde un motif destiné à modifier son affinité pour la surface cellulaire.

Cette partie s'attache à décrire les stratégies mises en place pour réaliser cette étape. Nous allons détailler de quelle façon il est possible de les rendre ciblant par greffage d'un ligand spécifique. Nous présenterons en particulier les deux couples ligands - récepteurs que nous avons utilisés dans ce travail. Il s'agit d'une part de la sous unité B de la toxine de Shiga et de l'autre d'une séquence peptidique GRGDSP. Nous terminerons sur l'intérêt dans les deux cas d'utiliser des objets fluorescents.

III.1. Colloïdes fonctionnalisés par la sous unité B de la toxine de Shiga

L'utilisation de la toxine de Shiga pour rendre nos colloïdes ciblant est le fruit d'une étroite collaboration avec Ludger Johannes (UMR 144 – CNRS – Institut Curie. Paris). Biologiste spécialiste du trafic intracellulaire, L.Johannes et son équipe, travaillent depuis de nombreuses années sur cette toxine en essayant de mieux comprendre les voies intracellulaires atypiques qu'elle emprunte. Parallèlement, ils tentent de valoriser les caractéristiques de cette toxine pour répondre à des questions de vectorisation.

Dans ce contexte, l'idée de greffer cette protéine à la surface de colloïdes ouvre de larges perspectives. Elle permet en effet d'envisager de suivre le colloïde ainsi décoré vers des voies cellulaires qu'il serait probablement incapable d'emprunter seul, ouvrant ainsi la voie à ce que l'on pourrait appeler du ciblage intracellulaire.

III.1.1. La toxine de Shiga

a- Une toxine bactérienne de type AB_5

La toxine de Shiga²⁸ (notée Stx) est une toxine bactérienne produite par *Shigella dysenteriae* décrite pour la première fois par Conradi en 1903. Elle provoque des pathologies graves générant des infections systémiques (colites hémorragiques, syndrome urémique hémolytique ou HUS).

²⁶ Fabienne GAUFFRE. « Utilisation de vésicules préparées par cisaillement d'une phase lamellaire comme microréacteurs chimiques ». Thèse de doctorat, Université de Bordeaux 1. 1997

²⁷ E.BELAMIE, F.ARGOUÏ and C.FAURE. J. Electrochem. Soc. 2001, 148, 4, C301-C309.

²⁸ A.D.O'BRIEN and R.K.HOLMES. Microbiological reviews, 1987, 51:2, p. 206-220

L'origine des gènes codant pour cette toxine n'est pas connue mais sa structure est comparable à celle de protéines analogues retrouvées chez certains végétaux supérieurs ou produites par des bactéries (toxine diphtéria, toxine du choléra). Toutes ces toxines sont en effet constituées d'une sous unité A (32kDa) et de 5 sous unité B identiques (5×7.7kDa) liées de façon non covalente ; c'est pour cette raison qu'on les appelle toxines de type AB₅.

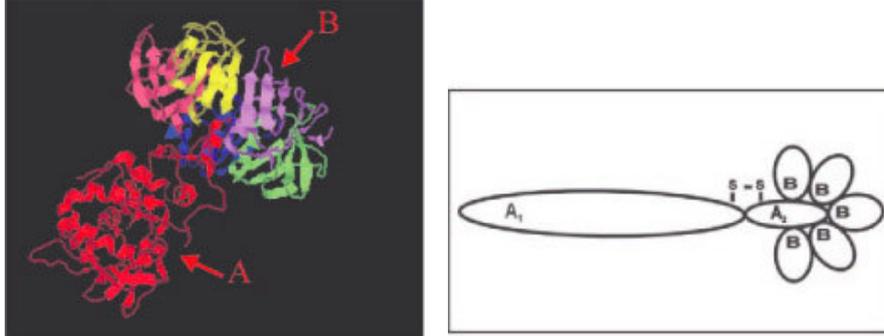


Figure 17 : Structure cristallographique et représentation schématique de la toxine de Shiga. Extrait de ²⁹. On note la structure type AB₅.

Seule la sous unité A est responsable du pouvoir pathogène. Son activité N-glycanase modifie l'activité des ribosomes de la cible infectée, inhibant ainsi la synthèse protéique. La sous unité B, qui se présente sous forme pentamérique, détermine quant à elle la spécificité de la reconnaissance avec les cellules cibles. C'est elle qui permet la fixation et l'entrée de la toxine dans la cellule cible. **Dans le cadre de notre étude, c'est à cette sous unité B seule responsable de l'adhésion sur la cellule que nous allons nous intéresser.**

b- Structure de la sous unité B (Stx-B)

De nombreuses études cristallographiques par rayons X ont été menées sur la toxine de Shiga et sa sous unité B. L'étude cristallographique à deux dimensions ³⁰ montre que, projeté sur un plan, le pentamère définit un disque de diamètre 6nm avec un pore central de 1nm. La troisième dimension est évaluée à 2nm ^{*1}. Dans une vision très simplifiée, nous représenterons le pentamère Stx-B comme un cylindre de hauteur $h_{sh}=2nm$ et dont le rayon de la base vaut $r_{sh}=3nm$. Nous reviendrons sur ce point dans le chapitre 3.

Par ailleurs, Ling *et al* ³¹ montrent que chaque monomère peut se lier à trois trisaccharides ; ainsi, ce sont 15 sites de fixation qui sont présents par pentamère Stx-B. Néanmoins, il est très peu probable que l'ensemble de ces sites soit accessible simultanément lors de la rencontre avec la surface cellulaire. Ainsi, on considère en général que la fixation de Stx-B sur la cellule implique au plus une dizaine de sites ^{*2}.

²⁹ SANDVIG *et al.* Histochem Cell Biol, 2002, 117, p. 131-141

³⁰ HAGNERELLE *et al.* Journal of Structural Biology. 2002, 139, p. 113-121

^{*1} Communication personnelle avec David Pina – Laboratoire Trafic et Signalisation (UMR 144 CNRS/Institut Curie)

³¹ LING *et al.* Biochemistry. 1998, 37, 1777-1788

^{*2} Communication personnelle avec Ludger Johannes

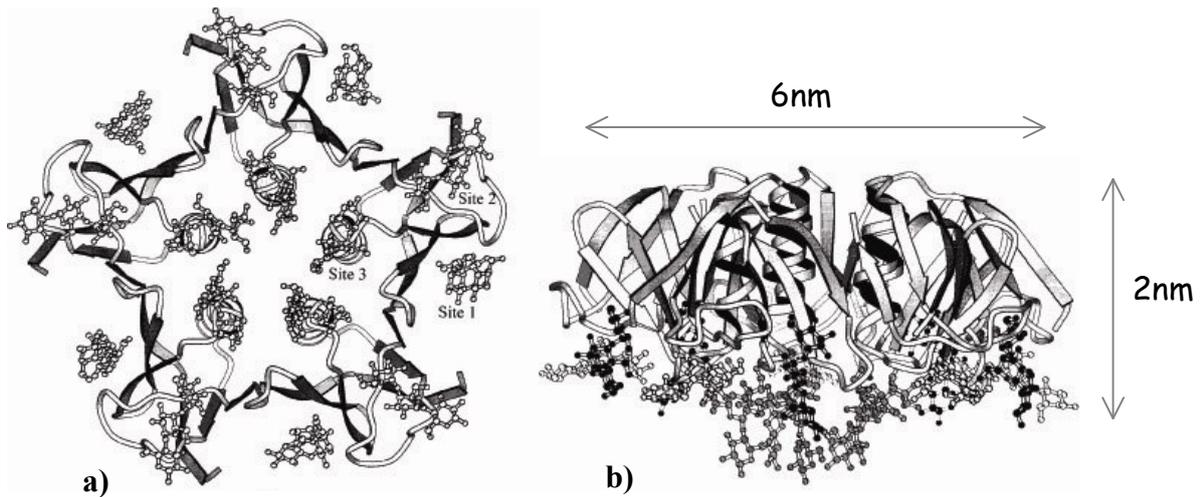


Figure 18 : Deux vues cristallographiques du complexe formé par la sous unité B de la toxine de Shiga et d'un analogue soluble du récepteur Gb3. 15 sites sont recensés sur le pentamère. Extrait de [31].

a). vue de dessous b). vue de côté

III.1.2. Le récepteur Gb3

La sous unité B, responsable de la fixation de la toxine, reconnaît spécifiquement un récepteur de la surface cellulaire. Il s'agit d'un glycolipide neutre, le **globotriaosylcéramide Gb3**. Constitué d'une longue chaîne grasse céramide incorporée dans la membrane plasmique et d'une courte chaîne trisaccharide extracellulaire, il se termine par un résidu digalactose sur lequel se fixe la sous unité B.

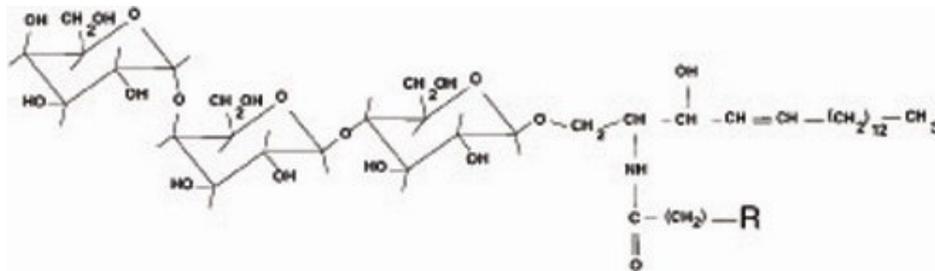


Figure 19 : Structure du récepteur Gb3.

La longueur de la chaîne céramide (R) est variable ; typiquement on compte 14 à 18 carbones.

Il faut noter que comme beaucoup de glycolipides la répartition du Gb3 n'est pas homogène dans la membrane cellulaire ; il est décrit associé à des microdomaines lipidiques (rafts)³².

Rôle physiologique du récepteur Gb3.

Le Gb3 est connu comme marqueur de différenciation (appelé alors CD77) et constitue un marqueur tumoral dans les lymphomes des lymphocytes B (lymphomes de Burkitt). Il est aussi fortement exprimé dans certains cancers comme les cancers des ovaires ou du colon et jouerait un rôle dans l'entrée du virus VIH, l'adhésion cellulaire et dans certaines voies de signalisation intracellulaires.

³² FALGUIERES *et al.* 2005, article soumis.

III.1.3. Un transport non conventionnel : la voie rétrograde

Nous avons décrit au début de ce chapitre, les mécanismes d'entrée de pathogènes dans leur cellule cible. La toxine de Shiga n'échappe pas à ces règles : elle doit pénétrer à l'intérieur de la cellule hôte et emprunter des voies intracellulaires lui permettant d'atteindre les ribosomes qu'elle inactive tout en évitant l'ensemble des processus d'élimination naturelle de la cellule. La toxine de Shiga suit ainsi une voie particulièrement atypique qui lui permet d'atteindre directement le réticulum endoplasmique.

Nous allons détailler ici les points principaux qui jalonnent le parcours de la toxine de Shiga présenté de manière simplifié sur le schéma suivant :

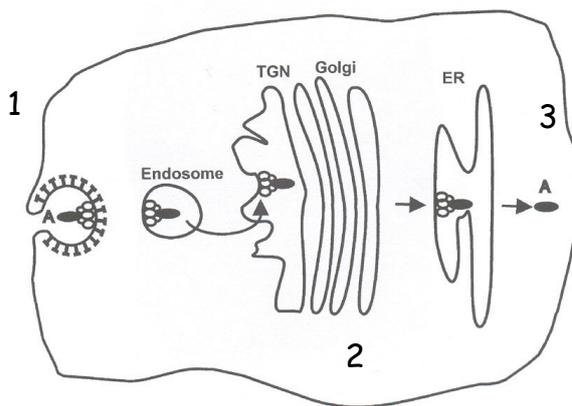


Figure 20 : Modèle simplifié de l'entrée de la toxine de Shiga dans une cellule.
Extrait de ³³

1. Endocytose

La toxine de Shiga suit une voie d'endocytose médiée par le récepteur Gb3 sur lequel elle se fixe. A partir de la membrane plasmique, elle est internalisée dans les endosomes précoces mais semble pouvoir emprunter à la fois une voie dépendante et indépendante de la clathrine³⁴.

2. Transport des endosomes vers l'appareil de Golgi puis vers le réticulum endoplasmique

L'endocytose de la toxine est indispensable pour l'intoxication mais elle n'est pas suffisante : la toxine doit encore être libérée dans le cytosol. Il faut donc assurer le transport vers le Golgi puis le réticulum endoplasmique. Il existe pour la toxine de Shiga un passage direct des endosomes précoces vers l'appareil de Golgi en évitant majoritairement les endosomes tardifs, les lysosomes et autres compartiments de dégradation. Ce passage est contrôlé par des protéines spécifiques de type SNARE et Rab³⁵. Du Golgi vers le RE, La toxine suit là encore une voie atypique, puisque indépendante des marqueurs classiques de type KDEL ou des protéines COPI.

3. Translocation de la toxine dans le cytosol et inhibition de la synthèse des protéines

Après la translocation dans le cytosol de la sous unité A (on ne sait pas si la sous unité B est transloquée aussi), la synthèse protéique est affectée rapidement et la cellule meurt. L'efficacité des toxines est donc redoutable d'autant plus que l'activité enzymatique est très stable.

³³ K.SANDVIG. Toxicon . 2001, 39, p. 1629-1635.

³⁴ S.U.LAUVRAK *et al.* Journal of Cell Science. 2004. 117, p. 2321-2331.

³⁵ TAI *et al.* Molecular Biology of the Cell. 2004, vol.15, p. 4011-1022.

La toxine de Shiga suscite ainsi un grand intérêt pour étudier ces voies d'entrées peu communes. De nombreuses études ont ainsi été menées sur cette voie originale³⁶ ; elles mettent en évidence l'implication en cascade d'un très grand nombre de familles de protéines (SNARE, Rab...). D'autre part, sa capacité à entrer dans le cytosol peut être exploitée pour y faire pénétrer des peptides ou protéines d'intérêt thérapeutique. Capable de se transloquer directement, elle est un bon candidat pour le développement de nouvelles approches antitumorales ou antivirales.

Dans ce contexte, il faut souligner que la sous unité B de la toxine suit, seule, les mêmes voies que la toxine dans son intégralité ce qui en fait un outil adapté car non pathogène.

III.1.4. Des colloïdes fonctionnalisés par la sous unité B

Cette partie décrit de quelle façon le fragment B de la toxine de Shiga est greffé de façon covalente sur la surface de nos colloïdes.

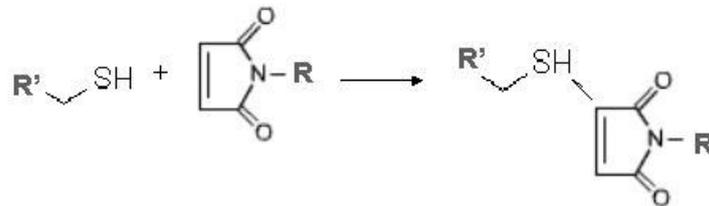
a- Sous unité B utilisée

La sous unité B que nous utilisons nous est donnée par Ludger Johannes. Elle est produite *in vitro* par une bactérie *Escherichia coli* (*E.Coli* pop6510). Elle est extraite et purifiée suivant les techniques classiques de préparation de protéines recombinantes³⁷ ; une cystéine libre est ajoutée permettant d'envisager de nombreux couplages. Il faut souligner ici qu'il s'agit de techniques complexes et coûteuses qui expliquent que nous ne disposons pas de grandes quantités de protéines. Le nombre d'expérience avec ce type de ligands est donc nécessairement limité et réfléchi.

En solution dans un tampon physiologique (Hepes), la sous unité B de la toxine de Shiga se présente sous sa forme pentamérique qui est thermodynamiquement la plus stable comme le montre l'étude de David G. Pina *et al*³⁸.

b- Principe du couplage : formation d'une liaison thioester

La réaction utilisée consiste à faire réagir la fonction thiol présente sur la cystéine avec une fonction maléimide. La réaction est présentée ci-dessous : l'attaque nucléophile du dérivé thiol sur la double liaison du dérivé maléimide permet la formation d'une liaison thioester stable. Cette réaction est particulièrement spécifique pour des pH physiologiques compris entre 6.5 et 7.5. Ainsi à pH 7, la réaction du maléimide sur le thiol est 1000 fois plus rapide que sur les amines.



Dans notre cas, chaque monomère de Stx-B porte une cystéine libre. Ce sont donc 5 fonctions thiol qui sont disponibles par pentamère Stx-B. Par ailleurs, l'ajout d'un lipide fonctionnel portant la fonction maléimide dans la formulation des colloïdes permet d'obtenir des objets présentant la fonction réactive. La ligation de la sous unité B se fait alors *a posteriori* c'est-à-dire en milieu colloïdal, sur l'objet formé et en suspension.

³⁶ Ludger JOHANNES. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2002, 283 :G1-G7.

³⁷ SU *et al*. Infection and Immunity. 1992. vol 60, n°8, p. 3345-3359.

³⁸ PINA *et al*. Biochemistry 2003, 42, p. 9498-9506.

Notons qu'il s'agit d'une méthode de couplage classique déjà utilisée pour la fonctionnalisation de liposomes³⁹. Nous pouvons la schématiser comme suit :

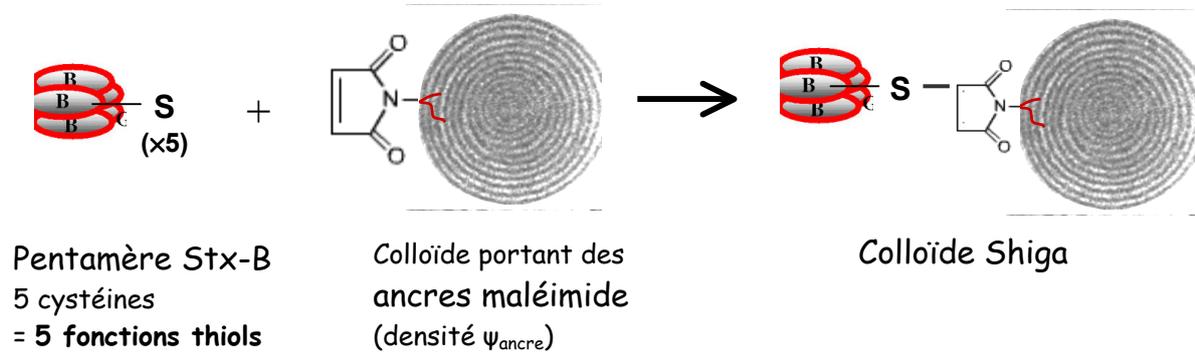


Figure 21 : Ligation de la sous unité B de la toxine de Shiga en milieu colloïdal

Nous n'avons pas représenté ici la stœchiométrie de la réaction. En considérant qu'elle est totale, ce sont 5 fonctions maléimide qui réagissent par pentamère Stx-B.

c- Préparation de colloïdes Shiga : protocole expérimental

La fonction maléimide doit être introduite dans les colloïdes lipidiques. Pour permettre son insertion dans la formulation, elle est portée par un ancrage lipidique de type phosphoéthanolamine. C'est donc un lipide fonctionnel que nous ajoutons dans la formulation de nos objets. La structure de cette ancre maléimide est représentée ci-dessous :

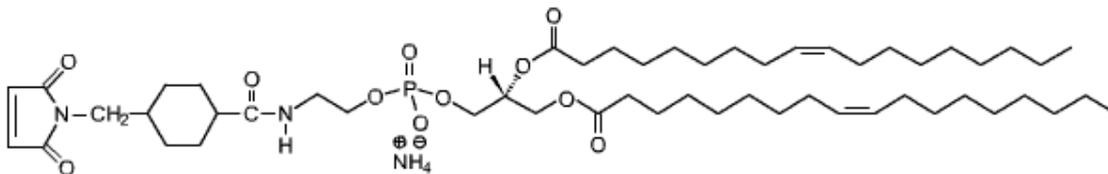


Figure 22 : Formule développée du 1,2-Dioleoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphoéthanolamine-*N*-[4-(*p*-maleimidométhyl)cyclohexane carboxamide] noté également 18 :1 PE MCC (Avanti Polar Lipids n°780201). Nous l'appellerons simplement ancre maléimide.

Le protocole complet pour la préparation de tels objets est présenté dans les annexes 2 à 6. Nous allons en reprendre ici les étapes principales :

1. Préparation de colloïdes portant l'ancrage réactive

- Préparation du mélange de lipides : une partie de la phosphatidylcholine est remplacée par l'ancrage maléimide (typiquement 7% en masse mais il est possible de moduler à souhait cette concentration). Le mélange de lipides est réalisé par solubilisation dans un solvant puis évaporation.
- Réhydratation de la phase lamellaire : une fois sec, le mélange lipidique homogène est réhydraté par de l'eau pure pour former la phase lamellaire à la limite de gonflement.

³⁹ Nobs *et al.* Journal of Pharmaceutical Sciences, vol 93, n° 8, 2004

- Après cisaillement et dispersion, nous obtenons des colloïdes présentant une partie des ancres maléimide en surface (statistiquement 8% en nombre^{*}). Nous appellerons ψ_{ancree} la densité surfacique d'ancres présentes en surface.

2. Couplage de la sous unité B de la toxine de Shiga

La réaction de couplage, encore appelé ligation, se fait par mise en contact de la dispersion colloïdale de concentration connue et de StxB dans un tampon pH 7.5. L'agitation est maintenue à température ambiante pendant une nuit.

3. Réalisation d'une droite abaque « fluorescence en fonction de la concentration des objets »

Après couplage, une petite fraction de la dispersion (de concentration C connue) est prélevée et une droite abaque de la fluorescence en fonction de la concentration est réalisée ; ce point sera développé en particulier dans le paragraphe III.3.

4. Séparation par gel-filtration

La protéine en excès non liguée est éliminée par une étape de filtration sur colonne. Par exclusion stérique, les colloïdes sont récupérés aux temps courts, tandis que Stx-B reste piégée dans le réseau de pores interconnectés du gel. Cette opération entraîne une dilution de la suspension colloïdale. L'étape suivante consiste donc à déterminer la concentration finale de la dispersion récupérée.

5. Détermination de la concentration

La fluorescence de la dispersion finale est mesurée et la concentration calculée à partir de la droite abaque réalisée au préalable.

Ces étapes permettent d'obtenir des colloïdes portant en surface le fragment B de la toxine de Shiga.

Expérimentalement, il faut noter que la préparation de tels objets est longue. Ainsi, l'enchaînement de toutes les étapes nécessite en moyenne 2 jours de préparation avant l'expérience de mesure de l'adhésion à proprement parler.

III.2. Colloïdes fonctionnalisés par une séquence peptidique GRGDSP

Nous allons voir ici de quelle façon il est possible de greffer sur les colloïdes une séquence peptidique de type RGD, ligand qui permet la fixation sur les récepteurs intégrines.

III.2.1. Les récepteurs intégrines et la matrice extracellulaire

Les intégrines sont des protéines membranaires responsables de l'accrochage des cellules sur la matrice extracellulaire. Elles fonctionnent comme des liants transmembranaires qui permettent les interactions nécessaires à l'adhésion cellulaire.

a- Structure des intégrines

Les récepteurs intégrines sont des hétérodimères composés par l'association non covalente de deux sous unités de glycoprotéines α et β . Chacune de ces sous unités est

^{*} Le calcul géométrique conduisant à ce résultat est présenté en annexe 1.

composée d'un large domaine extracellulaire, d'un domaine transmembranaire et d'un court domaine cytoplasmique lié au cytosquelette.

Les intégrines sont exprimées par de nombreux types cellulaires et la plupart des cellules expriment à leur tour plusieurs types d'intégrines. Ainsi chez l'homme, on compte plus d'une vingtaine d'hétérodimères différents formés à partir de 9 types de sous unités β et de 24 types de sous unités α .

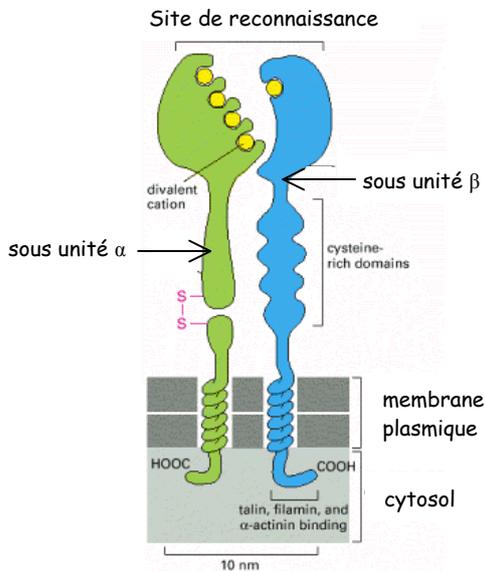


Figure 23 : Structure des deux sous unités d'une intégrine. Les études cristallographiques suggèrent que la molécule a approximativement la forme montrée ici. On peut considérer qu'elle s'étend d'une vingtaine de nm en dehors de la bicouche lipidique. Extrait de « *Biologie Moléculaire de la Cellule* » 4^{ème} édition [2].

De nombreuses études cristallographiques ont permis de déterminer la structure des hétérodimères. Elles montrent que l'affinité des intégrines pour leur substrat varie avec les changements conformationnels⁴⁰. Ces derniers peuvent être induits par la complexation d'ions divalents. Ainsi, les intégrines s'agrègent et sont désactivées en présence d'ions Ca^{2+} tandis que les ions Mg^{2+} ou Mn^{2+} favorisent une conformation active⁴¹.

b- Rôle des intégrines

Chaque type de sous unité possède ses caractéristiques propres. Les intégrines comportant la sous unité β_3 par exemple sont retrouvées sur diverses cellules et se fixent sur plusieurs protéines matricielles. Elles sont présentes sur les plaquettes sanguines où elles interagissent avec le fibrinogène pendant la coagulation sanguine ; les individus génétiquement déficitaires en intégrines β_3 sont alors atteints de la maladie de Glanzmann et présentent des hémorragies.

De façon générale, l'accrochage des intégrines à la matrice extracellulaire se manifeste en des points d'ancrage appelés contacts focaux constitués d'un groupement d'intégrines reliées aux cytosquelette et en particulier au réseau d'actine. Cette structure permet de connecter le réseau structural interne de la cellule au réseau externe de la matrice extracellulaire. Elle assure ainsi **la cohérence de l'organisme dans la transmission des efforts mécaniques** lors de la migration cellulaire par exemple. Beaucoup de déplacements cellulaires reposent ainsi sur ces points d'appuis fournis par les intégrines.

⁴⁰ M.J.HUMPHRIES *et al.* Trends in Biochemical Sciences. 2003, Vol 28, n°6.

⁴¹ A.P.MOULD and M.J.HUMPHRIES. Current Opinion in Cell Biology. 2004. 16, p. 544-551

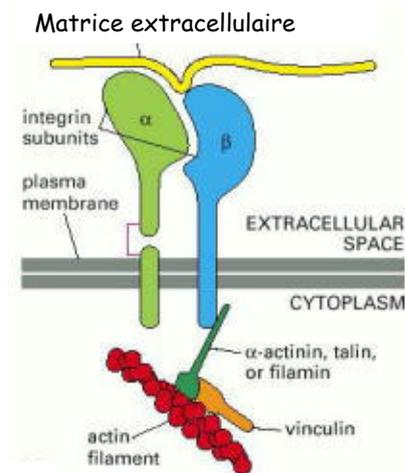


Figure 24 : Connexion entre la matrice extracellulaire et le cytosquelette via le maillon intégrine. Le domaine extracellulaire de l'intégrine se lie à la matrice extracellulaire tandis que la queue cytoplasmique de la sous unité β se fixe sur les filaments d'actine via diverses protéines d'ancrage intracellulaires (vinculine, taline, filamine, actinine α). Extrait de « *Biologie Moléculaire de la Cellule* » 4^{ème} édition [2].

Liées au cytosquelette, les intégrines peuvent également **activer diverses voies de signalisation intracellulaire** ; elles influent par exemple sur l'activation de récepteurs de facteurs de croissance. Ainsi, ces récepteurs restent bloqués en l'absence d'adhésion cellulaire (conduisant à l'apoptose) et sont au contraire activés par la liaison des intégrines à leur substrat. La survie et la prolifération des cellules sont donc fortement dépendantes de l'attachement à la matrice extracellulaire via les intégrines.

Enfin, il faut souligner que l'ensemble des propriétés des intégrines est sous le contrôle direct des cellules qui peuvent contrôler leur activité. **La cellule régule** de cette manière avec précision **l'affinité de ses intégrines** pour la matrice en fonction de ses besoins d'attachement ou de détachement.

c- Sites de reconnaissance entre intégrines et matrice extracellulaire

La matrice extracellulaire est un ensemble tridimensionnel complexe de macromolécules sécrétées par la cellule. Sa composition est variable suivant les tissus : on y trouve des polysaccharides (glycoaminoglycanes...) et des protéines (comme le collagène) qui s'assemblent en un réseau organisé solidement associé à la surface cellulaire qui les produit. Elle joue un rôle actif dans la régulation du comportement des cellules qui sont en contact en influençant leur survie, leur migration, leur forme...

La plupart des intégrines reconnaissent avec des affinités variables plusieurs ligands naturels présents dans leur matrice parmi lesquels on peut citer le collagène, la laminine, la fibronectine ou encore la vitronectine. Dans un grand nombre de cas, le site de reconnaissance sur les ligands a pu être déterminé. **La séquence minimale identifiée sur de nombreuses molécules de la matrice est un tripeptide RGD.** Cette séquence a également été mise en évidence sur des pathogènes qui utilisent les intégrines pour se fixer (beaucoup d'adénovirus, le virus de la fièvre aphteuse...).

Pour notre étude, c'est donc un ligand RGD que nous allons utiliser pour permettre la reconnaissance par les intégrines. Ces ligands, des tripeptides, ont l'avantage de la simplicité chimique et sont de petites tailles. Notons que la spécificité entre les différentes intégrines (et donc entre différents tissus) peut être augmentée en optimisant le ligand RGD au tissu visé.

d- Le couple « intégrine $\alpha_v\beta_3$ – peptide GRGDSP »

L'intégrine $\alpha_v\beta_3$ est particulièrement présente sur nos cellules HeLa. Impliquées dans l'angiogénèse, la formation des métastases, l'inflammation, elles se lient à de nombreux ligands parmi lesquels on peut citer la vitronectine, l'ostéopontine ou l'angiostatine. La structure cristallographique de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ a été déterminée. Jian-Ping Xiong *et al*⁴², propose une structure globale sous forme d'un fin cylindre de 16nm de hauteur et de 2nm de diamètre portant une tête de dimensions 9×6×4.5nm.

Pour augmenter la spécificité de la reconnaissance sur cette intégrine particulière, nous allons utiliser une séquence peptidique plus longue et donc moins ubiquitaire ; il s'agit de la séquence GRGDSP⁴³.

III.2.2. Colloïdes portant le ligand GRGDSP

Le ciblage des colloïdes par un motif de reconnaissance peptidique portant la séquence RGD a été très largement mis au point et étudié par Pascale Chenevier au cours de sa thèse^{*}, en collaboration avec Line Bourel et Oleg Melnyk (Institut de Biologie de Lille - CNRS UMR 8525). Nous en rappelons ici les principales conclusions.

Plusieurs stratégies de fonctionnalisation ont été envisagées. Nous en avons utilisé deux :

- l'incorporation en masse d'un motif de type lipopeptide
- la ligation du peptide RGD sur le colloïde présentant en surface une ancre réactive

a- Lipopeptide incorporé en masse

Dans ce cas, on prépare une molécule ligand constituée d'un ancrage lipidique qui porte la séquence de reconnaissance RGD d'où l'appellation de lipopeptide. Purifiée, elle est incorporée dans la composition de la phase lamellaire. Après cisaillement, on obtient des objets dont la bicouche extérieure porte une partie des lipopeptides incorporés^{*}.

Le lipopeptide est synthétisé en phase solide (technique de protection / déprotection Fmoc-Tbu). Il se compose de 3 parties :

- le ligand de reconnaissance GRGDSP
- un espaceur hydrophile triéthylène glycol auquel est ajouté une tyrosine et une lysine
- deux chaînes grasses palmitoyl qui permettent l'ancrage dans la membrane du colloïde.

La formule chimique du composé est présentée figure 25 et le protocole de synthèse est détaillé dans les annexes 7 et 8. Il faut noter que la préparation de telles molécules et en particulier l'étape de purification sont délicates. Elles ont été mises au point par Pascale Chenevier à Lille en étroite collaboration avec Line Bourel et Oleg Melnyk. Néanmoins, cette synthèse est aujourd'hui bien maîtrisée et après y avoir été initiée à Lille sous la direction attentive de Pascale Jolimaître et Line Bourel, nous avons pu transférer ce savoir faire à la cellule chimie du Centre de Recherche Paul Pascal.

⁴² XIONG *et al.* Science. 2001, vol 294.

⁴³ Cette séquence est rapportée dans de nombreuses études. On peut citer notamment le travail de thèse de Sophie Verrier. Thèse de Doctorat. Université Paris 7. 1998 « Etude des mécanismes d'adhésion des cellules ostéoprogénitrices humaines : Rôle et intérêt des séquences RGD »

* Pascale CHENEVIER. Thèse de doctorat de l'université de Bordeaux 1. 2001. [19]

* Se reporter à l'annexe 1.

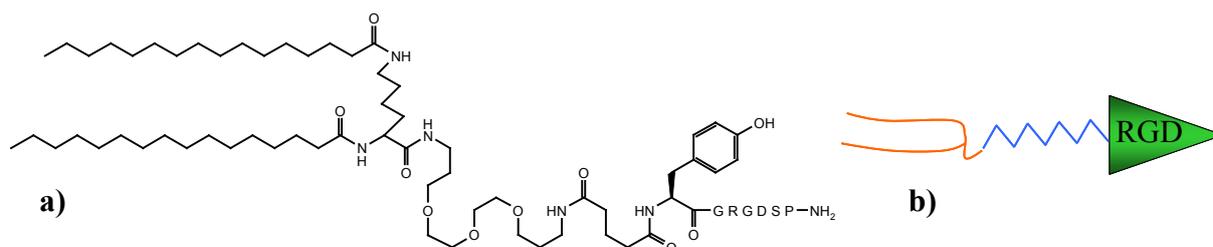


Figure 25 :

a). Formule chimique développée du lipopeptide RGD

b). Schéma de ce même lipopeptide. On reconnaît les deux chaînes grasses (rouge), l'espaceur hydrophile (bleu) et le peptide de reconnaissance RGD (vert).

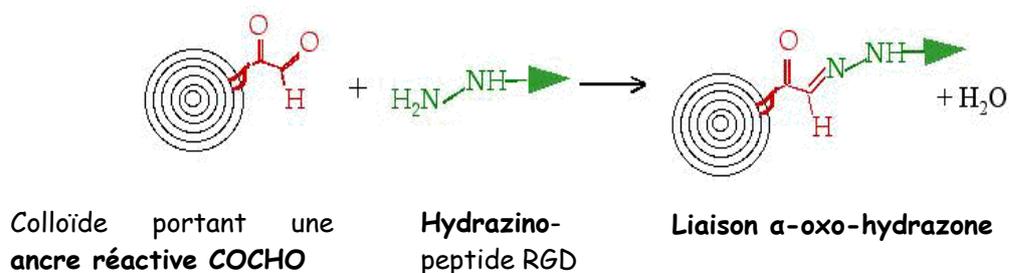
b- Ligation

Le principe général est le même que celui que nous avons détaillé pour le couplage de la sous unité B de la toxine de Shiga. Un lipide fonctionnel est introduit dans la phase lamellaire et une fois les objets formés, le ligand réactif est greffé sur l'ancre lipidique par ligation chimique. La réaction de ligation permet alors de créer une liaison covalente entre l'objet et le ligand. Plusieurs types de liens peuvent être formés sur ce principe.

Formation d'une liaison α -oxo-hydrazone

Il s'agit d'une liaison particulièrement originale. Elle repose sur la réaction d'une ancre lipidique portant une fonction α -oxo-aldéhyde (ancre COCHO) et d'un peptide portant une fonction hydrazine. Les applications de cette ligation et les méthodes de synthèse associées sont développées depuis quelques années par Oleg Melnyk (UMR 8525 – IBL)

La liaison formée est particulièrement stable en milieu biologique. Pascale Chenevier a largement étudié cette réaction en milieu colloïdal. L'étude complète du mécanisme a permis de démontrer qu'elle constituait une méthode efficace pour couvrir la surface de colloïdes avec une molécule ciblant⁴⁴.

Figure 26 : Représentation de la ligation α -oxo-hydrazone en milieu colloïdal.

Soulignons ici que les ancres COCHO et les hydrazino-peptides que nous avons utilisés ont tous été synthétisés à l'Institut de Biologie de Lille par Line Bourel et Pascale Jolimaître au cours de son travail post doctoral.

Formation d'une liaison thioester

Il s'agit de la même réaction de ligation que celle que nous avons détaillé dans le cas de la sous unité B de la toxine de Shiga. Les objets sont préparés de la même façon par

⁴⁴ P.CHENEVIER, L.BOUREL, D.ROUX. J.Am.Chem.Soc. 2003. 125 (52) p. 16261-16270.

incorporation d'une ancre maléimide. Un peptide GRGDSPC a été synthétisé pour cette ligation (*société Séquentia*). La présence de la cystéine libre C (avec une fonction thiol) permet d'assurer la réaction sur l'ancre maléimide.

Ces différentes stratégies permettent d'obtenir des colloïdes ciblant RGD. Toutefois, de façon générale, c'est l'incorporation en masse du lipopeptide que nous avons utilisé le plus couramment. En effet, elle permet un contrôle direct de la quantité de ligands incorporée. Au contraire, dans le cas des ligations, la réaction se fait a posteriori et nous ne disposons pas pour le moment de méthode permettant de déterminer le nombre de motifs effectivement greffés sur la surface du colloïde. En contrepartie, les ligations présentent l'avantage de la flexibilité ; le greffage se faisant sur l'objet déjà formé, c'est un système intéressant pour étudier des modifications physico-chimiques du ligand telles que la longueur de l'espaceur qui le sépare de l'objet. C'est dans ce but que les réactions de ligation RGD ont été utilisées ; nous y reviendrons dans le chapitre 4.

III.2.3. Remarque sur les quantités de ligands greffés sur les colloïdes

Ce paragraphe a pour vocation de préciser quelques points de formulation en les remplaçant dans leur contexte historique chronologique.

Les premiers oignons ciblant ont été réalisés avec le lipopeptide portant la séquence GRGDSP. Les phases lamellaires ont alors été formulées en remplaçant en masse 10% des lipides phosphatidylcholine par ce lipopeptide. Cette proportion permettait d'obtenir des objets capables d'adhérer sur les cellules tout en préservant leur structure lamellaire. Ce système constitue un point de référence bien caractérisé.

Calculons la fraction molaire de lipopeptide correspondante.

Soit f_{mass} la fraction massique de lipopeptide introduite et f_{mol} la fraction molaire correspondante, on peut écrire : $f_{mol} \cong \frac{M_{PC}}{M_{lipopeptide}} f_{mass}$

L'application numérique conduit avec $f_{mass} = 0.1$, $M_{PC} = 800 \text{ g/mol}$ et $M_{lipopeptide} = 1670 \text{ g/mol}$ à : $f_{mol} \approx 0.05$.

Lorsqu'il s'agit d'introduire une ancre réactive (ancre COCHO ou ancre maléimide), nous nous sommes placés dans ces mêmes conditions de sorte que la fraction molaire d'ancres et donc de motifs de reconnaissance reste la même autant que possible. En effet, nous verrons que la densité de motifs sur la surface est un paramètre important à prendre en compte et à contrôler lorsque l'on cherche à décrire l'interaction entre les colloïdes et la surface cellulaire.

III.3. Des colloïdes fonctionnalisés fluorescents

III.3.1. Nécessité et choix du marquage utilisé : un lipide bodipy

Dans notre approche, l'étude de l'interaction colloïde – cellule ne peut se faire sans un suivi de l'objet dans son parcours pour se fixer et pénétrer à l'intérieur de la cellule cible. Pour ce faire, les colloïdes sont rendus fluorescents par ajout d'un marqueur.

Il faut noter que plusieurs stratégies de marquage ont été développées. Dans un premier temps, il s'agissait d'encapsuler une petite molécule fluorescente, la calcéine, lors de la formation de la phase lamellaire. Largement mise au point et utilisée par Pascale Chenevier au

cours de sa thèse^{*}, elle est efficace mais le principe même de l'encapsulation nous a conduit à l'abandonner. En effet :

- la détermination du taux d'encapsulation nécessite une étape de dosage.
- l'encapsulation bien qu'efficace (rendement de 80%) n'est pas totale et n'est pas toujours reproductible: il reste 20% de la fluorescence à l'extérieur des objets, fluorescence résiduelle qu'il n'est pas possible d'éliminer et qui crée un bruit de fond qui peut être gênant pour la mesure de l'adhésion.
- enfin, ce n'est pas le colloïde qui est marqué mais l'actif hydrophile qu'il transporte.

Ainsi nous avons fait le choix de marquer l'objet lui-même en incorporant un lipide fluorescent dans la formulation. Le choix du fluorophore repose sur plusieurs impératifs :

- des longueurs d'onde d'excitation et d'émission compatibles avec l'appareillage que nous utilisons (cytomètre de flux, microscope confocale de fluorescence)
- une fluorescence stable peu dépendante du milieu extérieur (pH, changement de la formulation des objets, fonctionnalisation).
- un fluorophore résistant autant que possible au « bleaching ».

Compte tenu de l'ensemble de ces impératifs, notre choix s'est porté sur un lipide dérivé de la phosphatidylcholine portant un marqueur bodipy. Incorporé dans le mélange de lipides en faible quantité (0.1% des lipides en masse), il permet d'obtenir une phase lamellaire et des colloïdes fluorescents dans le vert (excitation 495nm - émission ≈515nm).

La particularité, c'est que le fluorophore se trouve sur la partie lipidique et donc à terme dans la membrane lipidique de l'objet. Il est ainsi « protégé » du milieu extérieur ce qui permet d'avoir une fluorescence relativement stable.

La formule développée de ce composé est présentée ci-dessous.

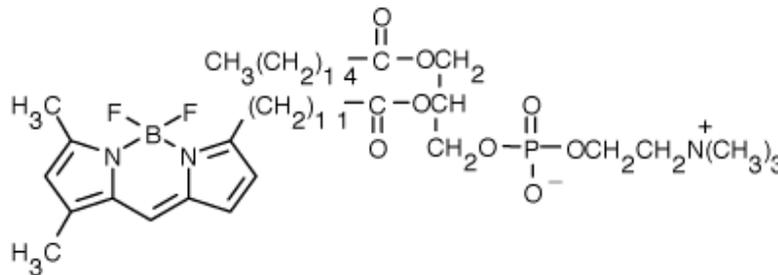


Figure 27 : Formule développée du 2-(4,4-difluoro-5,7-diméthyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene-3-dodécanoyl)-1-hexadécanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (β-BODIPY® FL C₁₂-HPC) Molecular Probes référence D 3792. Nous l'appellerons simplement lipide bodipy.

III.3.2. Concentrations des dispersions colloïdales / Fraction volumique d'objets

Nous avons vu que les objets sont préparés par cisaillement de la phase lamellaire puis dispersion dans un tampon aqueux. Précisons ici ce que nous entendons par « concentration ou fraction volumique d'objets dans la dispersion ».

La **fraction volumique** f est définie telle que $f = \frac{v_{objets}}{V}$ où v_{objets} est le volume de l'ensemble des objets de la dispersion et V le volume total de la dispersion.

^{*} P.CHENEVIER. Thèse de doctorat de l'université Bordeaux1. 2001. [19].

Le volume v de tampon aqueux ajouté pour préparer la dispersion s'écrit $v = V - v_{objets}$

Par ailleurs, soit m_{lamell} la masse de ces objets ou encore la masse de phase lamellaire cisailée pour préparer la dispersion. La phase lamellaire est constituée à 50% d'eau et sa masse volumique ρ est de l'ordre de $1\text{g}/\text{cm}^3$ de sorte que $v_{objets} = \rho m_{lamell}$ d'où $v = V - \rho m_{lamell}$.

On écrit donc également : $f = \frac{\rho m_{lamell}}{V}$

Ainsi, une dispersion à $f = 2.10^{-2}$ ($=1/50$) est préparée par cisaillement d'un 1mg de phase lamellaire puis dispersion dans 49mg (soit 49 μL) de phase aqueuse.

La **concentration C d'objets, en molaire**, s'exprime par ailleurs en fonction de f :

$$C = \frac{f}{\frac{4}{3}\pi R^3 N_A} \quad \text{soit } C \cong 4.10^{-7} f$$

avec R le rayon de l'objet (nous le prendrons égal à 100nm) et N_A le nombre d'Avagadro.

Lorsque la concentration d'une dispersion d'objets est inconnue (c'est le cas par exemple après une filtration sur colonne qui entraîne une dilution), la présence du fluorophore dans la membrane du colloïde peut permettre de la déterminer. Pour cela, une droite abaque est réalisée à partir d'une suspension de concentration connue ; cela consiste à mesurer au spectromètre de fluorescence, la fluorescence de la solution en fonction de la concentration (connue) d'objets introduite dans la cuve de mesure. La fluorescence de la dispersion de concentration inconnue est alors mesurée et la concentration déterminée à partir de l'abaque réalisée au préalable. Le protocole est présenté en annexe 6.

Ce sont donc toujours de tels colloïdes fluorescents, ciblant et dont nous connaissons la concentration que nous utiliserons par la suite.

Nous allons maintenant présenter, rapidement, les cellules que nous avons utilisées tout au long de ce travail.

IV. Modèle cellulaire utilisé : la cellule HeLa

IV.1. Notion de lignée cellulaire

Une lignée cellulaire continue est un clone de cellules qui prolifèrent en culture *in vitro* sans limite de durée. En général, il s'agit de cellules dites transformées afin qu'elles ne soient plus soumises aux contrôles de survie.

Les lignées peuvent être obtenues à partir de cellules cancéreuses prélevées chez des malades ou bien à partir de cellules saines en culture sous l'action de mutagènes ou encore par fusion de cellules cancéreuses avec des cellules saines d'intérêt. Elles se multiplient alors à l'infini avec des cycles de division rapide (elles doublent en 24h environ) et sont utilisées pour ces raisons en recherche.

IV.2. La cellule HeLa : une cellule tumorale épithéliale

Dans notre cas, nous avons travaillé sur des lignées de cellules cancéreuses d'origine humaine : **les cellules HeLa**. Ce sont des cellules épithéliales issues d'un cancer du col utérin d'une femme américaine du nom de Henrietta Lacks (d'où l'appellation HeLa pour les désigner). Prélevées en 1951, elles ont été mises en culture et se sont révélées particulièrement résistantes et adaptées à une utilisation en laboratoire. Elles ont ainsi été largement étudiées depuis 50 ans partout dans le monde.

Les cellules épithéliales constituent les épithéliums. Il s'agit de feuillets cohérents de cellules formés à partir d'une ou de plusieurs couches de cellules recouvrant une surface externe ou tapissant une cavité. La cavité utérine, la paroi intestinale, l'épiderme sont des épithéliums. Les cellules HeLa sont donc des cellules dites adhérentes. En culture, elles se fixent sur un substrat (une boîte de culture), s'y multiplient jusqu'à former une monocouche dans laquelle chaque cellule est en contact direct avec plusieurs voisines.

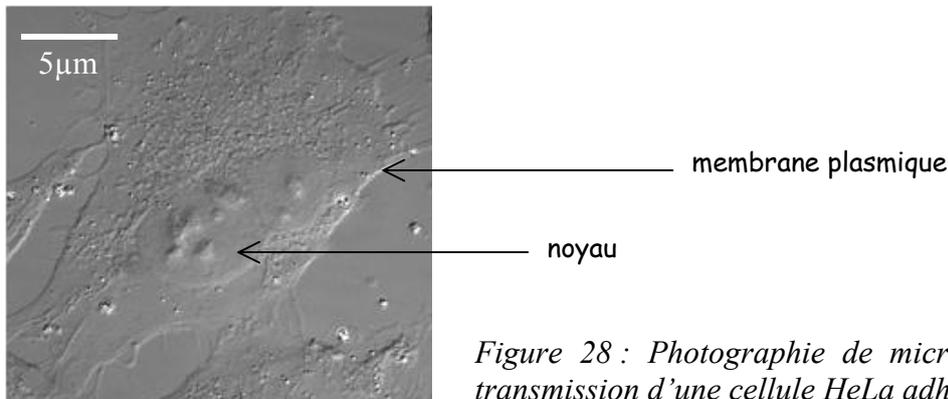


Figure 28 : Photographie de microscopie optique en transmission d'une cellule HeLa adhérente.

Elles sont cultivées au laboratoire dans des conditions détaillées dans le chapitre 2 (paragraphe A-II).

IV.3. Remarques sur l'utilisation de lignées cellulaires

Aujourd'hui, l'analyse du génome de différentes sources de ces cellules de par le monde montre qu'elles sont très différentes les unes des autres. Cela est probablement dû à leur nature tumorale et aux différences de conditions de culture dans les divers laboratoires. Nous possédons nous-mêmes au laboratoire ces cellules depuis plusieurs années. Il s'agit probablement d'un clone particulier qui possède aussi ces propres caractéristiques. Par exemple, nos cellules HeLa possèdent les récepteurs intégrines $\alpha_v\beta_3$ en grande quantité ce que nous n'avons pas nécessairement retrouvé sur des cellules HeLa provenant de sources différentes*.

De plus, comme toutes les lignées cellulaires, ces cellules tumorales sont différentes des cellules saines dont elles dérivent (la taille, la forme, l'expression de certains marqueurs de surface peuvent être modifiés). Elles fournissent des modèles cellulaires pratiques mais pas toujours fiables quant aux interprétations biologiques. Il faut donc garder ce point à l'esprit.

* Mesures réalisées par dosages d'intégrines en immunocytochimie double marquage.

La très grande partie du travail présenté ici a été réalisée sur ce type de lignées cellulaires. Néanmoins, compte tenu de la remarque précédente, quelques expériences ont également été reproduites sur des cultures primaires, c'est-à-dire directement prélevées dans l'organisme. Leur survie en laboratoire est limitée. Nous concernant, nous avons utilisé des cellules HUVEC qui nous ont été gentiment fournies par Reine Bareille^{*1}. Il s'agit de cellules humaines endothéliales issues de la veine de cordons ombilicaux. Ces expériences peu nombreuses ont donné des résultats qualitatifs tout à fait comparables à ceux obtenus sur cellules HeLa^{*2}.

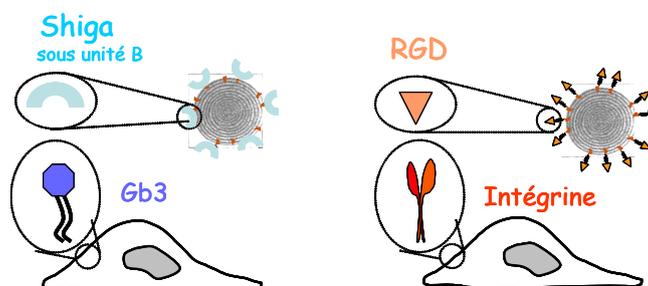
V. Problématique générale

Nous avons vu que l'interaction entre des colloïdes fonctionnalisés et des cellules est un domaine très largement inspiré du comportement des virus et qui ouvre la voie à un vaste champ d'applications dans le domaine de la vectorisation. Par ailleurs, nous disposons au laboratoire de colloïdes lipidiques particulièrement adaptés au travail en milieu biologique et que nous sommes capables de rendre ciblant. **De tels objets de taille submicronique, portant à leur surface des ligands ayant une affinité pour la membrane cellulaire, sont capables d'adhérer à la surface de la cellule, puis d'y pénétrer.**

Notre étude se propose ici de décrire les interactions entre ces colloïdes synthétiques et contrôlés, et des cellules vivantes en culture (HeLa) pour tenter de dégager les paramètres physico-chimiques qui gouvernent le comportement de ces objets. La fixation du colloïde sur la surface cellulaire est à ce titre une étape clé. Elle est gérée par des mécanismes de reconnaissance de type ligand – récepteur que nous avons détaillé. Dans ce cadre, deux types de colloïdes ciblant ont été mis au point :

- des colloïdes portant le fragment B de la toxine de Shiga (**colloïdes Shiga**) que nous avons développés dans le cadre d'une étroite collaboration avec Ludger Johannes (équipe « trafic intracellulaire et signalisation » UMR 144 CNRS/Institut Curie – Paris)
- des colloïdes portant une séquence peptidique RGD (**colloïdes RGD**)

Ces deux types de colloïdes se fixent sur deux récepteurs très différents de la surface cellulaire respectivement les glycolipides Gb3 et les intégrines. Ces deux systèmes colloïdes ciblant / récepteurs cellulaires mis au point au laboratoire sont schématisés ci-après :



^{*1} Equipe Imagerie cellulaire et Tissulaire du laboratoire Biomatériaux et Réparation Tissulaire INSERM U 577. Université de Bordeaux 2.

^{*2} Il s'agit des expériences suivantes: étude cinétique de l'adhésion de colloïdes ciblant RGD et étude de l'adhésion en fonction de densité surfacique de polymère sur des colloïdes ciblant RGD.

Historiquement, c'est le ciblage RGD qui a été développé le premier par Pascale Chenevier au cours de sa thèse qui a précédé ce travail. De notre côté, nous avons repris ce système tout en développant les colloïdes Shiga qui se sont finalement révélés beaucoup plus appropriés à notre étude.

Nous essaierons autant que possible de dégager **des mécanismes généraux du processus d'adhésion** de tels colloïdes sur la surface cellulaire. Néanmoins nous verrons en comparant ces deux systèmes qu'ils peuvent certes être décrits dans une certaine mesure par les mêmes approches thermodynamiques mais que les processus mis en jeu restent dépendants de l'objet lui-même et de son site de fixation sur la surface cellulaire.

Par ailleurs, ce travail qui porte majoritairement sur les questions d'adhésion s'inscrit dans une problématique plus vaste. En effet, nous avons vu que la toxine de Shiga suit un chemin intracellulaire tout à fait particulier, alors qu'un ligand de type RGD suit une voie classique d'endocytose et d'élimination. Qu'en est-il dans le cas d'un colloïde fonctionnalisé par ces mêmes ligands ? Nous reviendrons sur cette question, bien que très sommairement, dans la fin de ce manuscrit.

Dans la suite, nous allons tenter de voir en quoi des approches physico-chimiques thermodynamiques et cinétiques peuvent permettre de mieux appréhender la complexité des mécanismes biologiques mis en jeu dans l'interaction de particules colloïdales (virus, vecteurs...) sur cellules.

Le chapitre 2 s'intéresse en particulier à la cinétique d'adhésion des colloïdes sur leur récepteur membranaire. Alors que l'interaction ligand-récepteur est bien connue, peut-on sur le même principe, quantifier et décrire la fixation d'objets colloïdaux sur des cellules vivantes? Est-il possible d'interpréter ce mécanisme biologique de reconnaissance sous le regard du physico-chimiste et du physicien ? Nous proposerons notamment un mécanisme mettant en jeu des liens multiples entre le colloïde et la cellule et permettant de rendre compte de nos observations expérimentales.

Dans le chapitre 3, nous verrons comment des modifications de surface de l'objet peuvent influencer ces cinétiques. Nous décrirons entre autres l'effet de barrière généré par la présence de polymères.

Le système de ciblage utilisant le fragment B de la toxine de Shiga s'est révélé plus accessible pour la description cinétique et thermodynamique de l'interaction. Les chapitres 2 et 3 présentent majoritairement des résultats sur ce système. Néanmoins, dans le chapitre 4, nous reviendrons sur le système RGD en présentant les résultats, de nature plus qualitative, obtenus dans ce cas. Nous soulignerons en particulier des effets de la nature chimique du ligand greffé.

Par la suite, une approche biophysique pour la mesure de l'interaction est proposée dans le chapitre 5. Nous verrons en quoi, la mesure locale de la force du lien colloïde - cellule par une technique de micromanipulation (Biomembrane Force Probe) se révèle particulièrement intéressante. Ce travail pour le moment préliminaire a été mené en collaboration avec Frédéric Pincet (Laboratoire de Physique Statistique – Ecole Normale Supérieure – Paris). Il devrait se poursuivre au laboratoire après montage de la technique par Damien van Effenterre.

Enfin, dans le dernier chapitre, nous reviendrons sur le devenir de ces colloïdes dans les cellules (suivi à 37°C dans des conditions physiologiques) et sur leur trafic intracellulaire. Cette partie présentera quelques pistes d'analyses qui ont été amorcées au cours de ce travail et conclura sur les perspectives ouvertes par cette étude.

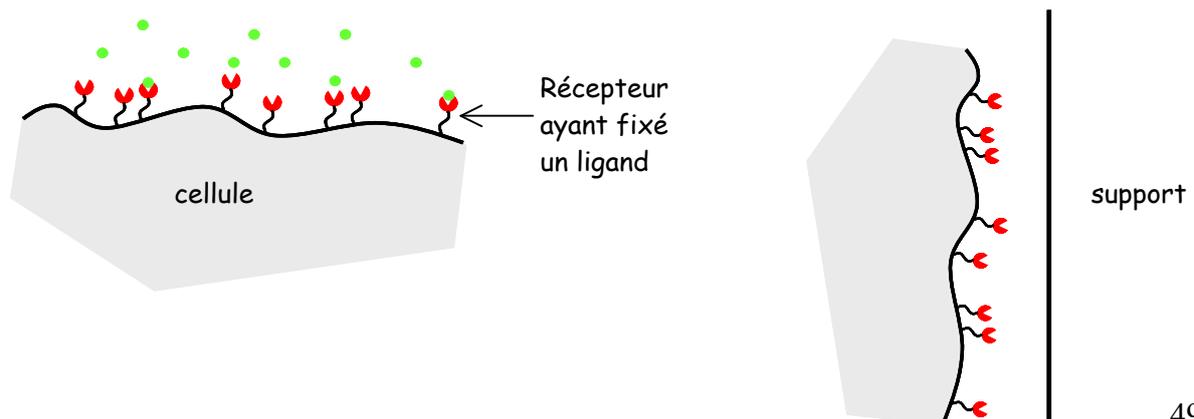
Chapitre 2

Adhésion sur des récepteurs cellulaires

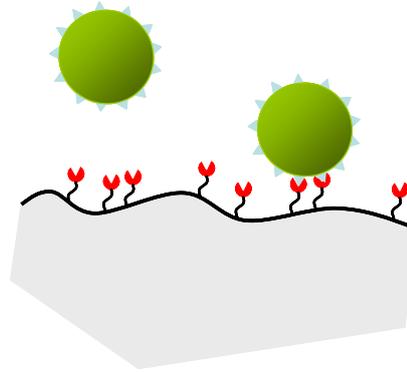
Suivi cinétique

Dans l'étude de l'interaction entre colloïdes et cellules, nous allons commencer par nous intéresser dans ce chapitre à la première étape de cette interaction : **l'adhésion**. Comme nous l'avons détaillé dans le chapitre précédent, c'est l'utilisation de ligands greffés à la surface des objets qui va permettre de créer une reconnaissance spécifique avec un récepteur de la surface cellulaire et donc de générer un lien adhésif entre les deux éléments.

Qu'ils s'agissent de nutriments, de médiateurs chimiques, de protéines, nombreux sont les éléments qui se fixent ainsi sur la membrane cellulaire grâce à des récepteurs. Ces situations familières pour la cellule concernent des éléments de taille moléculaire ou macromoléculaire : elles mettent en jeu en général une seule ou un petit nombre de liaisons. Par ailleurs, les cellules développent également des contacts adhésifs sur de plus grandes échelles, lorsqu'elles adhèrent sur un support ou qu'elles forment des tissus impliquant alors de nombreux liens.



Intermédiaire entre ces deux situations, le cas de colloïdes (d'un rayon d'environ 100 à 200nm), moins étudié, constitue une situation particulière pour la cellule. Tout comme pour les virus, il s'agit d'objets macroscopiques à l'échelle des récepteurs mais qui restent néanmoins browniens.



On imagine alors que l'adhésion de plusieurs de ces objets sur les cellules mette en jeu des mécanismes complexes (nombre fini de liens par colloïdes, compétition pour les récepteurs...). De plus, l'étude va être menée ici sur une population de cellules en contact avec la dispersion colloïdale permettant ainsi d'envisager des effets collectifs.

Dans ces conditions, peut-on mesurer et décrire simplement l'interaction des objets avec la membrane cellulaire? L'adhésion met-elle en oeuvre des mécanismes propres à la nature colloïdale de l'objet? Enfin, dans quelle mesure faut-il prendre en compte la nature du couple ligand – récepteur impliqué?

C'est à ces questions entre autres que nous nous intéresserons dans ce chapitre.

Dans une première partie, nous présenterons la cytométrie de flux, technique utilisée pour mesurer l'adhésion. Nous verrons qu'elle constitue un outil de mesure quantitatif et statistique puissant.

Puis nous appliquerons cette technique au cas des colloïdes fonctionnalisés par la sous unité B de la toxine de Shiga. Nous verrons que la description de l'adhésion de tels objets ne se réduit pas à un simple équilibre. De plus, et en nous appuyant sur l'étude de l'adhésion de la toxine de Shiga libre en solution et de colloïdes fonctionnalisés différemment comme éléments de comparaison, nous verrons que l'adhésion de ces objets Shiga relève d'un processus qui semble particulièrement atypique.

Enfin, dans une dernière partie, nous discuterons l'ensemble de ces résultats. Nous tenterons en particulier de proposer une interprétation permettant de rendre compte du comportement particulier observé dans l'adhésion des colloïdes Shiga.

A. Mesure de l'adhésion par cytométrie de flux

I. Une technique quantitative basée sur la fluorescence

La cytométrie de flux est une technique de mesure adaptée au matériel vivant que sont les cellules. Etymologiquement, la technique permet la mesure (« *métrie* ») de cellules (« *cyto* »). Elle est couramment utilisée en biologie, tant en recherche qu'en analyse (détermination de l'état cellulaire, taux d'expression d'une protéine...) et réalise des mesures statistiques sur une grande population de cellules en les comptant une à une.

I.1. Principe de la mesure

Le fonctionnement du cytomètre de flux repose sur 3 éléments:

- un rayonnement laser argon bleu (488 nm)
- un liquide de gaine ou fluide porteur qui circule dans l'appareil
- un compartiment de mesure constitué d'une tige capillaire qui plonge dans la suspension de cellules à mesurer

Lorsque l'appareil est en fonctionnement, le compartiment de mesure est placé en surpression permettant l'aspiration de l'échantillon dans la tige capillaire. La solution de cellules est alors étroitement focalisée par le flux hydrodynamique du liquide porteur et c'est un tout petit élément de volume qui passe dans la chambre de détection. Les éléments aspirés passent ainsi un à un devant le faisceau laser.

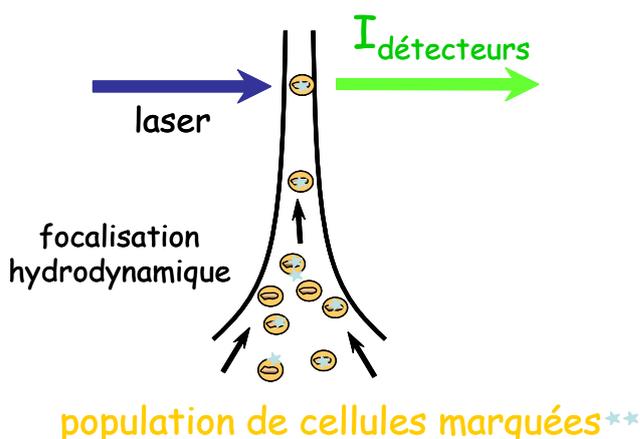


Figure 1 : Aspiration et focalisation de la solution de cellules dans le compartiment de mesure du cytomètre de flux.

Cinq signaux lumineux de diffusion sont récupérés, convertis en tension et assignés à un numéro de canal sur une barrette de 1024 détecteurs :

- l'intensité diffusée aux petits angles (notée FSC pour « forward scatter ») : elle renseigne sur la **taille** de l'objet.

- l'intensité diffusée aux grands angles (notée SSC pour « side scatter ») par les organites intracellulaires : elle représente la complexité interne de la cellule appelée aussi **granulosité**.
- trois intensités de fluorescence (vert, rouge et rouge profond) recueillies sur des canaux différents ((FL1-500-560 nm, FL2-543-627 nm, FL3-670 nm)

Un tube photomultiplicateur permet d'amplifier les signaux de faibles intensités. L'intégration de chaque signal donne la coordonnée de l'événement pour le paramètre mesuré.

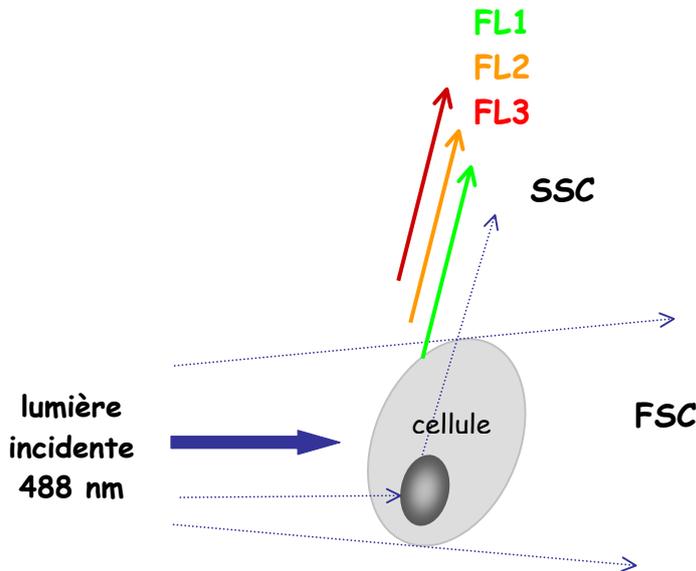


Figure 2 : Diffusion du rayonnement par une cellule dans le faisceau laser du cytomètre.

Pour chaque échantillon, la mesure s'effectue ainsi sur un grand nombre de cellules (typiquement 10000). Les résultats représentent donc, pour un échantillon donné, un ensemble de 10000 points à 5 coordonnées. En particulier, les 3 canaux de fluorescence (FL1, FL2 et FL3) permettent de corrélérer différents marquages. On peut par exemple simultanément sur une population cellulaire :

- marquer les cellules mortes par un intercalant de l'ADN, l'iodure de propidium* (rouge) dans le canal FL3.
- observer l'adhésion sur ces cellules de particules fluorescentes vertes sur le canal FL1.

Le traitement des données permet ainsi, si on le souhaite, d'éliminer les cellules mortes de la statistique et éventuellement de corrélérer les deux informations (mortalité et adhésion).

I.2. Traitement statistique des données

A défaut de pouvoir représenter le nuage de point dans un espace à 5 dimensions, on représente plusieurs projections à deux dimensions ; elles permettent l'analyse statistique du nuage (interface graphique du logiciel CellQuest Pro).

Une première représentation, la taille en fonction de la granulosité, permet le **tri des événements cellulaires**. Une région R1 correspondant aux paramètres connus pour nos cellules (lors d'une calibration préalable) est définie. Les événements extérieurs à R1 (débris

* L'iodure de propidium ne pénètre pas à travers les membranes ; par conséquent, il ne marque que les cellules mortes qui présentent alors des pores dans leur membrane. C'est ainsi un marqueur de la mortalité cellulaire : les cellules mortes apparaissent fluorescentes dans le rouge profond sur le canal FL3.

cellulaires, groupes de plusieurs cellules agglomérées, poussières...) sont éliminées de la statistique.

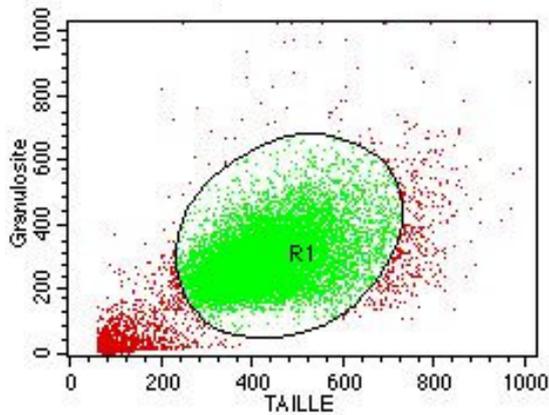


Figure 3 : Représentation graphique de la granularité (SSC) en fonction de la taille (FSC).

Chaque point représente un élément diffusant qui est passé devant le laser et a été mesuré.

L'ensemble des statistiques effectuées dans la suite concerne les éléments appartenant à cette zone R1.

Puis, l'information qui nous intéresse particulièrement est **la fluorescence moyenne par cellule**. Une représentation de la fluorescence en fonction de la taille est donc particulièrement intéressante (graphes A et C).

Comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent, nos objets sont marqués en fluorescence par un lipide fluorescent vert (lipide bodipy). Par ailleurs, les cellules ont une autofluorescence très faible (graphes A et B). Ainsi **la mesure de la fluorescence de la cellule (sur le canal FL1 ici) est directement proportionnelle à la quantité d'objets captés par la cellule**. Nous pouvons ainsi **quantifier** la capture des objets par la cellule (graphes C et D). Nous verrons que cette mesure permet de remonter à la description de l'interaction.

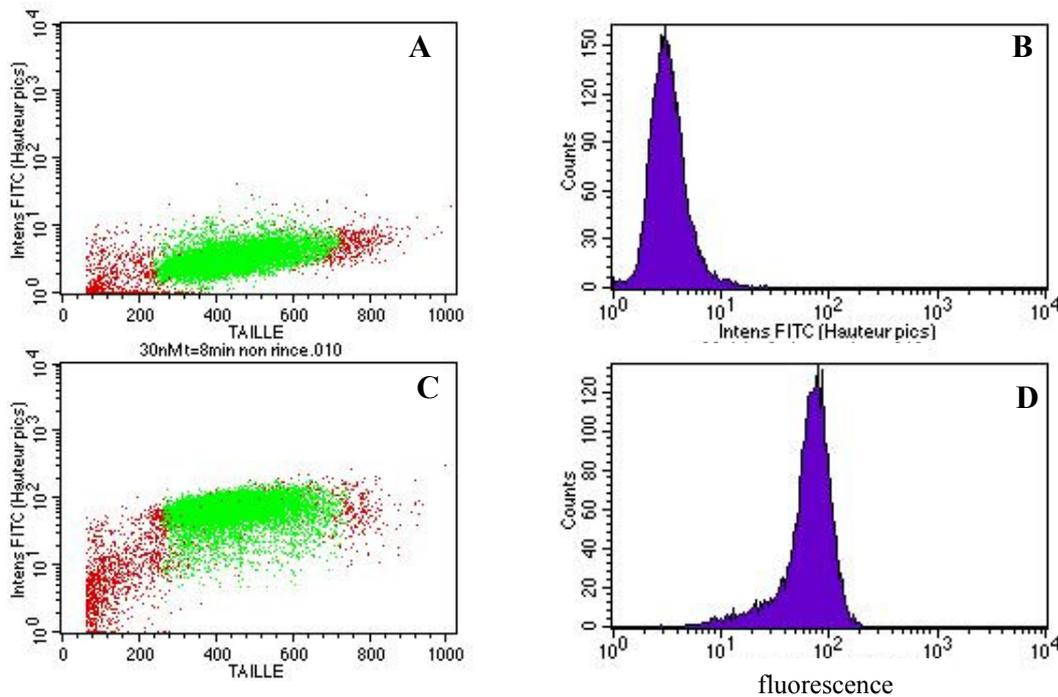


Figure 4 :

A et B : Cas d'une population de cellules témoin (pas de contact avec des éléments fluorescents). L'autofluorescence est très faible.

A : Fluorescence FL1 en fonction de la taille.

B : Intensité de fluorescence des cellules de la zone R1 sous forme d'histogramme

C et D : Cas d'une population de cellules en contact avec des éléments fluorescents.

C : Fluorescence FL1 en fonction de la taille

D : Intensité de fluorescence des cellules de la zone R1 sous forme d'histogramme

Les cellules sont devenues fluorescentes, signe qu'elles ont captées des objets.

La représentation sous forme d'histogramme correspond à la distribution de fluorescence de la population de cellules mesurée. C'est la superposition des 10000 mesures de la fluorescence sur FL1 effectuées sur les 10000 cellules de la population R1 déterminée. On lit donc en ordonnée le nombre de cellules et en abscisse l'intensité de fluorescence donnée ici sur une échelle logarithmique.

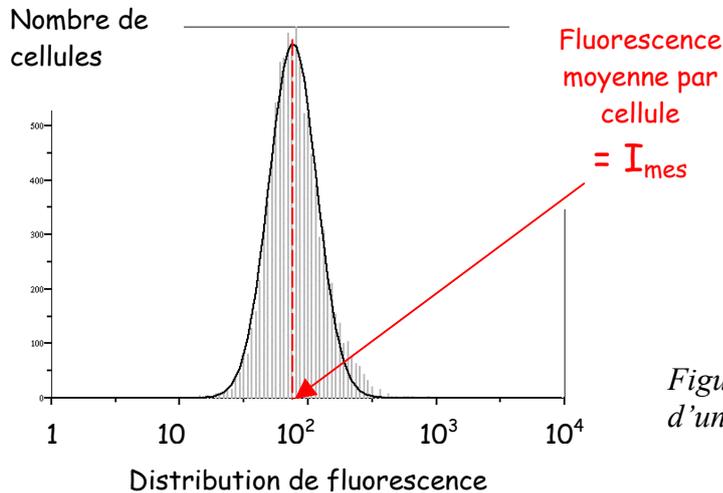


Figure 5 : Distribution de fluorescence d'une population de cellule.

La distribution de fluorescence présente en général un profil gaussien. **La valeur moyenne de la fluorescence par cellule correspond alors à la valeur centrale de la gaussienne (moyenne géométrique). C'est la valeur que nous reporterons par la suite. Elle sera notée I_{mes} .**

II. Protocole expérimental

La cytométrie permet la mesure de la fluorescence des cellules, fluorescence directement proportionnelle à la quantité d'éléments fluorescents (molécule, colloïde, particule...) captés par la cellule. Toutefois la technique ne permet pas de connaître la localisation de l'objet capté. Notamment, nous ne pouvons déterminer si il se trouve à l'extérieur ou à l'intérieur de la cellule. Comme nous souhaitons ici mesurer uniquement **l'adhésion** de l'objet sur son récepteur cellulaire, il nous faut la différencier de l'internalisation. Pour cela, les mesures sont réalisées à 4°C, température qui bloque le processus cellulaire d'internalisation.

Nous allons décrire dans cette partie le déroulement d'une expérience type de cytométrie de flux.

- Préparation des cellules

Les cellules HeLa, adhérentes, sont cultivées en flasques à bouchons filtrants en incubateur à 37°C sous atmosphère contrôlée (CO₂ 5% et humidité 95%). Le milieu de culture est un milieu DMEM auquel sont ajoutés 10% (en volume) de sérum de veau fœtal (SVF) décomplémenté, de la pénicilline (25U/mL) et de la streptomycine (25µg/mL). Les cellules sont mises en culture de façon à arriver à confluence le jour de l'expérience.

Les mesures de cytométrie étant réalisées en solution, une première étape consiste à mettre les cellules en suspension. Détachées de leur support sous l'action d'une enzyme (solution de trypsine à 0.25% dans le PBS, 4 min, 37°C), puis centrifugées (400g, 10min), elles sont ensuite suspendues dans un milieu physiologique sans sérum (milieu blanc). Après comptage (numération avec cellule Thoma et marquage au bleu trypan), elles sont dispersées à une concentration connue dans du milieu blanc puis placées dans un bain de glace.

- Mise en contact avec les colloïdes fluorescents

La préparation des phases lamellaires, de la dispersion colloïdale et la détermination de sa concentration ont été exposées dans le chapitre précédent. Ces étapes sont également détaillées dans les annexes 2 à 6. Nous n'y reviendrons pas davantage ici. Nous disposons donc à ce niveau d'une suspension d'objets ciblés de concentration connue. Toujours dans la glace (4°C), les cellules sont distribuées dans des tubes adaptés à la mesure par le cytomètre. La concentration finale de cellules dans le tube d'analyse est fixée à 10^6 /mL. Elle restera la même autant que possible dans l'ensemble des expériences que nous allons décrire par la suite. L'ajout des objets fluorescents à une concentration C^* marque le début de l'expérience et le déclenchement du chronomètre pour le suivi de la cinétique.

- Mesure

La mesure est réalisée à différents temps de contact objets/cellules. Elle peut se faire de deux façons :

- par passage direct de la suspension cellules / objets fluorescents dans l'appareil
- par prélèvement d'une partie de la suspension initiale, rinçage puis mesure

Nous détaillerons un peu plus tard l'importance de ce choix de mesure et les différences qui s'en suivent dans le suivi de l'adhésion. Retenons dès maintenant qu'il s'agit là d'un point important qu'il convient de contrôler.

Il faut souligner également que nous travaillons toujours sur des cellules vivantes, non fixées. Ce choix expérimental empêche la mesure en série d'un grand nombre d'échantillons ; néanmoins, il permet de réaliser des mesures à l'équilibre, sans perturber les interactions ni les systèmes biologiques.

III. Remarques importantes

III.1. Des grandeurs relatives

La cytométrie de flux permet de mesurer la fluorescence moyenne d'une cellule. Cette mesure se fait à un facteur près (facteur d'amplification de l'appareil, photomultiplicateur, détecteur...). L'intensité mesurée, notée I_{mes} , est donc simplement proportionnelle au nombre moyen n d'objets captés par la cellule et ne permet pas d'avoir accès directement à n . **Il convient donc de garder en mémoire que toutes les valeurs mesurées sont relatives.**

* Dans la suite, les concentrations de colloïdes seront exprimées soit en molaire d'objets (M) soit en terme de fraction volumique. Ce point est détaillé p43.

III.2. Fluorescence du milieu environnant et lavage

La mesure se fait par passage devant le laser d'un petit élément de volume qui ne comprend qu'une seule cellule. Cependant le milieu environnant la cellule est nécessairement inclus dans la mesure. Nous mesurons donc la fluorescence de la cellule, I_{cell} , mais aussi la fluorescence, I_{envir} , du milieu environnant qui contient les éléments fluorescents mis en contact avec les cellules et qui ne sont pas adhérents.

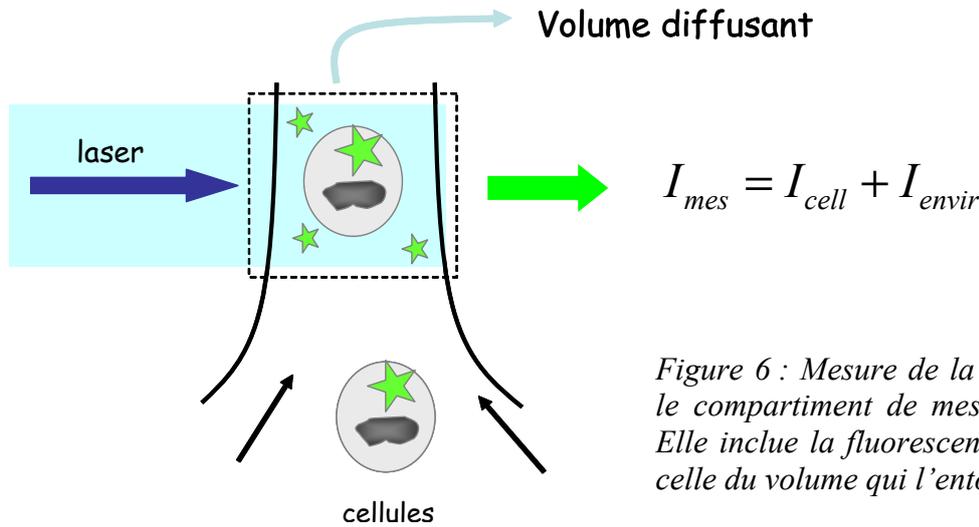


Figure 6 : Mesure de la fluorescence dans le compartiment de mesure du cytomètre. Elle inclue la fluorescence de la cellule et celle du volume qui l'entoure.

Expérimentalement, il est possible d'éliminer la contribution du milieu environnant. Une étape de lavage est alors nécessaire. Deux protocoles peuvent être mis en œuvre :

- un « lavage total » : la solution de cellules et d'objets mis en contact est centrifugée, le surnageant éliminé et le culot de cellules suspendu dans un nouveau milieu.

Dans ce cas, la contribution de l'environnement est éliminée et $I_{mes} = I_{cell}$

- une dilution (x fois) dans un milieu non fluorescent. On mesure alors

$I_{mes}^{diluée} = I_{cell} + \frac{1}{x} I_{envir}$. Connaissant la mesure avant dilution, $I_{mes} = I_{cell} + I_{envir}$, il est possible de déterminer I_{envir} et de l'éliminer.

Toutefois, si une étape de lavage permet d'éliminer ou de déterminer I_{envir} , elle génère également de nouvelles questions. En effet, n'oublions pas que nous mesurons des interactions entre des ligands et leurs récepteurs membranaires. Une modification de la concentration du milieu environnant peut perturber l'interaction adhésive (en favorisant le décrochage d'objets fixés par exemple). **Ainsi, une étape de lavage ou de dilution peut ne pas être sans effet sur I_{cell} .** Dans les différents cas que nous étudierons, il conviendra donc de prendre en compte cet effet potentiel qui sera par ailleurs riche d'informations sur la nature de l'interaction observée. Il faudra retenir pour la suite l'expression suivante pour toute mesure, chaque terme dépendant de la concentration C d'éléments fluorescents mis en contact avec la cellule et éventuellement de l'instant de la mesure :

$$I_{mes}(c, t) = I_{cell}(c, t) + I_{envir}(c)$$

III.3. Reproductibilité des mesures – erreurs expérimentales

Ce paragraphe va s'attacher à discuter la question des erreurs expérimentales et de leurs prises en compte dans la présentation des résultats expérimentaux qui va suivre.

III.3.1. Répétabilité des mesures

Nous entendons par répétabilité, la mesure de plusieurs échantillons traités de façon identique dans la même expérience, c'est-à-dire le même jour, avec le même lot de cellules et la même dispersion colloïdale. Elle peut être évaluée par exemple en mesurant à la suite la fluorescence de plusieurs échantillons (colloïdes + cellules) préparés en parallèle au sein d'une même expérience (il s'agit donc des mêmes lots de cellules et de colloïdes). Les écarts entre ces mesures permettent de calculer une erreur moyenne, erreur qui prend en compte l'ensemble des incertitudes expérimentales du protocole (pipetage des volumes, comptage des cellules...). Nous l'estimons autour de 5 à 10% ce qui semble satisfaisant compte tenu de l'enchaînement des multiples étapes au cours de l'expérience.

Nous considérerons dans la suite, sans la mesurer systématiquement, une erreur récurrente de 10% sur l'ensemble des points expérimentaux mesurés dans les cinétiques.

III.3.2. Reproductibilité des expériences

Il s'agit ici de discuter de la reproductibilité des expériences, d'un jour à l'autre avec des lots de cellules et de colloïdes différents.

Tout d'abord, les populations de cellules testées ne sont pas nécessairement homogènes d'une journée à l'autre ; le nombre de récepteurs présent en surface en particulier peut varier. Par ailleurs, les objets fluorescents issus de phases lamellaires différentes peuvent avoir une fluorescence variable (incertitude sur la formulation) et la détermination de leur concentration (malgré l'utilisation d'abaques) reste dépendante de la dispersion colloïdale elle-même (de la taille des objets qui dépend de chaque cisaillement par exemple). Ainsi d'une expérience à l'autre, on observe des différences importantes quant aux valeurs de fluorescence mesurées en cytométrie. Certes, nous avons vu que ces valeurs n'ont pas de signification intrinsèque, néanmoins ces différences empêchent la superposition d'expériences conduites des jours différents ce qui complique largement l'étude.

Par conséquent, nous avons décidé que les échantillons à comparer quantitativement doivent nécessairement être traités ensemble le même jour avec les mêmes cellules et en présence des mêmes colloïdes. Ce point limite de façon importante le nombre des échantillons traitables en parallèle dans une même expérience.

Néanmoins nous pouvons nuancer ce problème de reproductibilité en soulignant que si on a de grosses différences sur les valeurs absolues de fluorescence, **le comportement relatif des courbes entre elles** en fonction des différents paramètres testés (la concentration par exemple) **est robuste**. Ainsi, on retrouve par exemple, sur l'ensemble des cinétiques mesurées, des évolutions tout à fait cohérentes des temps caractéristiques.

B. Cinétique d'adhésion de colloïdes

Dans cette partie, nous nous intéressons à l'adhésion de colloïdes fonctionnalisés par la sous unité B de la toxine de Shiga sur le récepteur Gb3 de la surface cellulaire.

Dans un premier temps, nous allons tenter de décrire cette interaction suivie par cytométrie de flux. Après avoir vérifié sa nature spécifique, nous présenterons les mesures des cinétiques d'accrochage des colloïdes Shiga ; nous insisterons notamment sur l'effet de la concentration C d'objets en contact avec les cellules, résultat qui suggère une description simple de type équilibre. Pourtant, nous verrons qu'il n'est pas possible de décrocher les objets adhérents ce qui contredit l'hypothèse d'un équilibre classique.

Dans un second temps et afin de mieux comprendre ces résultats expérimentaux contradictoires avec une description classique, nous nous intéresserons à l'adhésion d'autres systèmes. Qu'il s'agisse de la protéine Shiga seule ou de colloïdes fonctionnalisés différemment (objets cationiques ou RGD), nous verrons qu'il semble toujours possible de proposer un modèle reposant sur la notion d'équilibre pour décrire leur accrochage sur cellules. Cette étude comparative renforcera encore l'originalité de l'adhésion des colloïdes Shiga et l'intérêt d'en comprendre le mécanisme. Nous explorerons alors de nouveaux modèles susceptibles de rendre compte de la situation observée.

I. Colloïdes Shiga et récepteurs Gb3

I.1. Prérequis et premiers résultats

Tout d'abord, nous allons montrer que les colloïdes fonctionnalisés par la sous unité B de la toxine de Shiga se fixent sur les cellules. En effet, après 30 minutes de contact à 4°C avec des colloïdes fluorescents (en vert), l'observation en microscopie confocale des cellules révèle une fluorescence bien marquée sur la périphérie de la cellule. **Les colloïdes Shiga sont donc bien capables d'adhérer sur la surface cellulaire.** De plus, nous n'observons pas de fluorescence intracellulaire, signe que les objets ne sont pas internalisés (puisque nous travaillons à 4°C).

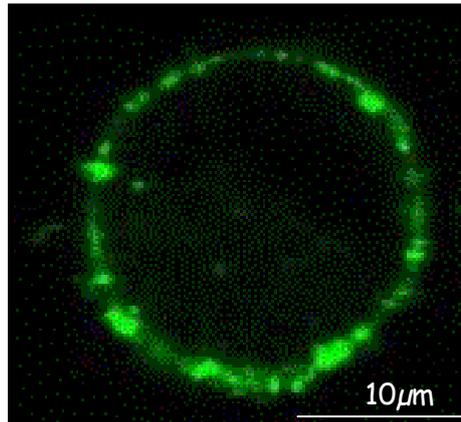


Figure 7 : Adhésion de colloïdes Shiga fluorescents sur la surface d'une cellule HeLa ici en suspension après 30min de contact à 4°C.

Photo de microscopie de fluorescence confocale – coupe équatoriale de la cellule.

Peut-on mesurer quantitativement par cytométrie de flux la cinétique de cette interaction ?

I.1.1. Suivi cinétique

Les expériences de cinétiques consistent à mettre en contact les cellules avec les objets fluorescents et à suivre l'évolution de la fluorescence moyenne des cellules en fonction du temps.

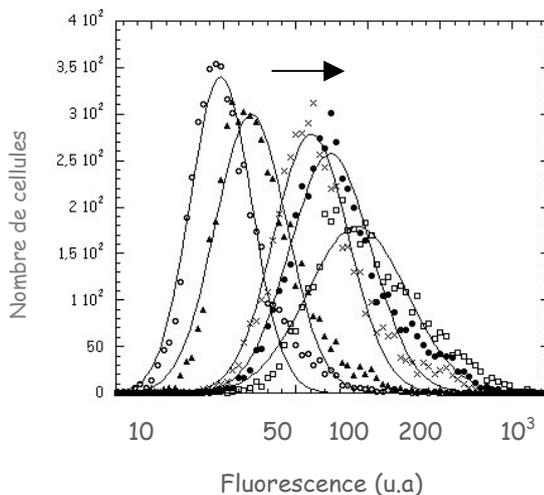


Figure 8 : Evolution de la distribution de fluorescence d'une population de cellules en contact avec des colloïdes Shiga ($C=3.10^{-4}$) en fonction du temps

o : 2min - ▲ : 5min - × : 35min - ● : 60min - □ : 150min

Nous constatons que la population de cellule est de plus en plus fluorescente : des objets adhèrent donc à la surface des cellules.

Pour plus de lisibilité, il est possible de tracer l'évolution de la valeur moyenne I_{mes} de chaque distribution en fonction du temps. On porte en ordonnée l'intensité de fluorescence par cellule (moyennée sur la population de cellules mesurées) exprimée en unité arbitraire. En abscisse le temps est exprimé en minutes.

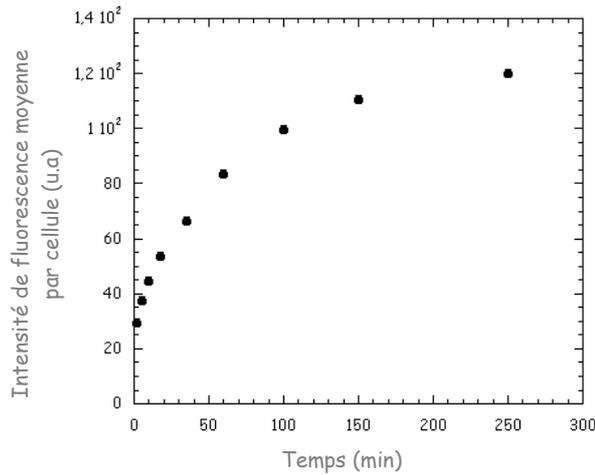


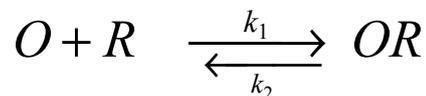
Figure 9 : Evolution de l'intensité de fluorescence des cellules en fonction du temps. Suivi cinétique à 4°C. Cellules HeLa mises en contact avec une fraction volumique $3 \cdot 10^{-4}$ de colloïdes Shiga fluorescents.

L'adhésion augmente très rapidement en début d'expérience puis ralentit pour atteindre ce qui peut sembler être une valeur seuil ou plateau. Cette courbe présente l'allure d'une cinétique classique.

I.1.2. Notion d'équilibre – Equations cinétiques

On choisit ici de décrire l'interaction entre un colloïde O et son site d'accrochage R comme un équilibre thermodynamique. Notons que le site d'accrochage n'est pas nécessairement constitué d'un unique récepteur ; très probablement, à l'équilibre, plusieurs récepteurs sont impliqués dans le lien colloïde-cellule.

Nous pouvons représenter cet équilibre comme suit :



OR représente le complexe formé par le colloïde et son site d'accrochage
 k_1 et k_2 sont les constantes cinétiques de l'équilibre.

La constante thermodynamique de l'équilibre K_D est définie par le rapport $\frac{k_2}{k_1}$

Ecrivons les équations relatives à cet équilibre.

On pose R_T la concentration totale de récepteurs et C_0 la concentration initiale d'objets O .

A tout instant, on a :

$$R_T = R + OR$$

$$C_0 = C + OR$$

On suppose un large excès de colloïdes de sorte qu'à tout instant $C = C_0$. Cette hypothèse est largement vérifiée. Un rapide calcul permet de s'en convaincre. En effet, nous travaillons à des concentrations C de l'ordre du nM ce qui correspond à des concentrations de particules de l'ordre de $10^{12}/\text{mL}$. Par ailleurs, la concentration de cellules (de rayon $\approx 7\mu\text{m}$) est de $10^6/\text{mL}$ ce qui correspond à une surface disponible de $6 \cdot 10^{-4} \text{m}^2/\text{mL}$. Parallèlement, la surface d'un colloïde de rayon 150nm vaut $3 \cdot 10^{-13} \text{m}^2$. Par conséquent, dans 1mL, ce sont au maximum de l'ordre de 10^9 colloïdes qui peuvent adhérer sur la surface cellulaire soit 1 sur 1000 environ. La concentration des colloïdes en volume reste donc globalement inchangée.

Compte tenu de ces remarques, la vitesse de la réaction s'écrit :

$$\frac{dOR}{dt} = k_1(R_T - OR)C_0 - k_2OR$$

L'intégration conduit à :

$$OR(t) = \frac{k_1R_T C_0}{k_1C_0 + k_2} [1 - \exp(-(k_1C_0 + k_2)t)] \quad (1)$$

que l'on peut écrire sous la forme :

$$OR(t) = [OR]_{plateau} \times [1 - \exp(-t/\tau)]$$

La valeur $[OR]_{plateau}$ correspond à la valeur d'équilibre de $OR(t)$ atteinte pour des temps longs. τ est le temps caractéristique de la cinétique.

$$[OR]_{plateau} = \frac{k_1R_T C_0}{k_1C_0 + k_2} = \frac{R_T C_0}{C_0 + K_D} \quad (2)$$

$$\frac{1}{\tau} = k_1C_0 + k_2 \quad (3)$$

I.1.3. Traitement des données expérimentales

Essays d'ajuster les données expérimentales avec l'expression (1).

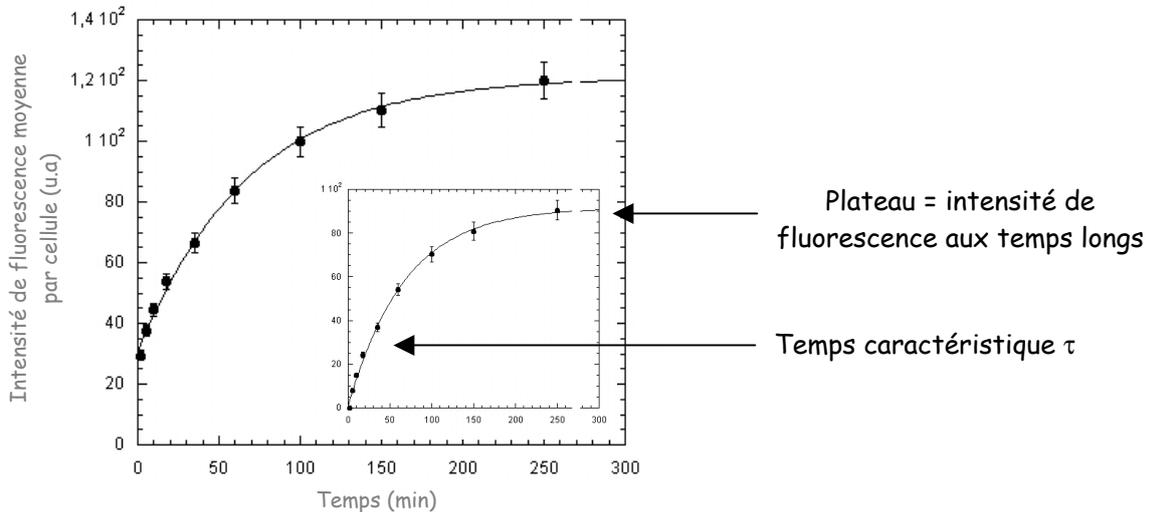


Figure 10 : Intensité de fluorescence moyenne des cellules HeLa mises en contact avec des objets Shiga ($C=3.10^{-4}$) en fonction du temps. Ajustement $m_1 + m_2 \times (1 - \exp(-m_3x))$ correspondant à la description $O+R \leftrightarrow OR$ (équation 1) avec m_1 le fond de fluorescence, $m_2 = [OR]_{plateau}$ et $m_3 = 1/\tau$. L'encart représente les mêmes données dont on a soustrait le fond de fluorescence m_1 .

Nous constatons que l'ajustement est largement satisfaisant.

Pourtant, les points expérimentaux présentés correspondent aux valeurs brutes telles qu'elles sont mesurées par le cytomètre. Nous avons vu dans la partie A que cette mesure peut s'écrire sous la forme $I_{mes} = I_{cell} + I_{envir}$. Si nous voulons étudier l'adhésion de colloïdes, il nous faut nous concentrer sur ces éléments spécifiquement adhérents sur la cellule et donc éliminer tout ce qui concerne l'environnement (I_{envir}) et éventuellement la part d'éléments non spécifiques qui participent à la fluorescence de la cellule (une part de fluorophore libre par exemple qui s'incorporerait dans la membrane cellulaire et serait compté dans I_{cell}).

Ce fond de fluorescence est fortement dépendant de la concentration de colloïdes utilisée. Il s'agit ici de la valeur m_1 de l'ajustement. Ce paramètre correspond en fait à toutes les sources de fluorescence (environnement, fluorophore libre incorporé très rapidement dans la membrane, autofluorescence de la cellule...) mesurées dès le départ à $t=0$ et qui n'ont aucune raison d'évoluer dans le temps.

Dans la suite, nous éliminerons donc cette valeur m_1 extraite de l'ajustement des mesures expérimentales par l'expression $m_1 + m_2 \times (1 - \exp(-m_3 x))$, considérant ainsi qu'il n'y a pas d'adhésion spécifique de colloïdes sur les récepteurs de la cellule à $t=0$. Dans la figure ci-dessus, l'encart représente les résultats traités de la sorte.

Nous extrayons alors de l'ajustement deux paramètres importants :

- la valeur $[OR]_{plateau}$ ou « plateau » : c'est-à-dire l'intensité de fluorescence de la cellule à l'équilibre aux temps longs ; elle est donnée par le paramètre m_2 de l'ajustement.
- le temps caractéristique τ donné par le paramètre m_3 .

I.2. Spécificité de l'interaction

Avant de pousser plus avant notre étude, il convient de s'assurer de la spécificité de l'interaction entre les colloïdes fonctionnalisés par la sous unité B de la toxine de Shiga et son récepteur Gb3.

I.2.1. Suppression des récepteurs Gb3

Pour cela, un contrôle intéressant consiste à supprimer l'un des partenaires de l'interaction, ici le récepteur Gb3 par exemple.

La synthèse de ce glycolipide par les cellules peut être très fortement ralentie par ajout dans le milieu de culture des cellules d'un inhibiteur de glycosylation. Cinq jours au minimum avant l'expérience, une partie des cellules est mise en culture avec $5\mu\text{M}$ de 1-phenyl-2-hexadecanoyl-amino-3-morpholino-1-propanol (noté PPMP). Il a pu être quantifié avec précision* que ce traitement permet de diminuer d'environ 95% la quantité de Gb3 à la surface des cellules.

Ce traitement effectué, nous menons alors nos expériences d'adhésion en parallèle sur deux lots de cellules, l'un portant les récepteurs Gb3, l'autre en étant dépourvu. Les objets fluorescents sont fonctionnalisés de la même façon et portent la toxine de Shiga sur leur surface (densité ψ fixe). Ils sont mis en contact à la même concentration (fraction volumique de $3 \cdot 10^{-4}$) sur chacun des deux lots de cellules. Les cinétiques d'adhésion sont mesurées dans

* Cette mesure a été réalisée par l'équipe de Ludger Johannes (UMR 144, Institut Curie). FALGUIERES *et al.* 2005, Article soumis.

les mêmes conditions par cytométrie de flux et les résultats sont traités comme nous l'avons vu auparavant.

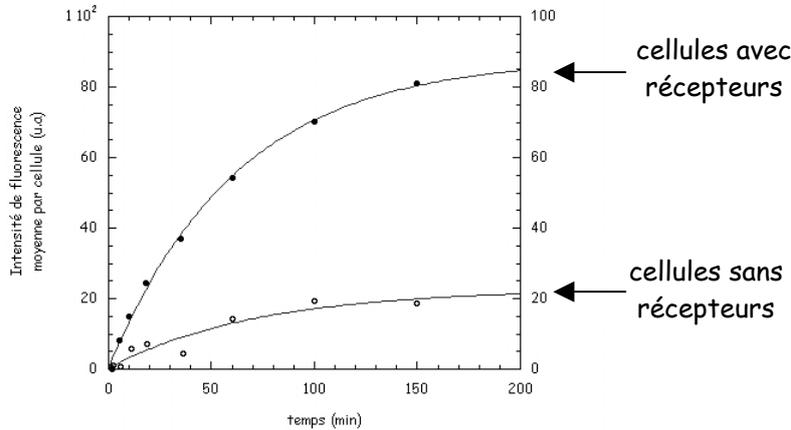


Figure 11 : Cinétiques d'adhésion d'objets Shiga sur des cellules avec et sans récepteurs.

Nous constatons que le signal de fluorescence est environ 4 fois plus faible sur les cellules dont la synthèse de Gb3 a été inhibée. Avec moins de récepteurs, les cellules perdent ainsi une grande partie de leur capacité à capter des objets fonctionnalisés par la sous unité B de la toxine de Shiga.

1.2.2. Colloïdes non ciblant

Toujours dans l'optique de s'assurer de la spécificité de l'interaction entre nos colloïdes et la membrane des cellules, nous pouvons utiliser des colloïdes dépourvus de ligands. Dans ce cas, les objets n'ont pas été fonctionnalisés par la toxine de Shiga ; ils portent donc en surface l'ancre maléimide réactive mais non couplée. De tels objets fluorescents (fraction volumique de $3 \cdot 10^{-4}$) sont mis en contact avec des cellules avec et sans récepteurs Gb3 et la cinétique est mesurée à 4°C.

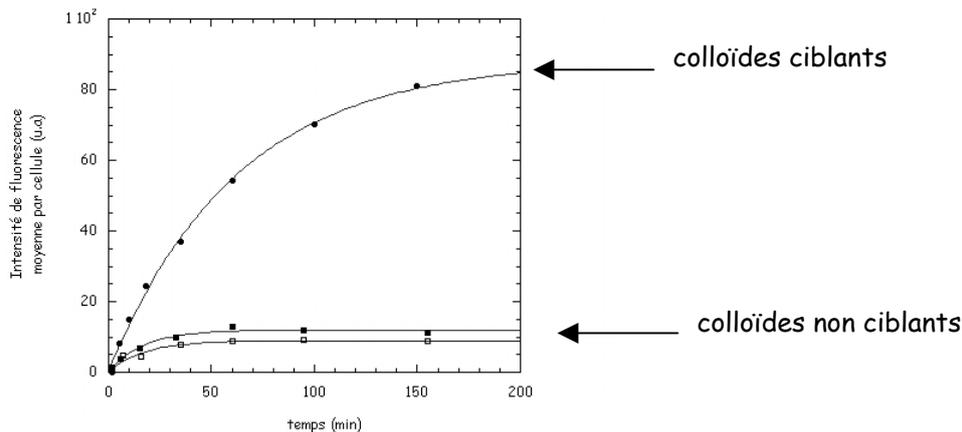


Figure 12 : Comparaison des cinétiques d'adhésion de colloïdes ciblant Shiga et de colloïdes non ciblant. La concentration d'objets fluorescents est la même dans les 2 cas ($C=3 \cdot 10^{-4}$).

- : Objets fonctionnalisés par la protéine Shiga / cellules HeLa portant le récepteur Gb3 = contrôle positif de l'expérience
- : Objets ne portant pas le ligand Shiga / cellules HeLa portant le récepteur Gb3
- : Objets ne portant pas le ligand Shiga / cellules HeLa sans récepteur Gb3

Nous constatons en premier lieu que l'adhésion des objets non fonctionnalisés (■) est très faible par rapport à celle d'objets ciblant (●). Sans ligand, les objets adhèrent très peu sur les

cellules. D'autre part, l'accrochage des objets non ciblant est du même ordre sur cellules avec ou sans récepteurs (■ / □). Le temps caractéristique de cette cinétique est le même (17 min). Cela démontre que cet accrochage faible est de nature non spécifique : il ne met en jeu ni le ligand Shiga, ni le récepteur Gb3. Il est probablement dû à la réaction des fonctions maléimide portées par les objets sur des cystéines libres de certaines protéines de la surface cellulaire. Il reste néanmoins négligeable au regard de l'adhésion spécifique de colloïdes ciblant.

L'utilisation conjointe de colloïdes dépourvus de ligands et de cellules sans récepteurs nous a ainsi permis de vérifier la spécificité de l'adhésion des objets décorés par la protéine Shiga. **Cette interaction est bien contrôlée par le mécanisme de reconnaissance ligand-récepteur.** Nous allons maintenant tenter de décrire quantitativement ce processus en essayant de dégager les paramètres qui le gouvernent.

I.3. Etude cinétique

Cette partie a pour but de déterminer les valeurs des constantes cinétiques et thermodynamiques de l'équilibre. Deux méthodes peuvent être envisagées :

- le suivi de l'évolution de la fluorescence au cours du temps : $OR(t)$
- la mesure de l'intensité de fluorescence aux temps longs : $[OR]_{plateau}$

Les deux approches, complémentaires, vont être utilisées ici.

I.3.1. Suivi cinétique

Le modèle d'équilibre prédit l'évolution du plateau et du temps caractéristique en fonction de la concentration C des colloïdes (équations 2 et 3).

Des cinétiques sont menées avec différentes concentrations de colloïdes ; elles sont globalement rapides avec des temps caractéristiques de 30 à 60 minutes environ. Nous observons une augmentation du plateau et une diminution du temps caractéristique avec la concentration d'objets du volume.

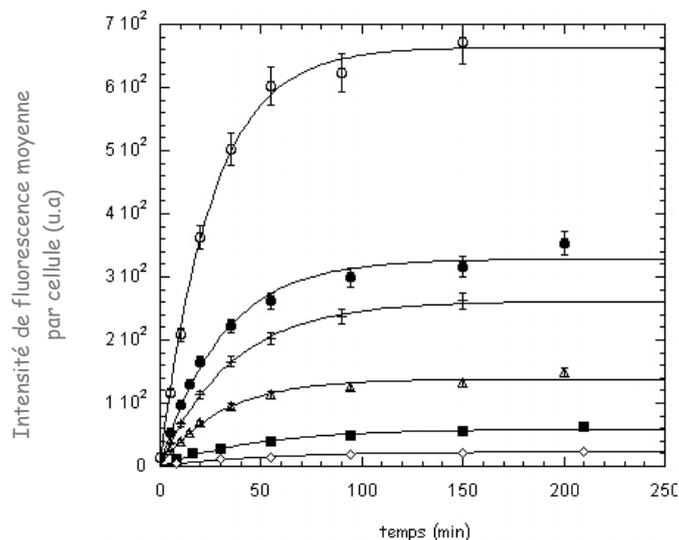


Figure 13 : Cinétiques d'adhésion à 4°C de colloïdes fonctionnalisés Shiga mis en contact à $t=0$ à différentes concentrations avec des cellules HeLa ($10^6/mL$).

Les fractions volumiques de colloïdes valent respectivement de bas en haut $2.10^{-5}, 10^{-4}, 2.10^{-4}, 3.10^{-4}, 7.10^{-4}$ et 10^{-3} .

L'étude cinétique conduit aux deux graphes suivants qui représentent respectivement l'évolution du plateau (graphe a)) et de $\frac{1}{\tau}$ (graphe b)) en fonction de la concentration d'objets ici exprimée en mol/L (M).

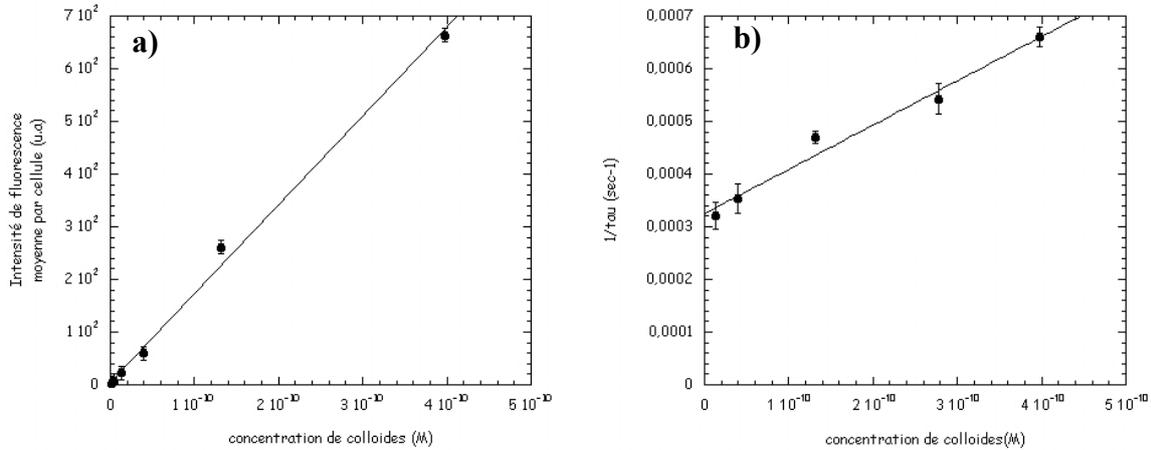


Figure 14 :

a). Plateau $[OR]_{\text{plateau}}$ en fonction de la concentration molaire de colloïdes. Ajustement linéaire.

b). $\frac{1}{\tau}$ (s^{-1}) en fonction de la concentration molaire de colloïdes. Ajustement linéaire

L'évolution du plateau est linéaire ; cela signifie que nous nous trouvons dans la zone de concentration en objets en deçà du K_D de l'équilibre considéré (soit $k_1 C < k_2$).

En effet, en considérant l'équation (2), on constate que :

- pour $C_0 \ll K_D$, le plateau augmente linéairement avec une pente $\frac{R_T}{K_D}$.

- pour $C_0 \gg K_D$, le plateau devient indépendant de la concentration et vaut R_T .

Le second graphe donne également une évolution linéaire de $\frac{1}{\tau}$ en fonction de la concentration ce qui est tout à fait compatible avec la description de l'équilibre (équation (3)). L'équation de la droite permet d'extraire les deux constantes cinétiques.

On trouve :

$$k_1 = 8.4 (\pm 0.7) \times 10^4 s^{-1} M^{-1}$$

$$k_2 = 3.25 (\pm 0.1) \times 10^{-4} s^{-1}$$

D'où une estimation de $K_D = 3.9 (\pm 0.5) nM$ (la valeur est donnée ici en nM d'objets)

I.3.2. Etude du plateau en fonction de la concentration

Pour valider ce résultat, nous pouvons tenter de déterminer indépendamment cette constante d'équilibre par une étude du plateau en fonction d'une plus grande gamme de concentration.

a- Compromis expérimental

Le graphe a) ci-dessus montre qu'il faut atteindre des concentrations en objets relativement fortes pour s'approcher du K_D . Toutefois, il est difficile de travailler à des

fractions volumiques supérieures à 10^{-3} (soit une concentration de 0.4nM d'objets) et ce pour plusieurs raisons (cytotoxicité des objets, limitations expérimentales dans la préparation des objets qui nécessite plusieurs étapes). L'étude en concentration est donc nécessairement limitée et très peu de mesures ont pu être effectuées aux fortes concentrations.

D'autre part, un autre problème apparaît lorsque la concentration des objets augmente de façon importante. La part de la fluorescence du milieu environnant devient dominante dans la mesure et masque la part d'adhésion spécifique. Pour cette raison, nous sommes contraints de travailler avec deux mesures :

- une mesure totale qui se fait directement et qui prend en compte intégralement la part de fluorescence du milieu environnant
- et une mesure après une dilution d'un facteur cinq de la solution à mesurer. Cette dilution permet de diminuer d'autant la part de fluorescence du milieu extérieur et de révéler la part d'adhésion spécifique.

b- Effet de la dilution

Toutefois il nous faut vérifier que cette opération de dilution ne perturbe pas l'équilibre. Pour cela, nous allons tout d'abord comparer des mesures de cinétiques réalisées dans deux conditions :

- mesures directes
- mesures après dilution d'un facteur 10.

L'étude est menée pour deux concentrations de colloïdes Shiga (fractions volumiques de 10^{-4} et $3 \cdot 10^{-4}$) et les résultats sont présentés ci-après.

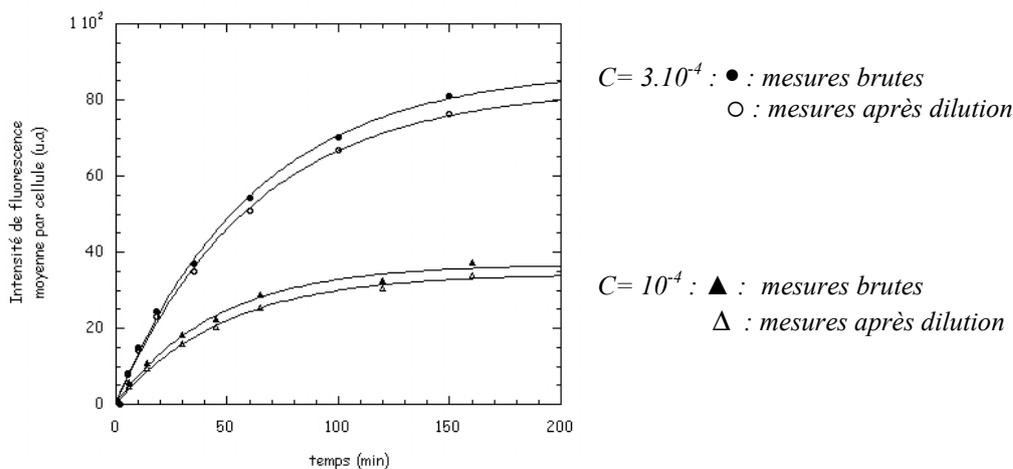


Figure 15 : Effet de la dilution d'un échantillon 2 min avant la mesure de l'adhésion.

Nous constatons que les courbes cinétiques avec et sans dilution sont très proches. Cela signifie que l'opération de dilution ne perturbe pas l'équilibre sur ces échelles de temps. Autrement dit, les objets ne se décrochent pas de la cellule pendant les deux minutes de cette opération.

On peut donc écrire pour une dilution d'un facteur x suivie d'une mesure rapide :

$$I_{cell}(c) = I_{cell}\left(\frac{c}{x}\right)$$

Il est donc possible (dans ce cas) de faire des mesures sur des échantillons dilués pour limiter la part de fluorescence due aux objets en volume dans le milieu extérieur des cellules.

c- Mesures du plateau en fonction de la concentration de colloïdes

Le graphe présente les mesures réalisées après 4h30 de contact à 4°C entre des cellules HeLa et des objets ciblands Shiga à différentes concentrations.

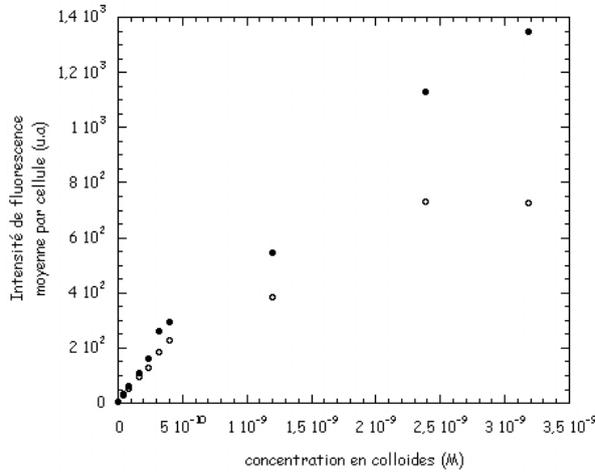


Figure 16 : Mesures du plateau après 4h30 de contact objets / cellules en fonction de la concentration de colloïdes (en M).

● : mesures directes : $I_{mes}(c)$

○ : mesures après dilution 5 fois : $I_{mes}(\frac{c}{5})$

Pour une concentration C de colloïdes, on peut écrire :

$$I_{mes}(c) = I_{cell}(c) + I_{envir}(c)$$

Après dilution et en tenant compte de l'étude préliminaire, l'expression devient :

$$I_{mes}(\frac{c}{5}) = I_{cell}(\frac{c}{5}) + I_{envir}(\frac{c}{5}) = I_{cell}(c) + \frac{1}{5} I_{envir}(c)$$

On tire de ces deux expressions :

$$I_{cell}(c) = I_{mes}(\frac{c}{5}) - \frac{1}{4} [I_{mes}(c) - I_{mes}(\frac{c}{5})]$$

Nous pouvons alors tracer $I_{cell}(c)$ en fonction de C .

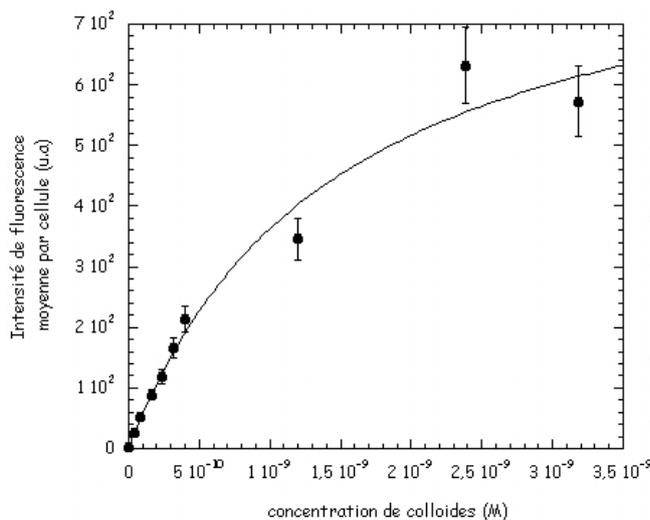


Figure 17 : Intensités de fluorescence de la cellule après 4h30 de contact objets / cellules en fonction de la concentration de colloïdes (en Molaire). Ajustement hyperbolique de la forme $\frac{m_1 x}{x + m_2}$.

La contribution de l'environnement a été éliminée. L'intensité de fluorescence reportée ici est donc exclusivement due aux colloïdes captés par la cellule.

Nous constatons que le nombre de colloïdes liés à la surface, à l'équilibre, augmente fortement avec la concentration en solution. Cependant, au-delà d'une certaine concentration,

la fluorescence par cellule n'évolue plus devenant indépendante de la concentration. Ces observations sont tout à fait cohérentes avec l'expression théorique : $[OR]_{plateau} = \frac{R_T C_0}{C_0 + K_D}$

L'expression $\frac{m_1 x}{x + m_2}$, une hyperbole, permet d'ajuster tout à fait correctement les données.

Remarquons ici qu'il n'est pas possible de faire l'analogie directe entre m_1 et R_T pour évaluer ce dernier paramètre car n'oublions pas que la valeur de fluorescence donnée par le cytomètre se fait à un facteur près. Par contre, m_2 est un paramètre intrinsèque qui permet d'estimer directement K_D .

Nous obtenons la valeur de la constante d'équilibre évaluée ici à 1.5nM (± 0.4) ce qui est relativement proche des 3.9nM (± 0.5) déterminée plus haut. Notons que ces valeurs de l'ordre du nM sont faibles, signe d'un accrochage fort entre le colloïde et la surface cellulaire. A titre de comparaison, cette même constante est estimée à 40nM dans le cas du ligand Shiga seul ; nous reviendrons sur ce point dans la suite de ce chapitre.

Une description simple du type équilibre permet donc de rendre compte des résultats obtenus en cinétique jusqu'à présent.

Cette hypothèse suppose qu'il y a, à tout instant, accrochage et décrochage de colloïdes. C'est ce que nous allons tenter de tester.

I.4. Perturbation de l'équilibre

Nous avons vu que l'établissement d'un équilibre dépend des concentrations de colloïdes et de récepteurs mis en contact. Par conséquent, si une fois l'équilibre atteint, le milieu extérieur est perturbé (par ajout de nouveaux colloïdes ou au contraire si on retire les objets en solution), la notion d'équilibre impose au système de se réajuster vers un nouvel état stationnaire qui tient compte de la nouvelle concentration.

I.4.1. Dissociation de l'interaction colloïdes Shiga / récepteur Gb3

Nous avons vu dans le paragraphe précédent que les colloïdes ne se décrochent pas sur des temps courts après dilution du milieu environnant.

Qu'en est-il sur des temps plus longs ?

Pour cela, nous avons suivi la cinétique de ce phénomène sur plusieurs heures. L'expérience consiste à établir un premier équilibre entre des objets à la concentration $3 \cdot 10^{-4}$ et des cellules (\blacktriangle). L'équilibre atteint (au bout de 200 minutes environ), l'échantillon est dilué trois fois par ajout de milieu blanc. La cinétique dans ces nouvelles conditions ($C = 10^{-4}$) est mesurée (\circ). Nous constatons que la fluorescence moyenne des cellules n'évolue pas ; en particulier, elle ne diminue pas vers la valeur atteinte à l'équilibre dans les conditions $C = 10^{-4}$ (points \bullet présentés pour comparaison). Il n'y a donc pas de modification du nombre de colloïdes captés sur la cellule : les objets ne sont pas relargués.

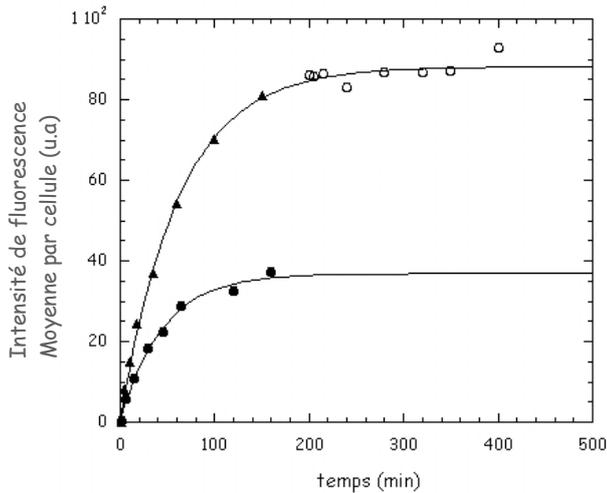


Figure 18 :

▲ : cinétique d'adhésion à $C=3.10^{-4}$
 ● : cinétique d'adhésion à $C=10^{-4}$ (pour comparaison)
 ○ : suivi de l'échantillon après dilution d'un facteur 3. Les valeurs reportées tiennent compte de la différence de fluorescence de l'environnement lors de la dilution de l'échantillon.

D'autres expériences peuvent être mises en œuvre pour reproduire et valider ce résultat étonnant.

Dans un premier cas (figure 19), une fois l'équilibre établi pour une concentration de colloïdes de 3.10^{-4} , les objets fluorescents sont éliminés (les cellules sont centrifugées, le surnageant éliminé) et remplacés par de nouveaux colloïdes à la même concentration mais dépourvus de fluorescence. Nous observons là encore que la fluorescence de la cellule reste constante. Il n'y a donc pas eu échange entre colloïdes marqués et non marqués.

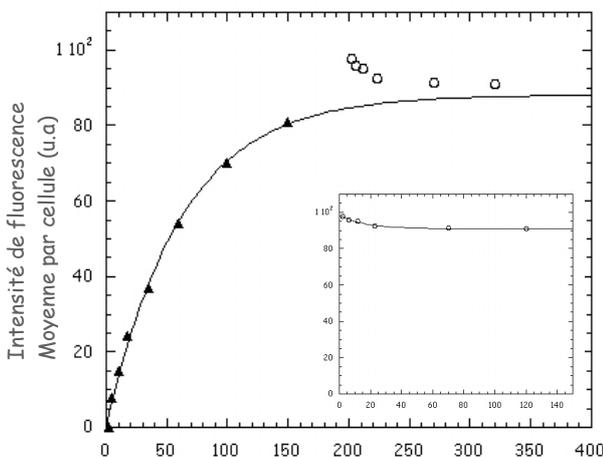


Figure 19 :

▲ : cinétique d'adhésion à $C=3.10^{-4}$
 ○ : suivi de l'échantillon après remplacement des colloïdes fluorescent par des colloïdes non fluorescents à la même concentration $C=3.10^{-4}$
 L'encart représente l'ajustement de ces points par une monoexponentielle. On peut mesurer une diminution de fluorescence de 8% avec un temps caractéristique de 16 minutes ; elle n'est pas significative et peut être imputée au décrochage d'objets adhérents de façon non spécifique lors de la centrifugation.

On peut interpréter le fait que l'échantillon apparaît plus fluorescent à la suite du lavage (○). La centrifugation provoque très certainement l'adhésion (non spécifique) de nouveaux colloïdes lors du lavage (notamment par une augmentation locale de concentration au voisinage des cellules). Remarquons que cette fluorescence supplémentaire relaxe rapidement vers la valeur initiale qui elle reste constante par la suite. Ainsi, l'information importante réside dans l'évolution globale de l'échantillon dont la fluorescence reste quasi constante pendant les 3h de l'étude.

De même on tente (figure 20) de provoquer le décrochage des colloïdes fluorescents par ajout d'une forte concentration de ligands Shiga libres non marqués ($30\mu\text{M}$). **L'ajout de ces éléments compétiteurs est sans effet majeur sur le système.**

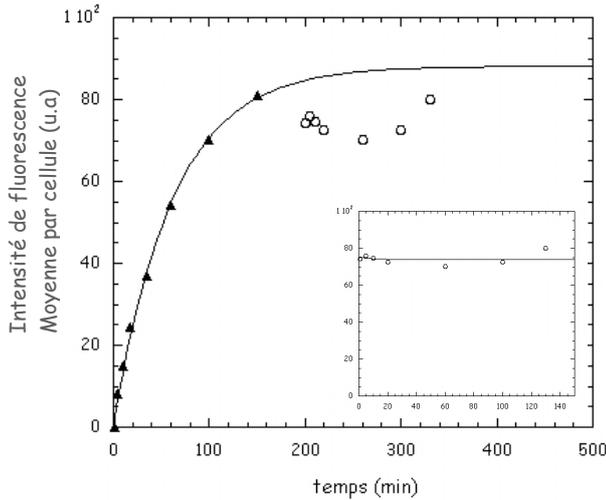


Figure 20 :

▲ : cinétique d'adhésion à $C=3.10^{-4}$

○ : suivi cinétique de l'échantillon après ajout de $30\mu\text{M}$ de Shiga libre non marquée.

L'encart représente un zoom de ces points. Il n'y a pas d'évolution marquée de la fluorescence.

La fluorescence apparaît plus faible en raison de la dilution de l'échantillon lors de l'ajout des ligands non fluorescents. Toutefois, elle n'évolue quasiment pas pendant les 200 min de l'expérience.

Ces résultats montrent qu'il n'est pas possible de dissocier le couple colloïde / cellule une fois celui-ci formé.

On peut néanmoins se demander si la dissociation n'est pas possible pour des temps d'incubation plus courts. En effet, on peut imaginer que le complexe *OR* soit fortement stabilisé à temps longs en impliquant notamment plusieurs récepteurs tandis qu'il pourrait être plus labile à temps courts en raison d'un nombre moins important de liens.

Dans l'expérience suivante, une cinétique d'accrochage est suivie (●). A différents temps, respectivement 10 et 30 minutes, une partie de l'échantillon est dilué dix fois. L'évolution de ces deux nouveaux échantillons est mesurée (respectivement ▲ et ×).

Même dans ces conditions, nous n'observons pas de décrochage des objets.

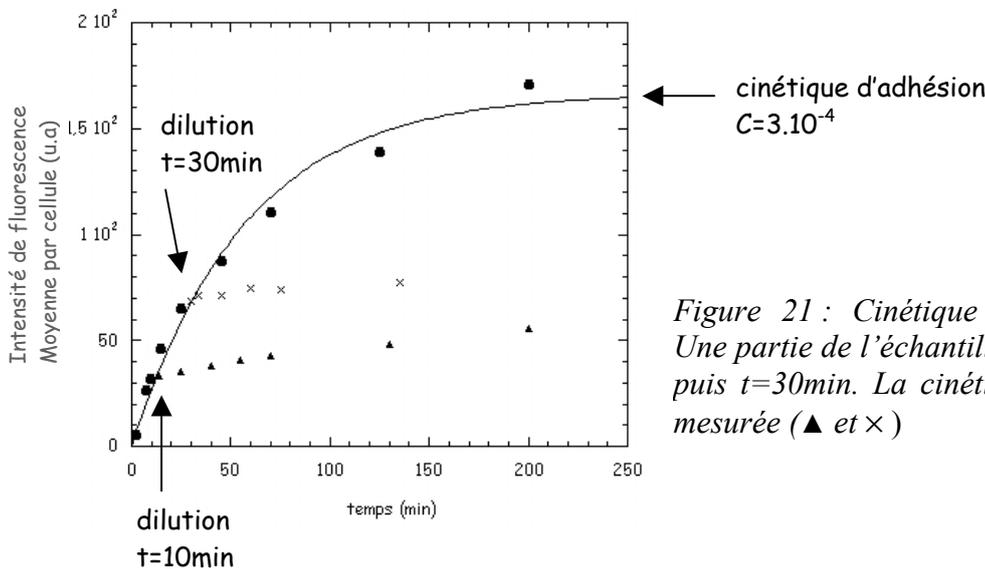


Figure 21 : Cinétique d'adhésion $C=3.10^{-4}$.

Une partie de l'échantillon est dilué à $t=10\text{min}$ puis $t=30\text{min}$. La cinétique après dilution est mesurée (▲ et ×)

L'ensemble de ces expériences semble montrer que les colloïdes Shiga adhèrent à la surface cellulaire de façon irréversible ce qui contredit très fortement l'hypothèse de l'équilibre.

Compte tenu de ce résultat, nous avons cherché de nouvelles interprétations ; nous les détaillerons dans la dernière partie, *C*, de ce chapitre. Pourtant, afin de bien préciser dès à présent la chronologie de la démarche, il faut souligner qu'un modèle proposé par Pierre

Gilles de Gennes permettait à ce niveau de rendre compte des résultats (à savoir des plateaux dépendant de la concentration et une absence de décrochage des colloïdes). C'est dans le but éventuel de valider ce modèle que nous avons alors réalisé les expériences qui vont suivre.

I.4.2. Ajout de nouveaux colloïdes fluorescents

Ici, nous allons augmenter la concentration de colloïdes et regarder de quelle façon l'état d'équilibre du système est modifié. Alors qu'en diminuant la concentration par dilution, nous n'avons observé aucune modification, l'ajout de nouveaux colloïdes a un effet: il permet de se déplacer vers un nouvel état stationnaire qui correspond à celui de la nouvelle concentration d'objets imposée.

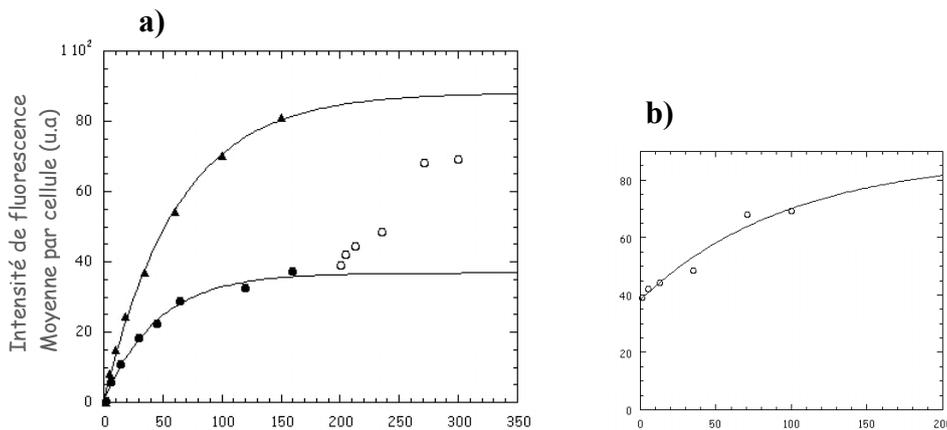


Figure 22 :

- a) ▲ : cinétique d'adhésion à $C=3 \cdot 10^{-4}$. L'ajustement donne $\tau = 62$ min
 ● : cinétique d'adhésion à $C=10^{-4}$
 ○ : suivi de l'échantillon après ajout à $t=200$ min de colloïdes fluorescents de sorte que C passe de 10^{-4} à $3 \cdot 10^{-4}$
- b) Ajustement des points expérimentaux ○ du graphe a). On trouve $\tau = 100$ min

I.5. Des résultats étonnants et contradictoires

Nous avons cherché à décrire l'adhésion de colloïdes fonctionnalisés en surface par la sous unité B de la toxine de Shiga sur la surface de cellules HeLa. Nous avons vu qu'il s'agissait d'une interaction spécifique impliquant la reconnaissance du ligand porté par l'objet avec le glycolipide Gb3 de la surface cellulaire.

D'autre part, l'étude cinétique autorise une interprétation classique sous la forme d'un équilibre entre colloïdes et récepteurs, le plateau et le temps caractéristique dépendant directement comme attendu de la concentration C des objets.

Toutefois, un résultat fort vient contredire cette hypothèse ; les colloïdes semblent incapables de se décrocher de leur récepteur, signe d'un processus irréversible dans le mécanisme d'adhésion. Or une étape irréversible, si elle existait, conduirait inévitablement l'ensemble des cinétiques menées à différentes concentrations C de colloïdes vers un plateau de saturation commun*, ce qui n'est pas le cas. Plus étonnant encore, alors que la surface

* Ce point sera détaillé dans la dernière partie de ce chapitre (C. Discussion sur l'adhésion des colloïdes).

cellulaire semble saturée à une concentration C (apparition d'un plateau) par des colloïdes incapables de se dissocier, il reste néanmoins possible de fixer de nouveaux objets.

Ces résultats expérimentaux relèvent ainsi de plusieurs points contradictoires :

- **une évolution vers un état saturé (plateau) dépendant de la concentration**
- **l'impossibilité de décrocher, à n'importe quel moment, les colloïdes adhérents, signe d'un processus irréversible**
- **la possibilité de fixer de nouveaux objets ce qui souligne la présence de récepteurs toujours disponibles sur la surface cellulaire.**

Ce comportement est-il lié au ligand Shiga lui-même ? A la nature colloïdale de l'objet ? Pour répondre à ces questions et tenter de comprendre le caractère général ou au contraire tout à fait spécifique de ces résultats, nous allons nous intéresser au comportement de la protéine Shiga seule ainsi qu'à d'autres types de colloïdes fonctionnalisés différemment.

II. Comparaison avec d'autres systèmes

II.A. Ligand Shiga seul

II.A.1. Sous unité B de la toxine de Shiga libre en solution

Dans cette partie, nous utilisons la sous unité B de la toxine de Shiga seule. Afin de suivre son adhésion sur cellule, la protéine est marquée de façon covalente par un fluorophore (FITC). Le couplage est réalisé par réaction de la cystéine libre de la sous unité B de la toxine de Shiga avec de la fluorescéine-maléimide (*Molecular Probes – F150*) en large excès. Après deux heures d'agitation, la solution est séparée sur colonne (G25) pour éliminer le fluorophore non couplé.

II.A.2. Spécificité de l'interaction

Comme nous l'avons fait pour les objets, vérifions la spécificité de l'interaction entre la protéine Shiga marquée et son récepteur Gb3. Pour cela, cinq jours au minimum avant l'expérience, une partie des cellules est mise en culture avec un inhibiteur de la synthèse des glucosylceramide (5 μ M de PMP). L'adhésion de la protéine Shiga est alors mesurée sur ces cellules dépourvues de récepteurs et comparée à celle obtenue sur des cellules non traitées. L'expérience est réalisée à 4°C et le suivi cinétique se fait par cytométrie de flux.

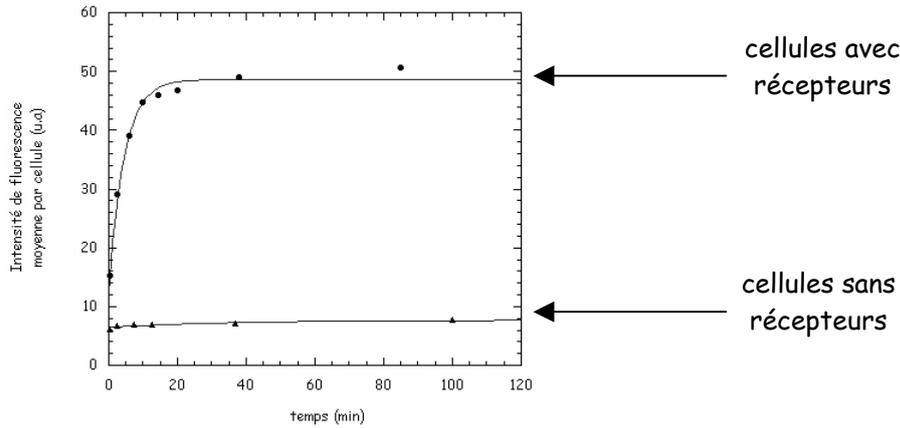


Figure 23 : Cinétique d'adhésion (4°C) avec 15nM de Shiga-FITC sur deux lots de cellules.

● : cinétique suivie sur cellules HeLa sans traitement préalable ; ces cellules portent le récepteur GB3 de la toxine de Shiga. ▲ : cinétique suivie sur cellules HeLa traitées 5 jours minimum avec 5μM de PPMP.

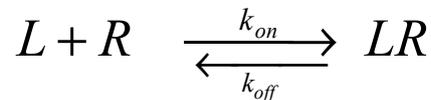
Nous voyons que l'intensité de fluorescence des cellules dépourvues de récepteurs reste très faible (6 fois moins importantes que pour des cellules normales) signe que ces cellules ne sont pas capables de capter la protéine Shiga fluorescente. **Sans récepteur, l'interaction ne se produit pas, preuve qu'elle résulte d'un mécanisme spécifique impliquant le ligand et le récepteur.**

II.A.3. Etude cinétique

Nous avons vu qu'il n'est pas possible de décrire l'adhésion des colloïdes Shiga comme un équilibre puisqu'ils sont incapables de se décrocher de la surface cellulaire. Qu'en est-il dans le cas de la protéine Shiga seule ?

II.A.3.1. Plateau en fonction de la concentration

Le modèle d'équilibre ligand - récepteur prédit l'évolution du plateau en fonction de la concentration L_0 de ligands Shiga. Avec k_{on} et k_{off} , les constantes cinétiques de formation et de dissociation, on peut écrire l'équilibre suivant :



$$\left\{ \begin{array}{l} [LR]_{plateau} = \frac{R_T L_0}{L_0 + \frac{k_{off}}{k_{on}}} = \frac{R_T L_0}{L_0 + K_D} \quad (2') \\ \frac{1}{\tau} = k_{on} L_0 + k_{off} \quad (3') \end{array} \right.$$

Peut-on vérifier ces relations ?

L'expérience de cinétique est conduite à dix concentrations différentes L_0 de Shiga variant de 1nM à 1 μ M. La valeur au plateau est mesurée après 75 minutes de contact à 4°C.

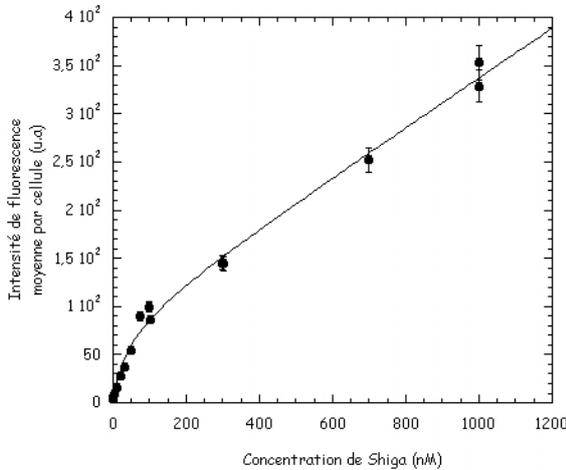


Figure 24 : Valeurs brutes de fluorescence mesurée à 4°C après 75min de contact entre des cellules HeLa et la protéine Shiga-FITC à différentes concentrations.

L'ajustement correspond à la somme d'une hyperbole et d'une droite suivant l'expression $\frac{m_1 x}{m_2 + x} + m_3 x + 3.5$ où la valeur 3.5 correspond à l'auto fluorescence des cellules.

Les points • représentent les mesures brutes données par le cytomètre. Comme nous l'avons déjà vu à deux reprises, cette mesure prend en compte deux termes de fluorescence ; l'un est lié directement à la cellule et aux éléments qu'elle a captés, l'autre correspond à la fluorescence de l'environnement.

La part due au milieu environnant la cellule est plus importante ici que dans le cas des colloïdes ; en effet, dans le cas présent, les cellules passent devant le faisceau laser dans une solution fluorescente. Elle est directement proportionnelle à la concentration L de ligands fluorescents ajoutés : $I_{envir} = \alpha \times L$.

Quant à la part liée à la cellule qui correspond aux ligands spécifiquement adhérents sur la cellule, elle est notée I_{cell} et régie par les lois de l'équilibre et en particulier par l'équation (2'). L'intensité mesurée aux temps longs s'écrit alors comme la somme de ces deux sources de fluorescence :

$$I_{mes}(plateau) = \frac{R_T L_0}{L_0 + K_D} + \alpha L_0$$

L'ajustement réalisé avec cette expression permet de déterminer le paramètre α ($=0.25 \pm 0.016$) et d'éliminer la contribution $I_{envir} = \alpha \times L$. Le graphe ci-après représente alors uniquement la partie adhésion liée à la cellule qui s'écrit alors:

$$I_{adh}(plateau) = \frac{R_T L_0}{L_0 + K_D}$$

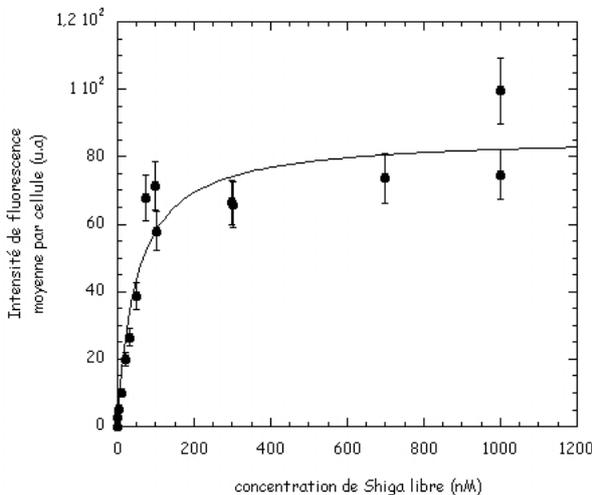


Figure 25 : Valeurs de fluorescence moyenne par cellule.

L'ajustement correspond à une hyperbole de la forme $\frac{m_1 x}{m_2 + x}$

L'ajustement hyperbolique du graphe permet d'estimer $K_D = 49(\pm 12)nM$. On remarque qu'en raison des incertitudes générées par la détermination du fond de fluorescence l'erreur est ici relativement importante.

II.A.3.2. Détermination des constantes cinétiques

Pour déterminer les constantes cinétiques k_{on} et k_{off} , des courbes de cinétiques sont nécessaires.

Le premier graphe ci-dessous (a)) représente les cinétiques d'accrochage de Shiga à 5 concentrations : 10, 15, 20, 75 et 200nM. Sur le second graphe (b)) nous avons reporté les valeurs de $\frac{1}{\tau}$ en fonction de la concentration L_0 de ligands Shiga. Comme le prédit l'équation (3'), l'évolution est linéaire. Enfin, sur le troisième graphe (c)), on trace la valeur mesurée au plateau en fonction de la concentration.

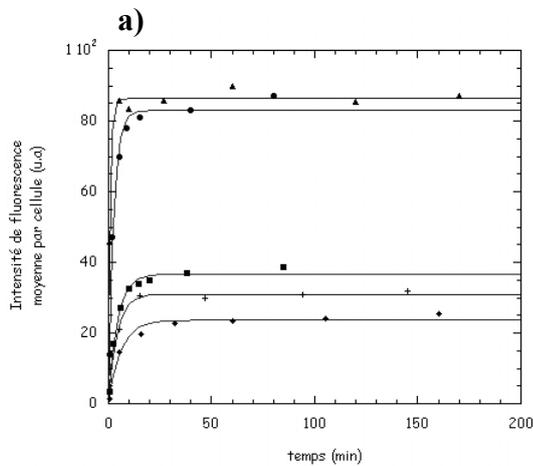
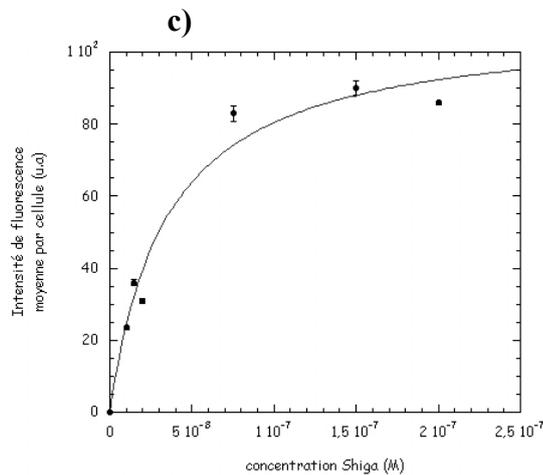
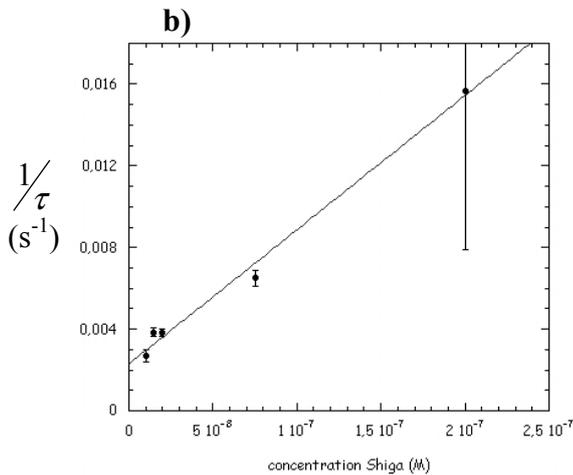


Figure 26 :

a) Cinétiques d'adhésion de Shiga à différentes concentrations L_0 (de bas en haut : 10, 15, 20, 75 et 200nM)

b) $\frac{1}{\tau}$ (s^{-1}) en fonction de L_0 (M). Ajustement linéaire $m_1x + m_2$ (équation 3')

c) Intensité de fluorescence au plateau en fonction de L_0 (M). Ajustement hyperbolique $\frac{m_1x}{m_2 + x}$ (équation 2')



L'ajustement du graphe b) permet d'extraire les constantes cinétiques.

$$k_{on} = 6.6 \pm 0.4 \times 10^4 s^{-1} M^{-1}$$

$$k_{off} = 2.3 \pm 0.3 \times 10^{-3} s^{-1}$$

$$\text{soit } K_D = 35 \pm 7 nM$$

L'ajustement hyperbolique du graphe c) conduit à la même valeur ($K_D = 35 \pm 8 nM$) ce qui souligne une bonne cohérence de ces résultats.

La valeur obtenue pour la constante K_D est légèrement plus faible que la première, estimée à 49nM. Néanmoins, l'ordre de grandeur est conservé et compte tenu des incertitudes de mesure, nous pouvons dire que **la constante de dissociation à 4°C de la sous unité B de la toxine de Shiga est de l'ordre de 40nM sur les cellules Hela que nous utilisons.**

Les constantes de dissociation mesurées sur cellules pour la toxine de Shiga dans la littérature sont du même ordre (de la dizaine à la centaine de nM). Toutefois, elles peuvent dépendre de la technique de mesure utilisée ou encore de l'isoforme de la toxine de Shiga testée. Pour l'isoforme 1 de la toxine de Shiga (Stx1), Head, Karmali et Lingwood⁴⁵ proposent une affinité de 46nM mesurée par une technique classique (microplaques). Des mesures ont également été réalisées sur des membranes modèles de phospholipides. Par résonance de plasmon de surface, Nakajima *et al*⁴⁶ proposent des valeurs plus élevée comprises entre 220 et 520nM suivant les densités de récepteurs incorporés dans la bicouche. Il faut remarquer ici que, dans le cadre d'une description type équilibre, la valeur de la constante K_D ne doit pas dépendre de la densité de récepteurs. Un mécanisme plus complexe serait donc à invoquer pour expliquer ces résultats.

II.A.3.3. Perturbation de l'équilibre et relaxation vers un nouvel équilibre

Nous avons mis en évidence les caractéristiques d'un équilibre pour décrire l'accrochage de la sous unité B de la toxine de Shiga. Comme nous l'avons fait pour les colloïdes, regardons de quelle façon évolue cet équilibre.

Lorsqu'on ajoute des ligands, on constate que l'équilibre se déplace vers un nouveau plateau supérieur au premier comme nous l'avons aussi observé pour les colloïdes Shiga.

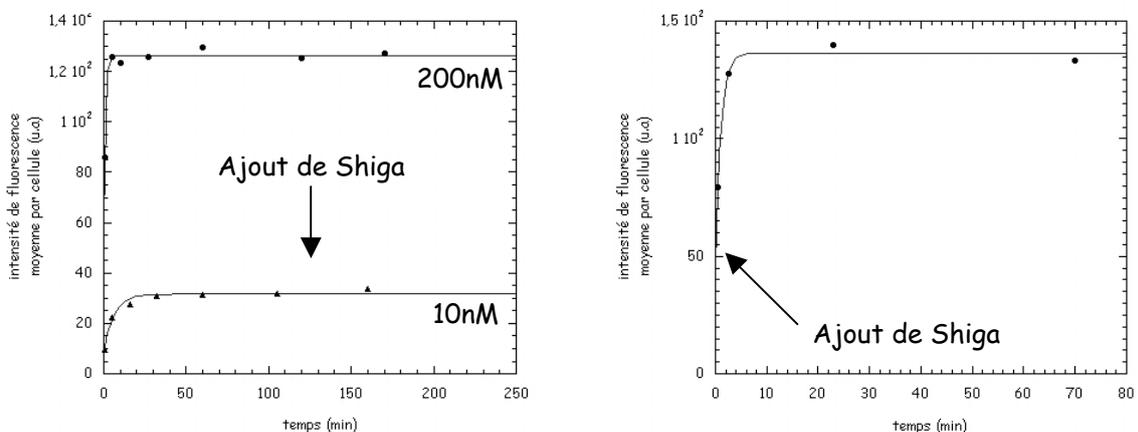


Figure 27 :

- a). Cinétiques d'adhésion pour $L_0 = 10nM$ et $200nM$. $\tau(200nM)=1min$
 A $t=120 min$, ajout de nouveaux ligands de sorte que L_0 passe de 10 à $200nM$
 b). Suivi cinétique après l'ajout. $\tau=1min$

Qu'en est-il maintenant si l'on essaie de dissocier le couple Shiga / Gb3 ?

Pour répondre à cette question, nous avons, dans le cas des colloïdes Shiga, diminuer la concentration de colloïdes par dilution. Ce protocole est difficilement applicable ici car il

⁴⁵ Head, Karmali et Lingwood , J. Biol. Chem. 266, 3617-3621, 1991

⁴⁶ Nakajima *et al*, J. Biol. Chem, 276, n°46, 2001

entraîne des variations trop importantes de la fluorescence du milieu environnant ce qui complique de beaucoup l'interprétation. Nous avons donc travaillé en ajoutant des ligands compétiteurs à des concentrations bien choisies.

Nous avons considéré deux concentrations de ligands respectivement 75 et 150nM. Ces concentrations sont supérieures au K_D (évalué à 40nM). Par conséquent, les cinétiques d'accrochage à ces deux concentrations conduisent au même plateau de telle sorte que $I_{adh}(150nM) \cong I_{adh}(75nM)$. **Il y a toujours le même nombre de ligands à la surface de la cellule.** C'est ce que l'on observe sur la figure 28 (• et ▲).

L'expérience consiste ensuite au bout de 120 minutes lorsque l'équilibre pour la concentration 75nM est bien établi à ajouter des ligands non fluorescents pour atteindre une concentration finale de ligands de 150nM. Les cellules sont alors en contact avec une concentration L_0 de ligands dont la moitié seulement est fluorescent ($L_0=150nM, L_{fluo}=75nM, L_{nonfluo}=75nM$)

Bien entendu, nous mesurons uniquement en cytométrie l'adhésion des ligands fluorescents de telle sorte que :

$$I_{mes}(L_0) = \frac{L_{fluo}}{L_0} I_{adh}(L_0)$$

Si le système respecte les lois de l'équilibre, il relaxe vers son nouvel état d'équilibre (correspondant à une concentration globale de 150nM) que nous mesurons et qui vaut :

$$I_{mes}(150nM) = \frac{1}{2} I_{adh}(150nM) = \frac{1}{2} I_{adh}(75nM)$$

En effet, les éléments fixés en équilibre sur la cellule s'échangent en permanence avec ceux du milieu environnant. Statistiquement, au bout d'un certain temps, les éléments à la surface de la cellule doivent respecter les proportions de ligands en solution qui l'entoure. A la surface de la cellule, un élément sur deux est alors fluorescent. Comme le nombre total n'a pas changé, la fluorescence de la cellule va progressivement diminuer de moitié.

C'est ce que nous observons. Toutefois, il faut noter que le décrochage des ligands se fait avec un temps caractéristique 10 fois plus grand que celui attendu.

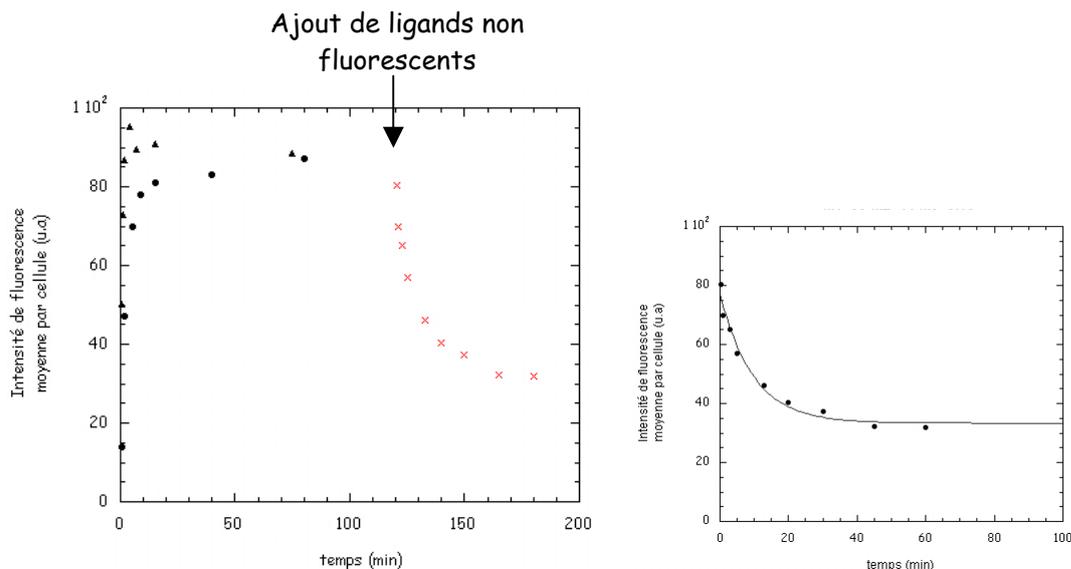


Figure 28 :

▲ : $L_0=150nM$. $\tau=1min$

• : $L_0=75nM$. A $t=120 min$, ajout de colloïdes non fluorescents

× : profil de dissociation des ligands fluorescents.

L'encart à droite représente l'ajustement de ce profil par l'expression $m_1 + m_2 \exp(-m_3x)$.

Le système Shiga-Gb3 semble donc se comporter comme un équilibre classique. En particulier, il est possible de dissocier le ligand de son récepteur. L'irréversibilité observée dans le cas des colloïdes n'est donc pas due à une simple particularité de ce couple ligand - récepteur puisque nous n'observons pas ce phénomène avec la protéine Shiga seule. On peut alors se demander si il s'agit d'un effet propre à l'objet colloïdal lui-même. Pour répondre à cette question, regardons le comportement d'autres colloïdes fonctionnalisés différemment.

II.B. Colloïdes cationiques : cas d'une adhésion non spécifique

Le cas de colloïdes cationiques a été étudié et publié par Pascale Chenevier et Nelly Henry-Toulmé⁴⁷.

De nature électrostatique, l'interaction n'est pas spécifique (au sens où nous l'entendons c'est-à-dire la reconnaissance particulière d'un couple ligand – récepteur) mais constitue un élément de comparaison intéressant quant aux comportements de colloïdes.

Nous allons reprendre ici les principaux résultats de cette étude.

- Les auteurs observent une adhésion de ces objets chargés sur les cellules J774.
- Ces colloïdes ont la possibilité de se décrocher de la surface cellulaire mais le décrochage observé n'est que partiel.

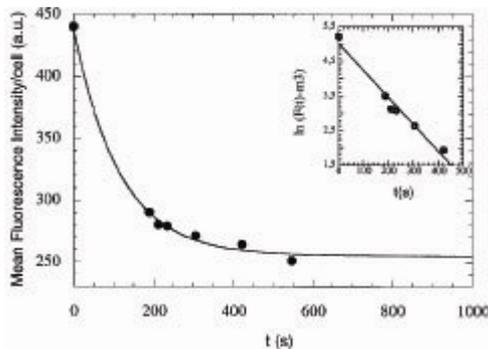
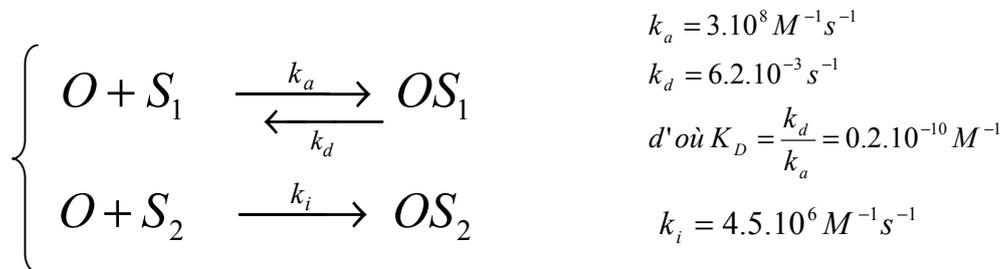


Figure 29 : Profil de dissociation après 2200s de contact entre colloïdes cationiques (2.10^{14} particules/L) et cellules.

L'ajustement réalisé est de la forme $m_3 + m_1 \exp(-m_2 m_0)$

Figure extraite de 47.

- L'étude conduit les auteurs à proposer un modèle d'accrochage des colloïdes cationiques (noté O) qui repose sur l'existence de deux types de sites d'accrochage en compétition (noté S). Un premier type de site, S_1 , répond aux lois de l'équilibre ; les objets adhérents sur ces sites le sont de façon réversible. Les autres sites, S_2 , sont des sites d'accrochage irréversibles.



⁴⁷ P.CHENEVIER *et al* « Interaction of cationic colloids at the surface of J774 cells : a kinetic analysis » Biophysical Journal. 2000, vol 79, p. 1298-1309.

- L'équilibre décrit présente une très forte affinité ; il est suggéré qu'un grand nombre d'interactions unitaires existe entre le colloïde et la cellule compte tenu du nombre de charges positives présentes par objet (de l'ordre de $2 \cdot 10^4$).
- Les sites irréversibles quant à eux mettent en jeu des temps caractéristiques plus importants. L'adhésion des colloïdes y est plus lente ce qui suggère que leur accessibilité est plus difficile et nécessite le passage d'une barrière d'activation plus importante. Les auteurs proposent une localisation de ces sites directement sur la membrane plasmique tandis que les sites réversibles, plus rapidement peuplés pourraient se trouver plus en périphérie directement sur la matrice extracellulaire par exemple.

Dans ce modèle, c'est le couplage de deux types de sites, réversibles et irréversibles qui permet de décrire l'accrochage des colloïdes cationiques. Il faut remarquer dès à présent qu'une description comparable ne permettrait pas de rendre compte de nos résultats avec les colloïdes Shiga. En effet, la présence de sites réversibles nécessite qu'une partie au moins des objets soit susceptibles de se décrocher ce qui n'est pas le cas de nos colloïdes.

Etudions maintenant le cas des colloïdes RGD.

II.C. Colloïdes RGD – Récepteurs intégrines

II.C.1. Résultats antérieurs

Le système de ciblage mettant en jeu la séquence peptidique RGD a été mis en place et largement étudié par Pascale Chenevier au cours de son travail de thèse^{*, 48}. L'étude démontre en particulier la spécificité de l'interaction entre la séquence RGD portée par le colloïde et les intégrines $\alpha_v\beta_3$ de la surface cellulaire.

La figure 30 ci-après reprend les principales conclusions de ce travail. Nous pouvons les résumer ainsi :

1. Les objets non ciblant ne présentent pas d'adhésion sur la surface cellulaire
2. Les objets cationiques, comme nous l'avons vu dans la partie précédente, adhèrent de façon électrostatique. L'adhésion, non spécifique, est ainsi du même ordre sur l'ensemble des types cellulaires testés.
3. Les colloïdes ciblant RGD n'adhèrent pas sur des les cellules Jurkat dépourvues d'intégrines. L'adhésion par contre est d'autant plus forte que la présence des intégrines $\alpha_v\beta_3$ est importantes (Huvec > Eahy > Hop) (corrélé à des expériences de dosage des intégrines par immunocytochimie non présentées ici)
4. La modification d'un acide aminé de la séquence de reconnaissance (RGE à la place de RGD) entraîne la perte de l'adhésion des colloïdes qui revient au niveau de celle des colloïdes non fonctionnalisés.

* P.CHENEVIER. Thèse de doctorat de l'Université de Bordeaux I. 2001. [19].

⁴⁸ CHENEVIER et al. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*. 2002, vol 1593, I, 17-27.

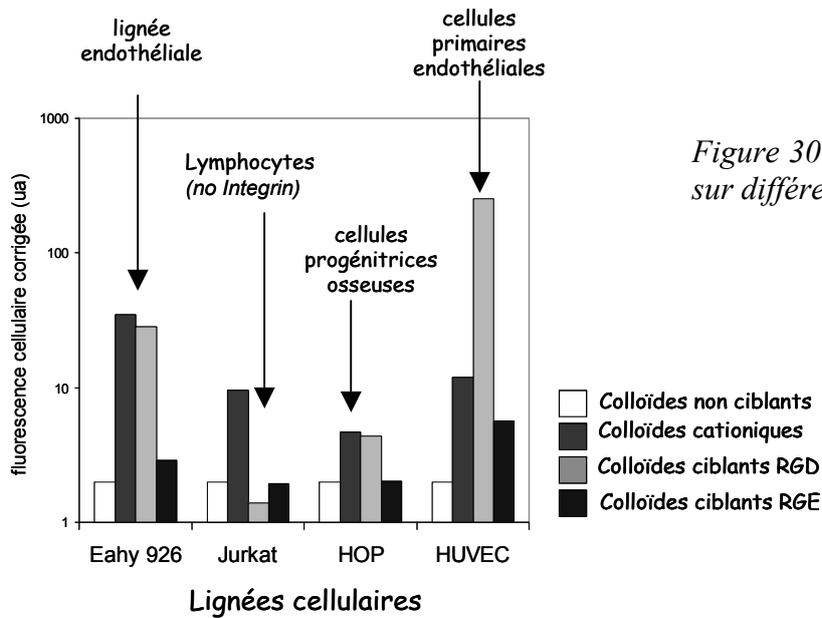


Figure 30 : Adhésion de colloïdes RGD sur différents types cellulaires.

Cette étude montre qu'une modification du ligand ou une absence de récepteur entraîne une perte très importante de l'adhésion des objets. Cela valide la spécificité de la reconnaissance entre ces objets portant le peptide RGD et les intégrines de la surface cellulaire.

Toutefois il faut préciser que ces mesures, réalisées en cytométrie de flux, relèvent d'un protocole particulier. Cellules et colloïdes fluorescents sont mis en contact dans des puits, centrifugés (10min, 4°C, 400g) puis placés à 37°C. Après 4 heures d'incubation, les cellules sont récupérées, débarrassées du surnageant d'objets fluorescents par une nouvelle étape de centrifugation puis mesurées au cytomètre.

Dans le cadre de notre étude où nous souhaitons mesurer les cinétiques d'adhésion de ces colloïdes, il nous a semblé important de modifier ce protocole notamment en supprimant les étapes de centrifugation qui peuvent modifier considérablement les caractéristiques de la rencontre entre le colloïde et la surface cellulaire (augmentation de la probabilité de rencontre par exemple).

II.C.2. Etude cinétique

Les premiers essais ont montré que les cinétiques d'accrochage (suivies à 4°C après simple mise en contact des colloïdes et des cellules) de ces objets ciblant RGD sont lentes et de faibles amplitudes et ce même pour des concentrations en colloïdes importantes (fraction volumique de 10^{-3}).

Par ailleurs, la littérature fait état de l'importance des changements dynamiques de conformation des intégrines⁴⁹. Cette complexité conformationnelle permet un ajustement très fin de l'affinité d'accrochage avec un ligand ou de la signalisation intracellulaire. Des études cristallographiques ont notamment pu montrer l'implication de cations divalents dans les conformations des intégrines et le lien avec la force des interactions intégrines – ligands. Ainsi la présence d'ions Mn^{2+} stabilise une conformation de haute affinité^{50, 51}.

⁴⁹ MOULD and M.J HUMPHRIES. A.P. Current opinion in cell biology. 2004, 16, p. 544-551.

⁵⁰ MOULD *et al*, J Biol Chem. 2003 : 51629-51662

⁵¹ CHEN *et al*, Nat Struct Biol. 2003, 10, p. 995-1001

Compte tenu des résultats de ces études, nous avons tenté de mener nos expériences de cinétiques en présence d'ions Mn^{2+} pour augmenter l'affinité et accélérer les cinétiques. Nous observons dans ce cas une cinétique qui reste lente mais mesurable.

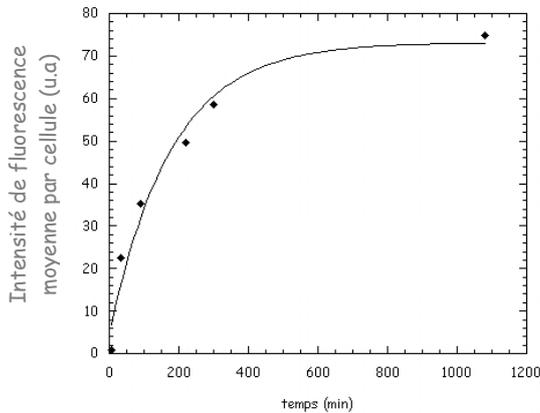


Figure 31 : Cinétique d'adhésion à 4°C d'objets ciblant RGD ($C=10^{-3}$) en présence de 0.7mM de Mn^{2+} . Cellules HeLa.

L'ajustement est réalisé dans le cadre de l'équilibre ; il donne un temps caractéristique de 178min (3h).

Toutefois dans ces conditions expérimentales (cinétique 4°C en présence de Mn^{2+}), l'interaction ne semble pas très spécifique.

En effet, l'ajout de peptide compétiteur de même séquence (GRGDSP) est sans effet sur la cinétique et ce même à très forte concentration (100µg/mL soit 160µM).

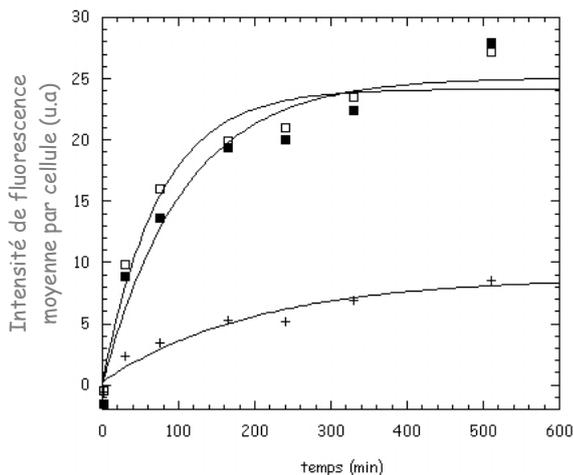


Figure 32 : Cinétiques d'adhésion à 4°C en présence de 0.7mM d'ions Mn^{2+} . La concentration des colloïdes vaut $C=3.10^{-4}$

■ : objets ciblant RGD

□ : objets ciblant RGD avec ajout d'un élément compétiteur (160µM de peptide GRGDSP en solution)

+ : objets non ciblant

C'est donc une interaction dont nous ne connaissons pas exactement la nature que nous allons regarder. Ce point nécessiterait des expériences complémentaires. Néanmoins, il s'agit d'un système colloïde – cellule différent de celui que nous avons observé auparavant (Shiga – Gb3). Il demeure intéressant à ce titre de regarder comment évolue l'interaction.

II.C.3. Paramètres et constantes d'équilibre.

Dans les conditions décrites précédemment (0.7mM d'ions Mn^{2+}), on réalise l'étude cinétique en faisant varier la concentration des colloïdes.

Le graphique ci-dessous présente les résultats de cinétiques obtenus pour 4 concentrations de colloïdes.

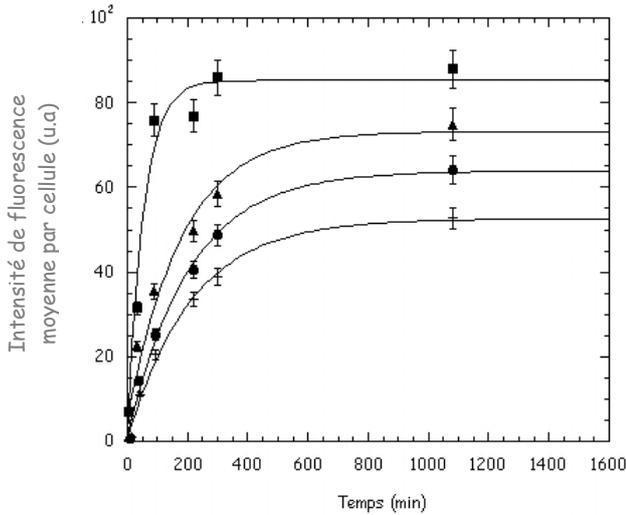


Figure 33 : Cinétiques d'adhésion à 4°C de colloïdes fonctionnalisés RGD mis en contact à $t=0$ à différentes concentrations avec des cellules HeLa ($10^6/mL$). Les fractions volumique de colloïdes valent respectivement 10^{-4} (+), $3 \cdot 10^{-4}$ (•), 10^{-3} (▲) et $3 \cdot 10^{-3}$ (■). En abscisse le temps est exprimé en min et en ordonnée, on lit la fluorescence moyenne par cellule (moyenne réalisée sur une population de 10000 cellules)

Les équations (2) et (3) permettent de tracer et d'ajuster l'évolution du plateau et du temps caractéristique en fonction de la concentration comme le montre les deux représentations ci-après.

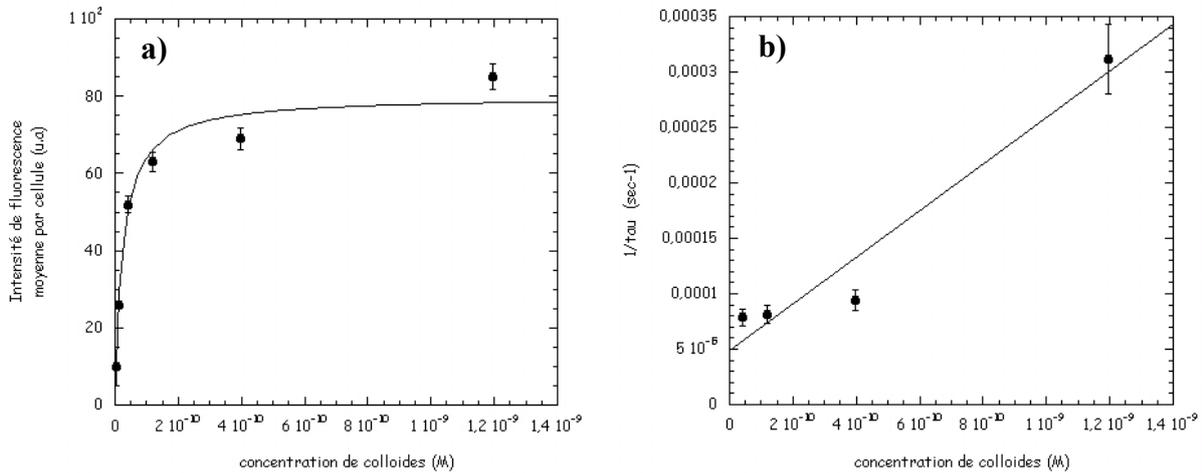


Figure 34 :

a). Plateau en fonction de la concentration molaire de colloïdes. Ajustement hyperbolique (équation 2)
On trouve $K_D = 2.5 \cdot 10^{-11} M$

b). $1/\tau$ (s^{-1}) en fonction de la concentration molaire de colloïdes. Ajustement linéaire (équation 3).

L'ajustement du graphe a) permet d'évaluer la constante de dissociation. On trouve $K_D = 0.025(\pm 0.005) nM$

L'ajustement du graphe b) permet d'extraire les valeurs des constantes cinétiques:

$$k_1 = 2.1(\pm 0.4) \times 10^5 \text{ sec}^{-1} M^{-1}$$

$$k_2 = 4.9(\pm 2) \times 10^{-5} \text{ sec}^{-1}$$

$$\text{On en déduit } K_D = \frac{k_2}{k_1} = 0.23(\pm 0.15) nM$$

Nous obtenons deux valeurs pour la constante d'équilibre thermodynamique. La différence d'un facteur 10 entre ces deux estimations peut s'expliquer par la nature indéterminée de l'interaction observée. Notons également que l'erreur sur la mesure est ici relativement importante (en particulier pour la détermination de k_2).

Pour rappel, Pascale Chenevier propose dans son travail de thèse une estimation de 0.43nM pour cette constante mesurée alors dans des conditions différentes (notamment centrifugation lors du contact et incubation à 37°C)

II.C.4. Perturbations de l'équilibre

Une première cinétique d'adhésion pour une concentration de colloïdes de 10^{-4} est conduite. Une fois l'équilibre bien établi (au bout de 17h), de nouveaux colloïdes sont ajoutés de sorte que la nouvelle concentration de colloïdes devient 10^{-3} . Cette seconde cinétique est mesurée ; nous constatons qu'elle conduit à l'établissement d'un nouvel état stationnaire.

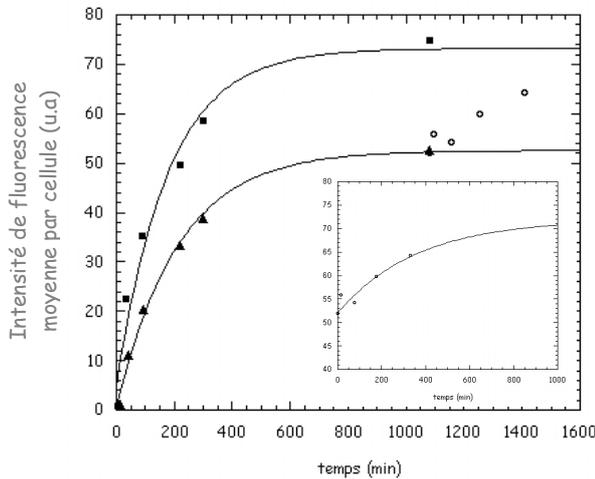


Figure 35 :

- ▲ : cinétique d'adhésion à $C=10^{-4}$
- : cinétique d'adhésion à $C=10^{-3}$ ($\tau=3h$)

○ : suivi cinétique de l'échantillon après ajout à $t=1000$ min de colloïdes de sorte que C passe de 10^{-4} à 10^{-3}

L'encart représente l'ajustement de ces points par une monoexponentielle. Le temps caractéristique de cette seconde cinétique vaut 6h.

D'autre part, il est possible par dilution de décrocher les colloïdes de la surface.

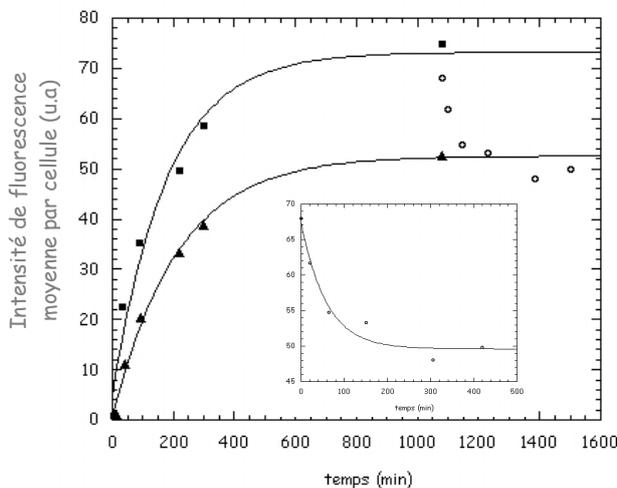


Figure 36 :

- ▲ : cinétique d'adhésion à $C=10^{-4}$ ($\tau=3h30$)
- : cinétique d'adhésion à $C=10^{-3}$ ($\tau=3h$)

○ : suivi cinétique de l'échantillon après dilution 10 fois de l'échantillon à $t=1000$ min. La dilution d'effectue dans un nouveau milieu dépourvu de Mn^{2+} .

L'encart représente l'ajustement de ces points par une monoexponentielle de la forme $m_3 + m_1 \exp(-m_2 m_0)$. Le temps caractéristique de la dissociation vaut ici 1h.

L'interaction entre colloïdes RGD et intégrines peut donc être décrit comme un équilibre.

II.D. Conclusion

L'étude du ligand Shiga libre en solution révèle que l'interaction de la sous unité B de la toxine de Shiga et de la surface cellulaire portant des récepteurs Gb3 peut se décrire avec un modèle simple d'équilibre (type ligand – récepteur classique). Le cas des colloïdes cationiques et RGD montre qu'il est également possible de décrire de la même façon l'interaction de ces objets avec la surface cellulaire. Ainsi, qu'elles soient de nature spécifique ou non, ces interactions font toutes appel à des notions d'équilibre. **Plus globalement, la correspondance logique entre des états stationnaires « concentration dépendants » et la possibilité de décrocher les objets (même partiellement dans le cas des objets cationiques) est respectée.**

Par conséquent, le cas des colloïdes Shiga apparaît particulièrement atypique puisque rappelons le :

- **leur adhésion mesurée aux temps longs (« plateaux ») dépend de la concentration.**
- **il n'est pas possible de les décrocher une fois qu'ils sont fixés sur la surface et ce à n'importe quel moment du processus.**
- **de nouveaux colloïdes ajoutés après apparition d'un premier plateau sont toujours capables de se fixer.**

Ces résultats d'apparence contradictoire mérite d'être discuté plus en profondeur afin d'essayer de proposer une interprétation cohérente. Dans la partie suivante, nous allons tenter de proposer une ébauche de modèle permettant d'en rendre compte.

C. Discussion sur l'adhésion des colloïdes

Dans cette troisième et dernière partie, nous allons tenter de **proposer un mécanisme permettant de comprendre les contradictions observées dans l'adhésion des colloïdes Shiga**. Nous décrirons la démarche qui nous a conduit à proposer, chronologiquement et en parallèle avec les expériences, différents modèles; nous essaierons de les discuter tour à tour en soulignant les contradictions qu'ils soulèvent. Finalement, nous insisterons particulièrement sur un mécanisme multi étapes qui semble proposer une piste d'interprétation tout à fait intéressante.

I. Modèle d'équilibre à une seule étape

L'interprétation la plus simple dans un premier temps consiste à décrire l'accrochage des colloïdes sur la surface de la cellule comme un équilibre thermodynamique simple. C'est la première hypothèse que nous avons faite et c'est dans cette démarche que nous avons présenté l'ensemble de nos résultats expérimentaux dans la partie précédente.

La figure ci-dessous illustre le type de comportement attendu dans le cadre de cette description. On note, en noir, la formation du complexe *OR* pour trois concentrations d'objets *O*; l'équilibre est atteint à trois « valeurs plateaux différentes ». Si l'équilibre est perturbé par une modification de la concentration des objets (diminution en rouge et augmentation en vert), il se réajuste avec le même temps caractéristique vers un nouvel état d'équilibre.

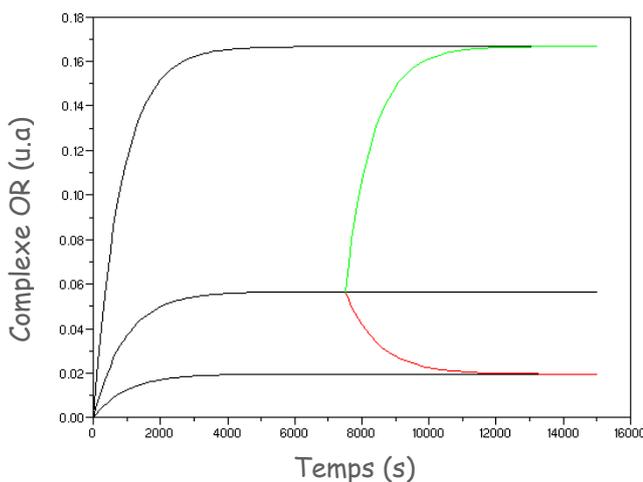


Figure 37 : Courbes théoriques tracées avec $k_1=0.2s^{-1}c^{-1}$ et $k_2=0.001s^{-1}$.

En noir, sont représentées trois cinétiques de formation du complexe *OR* pour 3 fractions volumiques de colloïdes *O* respectivement de haut en bas $c = 10^{-3}$, $3 \cdot 10^{-4}$ et 10^{-4} .

À $t=7500s$, à partir de la concentration intermédiaire, on perturbe l'équilibre en :

- augmentant c à $c=10^{-3}$ (en vert)
- diminuant c à $c=10^{-4}$ (en rouge)

Dans le cas de l'accrochage des colloïdes Shiga sur leur récepteur Gb3 de la surface cellulaire, nous avons constaté que cette description très simple permet de rendre compte de l'évolution du système en cinétique et ce pour différentes concentrations C de colloïdes. Néanmoins, comme nous l'avons largement souligné dans la partie précédente, cette

hypothèse est dans le même temps fortement contredite par l'absence de décrochage des objets. Nous avons ainsi montré que cette description de type équilibre qui décrit en partie tout au moins l'adhésion d'objets différemment fonctionnalisés (colloïdes cationiques ou RGD) ne peut être adaptée au cas des colloïdes Shiga.

Le résultat fort étant l'absence de décrochage des objets, il faut pour en rendre compte faire intervenir une part d'irréversibilité dans la description ; cela équivaut à diminuer la valeur de la constante k_2 . Pourtant, pour observer une absence totale de décrochage des objets, c'est le cas $k_2=0$ qu'il faut envisager. On se convainc alors très rapidement qu'une simple étape irréversible type $O+R \rightarrow OR$ conduit à temps long à une accumulation dans l'état complexé OR , accumulation qui ne permet pas d'observer une évolution du plateau en fonction de la concentration C de colloïdes. Ce cas est illustré ci-après.

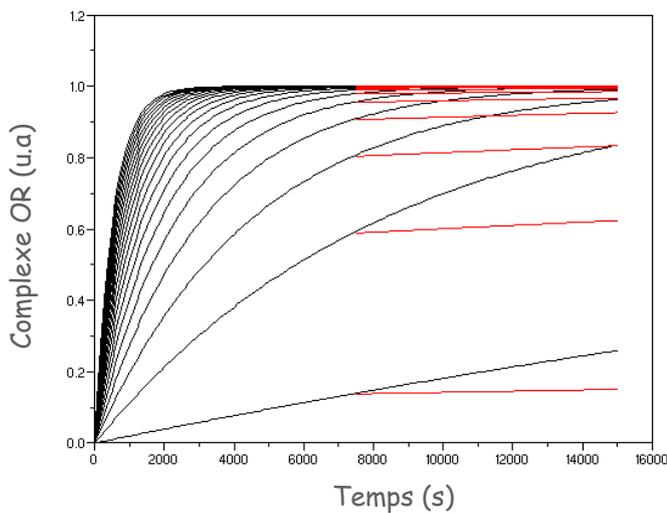
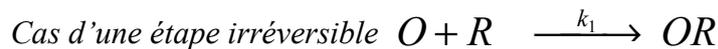


Figure 38 : Courbes théoriques tracées avec $k_1=0.2s^{-1}c^{-1}$.

En noir, sont représentées des cinétiques de formation du complexe OR pour des concentrations de colloïdes c allant de 10^{-4} à 10^{-2} (pas de $5 \cdot 10^{-4}$). L'ensemble de ces courbes convergent à des vitesses différentes (fonction de c) vers un plateau de saturation commun (saturation des récepteurs).

A $t=7500s$, en rouge, la concentration est diminuée d'un facteur 10 sans effet : il n'y a pas de décrochage possible.

Une description de ce type ne peut donc rendre compte de nos observations expérimentales. Si l'on peut s'en inspirer, il faut toutefois complexifier l'approche pour notamment préserver l'effet de saturation dépendant de la concentration.

II. Modèle cinétique irréversible avec diffusion des récepteurs

Le modèle présenté ici a été proposé par Pierre-Gilles de Gennes suite à une discussion autour de questions similaires mais indépendantes des résultats expérimentaux. Il s'est avéré par la suite qu'appliqué à nos expériences, il permettait d'en rendre compte de façon astucieuse. Nous constaterons néanmoins qu'il ne correspond pas non plus totalement à la situation que nous observons avec les colloïdes Shiga.

Nous allons commencer par présenter ce modèle dynamique, entièrement contrôlé par des phénomènes cinétiques, et dans lequel la diffusion des récepteurs dans la membrane est prise en compte.

II.1. Présentation du modèle

L'écriture du modèle repose sur deux points essentiels :

- une première étape d'accrochage irréversible entre un colloïde et un récepteur
- la diffusion des récepteurs libres de la membrane vers ce colloïde fixé et leur accrochage irréversible.

Le nombre de colloïdes fixés est ainsi directement gouverné par la concentration d'objets dans le volume. Ensuite, ces premiers points d'accroche se comportent comme des « puits attractifs » pour les récepteurs présents sur la surface et qui diffusent : ils y sont piégés et ne sont alors plus disponibles pour l'accrochage de nouveaux objets.

Nous allons détailler l'écriture d'un tel modèle.

La première étape « d'initiation » peut se représenter comme une simple étape irréversible du type:

$O + R \xrightarrow{k} OR$ où O représente un colloïde, R un récepteur et OR le complexe formé lorsque l'objet est fixé sur son récepteur. L'étape, de constante cinétique k est irréversible : le décrochage de l'objet n'est donc pas possible.

Au moment du contact, à $t = t_0$ on note C la concentration de colloïdes dans le volume et Γ_0 la concentration surfacique de récepteurs sur la cellule.

A l'instant t , nous considérons la concentration C de colloïdes inchangée (ils sont en large excès) tout comme nous l'avons fait dans l'hypothèse de l'équilibre.

$\Gamma(t)$ est la densité surfacique de récepteurs libres à cet instant ; $v(t)$ est celle du complexe OR .

La loi de vitesse de formation des sites de nucléation OR à la surface de la cellule s'écrit alors :

$$\frac{dv}{dt} = kC\Gamma(t) \quad (1)$$

On appelle S la surface telle qu'à tout instant $v(t)S=1$. S correspond ainsi à la surface concernée par un complexe. Le schéma ci-dessous représente ainsi 3 complexes OR , chacun occupant une surface S et se comportant comme un puits attractif pour les récepteurs libres présents sur S .

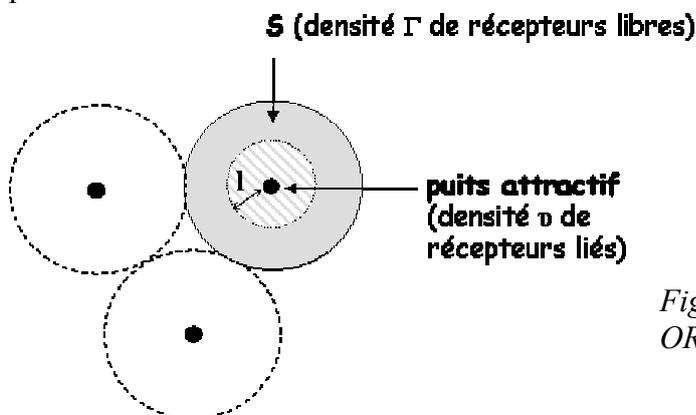


Figure 39 : Représentation de 3 complexes OR occupant chacun une surface S .

La variation du nombre de récepteurs libres dn sur cette zone S s'écrit alors :

$$dn = -[\Gamma(t + dt) - \Gamma(t)]S \quad (2)$$

Par ailleurs, appelons D le coefficient de diffusion des récepteurs dans la membrane cellulaire. Pendant un intervalle de temps dt , le nombre de récepteurs libres dn susceptibles de se lier au complexe OR et d'y être « piégés » s'écrit : $dn = l^2 \Gamma(t)$ où l est la distance parcourue par diffusion par les récepteurs libres pendant dt . Dans ces conditions, on écrit $l^2 = Ddt$.

Il s'en suit pour dn l'expression : $dn = Ddt\Gamma(t)$ (3)

De (2) et (3), on tire : $\frac{d\Gamma}{dt} = -D\Gamma\nu(t)$ (4)

II.2. Résultats du modèle

L'intégration du système différentiel (1) et (4) conduit à la solution suivante :

$$\nu(t) = \sqrt{\frac{2kC\Gamma_0}{D}} \operatorname{th} \left(\sqrt{\frac{kC\Gamma_0 D}{2}} t \right) \quad (5)$$

L'évolution cinétique est ainsi donnée par une tangente hyperbolique ; l'allure générale n'est donc pas très différente de celle d'une monoexponentielle décrite dans le cas d'un équilibre simple.

Aux temps longs, la tangente hyperbolique tend vers 1 et $\nu(t \rightarrow \infty) = \sqrt{\frac{2k\Gamma_0}{D}} \sqrt{C}$ (6)

$\nu(\infty)$ correspond ainsi au nombre de colloïdes fixés sur la surface cellulaire et donc à la valeur « plateau » que nous mesurons dans nos cinétiques d'adhésion aux temps longs ; cette valeur évolue en \sqrt{C} .

Ce modèle propose ainsi un système globalement irréversible mais où la saturation atteinte aux temps longs dépend de la concentration des objets. En effet, plus il y a de puits attractifs formés (c'est-à-dire plus il y a de colloïdes fixés), plus vite sont consommés les récepteurs libres susceptibles d'accrocher de nouveaux objets. Il s'en suit une compétition pour les récepteurs (en nombre fini) entre, d'une part, l'accrochage de nouveaux colloïdes qui crée de nouveaux points de nucléation et d'autre part les points d'accroche déjà formés par la fixation des premiers objets. L'étape d'adhésion se termine lorsque tous les récepteurs sont liés.

Ainsi, nous pouvons dégager deux types de comportement (mais on passe bien sûr continûment de l'un à l'autre) :

- à forte concentration de colloïdes, l'accrochage des objets sur la surface est un phénomène fréquent : de nombreux points d'accroche sont formés très rapidement. Les récepteurs se répartissent entre ces points. On obtient au final un grand nombre de colloïdes fixés irréversiblement sur la cellule mais chaque colloïde implique peu de récepteurs.

- à faible concentration de colloïdes au contraire, la rencontre entre un objet et un récepteur se fait moins fréquemment laissant aux récepteurs le temps de diffuser vers ces premiers points où ils restent bloqués ensuite irréversiblement. Finalement, on obtient une situation où peu de colloïdes sont fixés, chacun impliquant un grand nombre de récepteurs.

Une telle description permet donc de rendre compte de l'évolution du nombre d'objets fixés en fonction de la concentration de colloïdes mis en contact.

Par ailleurs, l'accrochage des objets étant de nature irréversible, leur décrochage est impossible ce qui est à nouveau compatible avec nos observations.

Ainsi, cette représentation permet de décrire :

- une saturation à temps long (un « plateau ») dépendant en \sqrt{C} de la concentration
- l'absence de décrochage des colloïdes

II.3. Comparaison avec les expériences et discussion

Le modèle présenté permet de rendre compte des évolutions cinétiques observées ainsi que de l'absence de décrochage des colloïdes Shiga.

Les mesures expérimentales (graphe a) peuvent ainsi être ajustées de façon tout à fait satisfaisante avec l'équation (5). De même, l'équation (6) rend compte de nos résultats expérimentaux « plateau » en fonction de C (graphe b).

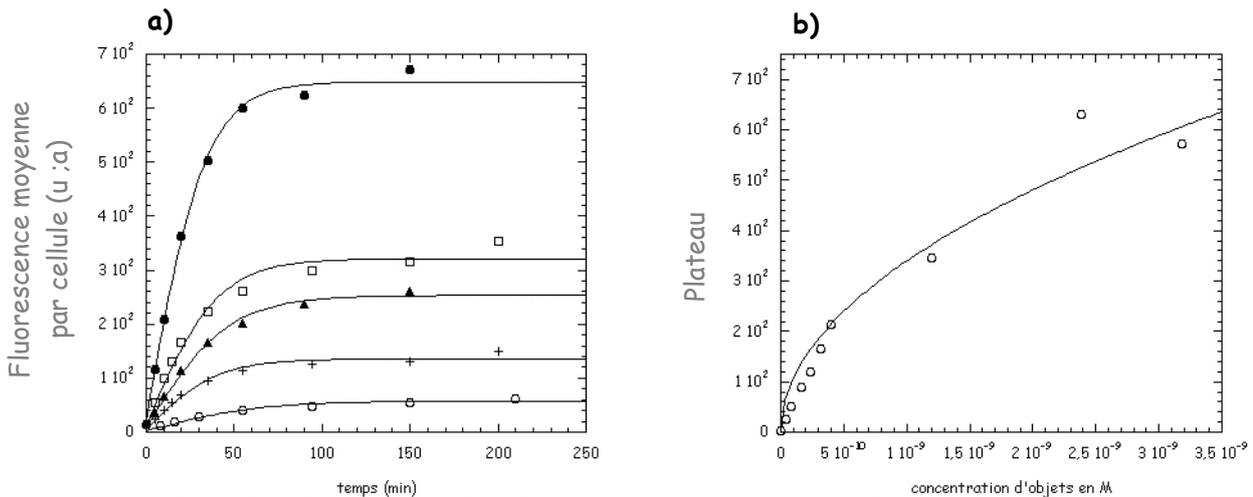


Figure 40 :

a). Cinétiques d'adhésion de colloïdes Shiga mesurées par cytométrie pour différentes concentrations C de colloïdes : de bas en haut, $C=10^{-4}$, 2.10^{-4} , 3.10^{-4} , 7.10^{-4} et 10^{-3} . Ajustement $m_1 \tanh(m_2 x)$ d'après l'équation (5)

b). Valeurs mesurées aux temps longs (« plateaux ») en fonction de C (en M)

Ajustement du type $m_1 \sqrt{x}$ d'après l'équation (6)

Pourtant, la description implique une saturation par épuisement des récepteurs disponibles. Par conséquent, une fois cette saturation atteinte, il n'est théoriquement plus possible de fixer de nouveaux objets. C'est pour valider ce point que nous avons regardé expérimentalement l'effet de l'ajout de nouveaux colloïdes. Comme nous l'avons relaté, nous observons dans ce cas, une augmentation de l'adhésion lorsque la concentration d'objets augmente.

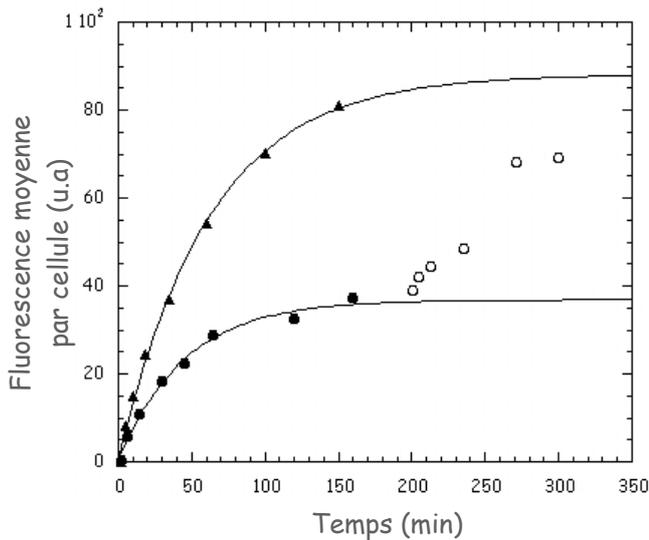


Figure 41 :
 ▲ : cinétique d'adhésion à $C=3.10^{-4}$
 ● : cinétique d'adhésion à $C=10^{-4}$
 ○ : suivi après ajout à $t=200\text{min}$ de colloïdes fluorescents de sorte que C passe de 10^{-4} à 3.10^{-4}

Ce dernier résultat est ainsi incompatible avec un tel modèle ce qui invalide la description et pose à nouveau une contradiction forte entre une notion d'irréversibilité d'une part (décrochage impossible des colloïdes) et de réversibilité (adhésion toujours possible donc récepteurs disponibles) de l'autre.

Néanmoins, l'étude de ce modèle proposé par de Gennes met en lumière l'importance de conserver dans la description une fraction de récepteurs libres, disponibles pour l'accrochage de nouveaux colloïdes. C'est donc bien sur la base d'un équilibre que doit reposer un modèle d'intérêt. Nous allons voir comment la prise en compte d'une succession d'équilibres peut permettre de proposer une interprétation plausible compatible avec la nature pourtant contradictoire des résultats présentés.

III. Modèle d'équilibre à plusieurs étapes successives

III.1. Présentation

L'idée est ici de proposer un mécanisme reposant sur l'équilibre mais en multipliant les étapes. Cette hypothèse est guidée par une description microscopique de la fixation du colloïde. On imagine en effet aisément que plusieurs récepteurs puissent être impliqués dans l'accrochage du colloïde. Comme envisagé dans le modèle proposé par de Gennes, les récepteurs sont en effet libres de diffuser dans la membrane cellulaire. Par ailleurs, plusieurs ligands sont présents sur un colloïde et la sous unité B de la toxine de Shiga utilisée possède plusieurs sites de reconnaissance pour le récepteur Gb3 (se reporter au chapitre 1). **On peut alors imaginer décrire l'adhésion du colloïde comme une succession de N étapes correspondant à la formation successives de N liens ligand/récepteur.**

Chaque étape dans cette description reste contrôlée par des probabilités d'accrochage et de décrochage non nulles: ce sont donc des **équilibres**.

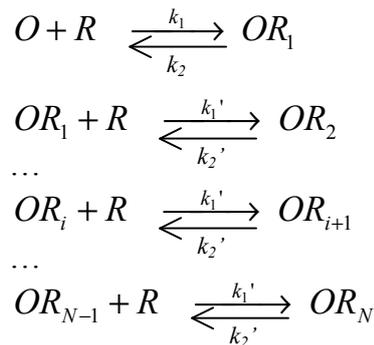
Inspiré des mécanisme de polymérisation, ce modèle repose sur:

- **une première étape d'initiation** où le colloïde crée un premier lien : un complexe OR_1 est formé impliquant un récepteur R (il peut s'agir d'un unique

récepteur Gb3 ou d'un quantum unité). Cette première étape est gérée par un premier jeu de constantes cinétiques k_1 et k_2 qui prennent en compte notamment la rencontre du colloïde (diffusion dans le volume) et de la cellule.

- **une succession de N-1 étapes de propagation** qui permettent le recrutement par diffusion par exemple du 2^{ème}, puis du 3^{ème} jusqu'au N^{ième} récepteurs pour former des complexes OR_2, OR_N, \dots . Nous avons fait le choix d'affecter toutes ces étapes du même jeu de constantes k_1' et k_2' . Cette approximation semble en effet raisonnable dans un premier temps si l'on considère que c'est le même mécanisme microscopique (la diffusion des récepteurs dans la membrane) qui contrôle ces étapes successives.

Ainsi nous représenterons ce mécanisme de la sorte :



Deux points fondamentaux sont à souligner dans la description de ce mécanisme :

- 1. la mesure prend en compte l'ensemble des colloïdes fixés sur la cellule et ce quel que soit le nombre de liens impliqués. On mesure donc la somme de tous les complexes OR_i , i variant de 1 à N.**
- 2. toutes les étapes sont des équilibres : le décrochage de chaque lien est toujours possible et une fraction des récepteurs R reste donc libre.** Néanmoins, compte tenu de la remarque précédente, seul le décrochage total de l'objet est mesurable. Ce sont donc N liens qu'il faut rompre pour mesurer un profil de dissociation d'où une cinétique que l'on suppose nettement ralentie.

Il faut noter que ce type de description s'inspire très largement des mécanismes connus de polymérisation, à ceci près que nous envisageons ici un nombre fini d'étapes (typiquement de 5 à 20).

Précisons ici que nous n'avons pas cherché à résoudre analytiquement ce système (en procédant par exemple à des simplifications) ou à le réduire à une forme équivalente plus simple qui existe peut être. Le parti pris est d'essayer de dégager des comportements en faisant des simulations. Ainsi, en utilisant une résolution numérique du système d'équations différentielles, nous avons essayé de voir dans quelle mesure un modèle de ce type permet de reproduire les effets observés expérimentalement notamment en générant des temps caractéristiques très différents pour le décrochage et la fixation de nouveaux colloïdes.

III.2. Résultats

Tout d'abord, il faut remarquer que cette description permet de décrire des cinétiques d'accrochage dont la saturation évolue en fonction de la concentration. Elle permet en plus de

ralentir le décrochage des objets tout en préservant la possibilité d'en accrocher de nouveaux. Nous allons illustrer ces différents points en nous appuyant sur une simulation numérique.

III.2.1. Effet d'une succession d'étapes sur le décrochage et la fixation des objets

L'objectif est ici de montrer l'effet du nombre d'étapes sur le ralentissement du décrochage des objets.

On se place ici à concentration fixe de colloïdes ; on choisit $c=3.10^{-4}$ qui correspond à la fraction volumique d'objets de référence que nous avons utilisé expérimentalement. On somme alors la quantité d'objets fixés sur la cellules (somme des états OR_i) en fonction du temps et ce pour différents mécanismes impliquant respectivement $N=1, 2, 5, 10$ et 15 étapes. Le graphe ci-dessous illustre le comportement de tels systèmes : en noir sont représentées les cinétiques de formation (dont les plateaux de saturation sont normalisés) et en rouge les profils de dissociation.

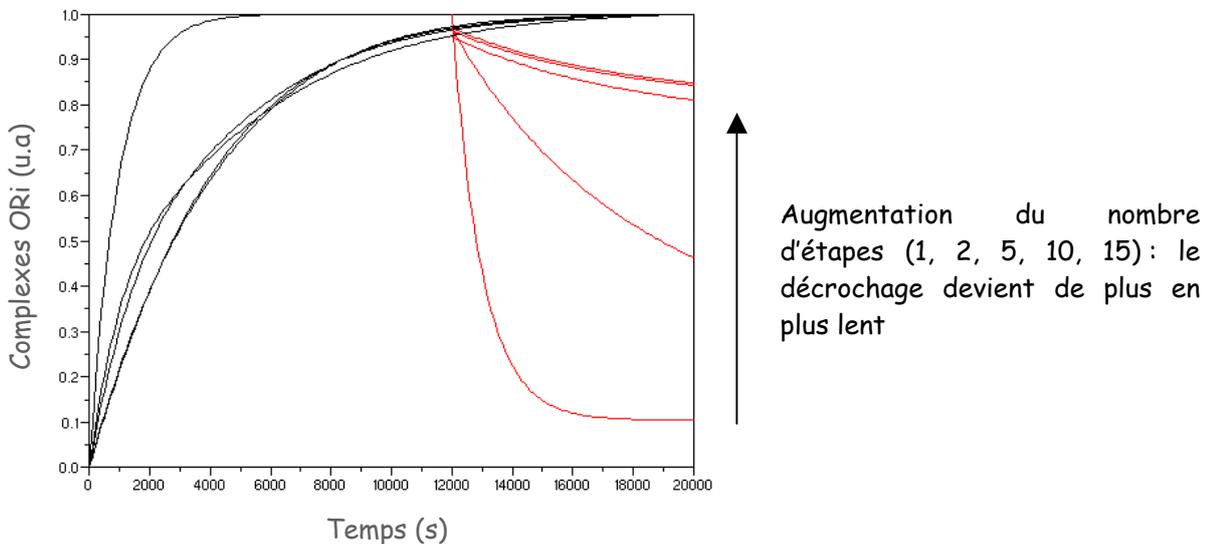


Figure 42 : La simulation est réalisée avec $k_1=0.5s^{-1}c^{-1}$, $k_2=0.001s^{-1}$, $k_1'=1s^{-1}c^{-1}$ et $k_2'=0.1s^{-1}$. La concentration de colloïdes vaut $c=3.10^{-4}$. En noir, sont représentées des cinétiques de formation du complexe OR_i pour N étapes. Elles sont normalisées. A $t=12000s$, la concentration est diminuée d'un facteur 10. Le profil de dissociation est représenté en rouge.

Nous constatons qu'au-delà de deux étapes les temps caractéristiques des cinétiques d'accrochage (en noir) sont du même ordre ($\approx 2000s$) alors que le temps caractéristique du décrochage (en rouge) augmente nettement avec le nombre d'étapes. Ainsi, on observe par exemple une diminution de 20% du signal en environ :

- 500s pour $N=1$
- 2500s pour $N=2$
- 8000s pour $N=5, 10$ et 15 .

En effet, on comprend que le décrochage d'un complexe OR_i nécessite la rupture en chaîne de i liens, mécanisme d'autant plus lent que i est grand.

Qu'en est-il maintenant si, au contraire, on simule une augmentation de la concentration par ajout de nouveaux colloïdes ?

Le graphe ci-dessous représente, en noir les cinétiques de formation des complexes OR_i (normalisées) dans le cas de 5, 10 et 15 étapes et en vert les cinétiques d'accrochage de nouveaux colloïdes ajoutés à $t=12000s$.

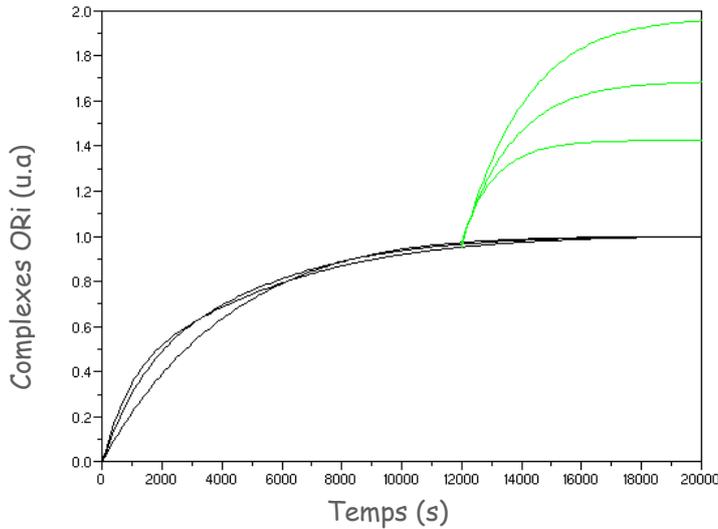


Figure 43 :

La simulation est réalisée avec $k_1=0.5s^{-1}c^{-1}$, $k_2=0.001s^{-1}$, $k_1'=1s^{-1}c^{-1}$ et $k_2'=0.1s^{-1}$. La concentration de colloïdes vaut $c=3.10^{-4}$. En vert, on simule une augmentation d'un facteur 10 dans la concentration d'objets.

Nous observons des cinétiques de fixation toujours relativement rapides (en vert) lorsque de nouveaux colloïdes sont ajoutés. Plus encore, les temps caractéristiques de cette seconde cinétique sont peu modifiés (en comparaison du décrochage) par le nombre d'étapes intervenant dans le mécanisme ; on les évalue à 500s pour $N=1$ et $N=2$ (non représentés sur cette figure) et à 800s pour $N=5$, 1300s pour $N=10$ et 1900s pour $N=15$.

Ainsi, pour résumer, la présence de $N=15$ étapes par exemple permet de ralentir d'un facteur 16 la dissociation tout en préservant la cinétique d'accrochage de nouveaux colloïdes. Ainsi on observe une diminution de 15% du signal en 8000s lors du décrochage alors que ce même signal double dans le même temps lorsque la concentration augmente. Ce cas est d'autant plus intéressant qu'il peut correspondre à une situation plausible ; l'implication d'une quinzaine de récepteurs par colloïde n'apparaît en effet pas aberrant compte tenu de la géométrie du système.

Ainsi, aux vues de ces deux simulations, il semble que ce modèle à étapes successives soit de nature à réconcilier les contributions contradictoires soulevées auparavant : il fait en effet apparaître des temps différents pour le décrochage et l'accrochage de nouveaux objets.

Nous allons maintenant essayer de voir si un tel modèle peut rendre compte de nos mesures expérimentales.

III.2.2. Ajustement manuel des données expérimentales

Le graphe ci-dessous représente les points expérimentaux d'une expérience réalisée en cytométrie de flux. Les lignes correspondent à l'ajustement réalisé par simulation. Il faut souligner qu'il s'agit là d'un ajustement manuel. Par conséquent, l'ensemble des paramètres n'a pas pu être testé ; l'objectif est ici simplement de montrer qu'il est possible de trouver un jeu de paramètres permettant de rendre compte de façon satisfaisante des effets observés expérimentalement.

Globalement en jouant manuellement sur les différents paramètres, nous avons constaté que le nombre N d'étapes agit en pondérant les caractéristiques de la première étape

et notamment en ralentissant le décrochage des objets. Pour cela, on constate que les constantes cinétiques des étapes de propagation doivent satisfaire à certaines conditions :

- l'étape de formation (k_1') doit être suffisamment rapide ; il faut en effet consommer au maximum les complexes de type OR_1 car la fraction restante de ces complexes au moment d'une dilution serait inévitablement décrochée sous l'effet du 1^{er} équilibre (et de k_2 en particulier) qui gère majoritairement la quantité OR_1
- l'étape de dissociation (k_2') ne doit pas être trop lente sous peine de défavoriser de façon importante la notion d'équilibre et l'allure « plateau » des courbes. Le nombre N d'étapes impliquées joue aussi un rôle à cet égard.

Le graphe ci-dessous représente un ajustement obtenu en tenant compte de toutes ces contraintes.

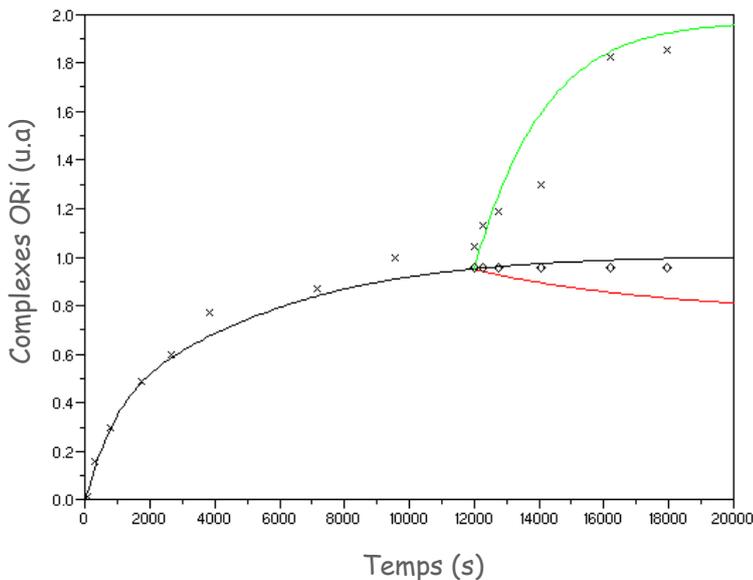


Figure 44 : Ajustement manuel

Points expérimentaux : mesure par cytométrie de flux avec cellules HeLa et colloïdes Shiga

× : Cinétique d'accrochage à $C=3.10^{-4}$ de 0 à 12000s puis augmentation de la concentration à $C=10^{-3}$.

○ : A $t=12000s$, on diminue la concentration par dilution à $C=3.10^{-5}$.

Ajustement manuel réalisé par simulation avec les paramètres :

$k_1=0.5s^{-1}c^{-1}$, $k_2=0.001s^{-1}$, $k_1'=1s^{-1}c^{-1}$ et $k_2'=0.1s^{-1}$ dans le cas 15 étapes.

Ainsi la succession de 15 étapes avec les paramètres suivants $k_1=0.5s^{-1}c^{-1}$, $k_2=0.001s^{-1}$, $k_1'=1s^{-1}c^{-1}$ et $k_2'=0.1s^{-1}$ semble pouvoir rendre compte de nos points expérimentaux. On remarque notamment que les deux cinétiques d'accrochage (en noir et en vert) sont bien représentées.

Concernant le profil de dissociation, la simulation prévoit un léger décrochage (en rouge) que l'on ne mesure pas expérimentalement. Cependant, il est possible que nous ne soyons pas capable de le mesurer. En effet, comme nous l'avons détaillé dans la présentation des résultats, le suivi des dissociations par dilution est délicat dans la mesure où il modifie la fluorescence du milieu environnant obligeant à normaliser les mesures ce qui entraîne nécessairement une perte de précision. Ces contraintes expérimentales pourraient expliquer que nous n'ayons jamais pu mettre en évidence, si il existe, ce léger décrochage.

Un modèle à 15 étapes permet donc d'ajuster nos données. Dans le but de continuer à valider cette interprétation, il reste à regarder ce qu'il en est lorsque l'on modifie la concentration c des objets.

III.2.3. Effet de la concentration de colloïdes dans un modèle à 15 étapes.

Avec les paramètres déterminés précédemment, nous allons simuler ici l'effet de la fraction volumique de colloïdes. Le graphe A de la figure 45 représente les cinétiques d'accrochage obtenues par simulation pour 4 concentrations : $C=10^{-4}$, 3.10^{-4} , 7.10^{-4} et 10^{-3} .

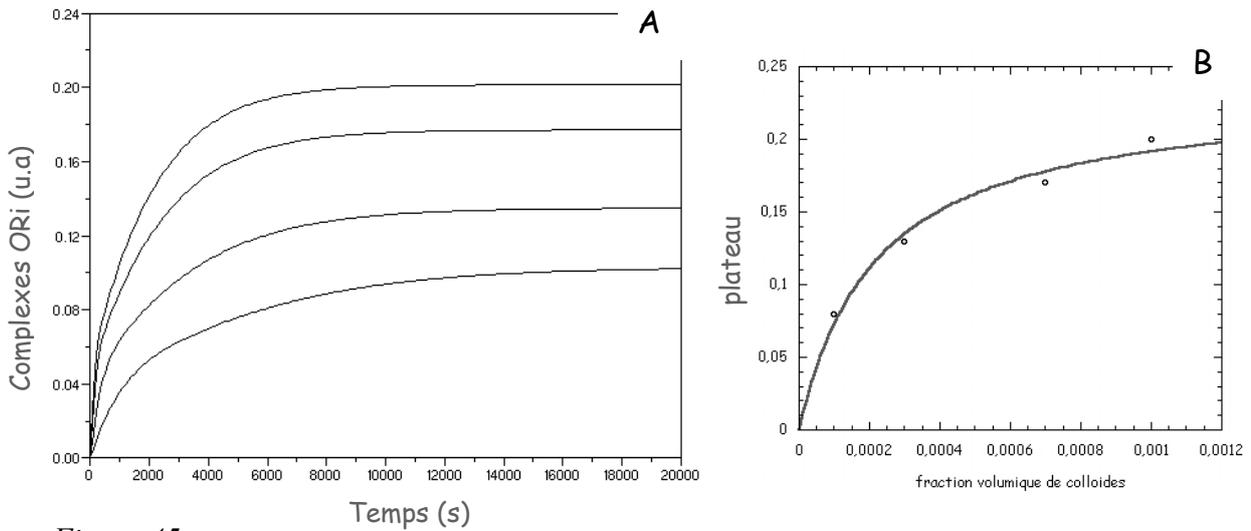


Figure 45 :

A : Simulation de l'adhésion de colloïdes dans un mécanisme à 15 étapes avec $k_1=0.5s^{-1}c^{-1}$, $k_2=0.001s^{-1}$, $k_1'=1s^{-1}c^{-1}$ et $k_2'=0.1s^{-1}$ pour 4 concentrations de bas en haut $c=10^{-4}$, 3.10^{-4} , 7.10^{-4} et 10^{-3}

B : Valeurs des plateaux (○) extraits du graphe A en fonction de c . Ajustement hyperbolique du type $\frac{m_1x}{m_2+x}$

Nous observons (graphe A) des plateaux de saturation qui augmentent avec la concentration de colloïdes. Pour évaluer de quelle façon ils évoluent, traçons la valeur de ces plateaux en fonction de la fraction volumique d'objets (graphe B). Un ajustement hyperbolique permet de rendre compte de l'évolution ce qui est compatible avec nos observations expérimentales. Par analogie avec la démarche suivie expérimentalement, l'ajustement permet par ailleurs de déterminer une constante thermodynamique K_D de 2.10^{-4} (soit 0.08nM) ce qui est environ vingt fois plus faible que ce que nous avons observé expérimentalement (soit 1.5nM).

Néanmoins, le comportement général est tout à fait bien conservé à savoir des plateaux dépendant de la concentration.

III.3. Discussion

Notre démarche n'a pas l'ambition ici d'une démonstration rigoureuse qui nécessiterait un approfondissement qui n'a pas pu être encore effectué.

Il nous semble néanmoins que le modèle proposé constitue une piste très sérieuse qui pourrait contribuer à expliquer des résultats expérimentaux jusque là très étonnants. **Ainsi, nous avons pu nous convaincre de certains comportements parfaitement robustes et notamment de l'effet d'une succession d'étapes qui conduit à ralentir fortement le temps caractéristique de décrochage des objets tout en conservant les caractéristiques générales d'un équilibre.**

Pourtant, l'interprétation présente aussi des limites ; il y a en particulier un compromis subtil qui se joue autour de la probabilité de décrochage dans les étapes de propagation (constante k_2'). Trop faible, elle limite complètement le décrochage des objets mais fait tendre le système vers l'irréversibilité ce qui conduit à la perte de la saturation dépendante de la concentration. Au contraire, trop forte, elle préserve « les plateaux » mais favorise de façon

trop importante le décrochage. Cette remarque souligne à nouveau le paradoxe très dur observé expérimentalement entre équilibre (plateaux) et absence de dissociation des colloïdes et dont le modèle semble rendre compte de façon moins drastique.

De surcroît, pour le moment, l'ajustement réalisé (figure 44) ne concerne qu'une seule courbe cinétique à une concentration C donnée. Le faisceau de courbes (cinétiques à différentes concentrations) que nous avons présenté dans la partie expérimentale (figure 13) n'a pu être encore ajusté de façon satisfaisante. Ce travail reste à poursuivre et il faudra peut être envisager pour cela de modifier les constantes cinétiques tout au long des étapes de propagation ; cette opération pourrait en effet permettre d'affiner l'interprétation en s'ajustant au plus près d'une description microscopique réaliste.

Dans tous les cas, un tel mécanisme demande encore beaucoup de travail pour être compris avec précision ; ce sont de nombreuses simulations qu'il faudra construire et étudier avec méthode pour en comprendre tous les rouages.

III.4. Validité d'une description de type équilibre à une seule étape

Nous avons vu qu'une succession d'équilibres semblait pouvoir rendre compte du comportement observé pour les colloïdes Shiga. Un enchaînement de 15 étapes apparaît particulièrement intéressant dans l'ajustement de nos données.

Pourtant au jour d'aujourd'hui, il paraît difficile de dépouiller l'ensemble de nos résultats expérimentaux avec un modèle de ce type qui reste relativement lourd. L'objectif de cette partie est de voir dans quelle mesure, si on met de côté l'absence de décrochage des objets, une description de type équilibre à une seule étape peut suffire pour interpréter les données cinétiques. **En particulier, à la lumière du modèle présenté ici, quel sens peut-on donner au traitement quantitatif réalisé dans la partie expérimentale précédente?** Les constantes cinétiques et thermodynamiques qui ont été évaluées sont elles légitimes ?

Nous allons essayer ici de répondre à cette question le plus rigoureusement possible.

Tout d'abord en jouant manuellement avec la simulation, nous avons très vite constaté que, dans ce mécanisme multi étapes, c'est la première étape (constantes k_1 et k_2) qui est décisive pour l'allure globale de la courbe. Par ailleurs, l'étude de nos résultats expérimentaux nous a montré qu'une seule exponentielle permettait d'en rendre compte de façon satisfaisante. Cela semble signifier que c'est en effet cette première étape d'initiation qui conditionne l'accrochage même labile de l'objet sur son récepteur.

Pour vérifier ce point, nous allons simuler dans le cadre d'un mécanisme multi étapes l'accrochage des colloïdes en fonction de leur concentration. L'idée est de générer à partir de ces simulations, des séries de points que nous allons ensuite traiter sous forme d'un équilibre simple à une seule étape. Nous pourrions ainsi confronter les deux approches ce qui permettra de déterminer la pertinence d'une interprétation à une seule étape.

Quatre cas vont être traités en parallèle avec respectivement 2, 5, 10 et 15 étapes. Pour chacun, on simule les courbes cinétiques pour quatre concentrations de colloïdes ($c=10^{-4}$, $3 \cdot 10^{-4}$, $7 \cdot 10^{-4}$ et 10^{-3}). Les paramètres suivants sont utilisés dans la simulation :

- $k_1=0.5s^{-1}c^{-1}$ et $k_2=10^{-3}s^{-1}$ pour la première étape d'initiation
- $k_1'=1s^{-1}c^{-1}$ et $k_2'=0.1s^{-1}$ pour les étapes de propagation suivantes

Une dizaine de points sont ensuite extraits de chaque courbe simulée ; ils sont reportés (○) puis ajustés (traits pleins) dans l'hypothèse d'un équilibre à une seule étape par l'expression $m_1 + m_2 \exp(-m_3 x)$.

Sur le modèle de ce que nous avons fait dans la partie expérimentale, on tire de ces ajustements de type mono exponentiel, un temps caractéristique τ pour chaque cinétique. Respectivement pour N=2, 5, 10 et 15 étapes, on peut alors reporter $1/\tau$ en fonction de la fraction volumique c de colloïdes. Dans le cadre d'un équilibre à une étape, ces évolutions sont linéaires de pente k_1 et d'ordonnée à l'origine k_2 .

L'ensemble des graphes, courbes cinétiques et évolution de $1/\tau$ en fonction de la fraction volumique c de colloïdes pour les cas N=2, 5, 10 et 15 est présenté page suivante (figure 46).

Nous remarquons en premier lieu que les constantes déterminées par une approche à une seule étape sont proches de celles utilisées dans la simulation pour l'étape d'initiation ce qui confirme bien que c'est cette étape qui domine le comportement général. Nous observons par ailleurs qu'elles dépendent du nombre d'étapes utilisé dans la simulation pour générer les points. Ainsi la constante k_1 diminue avec le nombre d'étapes (d'un facteur 3 lorsque N passe de 2 à 15 étapes) et la constante k_2 augmente (d'un facteur 2 entre 2 et 15 étapes). On constate enfin que l'accord est d'autant meilleur que le nombre d'étapes est important (N=10 et 15).

Pour résumer, une description comportant par exemple 15 étapes avec les paramètres $k_1=0.5s^{-1}c^{-1}$ et $k_2=10^{-3}s^{-1}$ pour l'étape d'initiation et $k_1'=1s^{-1}c^{-1}$ et $k_2'=0.1s^{-1}$ pour les étapes de propagation est caractérisé par les valeurs apparentes $k_1=0.3s^{-1}c^{-1}$ et $k_2=3.5.10^{-4}s^{-1}$ dans le cas d'une interprétation par un équilibre à une seule étape. On observe ici la correspondance en bon accord entre les deux jeux de constantes k_1 et k_2 déterminés à partir de modèles pourtant différents.

Ainsi, une analyse avec un modèle d'équilibre à une étape rend compte de la 1^{ère} étape du mécanisme multi étapes qui domine le comportement cinétique. Cette remarque permet de valider l'approche quantitative proposée jusqu'à présent. Elle permettra également de justifier que dans les chapitres suivants, un dépouillement de type équilibre à une seule étape sera utilisé pour des raisons de simplicité de traitement.

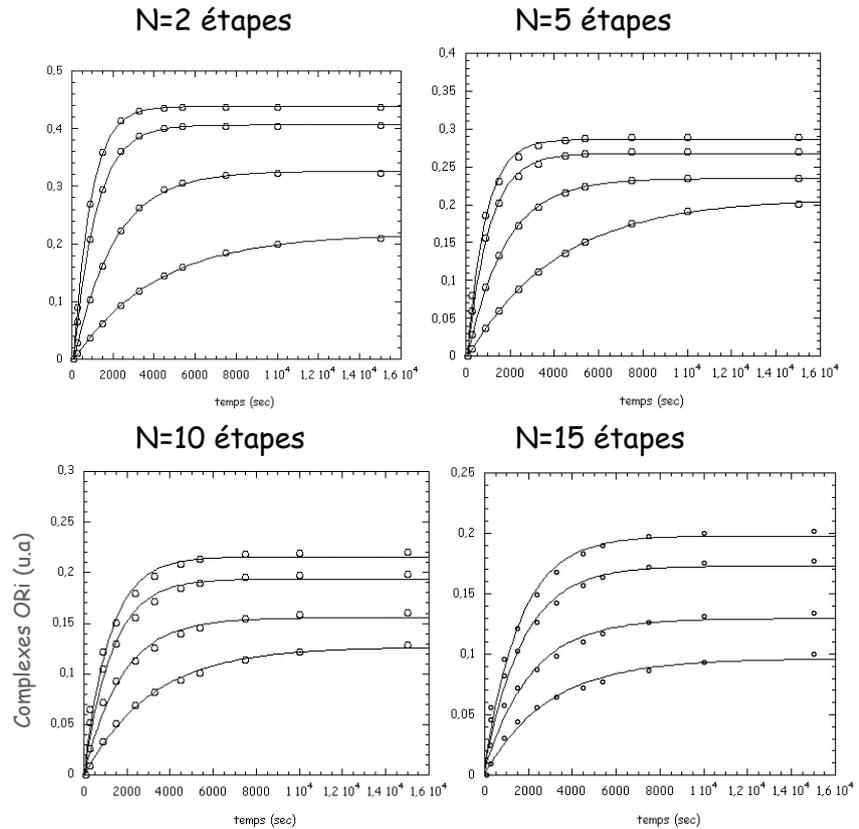
Figure 46 :

Courbes cinétiques

(complexes ORi en fonction du temps pour 4 concentration de colloïdes)

Les points (○) sont extraits de la simulation et les lignes correspondent à un ajustement monoexponentiel (hypothèse équilibre simple à une étape).

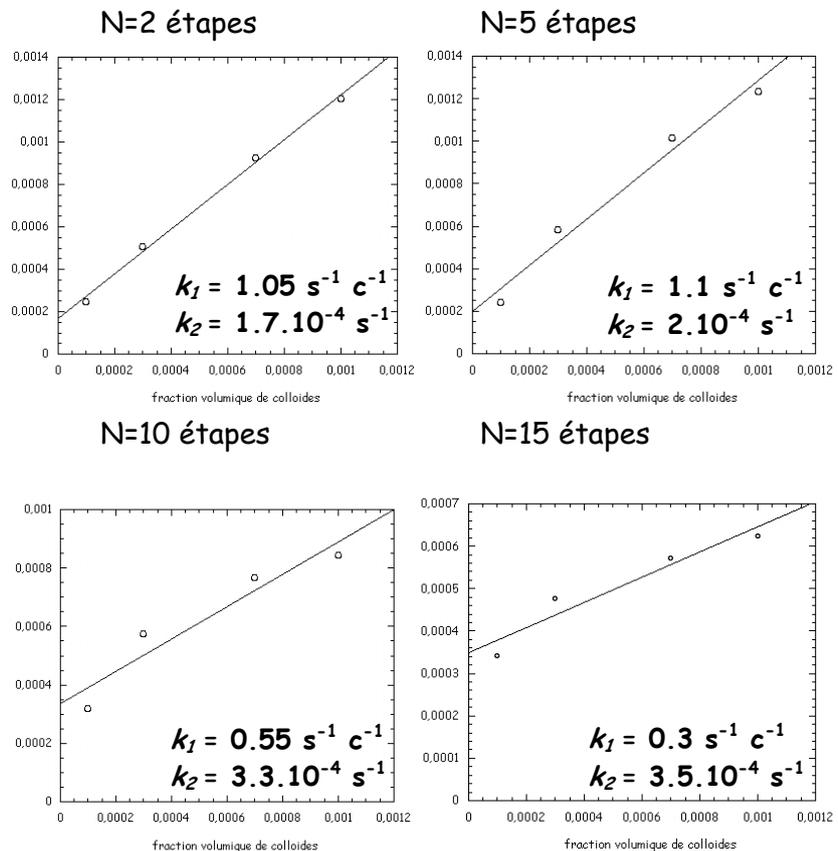
On en extrait un temps caractéristique τ reporté ci-dessous en fonction de la fraction volumique de colloïdes.



Détermination des constantes cinétiques k_1 et k_2

($1/\tau$ en fonction de la concentration de colloïdes)

Les évolutions de $1/\tau$ en fonction de la fraction volumique de colloïdes sont linéaires de pente k_1 et d'ordonnée à l'origine k_2 .



III.5. Conclusion

L'idée majeure à retenir à ce niveau est qu'un mécanisme multi étapes permet en conservant la notion d'équilibre de ralentir fortement le décrochage des objets par la succession des étapes.

Nous avons vu qu'il est possible avec un mécanisme d'une dizaine d'étapes (15 par exemple) de déterminer des constantes cinétiques k_1 , k_2 , k_1' et k_2' telles que :

- toutes les étapes prises individuellement soient des équilibres
- le comportement global des cinétiques présente un plateau de saturation concentration dépendant
- le décrochage rendu très lent par la multiplicité des étapes soit difficilement mesurable sur les échelles de temps considérées (de l'ordre 15% du signal)

Ainsi, il semble que le mécanisme d'adhésion des colloïdes Shiga puisse être décrit comme une succession de plusieurs étapes :

- une première étape de rencontre entre le colloïde et la surface pour la création d'un premier lien.
- les autres étapes (typiquement une dizaine) permettent par recrutement de récepteurs la formation de nouveaux liens entre le colloïde et la surface cellulaire rendant le décrochage de l'objet de plus en plus improbable.

Enfin, nous avons vérifié que l'étape d'initiation d'un tel mécanisme détermine le comportement cinétique global du système et qu'une description à une seule étape (bien qu'inexacte) permet d'en rendre compte avec une bonne précision. Bien entendu, les étapes de propagation sont indispensables pour décrire le comportement complet et notamment l'absence de décrochage des objets mais pour une simple étude des cinétiques d'adhésion, une description à une seule étape pourra suffire dans la suite de ce travail.

Toutefois, il faut souligner à nouveau que cette description doit être approfondie ; des modifications pourront être apportées en modifiant par exemple les valeurs des constantes cinétiques des étapes de propagation. En parallèle, d'autres types d'interprétations pourraient également être développées. En particulier, dans cette partie, nous n'avons envisagé que des mécanismes d'ordre 1. L'exploration de mécanismes d'ordres supérieurs amènerait probablement aussi des réponses intéressantes pour la description du processus d'adhésion de colloïdes sur la membrane cellulaire.

Chapitre 3

Modification des colloïdes : Effets sur l'adhésion

Dans le chapitre précédent, nous avons tenté de décrire de quelle façon une suspension de colloïdes Shiga adhère sur la surface cellulaire. Nous avons étudié l'effet de leur concentration, comparé leur comportement avec celui du ligand Shiga en solution ou avec des colloïdes fonctionnalisés différemment (peptide RGD). Néanmoins, l'objet lui-même n'a été modifié d'aucune façon.

Ici, nous allons nous interroger sur ce point en essayant de comprendre en quoi des modifications de nature physico-chimique influencent l'adhésion de l'objet sur son récepteur membranaire. Nous envisagerons essentiellement deux types de modifications. Dans un premier temps, nous étudierons le cas de colloïdes ciblant auxquels sont ajoutés, pour les rendre « furtifs » des polymères hydrophiles de type PEG. Nous verrons de quelle façon l'adhésion est altérée par la présence de ces polymères ; nous proposerons une piste d'interprétation microscopique et quantitative du phénomène. Dans une seconde partie, nous nous intéresserons à la densité de motifs de ciblage présents sur le colloïde. Alors que nous avons travaillé dans le chapitre précédent dans des conditions où la densité de ligands greffés restait fixe et importante, nous nous interrogerons ici pour évaluer de quelle façon l'adhésion est affectée par ce paramètre.

A. Ajout de polymères à la surface des colloïdes

I. Pourquoi et comment ajouter des polymères ?

I.1. Contexte général

L'enjeu de la vectorisation est de mettre au point des objets capables de délivrer de façon ciblée une molécule d'intérêt thérapeutique. Son principal corollaire est de formuler des vecteurs biocompatibles et ciblant d'une part mais également suffisamment stables pour atteindre leur cible. Leur durée de vie dans l'organisme est à ce titre un point crucial. Ainsi, il a pu être montré que l'ajout de polymères sur des liposomes permet d'augmenter de façon importante leur durée de vie *in vivo*⁵². Des essais de vectorisation ont même été menés avec succès^{53, 54}.

La conjugaison de plusieurs contributions explique ce phénomène. Principalement, les polymères, par répulsion stérique, limitent les interactions du vecteur avec l'environnement. Ils diminuent ainsi l'adsorption des protéines sériques à la surface du colloïde limitant sa capture par les cellules phagocytaires et augmentant son temps de séjour dans la circulation sanguine⁵⁵. Enfin, les dispersions colloïdales sont stabilisées par la présence de polymères, prévenant ainsi l'agrégation de ces objets.

Ce mécanisme qui repose sur une répulsion non spécifique, génère cependant des difficultés dans la mise au point d'un vecteur efficace. En effet, on comprend aisément que la barrière stérique créée par le polymère entre directement en compétition avec la reconnaissance ciblée de la cellule visée. Il y a donc un compromis à trouver entre répulsion stérique (qui permet au vecteur d'atteindre sa cible sans être éliminé) et adhésion spécifique qui nécessite une interaction forte avec le substrat visé pour la délivrance du principe actif.

Cette partie a pour objectif, dans une approche *in vitro*, de mieux comprendre les contributions respectives de ces deux interactions antagonistes. Cette étude permet de façon générale d'envisager les cas de compétition entre adhésion spécifique et répulsion non spécifique. Plus large que la seule étude de vecteurs « furtifs », il s'agit de comprendre en quoi une couche de polymère (qui peut représenter aussi le glycocalyx) modifie l'adhésion de colloïdes sur une surface.

I.2. Le polymère utilisé : un lipide-PEG 2000

L'utilisation, à la surface des colloïdes, de polyéthylène glycol (noté PEG) fait consensus dans la littérature en raison de ces propriétés physico-chimiques favorables:

⁵² ALLEN *et al.* Bioscience Reports. 2002, vol.22, n°2.

⁵³ HUA *et al.*, Biochim. Biophys. Acta. 2001, 78070 :1-13.

⁵⁴ VERMEHREN *et al.* Biochim. Biophys. Acta. 1998, 1373 :27-36.

⁵⁵ VERT and DOMURADO. Biomater. Sci. Polymer Edn. 2000, 11 :1307-1317.

- fortement hydrophile, sa solubilité en milieu aqueux est sans limite pour des températures physiologiques et ce quelque soit le degré de polymérisation.
- il est en bon solvant dans l'eau (paramètre de Flory Huggins $\chi = 0.4-0.5$)
- il est flexible (facteur stérique proche de 1)

D'un point de vue pratique, nombreuses sont les études qui se sont penchées sur la question de son insertion dans des vecteurs synthétiques ; la plupart, menées sur des liposomes (DPPC majoritaire), font état de l'effet des caractéristiques physico-chimiques du lipide PEG utilisé pour leur fonctionnalisation. Elles soulignent plusieurs influences *in vivo*:

- la quantité de PEG incorporé ⁵⁶
- la longueur de la chaîne PEG (le degré de polymérisation)
- l'ancrage lipidique utilisé ⁵⁷

L'ensemble des études s'arrête sur un ancrage lipidique du type DSPE et une longueur de 45 unités monomère (CH₂-CH₂-O) ce qui correspond à une masse PEG de 2000g/mol. La formule de ce lipide-PEG est présentée ci-dessous. C'est celui que nous utiliserons dans la suite.

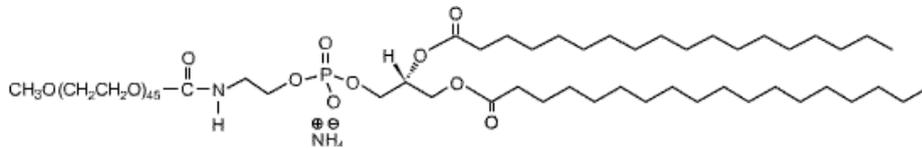


Figure 1 : Formule chimique développée du 1,2 Distearoyl-*sn*-Glycero-3-phosphoethanolamine-*N*-[méthoxy (polyéthylène glycol)-2000].
Il sera noté DSPE-PEG 2000 ou encore plus simplement lipide-PEG

Allen et al ^{*} ont ainsi montré que 31% des liposomes fonctionnalisés avec 5% molaire de ce lipide PEG sont retrouvés dans la circulation 24h après injection tandis que ceux dépourvus de polymères sont dégradés presque en totalité (après capture par le foie et la rate) dès la première heure.

I.3. Formulation de colloïdes pegylés

Nos colloïdes pegylés sont préparés comme décrit dans les annexes 2 et 3. Nous allons détailler ici les notations utilisées qui seront utiles pour décrire la géométrie du système et poursuivre dans ce chapitre.

Formulation de la phase lamellaire : pourcentages massique et molaire de PEG introduits

Le lipide-PEG est introduit en quantité contrôlée lors de la formation de la phase lamellaire. Soit p_{mass} , le pourcentage massique de lipide-PEG introduit dans le mélange de lipides tel que

$$p_{mass} = \frac{m_{PEG}}{m_{lip}} \text{ avec } m_{lip} = m_{PC} + m_{PEG}$$

⁵⁶ KLIBANOV *et al.* FEBS Lett. 1990, 368 :235-237

⁵⁷ YUDA *et al.* Biol. Pharm. Bull. 1996, 19 :1347-1351

* ALLEN *et al.* Bioscience Reports. 2002, vol.22, n°2. [52]

Expérimentalement, les fractions massiques de polymères que nous avons utilisées n'excèdent pas 10% de sorte que la phosphatidylcholine (PC) reste toujours le constituant largement majoritaire de la phase lamellaire. Dans ces conditions, nous pouvons exprimer le pourcentage molaire p_{mol} tel que $p_{mol} = \frac{n_{PEG}}{n_{lip}} \cong p_{mass} \frac{M_{PC}}{M_{PEG}}$ avec M_{PEG} la masse molaire du lipide PEG (2800g/mol) et M_{PC} celle de la lécithine de soja que nous utilisons ($\cong 800$ g/mol). L'application numérique conduit à $p_{mol} \cong 0.28 p_{mass}$.

Dans la gamme de concentration où nous travaillons ($0 \leq p_{mass} \leq 0.1$ soit $0 \leq p_{mol} \leq 0.028$), le polymère ne modifie pas structurellement parlant la phase lamellaire obtenue. Nous avons pu le vérifier en microscopie optique où nous observons des structures biréfringentes caractéristiques d'une organisation lamellaire. D'autre part, la littérature s'est largement intéressée au comportement de tels mélanges de lipides. Belsito *et al*⁵⁸ montre que le mélange DSPC/DSPE-PEG2000 est complètement lamellaire jusqu'à 5mol% de DSPE-PEG 2000 (soit $p_{mol} \leq 0.05$).

Densité surfacique Φ de polymères : relation entre p_{mass} et Φ

Nous notons Φ (en nm^{-2}) la densité surfacique de polymères présents sur le colloïde de surface S , n_{lip} le nombre de lipides sur S et σ la surface occupée par la tête polaire d'un lipide. La surface S du colloïde s'écrit alors : $S = n_{lip} \sigma$.

Par ailleurs, la densité surfacique Φ de polymères présents sur le colloïde est telle que

$$\phi = \frac{n_{PEG}}{S}.$$

En tenant compte des expressions de p_{mass} et de p_{mol} vues précédemment, on obtient

$$\phi = \frac{p_{mol}}{\sigma} \cong p_{mass} \frac{M_{PC}}{M_{PEG} \sigma}$$

Pour un phospholipide $\sigma = 0.5 \text{nm}^2$ ce qui conduit à $\Phi \cong 0.57 p_{mass} \text{nm}^{-2}$.

I.4. Géométrie du système

Intéressons nous dans cette partie, à la géométrie de nos objets fonctionnalisés par des polymères. En particulier, nous allons évaluer les ordres de grandeur des tailles caractéristiques du problème.

I.4.1. Mesure de la taille d'un PEG-2000 en solution

Nous avons mesuré le rayon de ce polymère (PEG-2000) en diffusion dynamique de la lumière, dans l'eau. La mesure a été réalisée au laboratoire avec l'aide de Maryse Maugey. Nous avons travaillé en régime très dilué (solution à 1% molaire dans de l'eau ultra pure après filtration sur membrane 100nm). Nous avons obtenu (mesure à 90°, température ambiante) la fonction d'autocorrélation présentée ci-après. L'ajustement par une monoexponentielle

⁵⁸ BELSITO *et al.* Biophysical Chemistry. 2001, 93, p. 11-22.

permet de déterminer un temps de corrélation égal à $1.1 \cdot 10^{-5} \text{ s}$ *. La valeur du rayon a ainsi été évaluée à $R_{PEG} = 1.5 \text{ nm}$ ($\pm 0.2 \text{ nm}$)

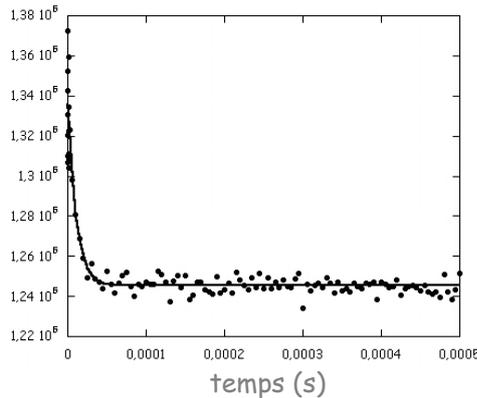


Figure 2 : Fonction d'autocorrélation obtenue en diffusion de la lumière.

L'ajustement par une monoexponentielle donne un temps d'autocorrélation $\tau = 1.1 \cdot 10^{-5} \text{ s}$ ($\pm 10^{-6}$)

Les conditions de la mesure s'apparentent au cas idéal d'une chaîne isolée en solution. Dans ce cas, le paramètre d'échelle pertinent est le rayon de giration R_g qui donne la taille de la pelote statistique formée par une chaîne de N éléments de taille élémentaire a ; N et a sont des grandeurs caractéristiques de la flexibilité de la chaîne. En bon solvant, on a :

$$R_g = \frac{aN^{\frac{3}{5}}}{\sqrt{6}}$$

Pour un PEG 2000, très flexible, on considère N le nombre de monomères $[\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O}]$ et a la taille d'un de ces monomères d'où $N=45$ et $a=0.35 \text{ nm}$ *. Dans ces conditions, on estime alors $R_g = 1.4 \text{ nm}$.

Ces deux valeurs sont en très bon accord. Néanmoins, elles rendent compte du comportement du polymère en solution et non de celui d'un polymère immobilisé sur une surface, cas que nous allons détaillé maintenant.

1.4.2. Cas de polymères greffés sur une surface

La question de polymères greffés sur des surfaces a été largement étudiée dans la littérature. Notamment, de Gennes ⁵⁹ propose deux régimes en fonction de la densité de polymères :

- à basse concentration, le polymère est dans un régime appelé « champignon ». Sous forme de pelote, il peut être décrit à la surface du colloïde comme une demi sphère de rayon R_f (rayon de Flory)
- à forte concentration, le polymère passe en régime « brosse ». Dans cette configuration étirée, il est alors caractérisé par sa longueur L .

Déterminons l'ensemble de ces paramètres.

* Soit τ le temps caractéristique obtenu, D le coefficient de diffusion des objets et q le vecteur d'onde. Les équations de diffusion du rayonnement permettent d'écrire avec n l'indice du milieu, λ la longueur d'onde du laser et θ l'angle d'incidence du rayonnement :

$$q = \frac{4\pi n}{\lambda} \sin\left(\frac{\theta}{2}\right) \text{ et } \frac{1}{\tau} = 2Dq^2. \text{ D'autre part, } D = \frac{kT}{6\pi\eta R} \text{ d'où } R.$$

* ALLEN *et al.* Bioscience Reports. 2002, vol.22, n°2. [52].

⁵⁹ de Gennes. Macromolecules. 1980, 13, p. 1069-1075.

a- Rayon de Flory

Nous avons vu que le milieu aqueux est un bon solvant pour le polyéthylène glycol ($\chi = 0.4-0.5$ et $A_2 > 0$). Dans ces conditions, les chaînes de polymères à la surface du colloïde se déploient et s'organisent en pelotes statistiques dont la taille est donnée par le rayon de Flory R_f qui s'écrit :

$R_f = aN^{\frac{3}{5}}$ avec a est la taille d'un monomère et N le nombre de monomère de la chaîne.
Avec $N=45$ et $a=0.35\text{nm}$, nous estimons $R_f= 3.4\text{nm}$.

b- Estimation de la longueur L du PEG 2000

La longueur totale du lipide-PEG est appréciée à 21nm. Si l'on ne considère que la partie hydrophile il faut retirer à cette valeur la longueur des deux chaînes aliphatiques en C_{18} dont on peut évalué la longueur à 2.4nm (18 liaisons C-C d'environ 0.13nm). Cela conduit à une estimation de la partie hydrophile, à l'extérieur de la membrane du colloïde, de $L=18.5\text{nm}$, valeur qui correspond à l'estimation parallèle de l'enchaînement de 45 monomères polyéthylène-glycol (0.35nm) auxquels il faut ajouter la partie phosphoéthanolamine polaire également.

Nous pouvons donc considérer $L=18.5\text{nm}$.

c- Transition champignon / brosse

Le régime de transition est atteint lorsque toute la surface disponible du colloïde est recouverte par les polymères « champignons » de rayon R_f . Dans la suite, l'ensemble des paramètres calculés à la transition champignon – brosse sera noté par *.

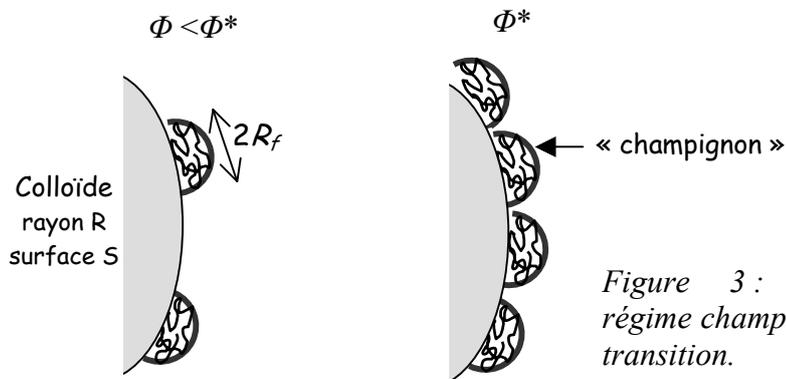


Figure 3 : Représentation du régime champignon et du régime de transition.

Dans ces conditions, si αS représente la surface disponible pour les polymères, on écrit à la transition $\alpha S = \pi R_f^2 n_{PEG}^*$ et $\phi = \phi^* = \frac{\alpha}{\pi R_f^2}$.

En faisant l'application numérique pour un polymère de rayon de Flory $R_f=3.4\text{nm}$, avec $\alpha=1$ (surface greffée par des PEG uniquement, sans ligand notamment) on trouve les caractéristiques suivantes pour la transition :

- densité surfacique de polymères : $\Phi^*=0.027/\text{nm}^2$
- pourcentage massique de polymère par rapport aux lipides : $p_{mass}=0.048=4.8\%$
- pourcentage molaire : $p_{mol}= 0.013=1.3\%$

I.5. Des colloïdes ciblants et pegylés

Après cisaillement de la phase lamellaire et dispersion, nous obtenons des vésicules multilamellaires dont la surface externe se trouve porteuse d'une partie des polymères incorporés *. Par ailleurs, les colloïdes sont rendus ciblants par ajout d'un motif de reconnaissance (sous unité B de la toxine de Shiga par exemple). Nous disposons donc de colloïdes multilamellaires dont la surface est fonctionnalisée par :

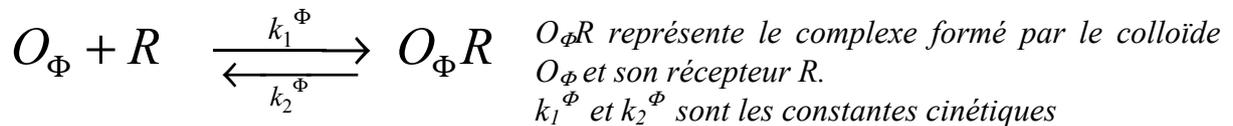
- une densité ψ de ligands. Ψ ($2.10^{-2}/\text{nm}^2$) restera constante dans toute la suite de cette partie consacrée aux polymères. Nous y reviendrons par la suite.
- une densité Φ de polymères.

Dans un premier temps, nous allons tenter de comprendre de quelle façon la densité de polymère affecte l'adhésion du colloïde sur son récepteur cellulaire. Nous essaierons dans un deuxième temps de proposer une interprétation aux évolutions mesurées. Nous présenterons uniquement ici les résultats obtenus avec le système de ciblage utilisant la sous unité B de la toxine de Shiga.

II. Adhésion de colloïdes Shiga-PEG

II.1. Introduction et rappels

Cette partie va s'attacher à l'adhésion de colloïdes Shiga en présence de polymères. Nous avons vu dans le chapitre 2 que le cas de l'accrochage d'objets fonctionnalisés par cette protéine est complexe et fait intervenir, très probablement, une succession de plusieurs étapes. Néanmoins, nous avons pu montrer qu'une description de type équilibre à une seule étape rend compte avec une bonne précision du comportement cinétique de ces colloïdes. Notamment, l'utilisation des constantes cinétiques de l'équilibre, même si elles cachent une description plus complexe et ne représentent que la première étape du mécanisme complet, permettra de comparer les comportements de colloïdes préparés avec différentes densités Φ de PEG. Rappelons rapidement les notations que nous allons utiliser dans cette partie.



Avec C la concentration de colloïdes, on peut écrire pour une densité de polymère Φ donnée :

$$[O_{\Phi}R]^{plateau} = \frac{k_1^{\Phi} R_T C}{k_1^{\Phi} C + k_2^{\Phi}} = \frac{R_T C}{C + K_D^{\Phi}} \quad (1) \quad \text{et} \quad \frac{1}{\tau} = k_1^{\Phi} C + k_2^{\Phi} \quad (2)$$

* Statistiquement, 8% des polymères sont présents sur la face externe du colloïde : le calcul est proposé en annexe 1.

II.2. Effet de la densité de polymères

Ci-dessous, sont présentés les cinétiques d'adhésion (à 4°C sur cellules HeLa) mesurées pour une fraction volumique $C=3.10^{-4}$ de colloïdes Shiga formulés à différents p_{mass} (graphe A). Le graphe B représente le plateau mesuré aux temps longs en fonction de Φ .

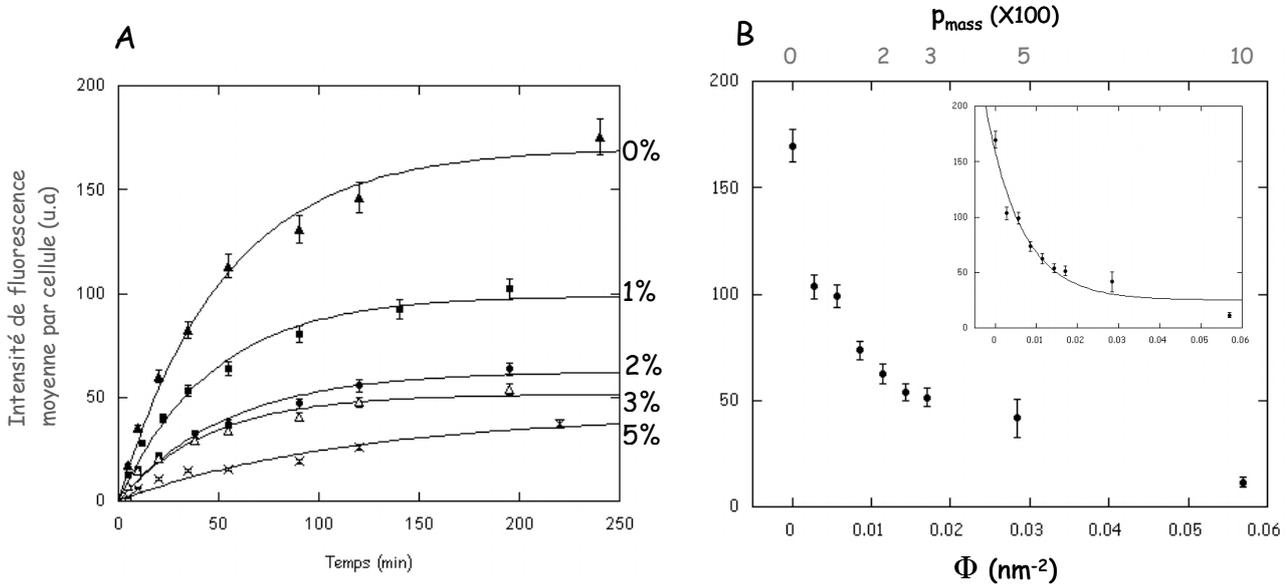


Figure 4 :

A : Cinétiques d'adhésion mesurées pour $C=3.10^{-4}$ pour des colloïdes Shiga préparés avec 0, 1, 2, 3 et 5% en masse de PEG.

B : Valeurs du plateau mesuré aux temps longs en fonction de la densité surfacique de PEG.

Nous constatons que la valeur $[O_{\Phi}R]^{plateau}$ diminue avec la densité de polymères : cela signifie qu'il y a de moins en moins de colloïdes collés sur la surface cellulaire (tous les autres paramètres étant égaux par ailleurs). L'encart représente un ajustement exponentiel de cette décroissance.

Cette observation combinée à l'équation (1) montre que K_D augmente avec Φ . Par contre, il n'est pas possible à ce niveau de décorrélérer les contributions respectives de k_1^{Φ} et k_2^{Φ} à cette évolution. Pour répondre à cette question, il faut mener une étude cinétique plus complète. Ceci fait l'objet d'expériences beaucoup plus longues et délicates à mener. En effet, il faut réaliser une étude en fonction de la concentration C d'objets et ce pour chaque type de colloïdes (à différents Φ).

II.3. Etude cinétique

L'étude en l'absence de PEG a été menée dans le chapitre 2. Nous allons répéter ici les mêmes expériences pour 3 pourcentages de PEG différents ($p_{mass}=0.01, 0.02$ et 0.03). Dans chacun de ces trois cas, la cinétique d'adhésion est mesurée pour 4 concentrations C de colloïdes ($C=10^{-4}, 3.10^{-4}, 6.10^{-4}$ et 10^{-3}). Les trois faisceaux de courbes sont représentés ci-dessous.

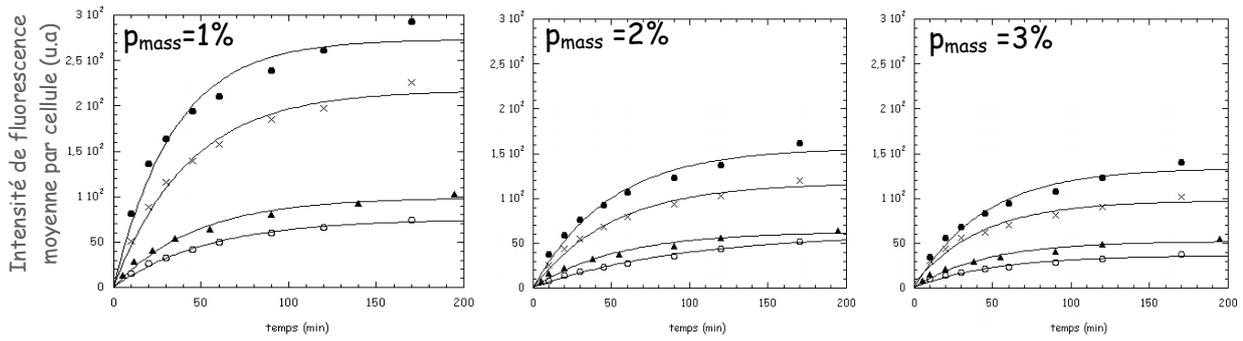


Figure 5 : Cinétiques d'adhésion mesurées pour 3 types de colloïdes Shiga (1%, 2% et 3% PEG). Dans chaque cas, quatre fractions volumiques de colloïdes sont utilisées.

Le traitement de ces courbes (identique à celui présenté au chapitre 2) donne l'évolution de $1/\tau$ en fonction de C et ce pour $p_{mass}=0,1, 2$ et 3% . L'ajustement linéaire (équation (2)) dans les 4 cas (Figure 6) permet de déterminer k_1^Φ et k_2^Φ (Figure 7).

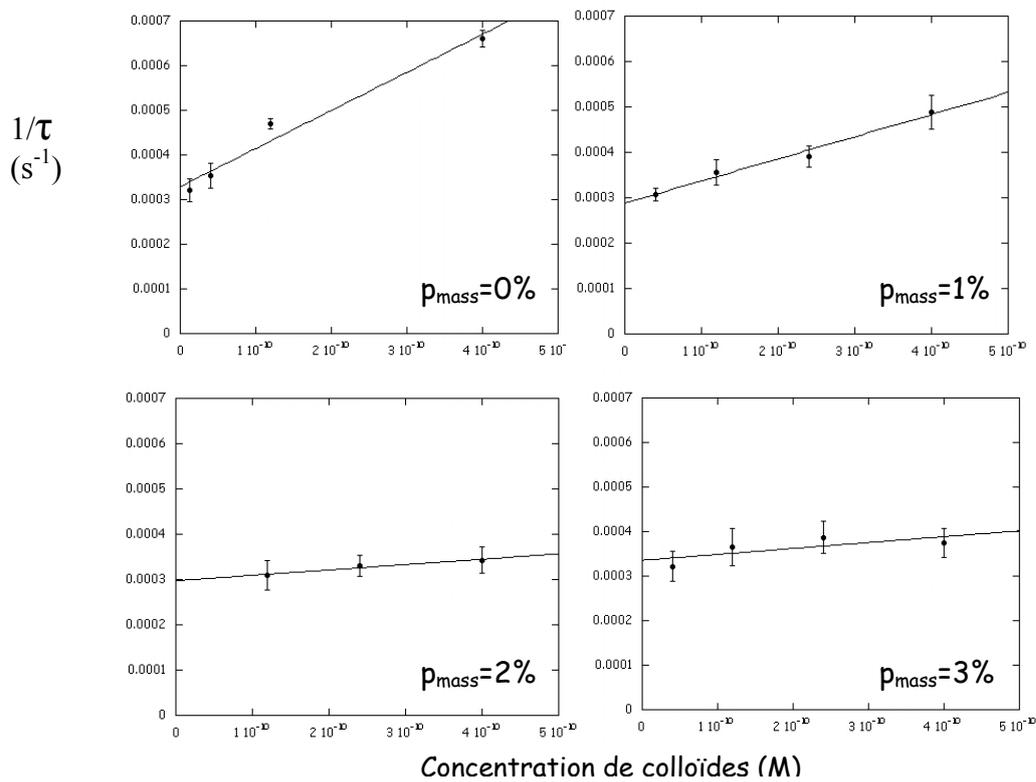


Figure 6 : Evolution de $1/\tau$ en fonction de la concentration de colloïdes pour 4 pourcentages de PEG différents.

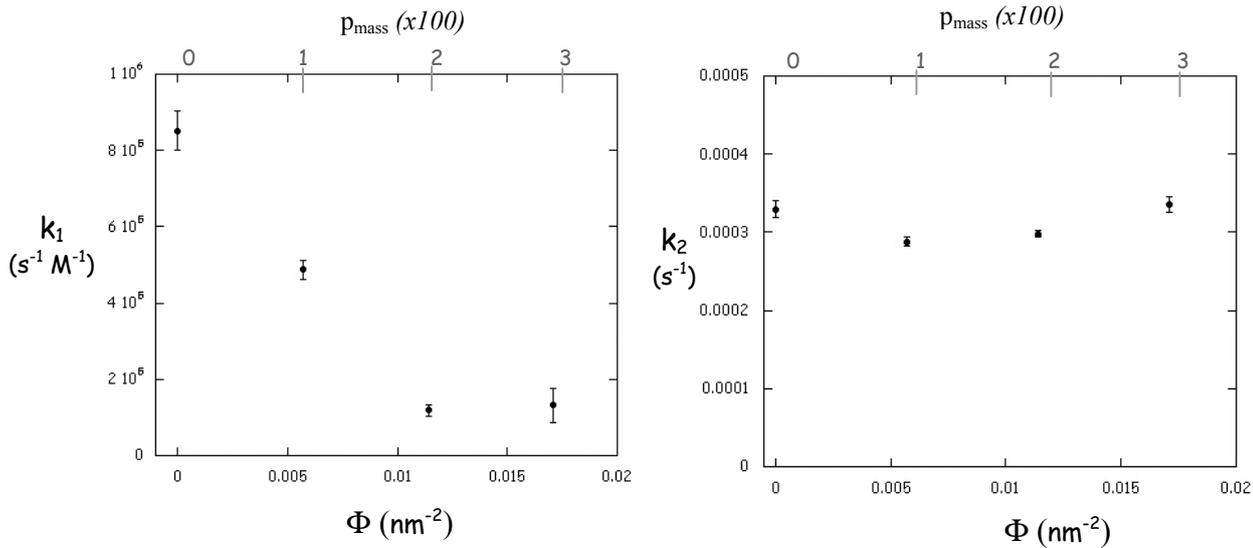


Figure 7 : Evolution de k_1 et de k_2 en fonction de la densité surfacique Φ de PEG.

Deux résultats se dégagent :

- **la constante k_1 diminue lorsque la densité de PEG augmente** : elle est ainsi environ 7 fois plus faible pour des objets préparés avec 3% en masse de PEG qu'avec des colloïdes sans polymère.
- **alors que k_2 reste constant**

Ceci confirme par ailleurs l'augmentation du K_D que nous avons observé dans le paragraphe précédent. Néanmoins, il faut souligner à ce niveau le caractère étonnant de ce résultat. En effet, si il n'est pas surprenant que l'adhésion des objets soit défavorisée en présence de polymères (d'où une diminution de k_1), le fait que seul k_1 soit modifié et que k_2 reste constant n'est pas directement intuitif. Nous allons détailler ce point.

II.4. Représentations en terme de barrières énergétiques

II.4.1. Notion de barrière et d'énergie d'activation

La constante cinétique d'accrochage k_1 s'écrit $k_1 = k_1^0 \exp\left(\frac{-E_1}{kT}\right)$

Elle représente :

- la probabilité de rencontre des deux espèces, ici, colloïdes et cellules. Ce terme, noté k_1^0 , dépend des concentrations et des tailles respectives des deux espèces en présence (coefficient de diffusion, viscosité du milieu...).
- la probabilité de créer une liaison, une fois le contact établi qui s'écrit sous la forme d'un facteur de Boltzman $\exp\left(\frac{-E_1}{kT}\right)$ où E_1 représente l'énergie d'activation du système, k la constante de Boltzman et T la température.

De la même façon, on peut écrire : $k_2 = k_2^0 \exp\left(\frac{-E_2}{kT}\right)$

II.4.2. Evolution de la barrière en fonction de Φ

Connaissant l'évolution de k_1 et de k_2 en fonction de Φ , nous pouvons représenter directement E_1 et E_2 qui s'écrivent respectivement (avec e, e', e'' et e''' des constantes):

$$\frac{E_1(\phi)}{kT} = -\ln(k_1(\phi)) + e \quad \text{et} \quad \frac{E_2(\phi)}{kT} = -\ln(k_2(\phi)) + e'$$

D'autre part, en considérant l'équation (1)*, il est possible de tirer des informations des expériences menées à l'équilibre sans cinétique. En effet, nous avons travaillé dans des conditions telles que $C < K_D$ ($C=0.12\text{nM}$ ici et $K_D=1.5\text{nM}$) de sorte que $k_1 C < k_2$.

Dans ces conditions, et en intégrant le fait que k_2 est indépendant de Φ , la variation du plateau $[O_\phi R]^{plateau}$ avec Φ est directement liée à la variation de $k_1(\Phi)$. En particulier, on peut écrire à une concentration C donnée : $\ln[O_\phi R]^{plateau} = \ln(k_1) + e''$

d'où $\frac{E_1(\phi)}{kT} = -\ln[O_\phi R]^{plateau}(\phi) + e'''$

Sur une échelle logarithmique, on peut donc superposer en fonction de Φ les points $[O_\phi R]^{plateau}$ (figure 4 graphe B) et $k_1(\Phi)$ (figure 7).

Traçons ainsi $-\ln[O_\phi R]^{plateau}$ et $-\ln(k_1)$ (graphe A) et $-\ln(k_2)$ (graphe B) en fonction de Φ . (Les points $-\ln(k_1)$ ont été reportés sur le graphe $-\ln[O_\phi R]^{plateau}$ par translation ; les valeurs des constantes e n'étant pas connues, seule la pente de l'évolution linéaire nous intéresse).

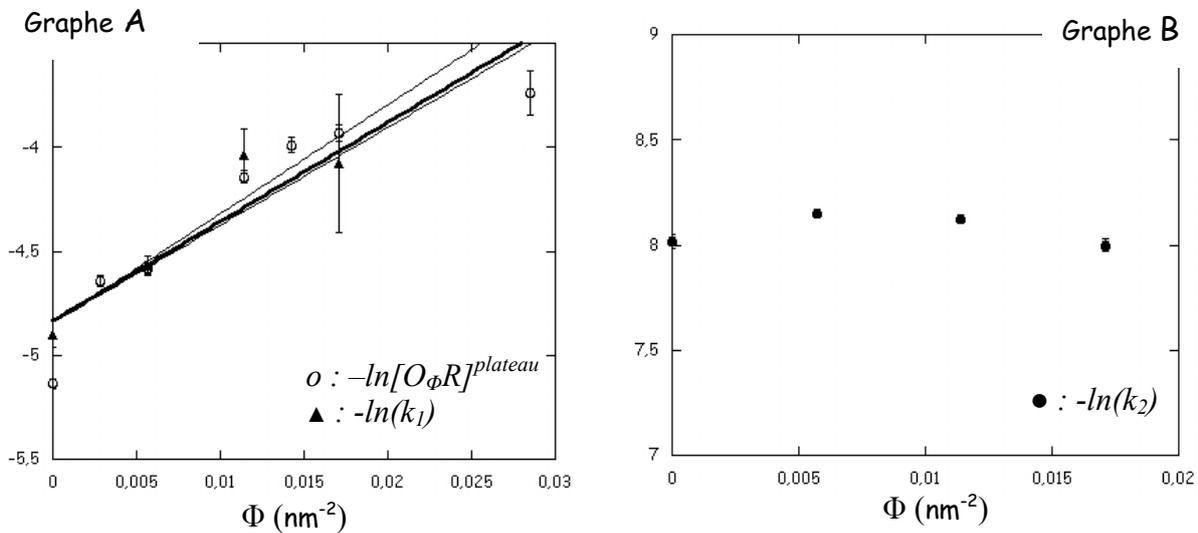


Figure 8 :
A : $-\ln[O_\phi R]^{plateau}$ et $-\ln(k_1)$ en fonction de la densité surfacique Φ de PEG.
B : $-\ln(k_2)$ en fonction de la densité surfacique Φ de PEG.

Sur le graphe A, nous constatons que les évolutions de $-\ln[O_\phi R]^{plateau}$ et de $-\ln(k_1)$ sont linéaires dans les deux cas avec des pentes très proches ; ceci montre la cohérence de nos résultats.

* Équation (1) : $[O_\phi R]^{plateau} = \frac{k_1^\Phi R_T C}{k_1^\Phi C + k_2^\Phi} = \frac{R_T C}{C + K_D}$

Nous pouvons donc dire que $E_1(\phi) = kT\alpha\phi + e$. L'évolution de la barrière est linéaire en fonction de la densité surfacique de PEG ajouté.

Les ajustements permettent d'obtenir des pentes respectives de $47(\pm 9)$ et $52(\pm 14)$. La droite en trait gras représente l'ajustement moyen de l'ensemble des points. Il donne une pente de $48(\pm 7)$. C'est cette dernière valeur, moyenne, que nous prendrons en compte.

D'où $E_1(\phi) = 48(\pm 7)kT\phi + e$

Le graphe B, montre que $-\ln(k_2)$ est constant soit $E_2(\phi) = const$

II.4.3. Représentations schématiques en terme de chemins énergétiques

On considère un état libre (colloïde non fixé) et un état lié (colloïde adhérent sur son récepteur). Le passage de l'état libre vers l'état lié stabilise le système mais nécessite une énergie d'activation. Représentons le chemin énergétique de l'adhésion d'un colloïde ciblant (cas A) et regardons ce qui se passe lorsqu'on ajoute une densité Φ de polymères à la surface de l'objet (cas B).

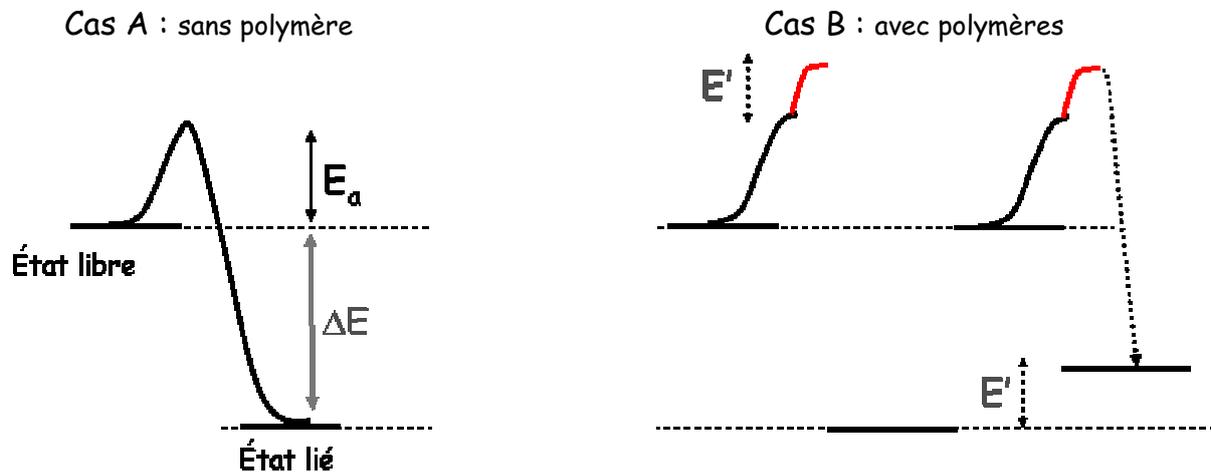


Figure 9 : Comparaison du chemin énergétique de l'adhésion d'un colloïde ciblant sans (A) ou avec (B) des polymères sur sa surface.

Cas A: Lorsqu'il n'y pas de polymère, la constante cinétique d'accrochage k_1 correspond au franchissement d'une barrière d'activation E_1 telle que d'après le schéma ci-dessus, $E_1 = E_a$

La fréquence de décrochage, k_2 , est associée à une barrière E_2 avec $E_2 = E_a + \Delta E$

Cas B : Ajoutons une densité Φ de polymères à la surface des colloïdes. Nous avons vu expérimentalement que cela entraîne une diminution de k_1 ou autrement dit une augmentation de E_1 . On peut alors écrire $E_1(\Phi) = E_a + E'(\Phi)$

Par ailleurs, k_2 ne varie pas ; la barrière E_2 ($E_2 = E_a + \Delta E$) n'est pas modifiée. Par conséquent, l'énergie finale de l'état lié est remontée d'une valeur égale à $E'(\Phi)$.

Ainsi, nos résultats semblent montrer que :

- la barrière d'activation pour l'accrochage d'un colloïde croît linéairement avec la densité de polymères **ajoutés rendant l'adhésion d'un objet de plus en plus défavorable.**

- la barrière liée au décrochage de l'objet reste constante ce qui signifie que **le complexe formé par le colloïde sur son récepteur cellulaire, est sur un niveau énergétique plus élevé et donc moins stable lorsque Φ augmente.**

III. Interprétations proposées

III.1. Quelques considérations géométriques et ordres de grandeurs

III.1.1. Géométrie du système

Avant d'entamer la discussion et pour fixer les idées, nous proposons ici une représentation schématique du contact.

Le schéma ci-dessous, qui se veut à l'échelle autant que possible, représente une fraction de la surface du colloïde fonctionnalisée par :

- une densité $\psi=2.10^{-2}/\text{nm}^2$ de ligands Shiga représenté par des cylindres de hauteur $h_{sh}=2\text{nm}$ et dont la base a un rayon $r_{sh}=3\text{nm}$. Un rapide calcul permet d'estimer que dans cette configuration, 57% de la surface de l'objet est occupée par des ligands Shiga.
- une densité Φ de polymères. Nous avons représenté ici une densité relativement faible de $10^{-2}/\text{nm}^2$ (soit $p_{mass}=1.7\%$). Les polymères se présentent sous forme de demi sphères de rayon $R_f=3.4\text{nm}$ et occupent environ 35% de la surface.

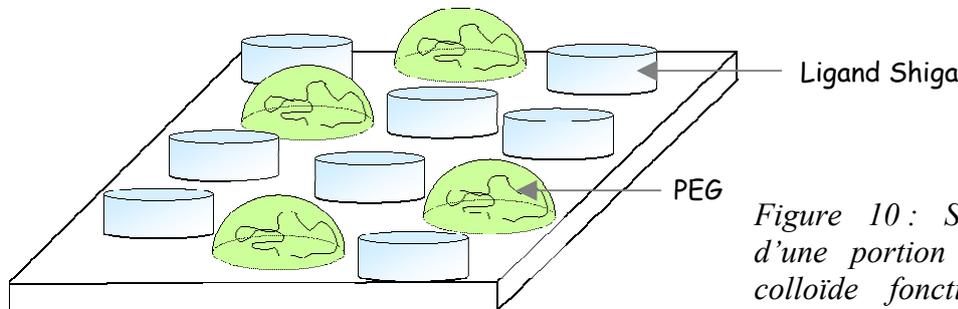


Figure 10 : Schéma à l'échelle d'une portion de la surface du colloïde fonctionnalisé par des ligands Shiga et des PEG.

Aux vues de ce schéma, nous voyons que la fraction de surface non occupée par les ligands Shiga vaut $\alpha = 0.43$. Il faut donc en toute rigueur revenir sur le calcul de la transition champignon / brosse (paragraphe I.4.2). En effet, dans ces conditions, la densité Φ^* est plus faible et vaut $0.012/\text{nm}^2$ (soit $p_{mass}^*=2.1\%$).

III.1.2. Remarque sur l'interaction électrostatique

Nous avons vu que le polymère PEG est ancré sur une structure lipidique de type phosphoéthanolamine. Ce lipide-PEG porte ainsi une charge négative sur le groupement phosphate à pH physiologique ; ce point est d'ailleurs relevé dans la littérature⁶⁰. La surface

⁶⁰ ALLEN *et al.* Bioscience Reports. 2002, vol 22, n°2.

cellulaire étant elle aussi chargée négativement (notamment par la présence de résidus d'acides sialiques), il convient de s'assurer ici que l'augmentation de la barrière décrite auparavant n'est pas simplement due à une répulsion de nature électrostatique.

Pour cela évaluons rapidement la longueur de Debye (qui caractérise la portée de l'interaction) dans le milieu que nous utilisons.

Colloïdes pegylés et cellules sont mis en contact dans un milieu tamponné (« milieu blanc ») qui contient un grand nombre de sels inorganiques. NaCl (6400mg/L) et NaHCO₃ (3700mg/L) sont largement majoritaires de sorte que nous allons considérer le milieu comme un électrolyte de type 1 :1 à une concentration de 0.3M*.

Dans ce cas, la longueur de Debye s'écrit ⁶¹ : $\frac{1}{\kappa} = \frac{0.304}{\sqrt{[electrolyte]}} \text{ nm}$ soit ici $\frac{1}{\kappa} \cong 0.55 \text{ nm}$.

Cette valeur est faible. Notamment, elle est largement inférieure à :

- la distance entre deux chaînes PEG sur l'objet qui vaut 11nm en moyenne pour une densité surfacique de polymères $\Phi=10^{-2}/\text{nm}^2$
- la taille caractéristique de la chaîne PEG elle-même qui vaut $R_F=3.4\text{nm}$

Par conséquent :

- il n'y pas lieu de prendre en compte, au premier ordre, la répulsion électrostatique entre polymères
- l'interaction entre polymères PEG du colloïde et glycocalyx est fortement dominée par les effets stériques.

Ainsi, l'effet de répulsion électrostatique, si il existe, reste de très faible amplitude. Ce sont donc bien les effets stériques qui contrôlent l'adhésion des colloïdes pegylés.

III.2. Interprétation proposée : pression osmotique des polymères

Avant de commencer, il faut noter que l'ambition ici n'est pas de construire un modèle complet interprétant le phénomène. Il s'agit plutôt de proposer quelques pistes d'interprétations plausibles en essayant de les valider par un calcul d'ordre de grandeur raisonnable et un mécanisme microscopique réaliste.

Les résultats expérimentaux que nous avons obtenu montrent que :

- la barrière d'activation E' à franchir pour l'adhésion d'un colloïde augmente linéairement avec Φ (pente de 48kT)
- le niveau énergétique de l'état lié augmente de la même quantité soit $E'(\Phi)$.

Pour les expliquer, nous proposons une interprétation qui prend en compte la pression exercée par les PEG, pression qui s'ajoute à celle du glycocalyx et qui suffit à déstabiliser le système. Nous considérerons ici la membrane plasmique comme fluide et déformable. Pour valider cette approche, nous allons dans un premier temps calculer la pression osmotique exercée à deux dimensions par des polymères sur une surface. Nous verrons ensuite comment interpréter qualitativement cette expression dans une description microscopique de l'adhésion. Enfin, nous verrons que quantitativement cette description est tout à fait compatible avec nos résultats expérimentaux.

* Il s'agit là d'une estimation, qui si elle n'est pas rigoureusement exacte, est largement suffisante pour calculer les ordres de grandeur qui nous intéressent.

⁶¹ Jacob Israelachvili. « Intermolecular and Surface Forces » Academic Press

III.2.1. Calcul de la pression osmotique exercée par une densité Φ de polymères

Soit Φ la densité surfacique (en nm^{-2}) de polymères greffés sur une surface. A 2 dimensions, la pression osmotique latérale π exercée par les chaînes de polymères s'écrit pour $\Phi < \Phi^*$: $\pi = kT\phi$ (*)

L'énergie nécessaire pour écarter les polymères hors d'une surface S vaut alors πS ; elle s'écrit $E(\phi) = kTS\phi$.

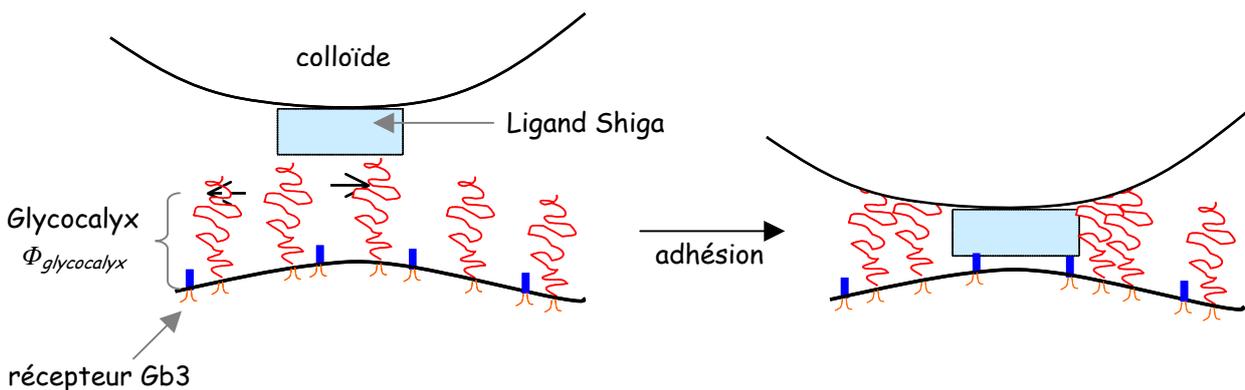
Ainsi dans une interprétation où on considère l'origine de la barrière comme étant liée à la nécessité de déplacer des polymères pour permettre le contact adhésif, on comprend l'évolution linéaire de la barrière observée en fonction de la densité surfacique de polymères.

Remarquons que cette évolution linéaire simple s'applique dans le cas $\Phi < \Phi^*$ que nous considérons. Dans un régime concentré où $\Phi > \Phi^*$, la relation est plus compliquée car il faut considérer l'allongement du polymère qui, en régime « brosse » se comporte comme la superposition de n blocs de taille d . Dans ce cas, la pression osmotique s'applique sur chacun des blocs et s'écrit $\pi \propto \frac{kT}{d^2} n$ ce qui conduit à $\pi \propto kT(\phi)^{\frac{11}{6}}$ (*). L'évolution n'est alors plus linéaire mais suit une loi puissance. Nous ne développerons pas davantage ce cas.

III.2.2. Description microscopique

Nous allons voir comment cette interprétation en terme de pression osmotique peut être décrite au niveau microscopique. Bien entendu, **il s'agit ici de rendre compte uniquement de l'étape d'initiation du mécanisme d'adhésion des colloïdes Shiga**. En effet, nous avons montré dans le chapitre 2 que la description sous forme d'un équilibre simple (et donc les constantes k_1 et k_2 déterminées ici) ne pouvait représenter que cette première étape d'accrochage. Les schémas suivant (figure 11 cas A et B) imagent la description ; mises à part les courbures du colloïde et de la cellule, ils sont à l'échelle.

Figure 11 : **Cas A-** Représentation schématique de l'adhésion de colloïdes Shiga sans PEG.



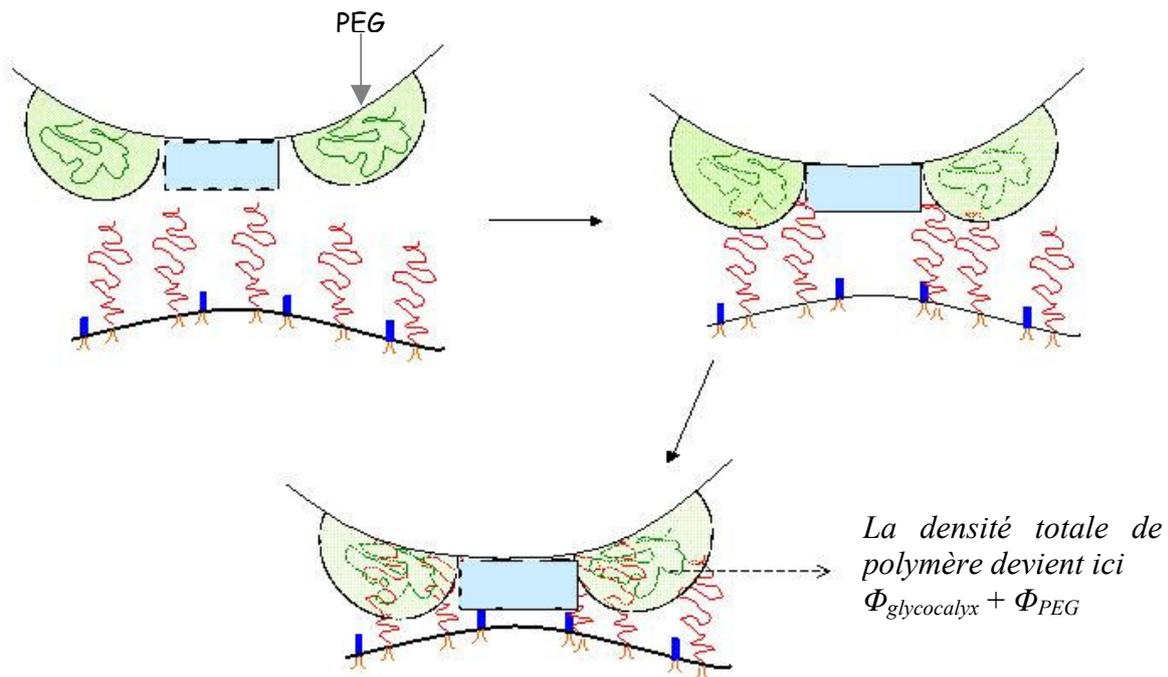
* Il s'agit de l'expression à 2 dimensions de l'équation des gaz parfaits $Pv=nkT$

* En effet, on écrit $n=N/g$ avec N est le nombre de monomères de la chaîne et g le nombre de monomères par blocs. D'autre part, la taille d'un blob s'écrit : $d = g^{\frac{3}{5}}a$ où a est la taille d'un monomère. Enfin, $\phi \propto \frac{1}{d^2}$ d'où, $\pi \propto NkTa^{\frac{5}{3}}(\phi)^{\frac{11}{6}}$. Calcul réalisé avec l'aide de Cyprien Gay.

Nous savons la surface cellulaire couverte de nombreux polysaccharides et de protéines glycosylées. Ces structures extracellulaires, appelées glycocalyx, forment un réseau polymérique de densité $\Phi_{glycocalyx}$ à la surface des cellules.

A l'approche de la surface cellulaire, le ligand Shiga entre en contact avec ce réseau dont il doit modifier la géométrie pour pouvoir se fixer sur son récepteur. La fluidité de la membrane plasmique autorise le déplacement de ces polymères. Leur déplacement (que nous considérons ici plus favorable que leur compression) « coûte » une énergie E_a ; une pression $\pi_{glycocalyx} = kT\phi_{glycocalyx}$ correspondante s'exerce sur le colloïde.

Figure 11 : **Cas B**- Représentation schématique de l'adhésion de colloïdes Shiga en présence de PEG.



Les PEG ajoutés sur l'objet, représentés par les demi-cercles verts, constituent une barrière supplémentaire à franchir. A l'endroit du contact, ils augmentent localement la densité de polymères (densité des polymères du glycocalyx $\Phi_{glycocalyx}$ + densité Φ_{PEG} des PEG). La pression globale exercée à l'endroit du contact devient $\pi_{glycocalyx} + \pi_{PEG} = kT(\phi_{glycocalyx} + \phi_{PEG})$. La barrière d'activation du système augmente alors d'une quantité $E' = kTS\Phi_{PEG}$.

III.2.3. Détermination de la pente

Nous avons vu que la barrière évolue linéairement avec la densité de PEG ajouté. Le calcul en terme de pression osmotique prévoit une pente kTS pour cette évolution. Evaluons sa valeur en nous appuyant sur la description schématique proposée.

La protéine Shiga se présente sous la forme d'un cylindre de hauteur $h_{sh}=2\text{nm}$ et de rayon $r_{sh}=3\text{nm}$. Le polymère PEG, lui, est une demi sphère de rayon $R_f=3.4\text{nm}$. Nous avons donc affaire à des objets dont les tailles sont du même ordre de grandeur. Dans ces conditions, il est raisonnable de penser que la pression π_{PEG} générée par la présence du PEG s'exerce sur la même zone que la pression $\pi_{glycocalyx}$ initiale due au déplacement du glycocalyx seul. S

représente alors la surface du contact adhésif entre le colloïde et la surface cellulaire, soit la surface de la sous unité B de la toxine de Shiga ^{*1}. D'où $S = \pi r_{sh}^2$ et $E'(\phi_{PEG}) = kT\pi r_{sh}^2 \phi_{PEG}$. L'application numérique donne $E'(\phi_{PEG}) = 28kT\phi_{PEG}$

Remarquons que cette pente théorique estimée à 28kT est du même ordre de grandeur que celle que nous avons observé expérimentalement (48±7 kT).

III.3. Discussion

Ainsi, l'hypothèse d'une pression osmotique qui augmente avec la présence des PEG à la surface des colloïdes permet de rendre compte de nos résultats :

- **d'un point de vue qualitatif tout d'abord : cette interprétation conduit à une évolution linéaire de la barrière avec Φ que nous observons expérimentalement (décroissance exponentielle de la constante cinétique k_I et croissance linéaire de la barrière E_I avec Φ).** Nous verrons dans le chapitre suivant que ce comportement a également été observé dans le cas des colloïdes RGD ce qui souligne le caractère robuste de ce résultat.
- **d'un point de vue quantitatif : la pente théorique calculée (28kT) est du même ordre de grandeur que celle que nous mesurons (48±7 kT)**

Expérimentalement, nous avons mesuré que l'énergie supplémentaire E' en fonction de Φ s'écrit : $E' = 48kT\Phi$. De plus, nous avons vu que l'ajout de $p_{mass} \cong 1.5\%$ de PEG, (soit $\Phi \cong 8.5 \cdot 10^{-3} \text{ nm}^{-2}$) entraîne une diminution d'un facteur 2 de la fluorescence des cellules et donc de l'adhésion des colloïdes ^{*2}. Cela correspond à une augmentation de l'énergie E' de 0.4kT. Ce rapide calcul montre qu'une augmentation E' même faible de la barrière a un gros effet sur l'adhésion des colloïdes ; en effet, l'accrochage des colloïdes est gouverné par la constante thermodynamique K_D qui s'écrit comme $\exp(E')$.

A cet égard, la mesure de l'adhésion permet d'observer des modifications même peu importantes du colloïde. Plus généralement encore, la mesure est un moyen de mettre en évidence des différences dans les densités de polymères présents dans l'environnement du contact objet – cellule (qu'il s'agisse de polymères greffés du côté du colloïde ou de polymères naturels du glycocalyx sur la membrane cellulaire). Dans ce contexte, on pourrait imaginer « sonder » ainsi le profil énergétique de la surface cellulaire et ce sur de petites échelles.

Dans la continuité de cette étude, nous allons maintenant modifier la surface du colloïde en changeant un autre paramètre. Jusqu'à présent en effet, nous avons travaillé à une densité surfacique ψ de ligands fixée. Quelle est l'influence de ce paramètre sur l'adhésion des colloïdes ? Sommes nous capables de mesurer des différences par cytométrie de flux ? Comment peut-on les interpréter dans un modèle d'accrochage d'objets sur une surface ? Nous présentons ici succinctement quelques effets.

^{*1} On considère ici un seul site d'accrochage ; ceci est raisonnable compte tenu du fait que nous travaillons dans cette partie dans le cadre d'un modèle d'équilibre à une seule étape, qui nous l'avons vu (chapitre 2) ne rend compte que de la première étape d'initiation (formation du premier complexe OR qui n'implique en théorie qu'un seul lien).

^{*2} cf figure 4 p 106

B. Variation de la densité de ligands à la surface des colloïdes Shiga

I. Etude cinétique

I.1. Densité surfacique de ligands Shiga

La fonctionnalisation de la surface du colloïde est réalisée par couplage de la cystéine libre de la protéine sur une ancre lipidique réactive portant une fonction maléimide. Ce greffage de nature covalente a été explicité dans le chapitre 1 et précisé en annexe 4. Nous considérons ici la réaction totale de telle sorte que le pourcentage massique d'ancre maléimide f_{mass} introduit lors de la préparation de la phase lamellaire est directement relié à la densité surfacique ψ de ligands Shiga sur l'objet colloïdal. On peut définir :

$$f_{mass} = \frac{m_{ancre}}{m_{lip}} \quad \text{et} \quad f_{mol} = \frac{n_{ancre}}{n_{lip}} \cong f_{mass} \frac{M_{PC}}{M_{ancre}}$$

L'application numérique donne avec $M_{ancre}=980\text{g/mol}$ et $M_{PC}=800\text{g/mol}$, $f_{mol} = 0.82 f_{mass}$.

Par ailleurs, la densité surfacique ψ_{ancre} d'ancres maléimide s'exprime $\psi_{ancre} = \frac{n_{ancre}}{S}$. La surface S du colloïde s'écrit : $S = n_{lip} \sigma$. En tenant compte des expressions de f_{mass} et de f_{mol} vues précédemment, on obtient :

$$\psi_{ancre} = \frac{f_{mol}}{\sigma} \cong f_{mass} \frac{M_{PC}}{M_{ancre} \sigma}$$

De plus, n'oublions pas que la sous unité B de la toxine de Shiga se présente sous forme d'un pentamère. Chaque monomère possède une cystéine libre susceptible de se lier à une ancre maléimide de sorte que $\psi_{ancre} = 5\psi$ avec ψ la densité surfacique de ligands Shiga en nm^{-2} .

$$\text{D'où } \psi = f_{mass} \frac{M_{PC}}{5M_{ancre} \sigma}$$

Avec σ la surface de la tête polaire d'un phospholipide, soit 0.5nm^2 , on trouve $\psi = 0.33 f_{mass}$

I.2. Résultats

L'expérience est menée à 4°C sur des cellules HeLa mises en contact avec une concentration C de colloïdes constante ($C=3.10^{-4}$). Le suivi cinétique est réalisé par cytométrie de flux suivant le protocole largement détaillé au chapitre 2. L'étude, dont les résultats sont résumés ci-après, est menée sur une large gamme de densités de ligands, f_{mass}

variant de 0 à 23%. L'encart représente une première série de mesures effectuées pour $f_{mass}=2, 7, 15$ et 23% (soit ψ variant de 7.10^{-3} à $8.10^{-2}/nm^{-2}$). Nous constatons que l'adhésion n'est pas modifiée dans cette gamme. Le plateau et le temps caractéristique des cinétiques restent constants. L'expérience est reconduite pour des pourcentages nettement plus faibles de 0.08, 0.4 et 1.5%. Dans ce cas, des modifications importantes de la cinétique d'adhésion des objets sont mesurables. Cela révèle qu'il s'agit de la zone d'intérêt pour étudier l'influence de la densité de ligands.

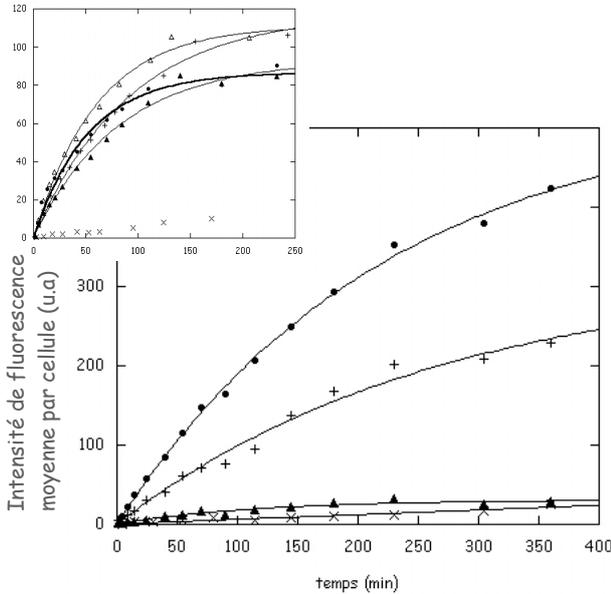


Figure 12 : Cinétique d'adhésion de colloïdes Shiga à $C=3.10^{-4}$ pour ψ variable

f_{mass}	$\psi \text{ nm}^{-2}$
×	0
▲	$2.5.10^{-4}$
+	$1.25.10^{-3}$
●	5.10^{-3}

L'encart représente la même expérience pour $f_{mass}=2, 7.5$ (trait épais), 15 et 23%. Il n'y a pas de différence significative entre ces courbes.

Dans cette gamme, nous n'avons pu mener qu'un nombre limité d'expériences. Toutefois, nous pouvons tenter de détailler cette évolution en traçant le plateau obtenu en fonction de ψ .

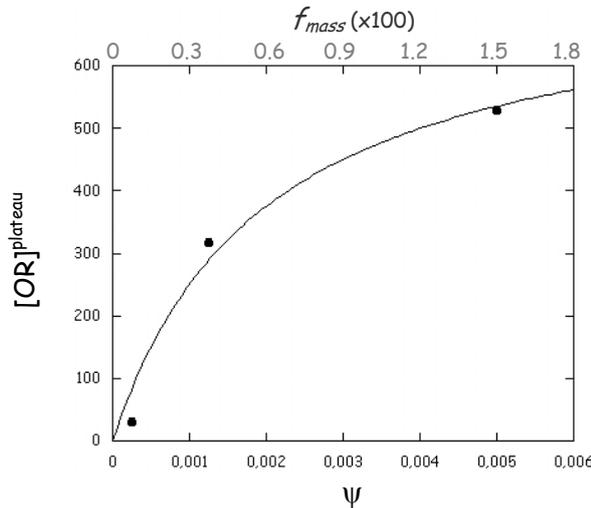


Figure 13 : Evolution du plateau mesuré aux temps longs en fonction de la densité surfacique ψ de ligands Shiga. Ajustement hyperbolique.

Nous constatons que dans cette gamme de concentration ($\psi < 5.10^{-3} nm^{-2}$) l'adhésion augmente avec la densité de ligands. Par ailleurs nous avons observé une saturation de l'adhésion pour $\psi > 7.10^{-3} nm^{-2}$ (encart figure 12). Compte-tenu de ces remarques, il est raisonnable de proposer un ajustement hyperbolique des données de la figure 13. Cette ajustement (qui correspond à une hypothèse d'équilibre que nous savons inexacte mais suffisante) permet d'extraire une valeur qui correspond à un K_D équivalent ; il est estimé à $\psi = 2.10^{-3} / nm^2$ soit $f_{mass} = 0.6\%$.

II. Discussion

II.1. Interprétation des résultats

II.1.1. Géométrie du système et ordre de grandeur

Sur la surface S d'un colloïde de rayon $R=150\text{nm}$ fonctionnalisé par une densité ψ de ligands Shiga, nous avons $n_{\text{Shiga}} = \psi 4\pi R^2$ ligands disponibles. Pourtant, géométriquement, seule une partie de ces ligands peut entrer en contact avec la surface cellulaire. Soit Z l'aire de contact entre un colloïde de rayon R fonctionnalisé par la sous unité B de la toxine de Shiga ($h_{sh}=2\text{nm}$) et la surface cellulaire (plane).

Nous avons choisi de la définir comme la section du colloïde sur la hauteur h_{sh} (figure 12-a). Elle s'écrit alors $Z = \pi(2Rh_{sh} - h_{sh}^2)$ (figure 12- b). L'application numérique conduit dans notre situation à $Z=1900\text{nm}^2$

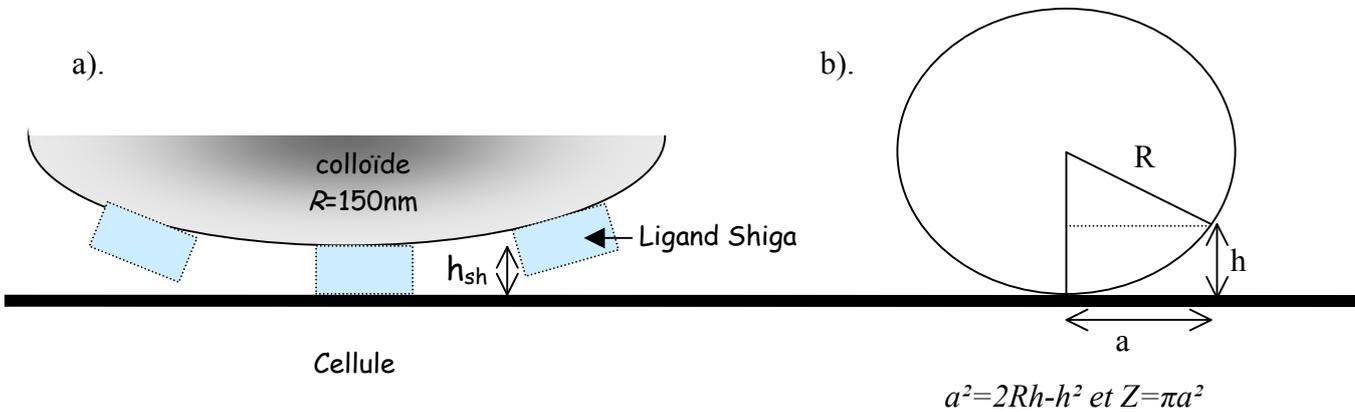


Figure 14 : Représentations géométriques de la zone de contact entre un colloïde Shiga et la surface cellulaire.

Ainsi, dans cette zone, nous avons typiquement $Z\psi$ ligands disponibles pour permettre l'adhésion sur les récepteurs cellulaires.

Dans cette même zone, calculons la densité de récepteurs Gb3. Une cellule HeLa de rayon R_{cell} (environ $7\mu\text{m}$) compte en moyenne 5.10^7 récepteurs Gb3*. La densité de récepteurs vaut alors $8.10^{-2}/\text{nm}^2$ ce qui correspond à 150 récepteurs disponibles dans la zone de contact Z . Il faut noter que ce calcul ne tient pas compte de l'organisation des Gb3 que nous savons par ailleurs concentrés dans des microdomaines (« rafts »). Nous considérons donc ici une répartition homogène des récepteurs Gb3 sur l'ensemble de la surface cellulaire. Par ailleurs, ligands et récepteurs sont susceptibles de diffuser librement vers la zone de contact Z . Une description complète devrait considérer l'ensemble de ces éléments.

II.1.2. Interprétation

Nous avons mesuré un K_D équivalent qui vaut $\psi = 2.10^{-3} / \text{nm}^2$ (soit $f_{\text{mass}} = 0.6\%$). Cela signifie que pour $\psi > 4.10^{-3} \text{nm}^{-2}$, l'adhésion n'est plus affectée par ajout de nouveaux ligands (saturation). Nous noterons cette valeur ψ_{sat} . Compte tenu de la géométrie du système

* Cette mesure a été réalisée par l'équipe de Ludger Johannes (UMR 144 – Institut Curie)

que nous venons de détailler, nous pouvons alors évaluer que le K_D correspond à 4 ligands Shiga en moyenne dans la zone de contact Z , la saturation complète étant atteinte pour ψ_{sat} soit 8 ligands sur la même surface Z .

Dans ce cadre, ce sont donc au maximum de l'ordre d'une dizaine de ligands Shiga par colloïde qui peuvent se lier avec les 150 récepteurs présents dans la zone Z . Ceci correspondrait à une quinzaine de récepteurs par colloïde. Il s'agit là d'un rapide calcul d'ordre de grandeur à considérer avec précaution, en particulier parce qu'il repose sur des expériences qu'il faudrait reproduire. Néanmoins, il renforce encore l'idée d'un mécanisme multi étapes impliquant plusieurs récepteurs.

II.2. Discussion

Dans le chapitre 2, nous avons travaillé avec une densité ψ de ligands fixe (les objets étaient préparés avec $\psi=2.10^{-2} \text{ nm}^{-2}$). Dans ce régime saturé en ligands Shiga, les effets mis en évidence concernent uniquement la concentration C de colloïdes. L'étude cinétique en fonction de C a ainsi permis de déterminer une constante d'équilibre thermodynamique K_D exprimée en molaire d'objets.

Dans le paragraphe précédent, nous avons au contraire fixé la concentration C de colloïdes et fait varier la densité ψ de ligands Shiga par objet. La concentration de colloïdes restant fixe, **l'effet s'interprète alors localement au niveau de chaque colloïde**. A cette échelle, l'interaction se décrit naturellement comme celle de ligands L en quantité variable avec des récepteurs. Elle peut alors s'écrire comme un équilibre classique du type $L + R \leftrightarrow LR$. On s'attend donc nécessairement à observer un régime linéaire où l'adhésion augmente avec ψ suivi d'une saturation fixée par la géométrie du système (seul un nombre fini de ligands par colloïde peut se lier).

Le K_D de ce nouvel équilibre a pu être déterminé ; il s'exprime en terme de densité surfacique de ligands par objet et est compatible avec l'idée déjà évoquée d'une dizaine de liens impliqués dans la fixation d'un colloïde. Notons néanmoins que nous mesurons expérimentalement toujours la formation du complexe objet/récepteur (OR) et non le nombre de liens ligand/récepteur (LR).

Il faut souligner ici que la prise en compte simultanée des contributions macroscopiques (concentration C de colloïdes) et microscopiques (densité ψ de ligands par colloïde) n'est pas simple. Une description complète doit en effet prendre en compte :

- la diffusion des récepteurs sur la membrane cellulaire
- la concentration C variable de colloïdes
- la diffusion des ligands L sur le colloïde
- la concentration ψ variable de ligands sur chacun des objets.

Nous n'avons pas réussi de façon évidente pour le moment à proposer une écriture générale permettant le couplage entre la cinétique d'accrochage des objets et la cinétique de diffusion des récepteurs. Ce travail devra être poursuivi.

Chapitre 4

Cas des colloïdes RGD :

Adhésion

Ajout de polymères

Modification de la longueur du ligand

Jusqu'à présent, nous nous sommes intéressés à l'adhésion sur le récepteur Gb3 de colloïdes fonctionnalisés par la sous unité B de la toxine de Shiga. Ce système s'est en effet révélé bien adapté à notre étude, permettant le suivi des cinétiques d'accrochage. Il nous a ainsi été possible de mettre en évidence plusieurs paramètres contrôlant l'adhésion des objets. Nous allons maintenant consacrer ce nouveau chapitre à l'étude d'un autre type de ciblage reposant sur la reconnaissance entre une séquence peptidique **GRGDSP** et l'intégrine $\alpha_v\beta_3$. Ce système, chronologiquement le premier que nous ayons étudié, a fait l'objet de nombreuses expériences ; pourtant, l'utilisation de ce couple ligand/récepteur s'est révélée moins appropriée quant au sujet de notre étude. Ce sont donc des résultats plus qualitatifs et moins fouillés que nous présenterons ici. Néanmoins, nous verrons qu'il est possible de les interpréter dans un cadre commun avec ceux obtenus sur le couple Shiga/Gb3.

Dans une première partie, nous décrirons l'adhésion de ces colloïdes RGD. Nous soulignerons notamment la nécessité d'utiliser un protocole particulier (une centrifugation) pour permettre l'adhésion de ces objets. Comme nous l'avons fait pour les colloïdes Shiga, nous présenterons ensuite quelques résultats obtenus avec ces objets RGD en présence de polymères PEG. Enfin, nous envisagerons le cas de ligands RGD de longueurs variables.

I. Adhésion des colloïdes RGD

I.1. Nécessité de la centrifugation

Nous avons déjà vu dans le chapitre 2 consacré à l'étude cinétique qu'il n'est pas possible de suivre la cinétique d'adhésion de colloïdes RGD sur des temps raisonnables. L'ajout de manganèse permet en activant les intégrines d'obtenir des cinétiques mesurables ; toutefois, ces cations divalents modifient également la nature de l'interaction dont la spécificité n'est plus validée. Cependant, la centrifugation des objets et des cellules lors du contact permet d'obtenir des adhésions fortes et spécifiques mesurées après 4 heures d'incubation à 37°C*.

Dans ce contexte, nous avons décidé de mener les expériences sur les colloïdes RGD en suivant ce protocole de centrifugation mais en tentant de mieux comprendre l'importance de cette étape et d'en mesurer les effets sur l'adhésion.

I.1.1. Effets de la centrifugation

Tout d'abord, dans le cas des colloïdes RGD, la centrifugation modifie les profils des distributions de fluorescence obtenus en cytométrie de flux. Elle fait en effet apparaître un second pic aux fortes fluorescences comme le montre la figure ci-après, effet qu'il faut prendre en compte pour le traitement statistique des données.

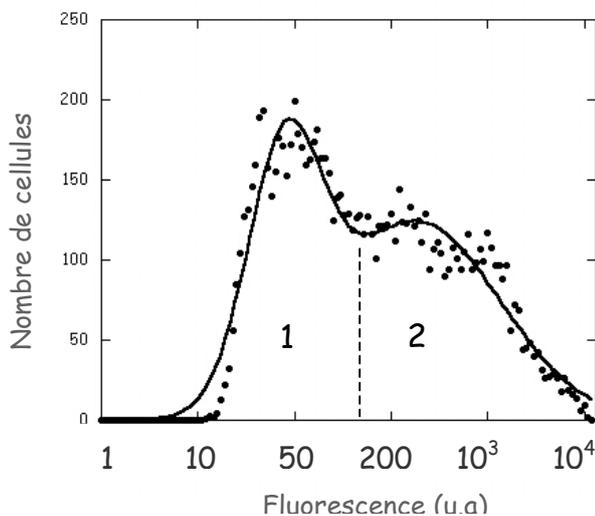


Figure 1 : Distribution de fluorescence obtenue pour une population de cellules HeLa (7.10^5 /mL) mises en contact avec des colloïdes RGD ($C=5.10^{-4}$) fluorescents.

Le contact se fait dans des puits (plaque 24 puits) à $t=0$ puis l'ensemble est centrifugé (400g, 10min, 4°C) et placé à 37°C. La mesure est réalisée après 4h d'incubation. L'ajustement correspond à la somme de deux gaussiennes.

Nous observons sur cette distribution deux populations de cellules :

- une population de faible fluorescence (**1**) : ces cellules n'ont pas ou peu capté de colloïdes
- une population fortement fluorescente (**2**) pour laquelle de nombreux colloïdes sont au contact des cellules.

Par ailleurs, il faut retenir que dans ce protocole expérimental, la mesure se fait après 4h d'incubation à 37°C et rinçage des cellules. Ceci implique que:

* P.CHENEVIER. Thèse de doctorat de l'université de Bordeaux I. 2001. « Vésicules multilamellaires de type oignons comme vecteurs biologiques ciblés ». [19]

1. les mesures réalisées ne correspondent pas nécessairement à l'équilibre thermodynamique.
2. la fluorescence mesurée correspond à des colloïdes internalisés ; en effet, l'accrochage étant (au moins en partie) réversible *, l'étape de rinçage élimine les colloïdes fixés sur la surface.

I.1.2. Conséquences sur l'interprétation des résultats

Contrairement au cas des cinétiques que nous avons décrit au chapitre 2, l'information contenue dans la simple valeur moyenne de la fluorescence des 10000 cellules mesurées n'est ici que partielle. La forme même du profil (avec ses 2 populations) est source d'informations et il nous faut en tenir compte. Pour cela, les distributions de fluorescence sont ajustées par la somme de deux gaussiennes ; chacune d'entre elles caractérise ainsi une des deux populations de cellules. Plusieurs paramètres peuvent alors être extraits de chacune de ces gaussiennes :

- **la fluorescence moyenne par cellule**: elle correspond à la position du pic gaussien et représente la valeur moyenne de fluorescence de la population de cellule concernée. On la note G_1 pour la population 1 et G_2 pour la population 2.
- la hauteur (notée h_1 et h_2)
- la largeur (σ_1 et σ_2)

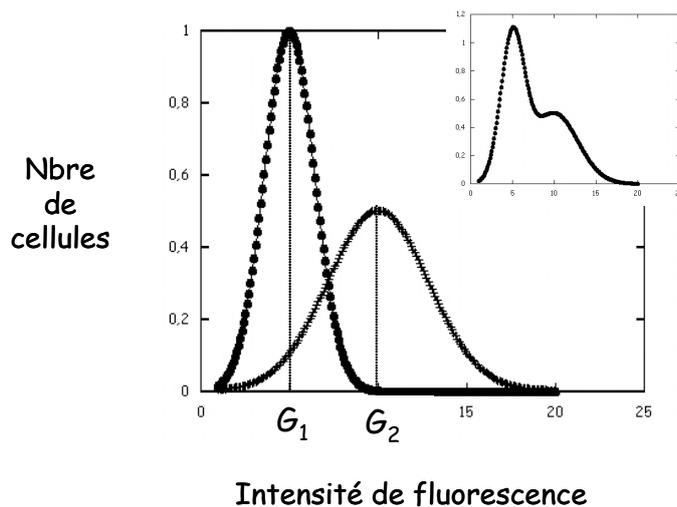


Figure 2 : Le graphe représente deux gaussiennes centrées respectivement sur les valeurs moyennes G_1 et G_2 .

L'encart représente la somme de ces 2 gaussiennes. Ce profil est du même type que celui que nous observons expérimentalement.

La moyenne M globale sur l'ensemble de la population de cellules s'écrit alors :

$$M = G_1^{P_1} G_2^{P_2}$$

P_1 et P_2 sont les proportions respectives de la population 1 et de la population 2 et s'écrivent respectivement :

$$P_1 = \frac{h_1 \sigma_1}{h_1 \sigma_1 + h_2 \sigma_2} \text{ et } P_2 = 1 - P_1$$

Plusieurs informations peuvent être dégagées de ces profils. Ainsi nous pouvons regarder l'évolution de la moyenne M de façon globale ; G_2 donne une information plus ciblée sur le

* Ce point a été étudié dans le chapitre 2.

nombre d'objets captés par les cellules positives de la population 2 et P_2 enfin renseigne sur la proportion de cellules positives dans la population totale.

Ayant constaté les effets de cette étape de centrifugation, par ailleurs indispensable pour mesurer un signal, nous avons voulu essayer de comprendre quels processus pouvaient les expliquer. Notamment, l'apparition de ces deux populations de cellules au comportement différent est-il un artéfact de l'expérience, un corollaire évident de la centrifugation de colloïdes sur la surface cellulaire ou bien peut-on lui attribuer un sens dans la description du mécanisme d'adhésion?

I.2. Spécificité de l'effet

Nous avons ainsi effectué plusieurs expériences de contrôle. Nous ne présenterons pas ici l'ensemble des résultats mais uniquement les conclusions auxquelles nous sommes parvenus.

Ainsi, nous avons vérifié que l'effet observé :

- n'est pas le résultat d'un accrochage non spécifique de particules colloïdales sur la surface cellulaire puisque aucun effet n'est observé avec des colloïdes non ciblant.
- **est dû à l'interaction spécifique entre colloïdes RGD et récepteurs intégrines :** avec des cellules dépourvues d'intégrines $\alpha_v\beta_3$ *, ou en présence de peptides RGD compétiteurs non marqués, ce 2^{ème} pic aux fortes fluorescences disparaît. Le graphe ci-dessous illustre ces résultats.

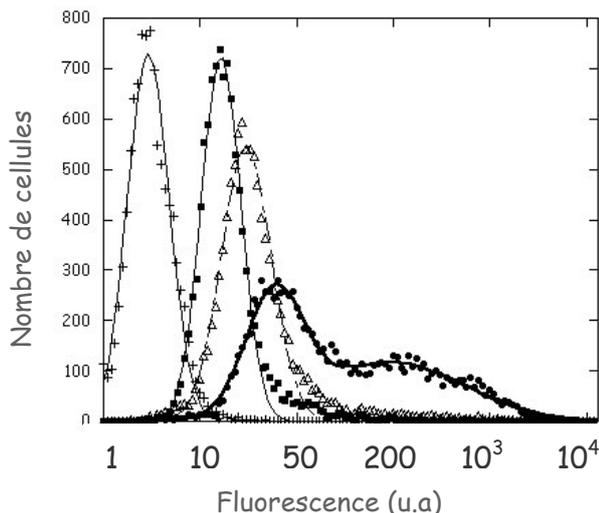


Figure 3 :

Le contact se fait dans des puits (plaque 24 puits) à $t=0$ puis l'ensemble est centrifugé (400g, 10min, 4°C) et placé à 37°C. La mesure est réalisée après 4h d'incubation.

- + : cellules HeLa témoin
- : colloïdes non ciblant / cellules HeLa
- Δ : colloïdes RGD / cellules HeLa sans intégrines $\alpha_v\beta_3$
- : colloïdes RGD / cellules HeLa (trait épais)

Notons que ces résultats ont été validés par observation simultanée en microscopie de fluorescence.

* Il s'agit de cellules HeLa X 1/5 transfectées pour l'expression d'un gène rapporteur luciférase ; elles ont été fournies par J-C.François (Laboratoire de Biophysique. Muséum National d'Histoire Naturelle. Inserm U201, CNRS UMR 8646). Des mesures par immunocytochimie ont montré qu'elles ne possèdent pas d'intégrines $\alpha_v\beta_3$.

Par ailleurs, plusieurs autres points ont été également contrôlés. Notamment, nous pouvons dire que la présence de ces deux populations de cellules :

- n'est pas un effet de la « géométrie » du système. Il était en effet possible que certaines cellules soient inaccessibles pour les objets. Pour évaluer cette supposition, le volume total du puits où s'opère le contact colloïdes-cellules et le nombre de cellules ont été modifiés mais sans effet. De même, l'agitation des cellules après une 1^{ère} centrifugation suivie d'une seconde centrifugation ne modifie pas le profil de fluorescence excluant ainsi cette hypothèse.
- n'est pas due à une répartition hétérogène des récepteurs. La population d'intégrines $\alpha_v\beta_3$ des cellules HeLa utilisées est homogène ; autrement dit, les cellules possèdent toutes le même nombre moyen de récepteurs et se comportent donc, en moyenne, toutes de la même façon vis-à-vis des objets.

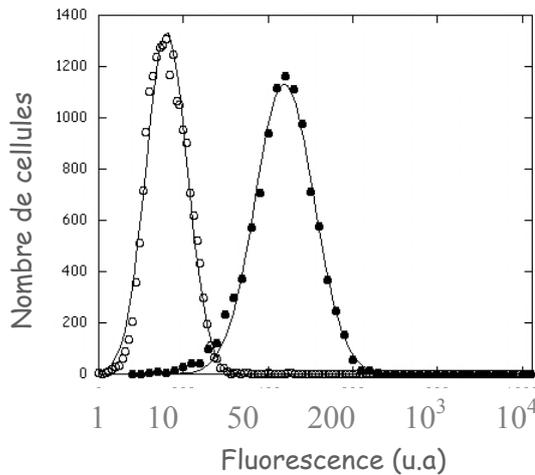


Figure 4 : Dosage des intégrines $\alpha_v\beta_3$ réalisé par immunocytochimie avec deux anticorps fluorescents (FITC).

○ : Anticorps IgG (anti-humain) non spécifique
 ● : Anticorps spécifique anti- $\alpha_v\beta_3$ (anti-humain)
 Le signal obtenu est une gaussienne régulière centrée sur une valeur moyenne ; en particulier, on n'observe pas de répartition bipolaire.

- n'est pas corrélée avec le cycle cellulaire (dosage par cytométrie de la quantité d'ADN de la population de cellules mise en contact en parallèle avec les colloïdes fluorescents ; l'étude des deux profils de cytométrie obtenus (ADN et adhésion) n'a révélée aucune corrélation entre les deux phénomènes)

De plus, l'état de confluence des cellules ainsi que la présence ou non de sérum dans le milieu de culture avant l'expérience est sans influence. Enfin, il n'est pas envisageable d'invoquer un argument sur les colloïdes eux-mêmes. La mesure ne peut révéler une disparité dans la population d'objets : les cellules sont toutes également soumises au même environnement colloïdal et y réagissent donc en moyenne de façon homogène.

I.3. Interprétations proposées

Nous avons vu que la centrifugation a essentiellement deux effets sur l'adhésion des colloïdes RGD :

1. **elle permet d'obtenir des intensités de fluorescence mesurables en augmentant significativement l'adhésion des colloïdes.**
2. **elle entraîne une répartition bipolaire de la population cellulaire**

Il n'est pas simple de proposer une interprétation complète de ces mécanismes. Il s'agit très probablement de la conjugaison de plusieurs effets qui ne sont pas encore complètement

compris au jour d'aujourd'hui. Pour autant, nous allons présenter ici deux pistes d'interprétations cohérentes avec la description de l'adhésion développée jusqu'à présent.

I.3.1. Une augmentation locale de la concentration de colloïdes permet des adhésions plus importantes

La centrifugation exerce une force F (*) sur les colloïdes et les cellules. Les cellules sédimentent ainsi très rapidement sur le fond du puits de culture. Les colloïdes (masse volumique proche de 1) subissent une force nettement plus faible. Néanmoins, la hauteur de liquide dans les puits de contact étant faible (de 2 à 3 mm), la centrifugation entraîne une augmentation locale de la concentration des colloïdes au voisinage de la surface où reposent les cellules ; la probabilité de rencontre entre cellules et colloïdes est donc augmentée d'où des intensités de fluorescence et des adhésions globalement plus importantes.

I.3.2. Une force permet le franchissement d'une barrière distribuée sur la population cellulaire.

En premier lieu, nous avons remarqué l'influence de la vitesse de centrifugation sur les distributions de fluorescence mesurées. Le graphe ci-dessous illustre cette évolution mesurée en cytométrie pour différentes vitesses de centrifugation.

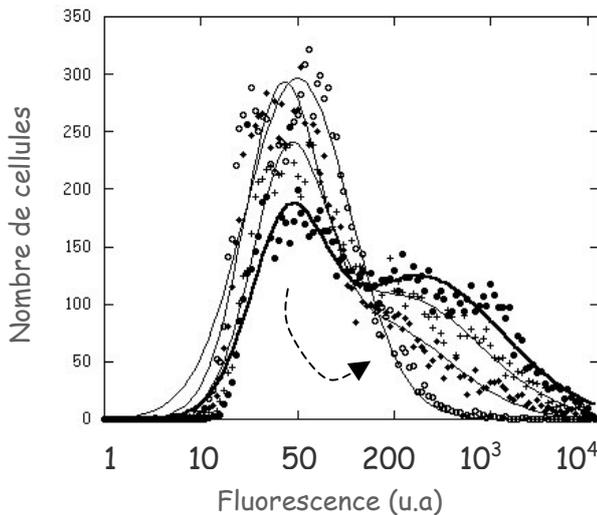


Figure 5 : Le contact entre colloïdes RGD et cellules Hela est réalisé par centrifugation à différentes vitesses.

○ : 0 rpm 0g
 ■ : 1000 rpm 100g
 + : 1500 rpm 250g
 ● : 2000 rpm 400g

Nous constatons que la proportion de cellules fluorescentes (dans la population 2) augmente avec la vitesse de centrifugation. Cette évolution qui se fait par passage de la population de cellules faiblement fluorescentes vers des cellules marquées plus fortement est étonnante. Elle suggère que l'application d'une force de plus en plus conséquente permet à davantage de colloïdes d'accéder à leur récepteur probablement en abaissant la barrière énergétique qu'il leur faut franchir.

Pour expliquer ce mécanisme de répartition bipolaire variable, nous proposons de considérer une distribution de barrières dispersées sur la population de cellules. Dans cette hypothèse, on montre qu'une distribution de barrière même faiblement dispersée entraîne une distribution

* Soit ω la vitesse angulaire de rotation (rad/sec) et R_{centri} le rayon de la centrifugeuse, la force centrifuge exercée sur un objet de masse m s'écrit $F = m \frac{\omega^2 R_{centri}}{g} g$

des vitesses de fixation des colloïdes qui conduit à l'apparition de deux populations de cellules. Simplement, nous pouvons résumer la situation ainsi :

- des cellules « à faible barrière » captent facilement les colloïdes ; elles sont donc rapidement fluorescentes et se trouvent dans la population 2.
- des cellules à « fortes barrières » captent plus difficilement les objets et restent peu ou pas fluorescentes (population 1).

La force variable exercée en modifiant la vitesse de centrifugation permet ainsi de sonder la largeur de la distribution des barrières de la population de cellules.

Nous avons par ailleurs déjà fortement suggéré dans le chapitre précédent que le glycocalyx pouvait jouer le rôle d'une barrière répulsive (que l'on peut d'ailleurs tout à fait imaginer répartie de façon inhomogène entre les cellules d'où la présence des deux populations de cellules...). On trouve également dans la littérature de nombreux exemples où le glycocalyx est décrit comme une barrière répulsive empêchant par exemple l'invasion par des particules virales. C'est le cas de certains adénovirus⁶² ⁶³ ou encore de vecteurs rétroviraux⁶⁴ pour lesquels l'élimination des structures glycosylées permet alors *in vitro* l'entrée dans la cellule cible. Pour essayer de valider l'hypothèse dans le cas de notre système, des essais préliminaires pour éliminer une partie du glycocalyx ont été réalisés :

- par digestion enzymatique : traitement des cellules 1h à 4°C avec 100mU/mL de neuraminidase^{*1}.
- en inhibant sa production : mise en culture des cellules pendant 5 jours avec 100nM de 2-déoxy-D-glucose^{*2}. Le graphe ci-après présente les résultats obtenus dans ce cas.

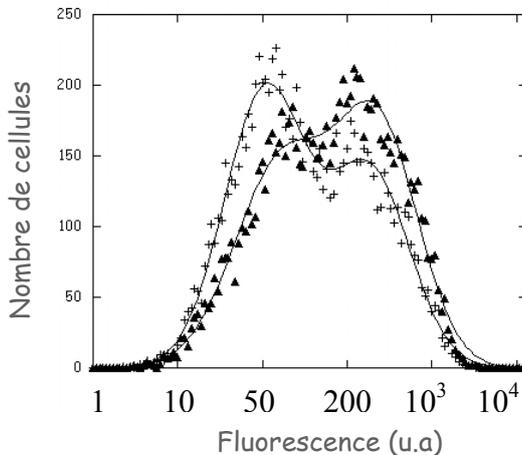


Figure 6 : Distribution de fluorescence obtenue avec des colloïdes RGD ($C=5.10^4$) et des cellules HeLa ($7,5.10^5/mL$)

+ : Cellules HeLa non traitées - $G_2=360$ et $p_2=0.5$
 ▲ : Cellules HeLa traitées 5 jours avec la 2-déoxy-D-glucose - $G_2=437$ et $p_2=0.6$

Nous constatons que les cellules traitées (▲) présentent une population 2 plus importante et globalement plus fluorescente (G_2 augmente de 20%) que pour les cellules non traitées. Ces premiers tests suggèrent ainsi que l'adhésion des colloïdes est favorisée lorsque la densité des structures glycosylées diminue. Ceci confirmerait d'une part l'implication du glycocalyx dans l'adhésion des colloïdes et d'autre part, l'hypothèse d'une pression osmotique exercée par ces polymères, pression rappelons le proportionnelle à la densité de

⁶² ARCASOY *et al*, Am.J.Respir.Cell Mol.Biol. 1997, vol.17, p. 422-435.

⁶³ PICKLES *et al*, Journal of Virology. 2000, vol.74, n°13, p. 6050-6057.

⁶⁴ G.WANG *et al*, Gene Therapy. 2002, 9, p. 922-931.

^{*1} Neuraminidase from *Vibrio Cholerae* (Sigma 7885) ; il s'agit d'une sialidase qui permet de « couper » les acides sialiques, terminaisons chargées de la majorité des glycoprotéines de la membrane plasmique.

^{*2} La 2-Déoxy-D-Glucose (Sigma D 3179)) permet d'inhiber une partie des glycosylations post traductionnelles au niveau de l'appareil de Golgi. Elle agit au niveau du métabolisme cellulaire.

polymères présents. Néanmoins, ce type d'étude de nature biochimique est complexe et mériterait d'être poursuivi afin de confirmer ces premiers éléments.

I.4. Discussion : Comparaison entre colloïdes Shiga et colloïdes RGD

Cette partie va tenter de proposer deux arguments susceptibles d'interpréter les différences d'adhésion observées entre des colloïdes Shiga et des colloïdes RGD. En effet, il apparaît que ces derniers ne sont pas capables d'adhérer spontanément sur les cellules alors que les colloïdes Shiga se fixent eux fortement.

I.4.1. L'effet du glycocalyx : une répulsion non spécifique

Nous avons vu que le glycocalyx peut jouer le rôle d'une barrière répulsive. Si tel est le cas, cela signifie que pour les colloïdes RGD, la répulsion est suffisamment forte pour empêcher l'adhésion spontanée (sans centrifugation) des objets alors qu'elle est moins importante pour les colloïdes Shiga. Les cellules utilisées étant les mêmes, cette différence pourrait s'expliquer par la nature et la géométrie du ligand.

La partie hydrophile du lipopeptide RGD ^{*1} utilisé pour fonctionnaliser les colloïdes s'articule autour d'un groupement espaceur dont la longueur est évaluée à 26Å et de la séquence peptidique GRGDSP appréciée à 24Å. La longueur totale dans une configuration étirée vaut alors $L=50\text{Å}$. Nous allons considérer que ce lipopeptide se comporte sur l'objet comme un polymère flexible (type PEG).

En configuration « champignon », on peut évaluer ^{*2} son rayon de Flory $R_F = aN^{\frac{3}{5}} = 1.7\text{nm}$. La transition « champignon/brosse » vaut alors $\gamma_{RGD}^* = 0.11/\text{nm}^2$.

Au niveau de la formulation, les colloïdes RGD sont préparés avec 10% en masse de lipopeptide (soit $p_{mass}=0.1$). La densité surfacique de ligands s'exprime alors

$$\gamma_{RGD} \cong p_{mass} \frac{M_{PC}}{M_{RGD} \sigma} \text{ soit } \gamma_{RGD} = 0.096/\text{nm}^2.$$

Nous nous trouvons donc en deçà de la transition. Par conséquent, le ligand RGD se présente à la surface du colloïde comme une demi sphère de rayon 1.7nm. Le ligand RGD ($R_F=1.7\text{nm}$) est ainsi plus petit que le ligand Shiga ($h_{sh}=2\text{nm}$). Cette différence, bien que faible, peut suffire à expliquer les différences observées en terme d'adhésion comme l'illustrent les schémas de la figure 7.

^{*1} Se reporter au chapitre 1 où la formule chimique de ce lipopeptide a été détaillée.

^{*2} Le groupement espaceur étant constitué de motifs PEG, nous allons considérer $a=0.35\text{nm}$ pour la taille d'un motif, d'où $N=L/a \approx 14$

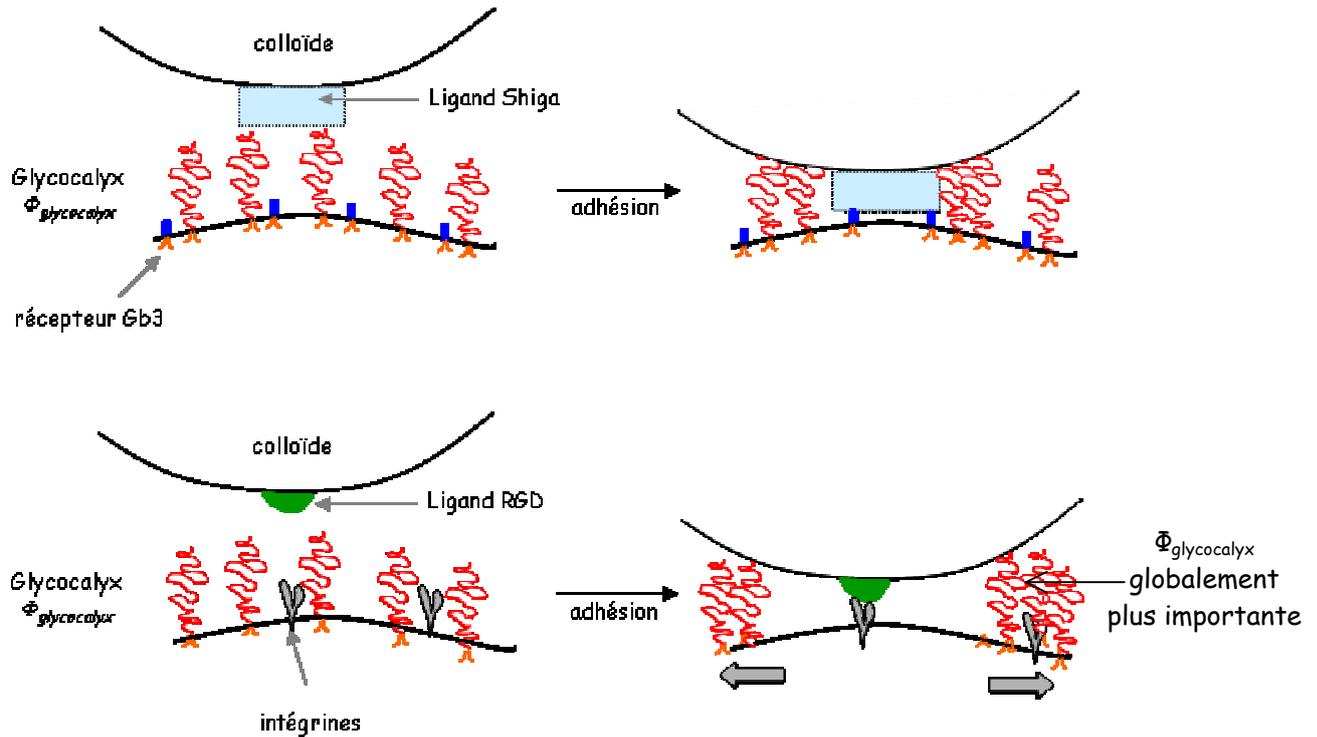


Figure 7 : Comparaison schématique (à l'échelle) de l'adhésion des colloïdes Shiga et RGD sur la surface cellulaire recouverte par le glycocalyx.

En effet, en reprenant la description microscopique proposée dans le chapitre précédent, le ligand RGD, plus court, devient moins accessible et ce sont donc davantage de polymères du glycocalyx qu'il faut déplacer pour permettre la fixation sur l'intégrine. Nous avons vu par ailleurs que de très légères différences dans les densités globales de polymères à déplacer (sondées par ajout de PEG sur les objets) suffisaient à rendre l'adhésion très défavorable. On peut supposer que c'est ce qui se passe dans le cas du ligand RGD d'où la nécessité d'apporter une énergie supplémentaire au système par la centrifugation.

I.4.2. Des récepteurs en nombre différent

La comparaison entre les comportements des objets utilisant les deux types de ciblage conduit à s'intéresser aux récepteurs membranaires visés. Les intégrines sont des protéines membranaires ; leur nombre peut être estimé autour de 10^4 par cellule ce qui en fait des récepteurs environ 1000 fois moins nombreux que les glycolipides Gb3. De telles différences peuvent expliquer des comportements différents pour les colloïdes qui viennent s'y fixer.

En premier lieu, évidemment, des récepteurs moins nombreux influencent le nombre maximum de colloïdes (« la hauteur du plateau ») qu'il est possible de fixer et la vitesse de la réaction. On comprend donc aisément que les colloïdes RGD adhèrent en moins grand nombre et avec des cinétiques nettement ralenties d'où des signaux mesurés nettement plus faibles.

Mais, plus encore, le nombre de récepteurs est à prendre en compte dans une description dynamique de l'adhésion. En effet, moins nombreux, ils mettent davantage de temps à diffuser vers la zone de contact. Pour espérer créer un lien, le temps de séjour d'un colloïde RGD sur la surface cellulaire doit donc en particulier être supérieur au temps caractéristique de diffusion des intégrines. Cette contrainte sur les temps de séjour est ainsi 1000 plus importante pour les colloïdes RGD que pour les colloïdes Shiga (les récepteurs Gb3 étant

1000 fois plus nombreux que les intégrines) d'où les différences observées dans les adhésions des deux systèmes. Dans cette hypothèse, une force (centrifugation) exercée sur les colloïdes RGD lors du contact allongerait leur temps de séjour au voisinage de la surface, laissant ainsi aux récepteurs intégrines le temps de diffuser.

I.5. Conclusion

Ainsi, nous retiendrons que la centrifugation lors du contact objets – cellules suivie d'une incubation de 4 heures avant la mesure semble être aujourd'hui le seul moyen d'observer l'interaction entre les colloïdes RGD et les cellules HeLa utilisées. Ce protocole permet :

- de visualiser une interaction spécifique
- de mesurer la « trace » de l'adhésion de ces objets via un processus irréversible d'internalisation, l'étape d'adhésion seule n'étant pas mesurable.

Plusieurs arguments peuvent être avancés pour expliquer la nécessité de cette étape de centrifugation dans l'adhésion des colloïdes RGD. Tout d'abord, le ligand RGD, plus court que le ligand Shiga est également moins accessible. La rencontre avec le récepteur intégrine nécessite le déplacement de davantage de glycocalyx. Cela revient en terme énergétique à augmenter localement la densité de polymères ce qui est, nous l'avons vu avec les colloïdes Shiga PEG, extrêmement défavorable pour l'adhésion. Par ailleurs, le nombre des récepteurs, très différent, peut également contribuer à expliquer les différences observées. Soulignons que ces deux contributions ne sont pas antagonistes ; elles peuvent être invoquées ensemble pour expliquer d'une part les différences entre colloïdes Shiga et RGD et d'autre part l'effet de la centrifugation sur les colloïdes RGD.

Toutefois, il faut garder à l'esprit que l'étape de centrifugation en favorisant la rencontre colloïde – cellule perturbe l'interaction « naturelle ». Il n'est donc pas possible avec ce système de ciblage RGD de procéder à une étude thermodynamique quantitative comme nous l'avons décrite dans les chapitres précédents. Des comparaisons qualitatives pourront néanmoins être menées entre des colloïdes modifiés par ajout de polymères par exemple ; les informations obtenues et les effets observés sont en effet robustes comme nous allons le voir.

II. Ajout de polymères : colloïdes RGD-PEG

Dans cette partie, nous allons nous intéresser à l'adhésion de colloïdes RGD en fonction de la densité de polymères PEG présents à leur surface.

II.1. Protocole expérimental

La concentration de colloïdes est la même pour tous les échantillons et correspond à une fraction volumique $C=5.10^{-4}$. Le pourcentage massique p_{mass} de PEG introduit dans la

phase lamellaire varie de 0 à 8% de la masse totale de lipides. Colloïdes et cellules sont mis en contact dans des puits (volume total de 300 μ L avec 1.5.10⁵ cellules par puits) puis centrifugés à 400g pendant 10 minutes. Après 4 heures d'incubation à 37°C, les cellules sont récupérées, centrifugées et lavées pour éliminer l'ensemble des objets présents dans le volume.

La mesure au cytomètre ne prend alors en compte que les colloïdes internalisés. Néanmoins, ils sont la trace directe de l'adhésion qui a précédé le processus d'entrée dans la cellule.

II.2. Résultats

Comme nous venons de le voir dans la partie précédente, le suivi de l'adhésion des colloïdes RGD requiert un traitement particulier. Les profils de fluorescence se présentent sous la forme de deux populations de cellules qui se comportent différemment vis-à-vis des colloïdes qu'elles rencontrent (cinétiques d'adhésion variables). Ces profils sont ajustés par la somme de deux gaussiennes centrées respectivement sur deux valeurs moyennes G_1 et G_2 .

Le graphe ci-dessous représente l'évolution de la distribution de fluorescence d'une population de cellules mis en contact avec des colloïdes portant différentes densités surfaciques ϕ (en nm⁻²) de PEG.

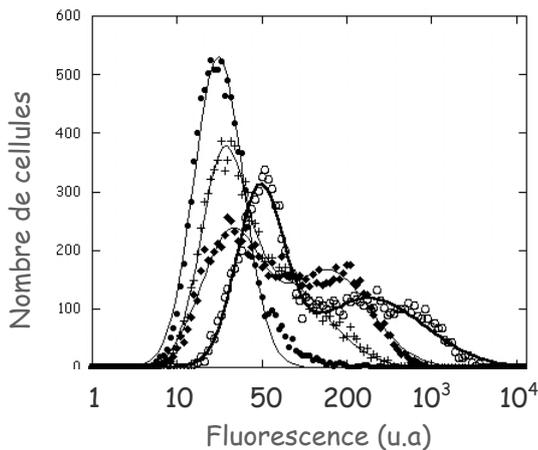


Figure 8 : Distribution de fluorescence obtenue pour une population de cellules HeLa en contact avec des colloïdes RGD ($\gamma_{RGD} = 0.096/nm^2$ et $C=5.10^{-4}$) préparés avec différentes densités Φ de PEG.

p_{mass}	Φ (en nm ⁻²)
○ : 0%	0
■ : 1%	5.7.10 ⁻³
+ : 3%	1.7.10 ⁻²
● : 8%	4.6.10 ⁻²

Compte tenu de l'échelle logarithmique, nous constatons que la valeur moyenne du premier pic varie très peu, tandis que celle du second pic présente une forte évolution. L'évolution de ces paramètres est représentée ci-dessous.

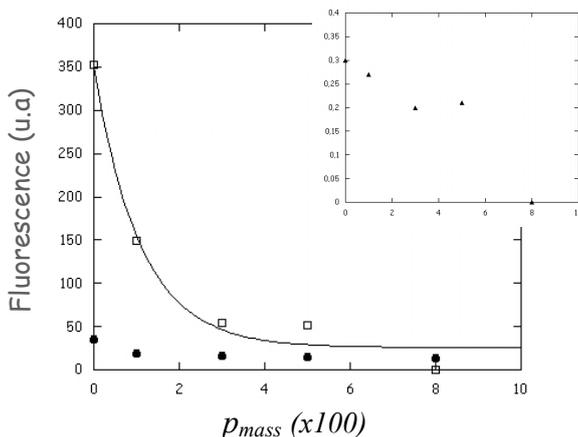


Figure 9 : Intensités de fluorescence en fonction de p_{mass} .

● : G_1 (moyenne de la population 1)
 □ : G_2 (moyenne de la population 2)
 Ajustement exponentiel

L'encart représente la proportion P_2 (▲) de cellules dans la population 2 en fonction de p_{mass} .

Nous constatons que la fluorescence moyenne G_2 (\square) des cellules positives diminue très rapidement avec la densité de polymères ajoutés. L'adhésion des colloïdes est ainsi diminuée de plus de 50% pour $p_{mass} = 1\%$. De plus, au-delà de 5%, l'adhésion des colloïdes devient pratiquement nulle.

Plus quantitativement maintenant, nous remarquons que l'évolution de G_2 semble suivre un profil de décroissance exponentielle. Pour valider ce point, traçons $-\ln(G_2)$ en fonction de Φ .

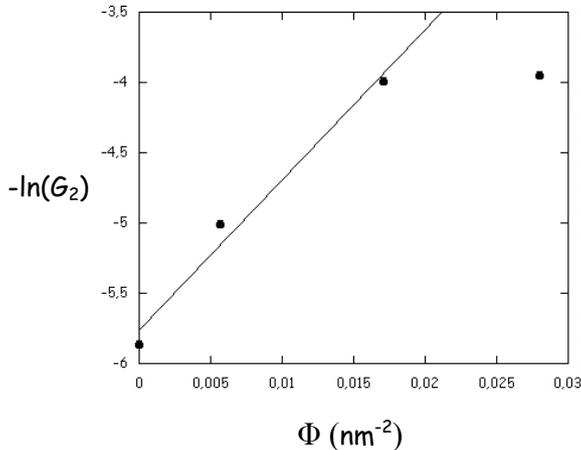


Figure 10 : Evolution de $-\ln(G_2)$ en fonction de Φ . L'ajustement linéaire est réalisé sur les 3 premiers points uniquement c'est-à-dire dans la zone $\Phi < \Phi^*$ où l'évolution linéaire est effectivement valide (se reporter au chapitre précédent)

Nous constatons que dans la gamme $\Phi < \Phi^*$, $-\ln(G_2)$ présente une évolution linéaire (l'ajustement permet d'obtenir la valeur de la pente : $a=107$). Cela est compatible avec une augmentation de la barrière due à la pression osmotique des polymères avec la concentration de polymères. Ce comportement est ainsi tout à fait similaire à celui des colloïdes Shiga que nous avons décrit dans le chapitre précédent. Néanmoins avec ce système, il est difficile de pousser l'étude plus avant et ce pour deux raisons :

- les mesures sont réalisées après une étape de centrifugation, indispensable par ailleurs
- elles ne correspondent pas à l'état d'équilibre thermodynamique du système.

Nous retiendrons de cette étude que :

- **nous sommes capables là encore par cette approche en cytométrie de flux de mesurer des effets de faible amplitude quant aux modifications de la surface des colloïdes.**
- **l'ajout de polymères est rapidement très défavorable pour l'adhésion. La diminution de l'adhésion suit une évolution particulière de type exponentielle.**

Ainsi, les tendances observées ici sont du même ordre que celles que nous avons déjà décrites pour le système Shiga ce qui conforte encore notre description en terme de pression osmotique.

Toujours dans l'idée de modifier la surface des colloïdes et ses propriétés physico-chimiques, nous nous sommes intéressés dans la suite à la géométrie du ligand et notamment à sa longueur. De quelle façon ce nouveau paramètre intervient-il dans l'adhésion des colloïdes ?

III. Modification de la longueur du ligand RGD

III.1. Contexte et motivations de l'étude

Nous avons vu que le ciblage permet de créer une reconnaissance spécifique entre l'objet et la surface cellulaire. Par ailleurs, la présence de polymères limite les interactions non souhaitables par répulsion non spécifique mais défavorise du même coup la reconnaissance ligand/récepteur. Les causes stériques de ces effets étant bien établies, on peut s'interroger sur l'influence de la géométrie du ligand. Dans notre étude, les deux contributions sont restées séparées jusque là mais on pourrait par exemple imaginer positionner le ligand à l'extrémité d'un polymère, le même élément assurant alors répulsion et adhésion^{65,66}. Ce sont ces questions que nous avons commencé à explorer ici.

Dans un premier temps nous allons faire varier la longueur du ligand RGD. Des études montrent qu'un ligand plus long peut explorer davantage d'espace et donc possède une probabilité plus importante de rencontrer son récepteur⁶⁷. Après avoir présenté les systèmes de ciblage que nous avons utilisé, nous chercherons à savoir si il est en effet possible de mesurer une adhésion plus importante en éloignant ainsi le motif RGD de la membrane du colloïde. Puis, nous essaierons de voir si ces effets permettent, en présence de polymères PEG sur l'objet, de favoriser à nouveau la reconnaissance spécifique. Il s'agit ainsi d'essayer de comparer l'adhésion de 4 types colloïdes dont la surface est modifiée par la géométrie du ligand RGD et / ou l'ajout de polymères PEG.

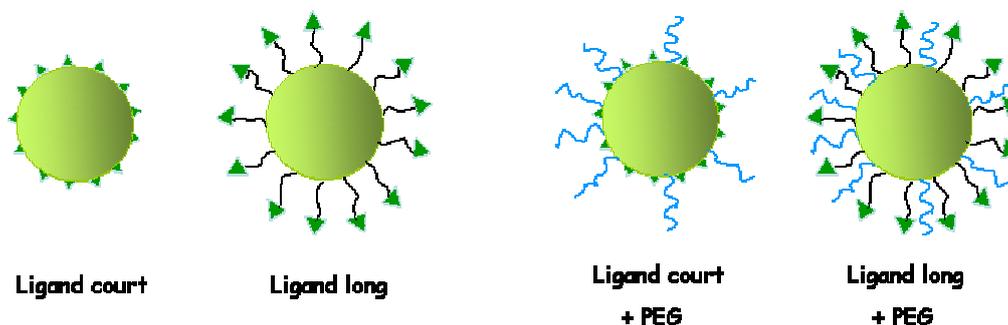


Figure 11 : Quatre types de colloïdes dont nous allons comparer les adhésions. Deux paramètres sont modifiables : la longueur du ligand de reconnaissance (RGD) et la densité de polymères PEG ajoutés.

III.2. Systèmes de ciblage utilisés

Le motif RGD utilisé jusqu'à présent, se présente sous la forme d'un lipopeptide introduit dès la formation de la phase lamellaire. Dans cette configuration, faire varier la longueur du motif RGD nécessiterait la synthèse de lipopeptides de longueurs différentes, et la formulation de nouvelles phases lamellaires pour chaque longueur testée. Ce n'est donc pas

⁶⁵ MAEDA *et al.* Bioorganic et medicinal chemistry letters. 2004, 14, p. 1015-1017.

⁶⁶ JANSSEN *et al.* International Journal of Pharmaceutics. 2003, 254, p. 53-58.

⁶⁷ J.Y.WONG, T.L.KUHL, J.N.ISRAELACHVILI, N.MULLAH, S.ZALIPSKY. Science. 1997, vol.275.

un système très adapté à ce genre d'étude où il paraît important de disposer d'un procédé de ciblage plus flexible. C'est le cas des systèmes de ligations qui consistent à incorporer dans la phase lamellaire une ancre réactive et à venir faire réagir sur une seule espèce de colloïdes des peptides de longueurs différentes.

Nous avons présenté dans le chapitre 1, les deux types de ligations dont nous disposons. Dans le cadre de cette étude, c'est la ligation α -oxo-hydrazone qui a été utilisée. Les détails concernant cette réaction hautement chimiospécifique ont été présentés dans le premier chapitre. Développée à l'UMR 8525 de l'Institut de Biologie de Lille, cette ligation consiste à faire réagir un hydrazino peptide sur une ancre α -oxo-aldéhyde (notée COCHO). Soulignons que la synthèse et la purification de telles molécules sont délicates et ont nécessité un vrai travail de recherche; elles ont été mises au point à Lille par Line Bourel et Pascale Jolimaître.

Les molécules synthétisées, ancres et peptides, sont présentées ci-après (figure 13). Elles sont construites autour d'un bras espaceur hydrophile dont le nombre est variable. Les notations et les longueurs correspondantes sont reportées pour chaque système.

Ces molécules permettent ainsi de préparer des colloïdes dont le ligand à la surface est de taille différente. Le protocole complet pour la préparation de tels objets par ligation est rappelé en annexe 4.

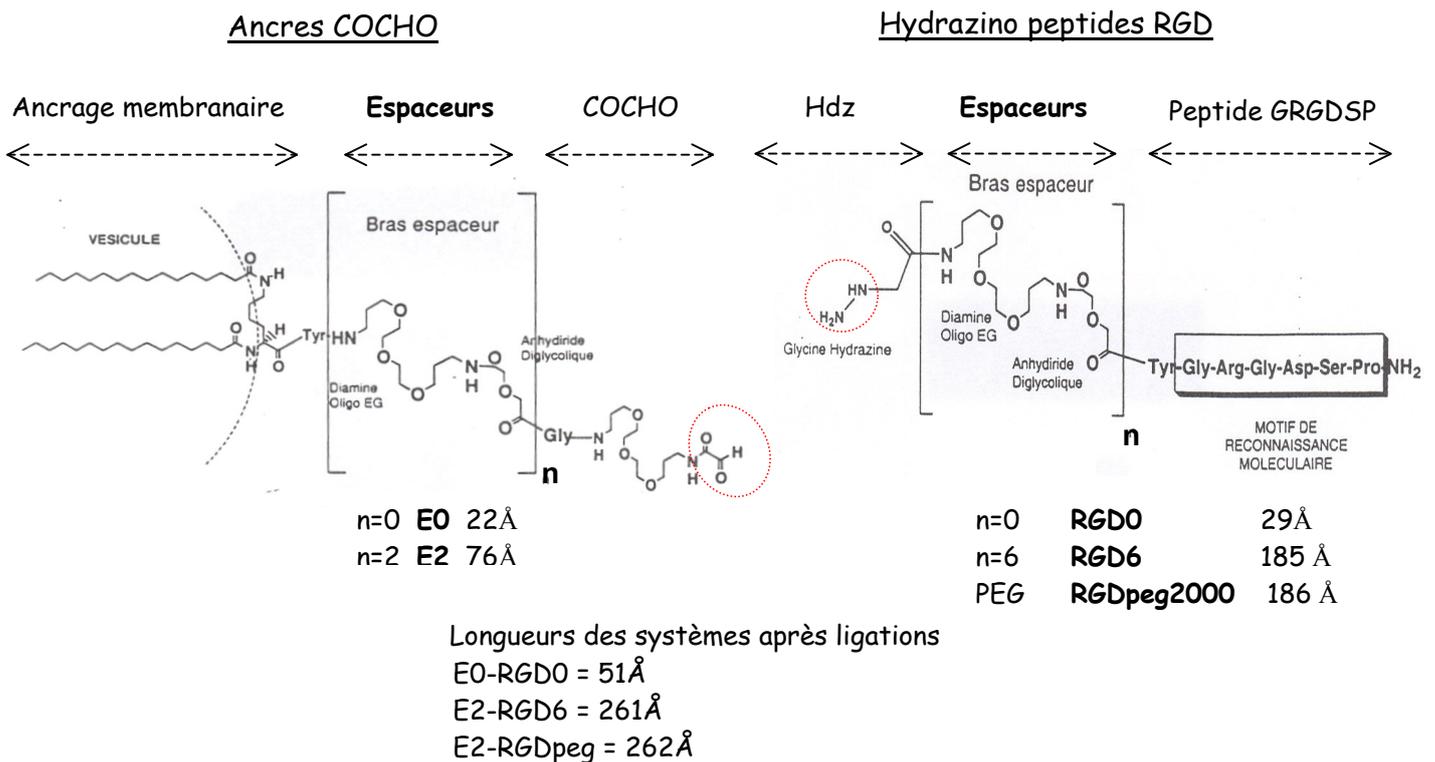


Figure 12 : Formules chimiques des ancres COCHO et des hydrazino-peptides RGD utilisés. Les longueurs de chaque système sont reportées.

Notons que le système E0-RGD0 est de taille comparable avec le lipopeptide utilisé jusque-là présent. Nous allons d'ailleurs commencer par comparer ces deux systèmes afin d'évaluer l'effet de la ligation sur l'adhésion. Les systèmes E2-RGD6 et E2-RGDpeg, 5 fois plus longs, sont de tailles identiques mais la nature chimique de l'espaceur a été modifiée. Nous pouvons

remarquer qu'ils sont également plus longs que le lipide PEG (185Å) que nous utilisons par ailleurs.

Remarquons que ces structures se comportent comme des chaînes de polymères : sous forme de pelotes « champignons » à basse concentration, elles s'étirent lorsque leur densité augmente.

Dans cette partie, nous avons travaillé à densité de peptides RGD fixe telle que $\gamma_{RGD} = 0.096 / nm^2$. Cette densité est la même que celle utilisée pour l'ensemble des expériences présentées auparavant avec le lipopeptide (longueur 50Å). A cette densité, les systèmes courts (lipopeptide, E0-RGD0) sont dans une conformation de type « champignon », tandis que les longs (E2-RGD6 et E2-RGDpeg) sont dans un régime « brosse ».

Nous allons comparer les adhésions des objets fonctionnalisés avec ces différents systèmes.

III.3. Résultats obtenus

III.3.1. Comparaison de l'adhésion de colloïdes « lipopeptide RGD » et « E0-RGD0 » : effet de la ligation.

Avant d'envisager des systèmes de longueurs différentes, nous avons comparé l'adhésion de colloïdes ciblant préparés avec le lipopeptide d'une part et une ligation de type α -oxo-hydrazone d'autre part. Les deux ligands (lipopeptide et E0-RGD0) sont de même longueur (50Å).

L'expérience est réalisée sur des cellules HeLa mises en contact avec des colloïdes ciblant ($C=5.10^{-4}$) par une étape de centrifugation (10min, 2000rpm, 4°C). Après 4h d'incubation à 37°C et rinçage des cellules, la mesure est faite au cytomètre de flux ; la distribution de fluorescence obtenue est présentée ci-dessous.

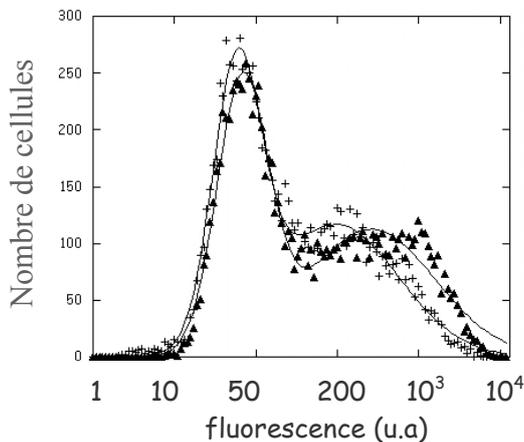


Figure 13 : Distribution de fluorescence obtenue pour des colloïdes RGD préparés avec :

▲ : système ligué E0-RGD0 ($G_2=465$, $p_2=0.55$)

+ : lipopeptide RGD ($G_2=214$, $p_2=0.55$)

Les deux systèmes sont de longueur équivalente.

L'ajustement réalisé correspond à la somme de 2 gaussiennes.

Nous constatons que les profils de fluorescence obtenus sont comparables même si on peut remarquer une adhésion (population 2 : ▲) légèrement plus marquée pour le système ligué. Pour autant, l'adhésion des colloïdes fonctionnalisés par les deux méthodes est du même ordre ce qui permet de valider l'efficacité de la ligation.

III.3.2. Effet de la longueur de l'espaceur : comparaison des colloïdes ciblant E0-RGD0, E2-RGD6 et E2-RGDpeg

Dans cette partie, nous allons utiliser des ligands de longueurs différentes, greffés sur les objets par ligation, et comparer leur adhésion.

L'expérience présentée ici a été réalisée sur des cellules primaires de type Huvec. Il s'agit de cellules endothéliales extraites de la veine du cordon ombilical qui nous ont été aimablement fournies par Reine Bareille *. L'expérience menée sur HeLa en parallèle n'a pas permis d'obtenir de résultats exploitables (problèmes expérimentaux) et pour des raisons de temps, nous n'avons pu encore la reproduire.

Le protocole utilisé reste néanmoins le même. Cellules et colloïdes ($C=10^{-3}$) sont mis en contact puis centrifugés (400g, 10min, 4°C) ; la mesure au cytomètre est réalisée après 4h d'incubation à 37°C et rinçage des cellules.

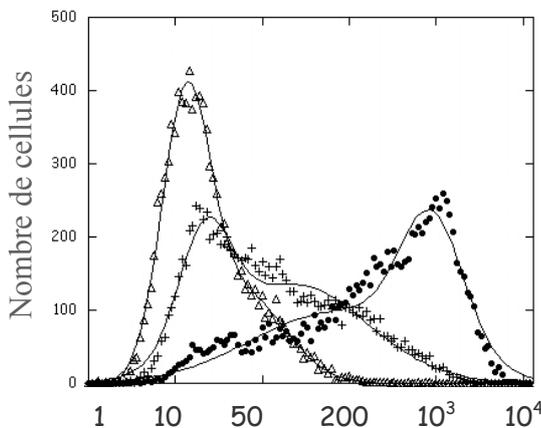


Figure 14 : Distribution de fluorescence obtenue pour des colloïdes préparés avec des ligands RGD de différentes longueurs :

- court = E0-RGD0 ($G_2=1220, p_2=0.42$)
- Δ long = E2-RGD6 ($G_2=26, p_2=0.35$)
- + long peg = E2-RGDpeg ($G_2=70, p_2=0.7$)

Nous observons une adhésion très forte avec le système court. Concernant les systèmes longs, les adhésions mesurées sont nettement moins importantes. L'adhésion est même quasiment nulle pour le ligand E2-RGD6. **Il semble donc qu'un espaceur long soit plutôt défavorable pour l'adhésion.** En comparant les deux ligands longs, nous constatons pourtant une adhésion plus importante pour le ligand possédant un espaceur PEG.

III.3.3. Adhésion en présence de polymères PEG

Nous avons vu que la longueur du ligand semble plutôt un élément défavorable pour l'adhésion des colloïdes. Néanmoins, nous avons cherché à voir ce qu'il en était en présence de polymères PEG. En effet, dans ce cas, la longueur du motif de reconnaissance peut apparaître comme un atout supplémentaire pour contrebalancer l'effet stérique des polymères PEG en permettant au peptide RGD d'accéder plus facilement à son récepteur.

Les objets sont préparés en présence de densités différentes de polymères PEG. La ligation doit être effectuée dans un second temps sur des objets dont la surface est déjà encombrée par les PEG. Nous avons donc dû vérifier qu'elle restait possible dans ces conditions et ce avec un rendement convenable. Pour cela, nous avons utilisé un réactif modèle portant une fonction hydrazine : la N-méthylbenzothiazolinone hydrazone ou MBTH. Cette molécule mimant notre peptide présente la particularité de fluorescer lorsqu'elle est engagée dans une liaison hydrazone. La mesure en cinétique au spectromètre de fluorescence permet de suivre l'apparition de cette fluorescence et par là même la formation de la liaison.

* Equipe Ingénierie Cellulaire et Tissulaire du laboratoire Biomatériaux et Réparation Tissulaire (INSERM U577). Bordeaux 2.

Nous avons ainsi pu suivre la ligation de cette molécule sur nos objets portant d'une part l'ancre réactive COCHO mais également une densité importante de polymères PEG. La comparaison avec une ligation en l'absence de polymères montre que la cinétique de la réaction n'est pas perturbée de façon importante. Nous avons ainsi pu nous assurer que la ligation a bien lieu en présence de polymères ; **il est donc possible de préparer des objets ciblant par ligation en présence de PEG.**

Nous avons ensuite mesuré l'adhésion sur cellules Huvec d'objets fonctionnalisés respectivement par des ligands de différentes longueurs et ce en faisant varier à chaque fois la concentration de polymères en surface (0%, 3% et 6%).

Nous constatons (graphes ci-après) qu'en présence de polymères PEG, l'adhésion est nulle et ce quelle que soit la longueur de l'espaceur. Un espaceur long ne permet donc pas a priori de favoriser à nouveau l'adhésion.

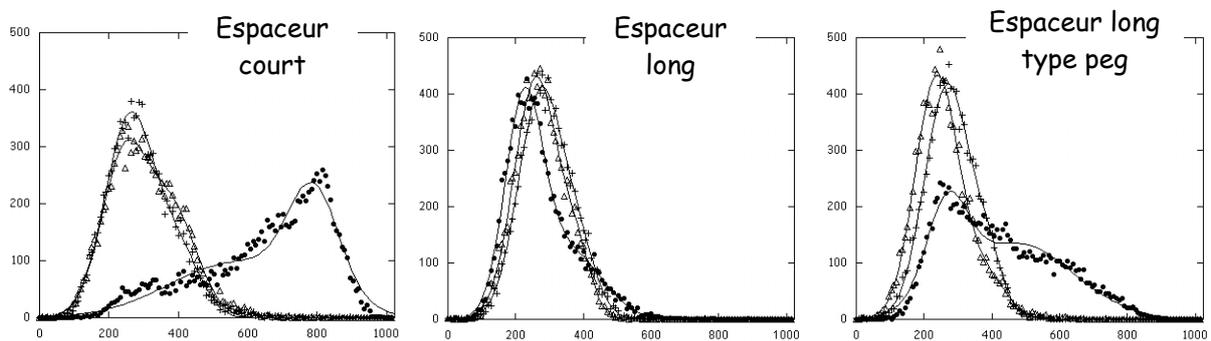


Figure 15 : Distribution de fluorescence obtenue pour une population de cellules Huvec en contact avec :

- : Colloïdes RGD sans PEG
- Δ : Colloïdes avec 3% PEG (soit $\Phi=1,7.10^{-2}/nm^2$)
- + : Colloïdes avec 6% PEG (soit $\Phi=3,4.10^{-2}/nm^2$)

III.4. Conclusion

Il convient de prendre tous ces résultats préliminaires avec beaucoup de précautions. Néanmoins, **il semble, pour nos systèmes, que la longueur de l'espaceur du ligand de reconnaissance soit plutôt défavorable pour l'adhésion des colloïdes.**

Si une longueur importante permet d'augmenter le nombre de degré de liberté du ligand, elle rend aussi moins probable une conformation favorable à la fixation sur le site de reconnaissance de l'intégrine. De plus, la structure flexible de l'espaceur joue aussi le rôle, comme un polymère, de répulsion stérique rendant le récepteur difficilement accessible. Des expériences complémentaires devraient être menées pour poursuivre cette étude. En effet, il est très probable qu'il existe une longueur optimale, à déterminer, pour le ligand :

- trop court, sa rencontre avec le récepteur nécessite le déplacement d'une densité importante de glycocalyx ce qui est hautement défavorable (c'est probablement ce qui explique les différences d'adhésion observées entre les colloïdes Shiga et RGD)
- trop long, le ligand joue à lui seul le rôle d'une barrière répulsive comparable à celle des polymères PEG.

Chapitre 5

Mesure de force locale sur colloïde unique

Micromanipulation par Biomembrane Force Probe

Nous avons vu dans les trois chapitres précédents comment une approche statistique sur une population de cellules en contact avec un ensemble de colloïdes permet de remonter à des paramètres thermodynamiques et cinétiques de l'interaction et ce en milieu biologique. Par cette approche, nous avons pu identifier un certain nombre de paramètres physico-chimiques contrôlant l'interaction colloïde/cellule. Le choix du couple ligand - récepteur, sa structure, son environnement se sont révélés des paramètres d'importance dans l'étude de l'interaction. Pour compléter et tenter d'apporter un nouvel éclairage à cette étude, nous avons cherché à obtenir des informations au niveau plus local d'un colloïde unique. La mesure de la force du lien ligand / récepteur et plus globalement de la liaison colloïde - cellule, dans son environnement, constitue à ce titre une information supplémentaire et nouvelle dans la description de l'interaction.

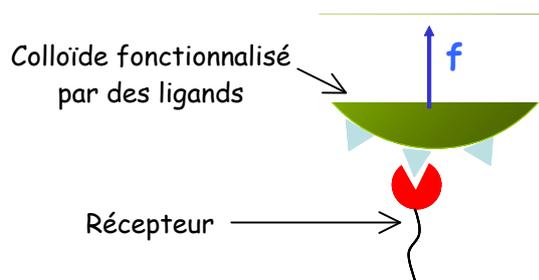


Figure 1 : Représentation schématique d'un lien ligand / récepteur. f représente la force qu'il faut exercer pour rompre ce lien.

Dans ce chapitre, nous allons nous intéresser particulièrement à la technique de Biomembrane Force Probe (BFP). **C'est en collaboration avec Frédéric Pincet et Julien Husson qui connaissent très bien la technique et disposent du montage au laboratoire de Physique Statistique (LPS) de l'Ecole Normale Supérieure (Paris), que nous avons validé cette nouvelle approche.**

Nous commencerons par présenter l'intérêt de la technique, puis nous en détaillerons le principe en insistant sur le système expérimental. Enfin, nous discuterons des premiers résultats obtenus.

I. Introduction et intérêt de la technique

I.1. La technique de Biomembrane Force Probe

L'expérience de Biomembrane Force Probe (BFP) est une technique de micromanipulation qui permet de mesurer une énergie de liaison entre un ligand et son récepteur et ce de manière très locale à l'échelle d'un (ou de quelques) lien. Il s'agit d'une technique originale développée initialement par Evan Evans⁶⁸ et disponible actuellement dans le monde en seulement quatre exemplaires.

Pour le physicien, la technique est utilisée pour décrire la formation et la rupture d'un lien de façon mécanistique au niveau moléculaire. Pour les biologistes, elle est un outil pour mieux comprendre l'adhésion cellulaire et appréhender ses conséquences sur l'aspect biochimique et structural. Pour exemple, Evans *et al*⁶⁹ ont étudié par cette technique l'interaction entre des P-sélectines (présentes sur les cellules endothéliales) et leurs ligands PSGL-1, des glycoprotéines de la famille des mucines présents sur les leucocytes. Cette interaction est d'importance puisqu'elle «ralentit» les leucocytes (transportés rapidement par le flot sanguin) leur permettant ainsi par un mouvement de «rolling» de venir explorer les parois des vaisseaux sanguins lors d'une réponse inflammatoire. Les auteurs montrent que la force de la liaison dépend directement d'une part de la force appliquée mais plus encore de l'histoire de cette force (saut de force, rampe...). Le lien P-sélectines / PSGL-1 agit comme un interrupteur mécanique qui répond de façon différente à des changements même très subtils des stimuli qu'ils reçoivent.

Alors que de nombreuses techniques existent pour mesurer des forces ligands/récepteurs et décrire avec précision des liens adhésifs, nous allons essayer de souligner ici les avantages particuliers de la technique de BFP pour l'étude de notre système

I.2. Intérêt de la BFP

⁶⁸ EVANS, Nature, 1999, vol 397

⁶⁹ EVANS *et al*, PNAS, 2004, vol 101 n°31, 11281-11286

De façon générale, l'ensemble des techniques de mesure des forces est aujourd'hui un outil précieux comme le montre Merkel dans une revue très complète⁷⁰. L'AFM, les pinces optiques ou le BFP permettent par exemple de déterminer l'amplitude des forces qui s'exercent entre protéines. La mesure de ces forces et des distances sur lesquelles elles s'exercent permet de comprendre en quoi l'architecture des protéines contribue à la stabilité et l'organisation structurale des jonctions adhésives⁷¹. Néanmoins, toutes ces techniques ne sont pas équivalentes. Wang Na⁷² en propose une comparaison intéressante résumée dans le schéma suivant.

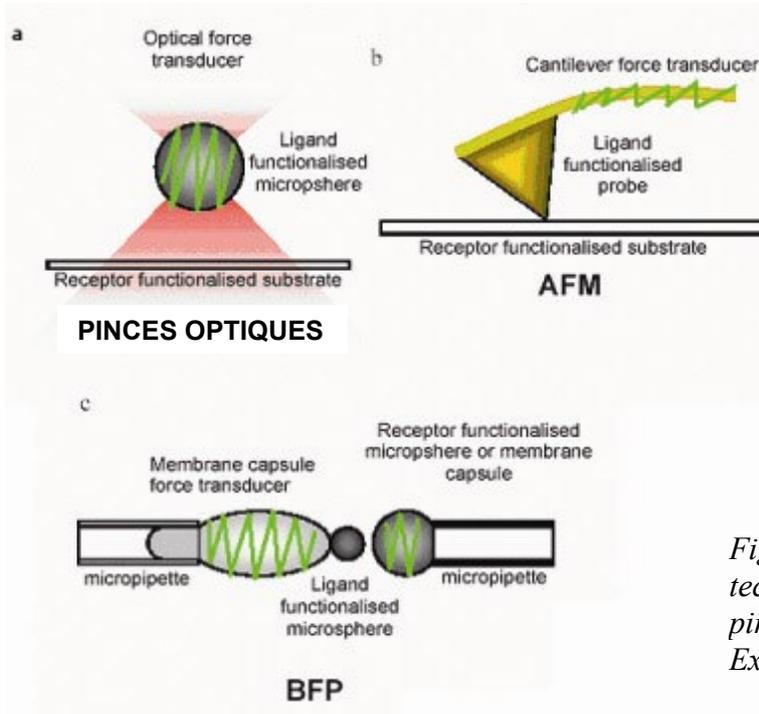


Figure 2 : Comparaison de 3 techniques de mesures de force : pinces optiques, AFM et BFP. Extrait de [72].

Ces trois techniques, AFM, pinces optiques et BFP, reposent sur le même principe : elles utilisent un capteur de force et un substrat fonctionnalisés respectivement par un ligand et un récepteur. La mesure consiste à mettre en contact les deux éléments puis à mesurer la force nécessaire pour les séparer. Cette force est directement reliée au déplacement et à la raideur du capteur utilisé.

C'est la nature de ce capteur, (et par extension la gamme de raideur disponible) qui différencie ces techniques. Dans le cas de l'AFM, il est possible de mesurer des forces d'une dizaine de pN à plusieurs nN⁷³. Cependant, la technique repose sur l'utilisation de cantilevers dont la raideur ne peut pas varier lors des expériences. Avec les pinces optiques il est possible de modifier la force exercée en variant l'intensité du rayonnement et donc la force du piège optique. Couplées à de la microscopie optique à haute résolution, des résultats ont été obtenus sur cellules⁷⁴. Cependant les forces appliquées ne peuvent excéder 50pN en raison des dommages causés par le rayonnement au-delà.

⁷⁰ MERKEL., Physics Reports 346 (2001) 343-385

⁷¹ Leckband, Current Opinion in Structural Biology, 2004, 14 :524-530

⁷² « Testing bond strength with Biomembrane Force Probe (BFP) » de mars 2004

⁷³ Florin et al, Science, 1994

⁷⁴ Hochmuth et al, Biophysical Journal, vol 70, 358-369, 1996

Il faut noter aussi l'existence d'autres techniques telles que la chambre à flux. Bien que le principe soit légèrement différent, la force exercée est également contrôlable par la maîtrise des forces hydrodynamiques⁷⁵.

Le tableau suivant (extrait de⁵) donne les caractéristiques de travail de ces trois techniques.

Technique	Force range (pN)	Position resolution	Force resolution	Loading rate (pN/s)	Force constant (pN/nm)
BFP	0.01-1000	~1-10nm	~ 1-10pN	0.05-60 000	0.1-3
AFM	10 – 10 ⁵	~nm	~0.1 pN	10 ⁴ – 10 ⁷	~40
Optical tweezers	0.01-100	~nm	~0.1 pN		~0.01

Table 1. Comparison of different techniques

Pour l'étude de notre système, Le BFP avec un capteur de force à globule rouge présente plusieurs avantages. Par modulation de la raideur du globule rouge, la force peut être explorée sur cinq ordres de grandeur. Cette large gamme de force disponible permet, dans la même expérience, de sonder des liens biologiques dans des conditions d'environnement différentes. Cette caractéristique unique est particulièrement pertinente pour notre étude où nous souhaitons tester l'influence de l'environnement de la liaison colloïde / cellule (ajout d'éléments compétiteurs dans le système, ajout de polymères...). Néanmoins, il faut souligner que très peu d'études ont ainsi été menées sur cellules.

Dans la suite de ce chapitre, nous commencerons par expliquer le principe de cette expérience simple mais délicate ; nous expliciterons le système que nous avons mis en place pour notre étude et détaillerons l'ensemble des paramètres modulables de l'expérience. Nous préciserons aussi la notion de force de rupture en essayant de souligner que ce concept qui paraît simple nécessite d'être traité avec précautions. Dans un second temps, nous présenterons les premiers résultats obtenus ; ces résultats qui confirment l'intérêt de cette approche, nous ont notamment permis de mettre en évidence une quantification du nombre de liens et l'effet du temps de contact. Nous tenterons dans cette partie de faire le lien avec des résultats déjà connus mis en évidence en AFM notamment.

Bien entendu, il ne s'agit là que de présenter les résultats très préliminaires obtenus. Pour s'inscrire dans la problématique plus générale d'interaction colloïde - cellule développée dans l'ensemble de ce manuscrit, l'intérêt de la technique de BFP sera de pouvoir étudier les modifications de l'environnement de la liaison, chose que nous n'avons pas pu faire. Cependant, nous avons montré que cela était tout à fait envisageable et mis au point le système expérimental.

Plus encore, l'étude menée a permis de démontrer la faisabilité de l'expérience dans les conditions propres à notre système colloïde - cellule vivante. Cette étude poursuivie à l'avenir permettra très certainement d'obtenir des résultats d'un grand intérêt pour la compréhension des mécanismes.

⁷⁵ Pierres et al, 1995

II. L'expérience de Biomembrane Force Probe

II.1. Dispositif expérimental

L'expérience de BFP est **une technique de micromanipulation sous microscope qui permet d'obtenir la courbe force / distance d'un couple ligand - récepteur**. C'est l'utilisation d'un capteur de force à globule rouge, développée par Evan Evans, qui en fait l'originalité.

L'expérience consiste à approcher une bille fonctionnalisée par des ligands et une cellule portant le récepteur correspondant. Bille et cellule sont chacune maintenues par aspiration dans deux micropipettes que l'on déplace sous microscope grâce à des micromanipulateurs. A chaque aller retour, la force est mesurée grâce au globule rouge utilisé comme un ressort. Nous reviendrons plus en détail sur cette mesure dans la suite.

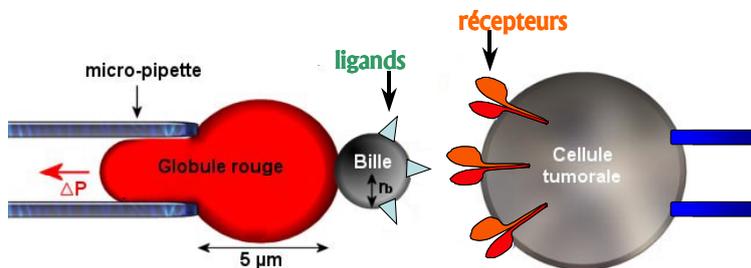


Figure 3 : Schéma de principe du BFP (d'après J. Husson)

Les expériences sont réalisées dans une chambre contenant le milieu où sont déposés les trois éléments : globules rouges, billes greffées par le ligand et cellules. Tous ces objets sont ensuite micromanipulés à l'aide de pipettes ; le tout est visualisé par microscopie optique. Les images sont enregistrées avec une caméra et une partie de l'expérience est pilotée par informatique.

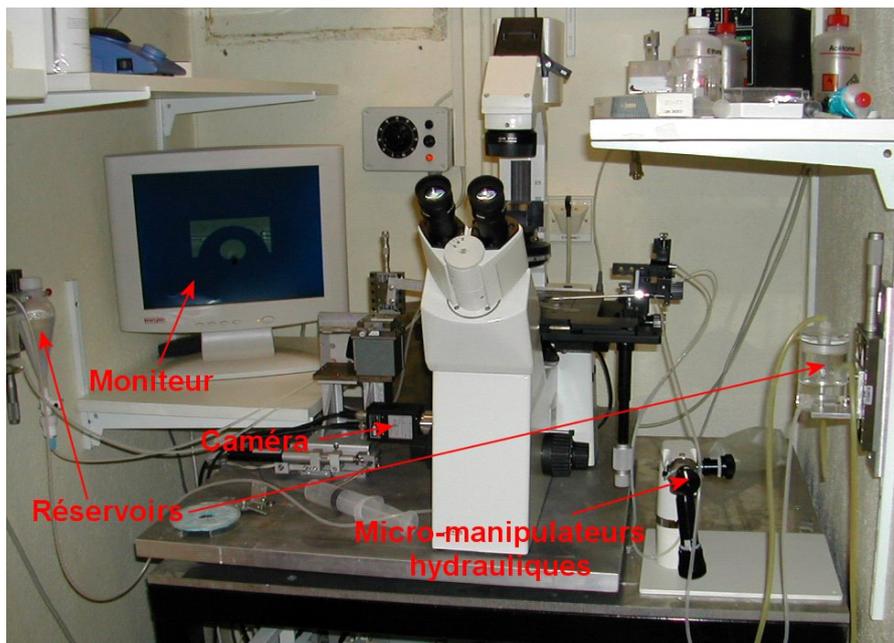


Figure 4 : Photographie du montage (J.Husson) LPS - ENS

II.1.1. La chambre

La chambre est constituée de deux lamelles de verre collées avec de la graisse de part et d'autre d'un support métallique adapté à la visualisation sous microscope. La solution tampon (tampon phosphate pH=7.4 type PBS) est introduit dans la chambre ainsi formée ; elle y tient par capillarité. Notons que la chambre est reliée à un réservoir d'eau par un capillaire ce qui permet de compenser ainsi l'évaporation de la solution durant le temps de l'expérience.

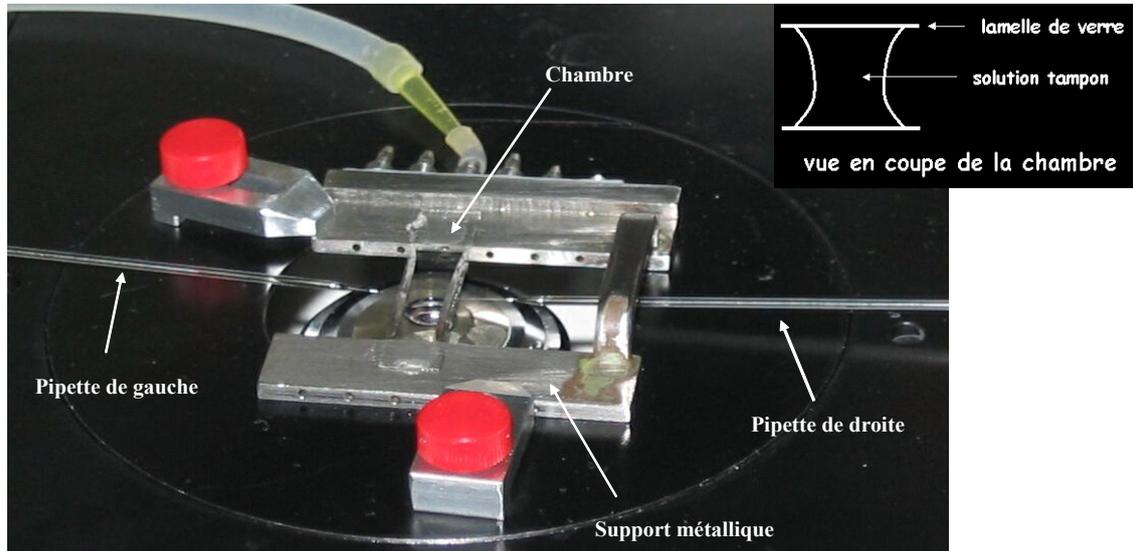


Figure 5 : Photographie de la chambre

II.1.2. Les micropipettes

Deux micropipettes entrent de part et d'autre de la chambre permettant d'y manipuler des objets. Leur tout petit diamètre ($2\mu\text{m}$ environ) rend leur préparation délicate. Nous en détaillerons le principe dans la suite.

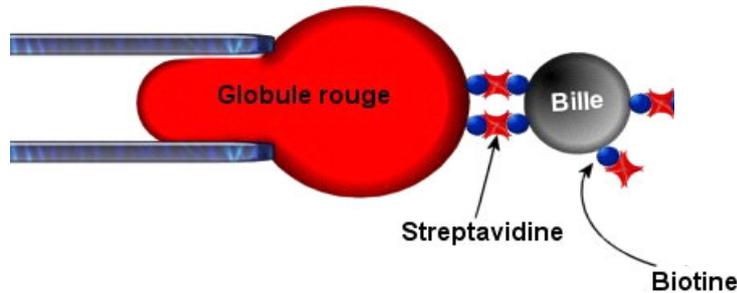
Une fois préparées, elles sont installées dans les micromanipulateurs qui assurent leur déplacement dans les trois directions. Leur extrémité est plongée dans la solution de la chambre. Elles communiquent par leur autre extrémité à un réservoir d'eau de hauteur variable.

Une différence de niveau Δh entre l'extrémité de la pipette et son réservoir crée une différence de pression $\Delta P = \rho_{\text{eau}} g \Delta h$. Lorsque le réservoir est plus bas que la pipette, l'aspiration dans la pipette permet d'attraper globules, billes ou cellules. Ces sont des vis micrométriques qui règlent ainsi avec une grande précision ($20\mu\text{m}$) la hauteur des réservoirs. Les aspirations peuvent ainsi être modulées très finement (0.2Pa) d'où la grande sensibilité de la technique ; dans notre cas, elles sont typiquement de l'ordre de 100Pa .

II.1.3. La sonde

La formation de la sonde, c'est-à-dire de l'ensemble globule – bille, repose sur une interaction spécifique. Les billes utilisées sont des billes de verre de diamètre $3\mu\text{m}$. Les globules rouges ont un diamètre d'environ $5\mu\text{m}$. L'accrochage entre ces deux éléments est assuré par le couple streptavidine – biotine. Cette liaison très utilisée par la communauté scientifique est l'une des liaisons non covalentes les plus « fortes ».

Billes et globules subissent un traitement chimique préalable permettant de greffer à leur surface une protéine biotine *. Les billes sont ensuite incubées dans une solution de streptavidine. Nous disposons donc de globules rouge biotinylés et de billes streptavidine. Ces deux entités sont capables de se lier pour former la sonde.



Dans notre cas, nous souhaitons étudier l'interaction entre un colloïde portant un peptide GRGDSP et nos cellules HeLa disposant des intégrines $\alpha_v\beta_3$. On peut alors se demander de quelle façon présenter notre ligand sur la sonde ainsi formée afin d'obtenir un système optimal pour la mesure de la force.

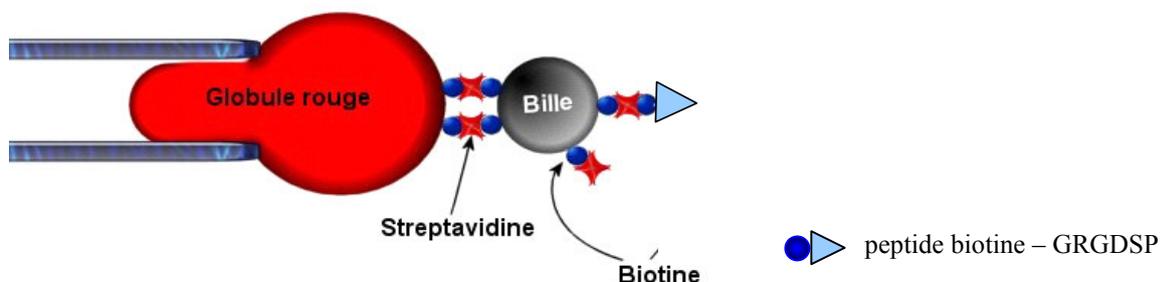
a- Utilisation des colloïdes lipidiques

Dans un premier temps, l'idée était d'utiliser directement nos colloïdes lipidiques en les fixant sur la bille. Pour cela, nous les avons fonctionnalisés à l'aide d'un lipide biotine destiné à assurer l'accrochage sur la bille streptavidine. Dès les premiers essais, cette configuration s'est révélée irréalisable et ce pour plusieurs raisons.

Le premier argument est d'ordre expérimental. En effet, nos colloïdes sont de taille trop faible (largement en dessous du μm) et sont donc extrêmement difficiles à micromanipuler. D'autre part, ces colloïdes lipidiques sont des objets « mous ». Même en supposant possible la formation d'une sonde, leur déformation est un vrai obstacle à la mesure de la rupture du lien ; ils constituent en effet le maillon « faible » de la chaîne ainsi formée. Nous avons donc rapidement renoncé à cette solution.

b- Utilisation de la bille fonctionnalisée comme colloïde modèle

Nous avons alors choisi d'utiliser la bille de verre comme colloïde modèle en la fonctionnalisant directement avec notre peptide GRGDSP. La bille étant recouverte d'une densité importante de streptavidine, nous avons utilisé un peptide portant une extrémité biotine. Nous obtenons ainsi des billes qui portent le ligand GRGDSP que nous voulons étudier.



* Les globules rouges sont liés de façon covalente avec un polymère PEG portant une fonction biotine. Les billes sont tout d'abord fonctionnalisées par des groupes amino-silane. En présence de sulfo-MBS, on vient ensuite faire réagir un NHS-PEG-biotine (NHS-PEG3400-biotin) [MERKEL *et al.* Nature, 1999, vol 397]

Il faut noter ici que dans la construction de la sonde, **le lien sondé, entre le peptide GRGDSP et le récepteur intégrine, est le plus faible de la chaîne. C'est donc bien sa rupture que nous mesurons** et non celle du couple biotine-streptavidine au niveau de la jonction globule/bille (le lien biotine-streptavidine est de loin le plus fort avec une affinité de 10^{13} à 10^{15} M^{-1} ce qui en fait un des liens biologiques les plus résistants).

c- Fonctionnalisation de la bille par le ligand peptidique

Le greffage du peptide GRGDSP-biotine sur la bille a nécessité une mise au point. Pour ce faire, nous avons défini deux critères basés sur les contraintes expérimentales :

- l'attachement sur le globule rouge doit être conservé : nous devons donc veiller à ne pas saturer complètement les sites d'accrochage streptavidine de la bille
- la probabilité d'événements entre bille fonctionnalisée et surface cellulaire doit être non nulle : la densité de peptides greffés doit donc être suffisante.

Après quelques essais, nous avons déterminé des conditions de greffage satisfaisant ces contraintes. Le peptide est incubé en contact avec les billes à une concentration relativement faible de 32nM pendant 15 min. Les billes ainsi préparées sont débarrassées du peptide en excès non ligué par trois lavages (centrifugation 2min 14000rpm, récupération du culot de billes qui est alors remis en suspension dans du milieu PBS propre).

Il faut cependant noter qu'il n'a pas été possible pour le moment de caractériser la surface de la bille ainsi obtenue. Notamment nous ne sommes pas capables de quantifier le nombre de peptides effectivement greffés sur la surface.

II.1.4. Protocole expérimental

Cette partie a pour but de présenter le déroulement de l'expérience du point de vue expérimental. Cela permettra au lecteur de se familiariser avec le dispositif expérimental et d'appréhender la délicatesse, la précision et la patience que requiert la préparation de ce type de manipulation.

La préparation de l'expérience est une suite de plusieurs étapes qui s'enchaînent comme suit :

▪ Préparation de la chambre.

Une fois montée comme précisé précédemment (paragraphe 1.1), elle est remplie d'une solution de PBS contenant 10% de BSA (albumine bovine) que l'on laisse incubé 30 minutes environ. Cette protéine sature l'ensemble des surfaces où elle s'adsorbe permettant ainsi de les « passiver » pour les globules, billes et cellules qui sont injectées ensuite.

▪ Après rinçages, elle est ensuite remplie par un milieu tamponné (PBS). A cette étape, on règle également la régulation de l'évaporation en ajustant le niveau du réservoir correspondant.

Pour cela, on ne remplit la chambre que partiellement (environ 1/3) et l'on observe la position du ménisque ainsi formé. Celui-ci doit rester stable ; s'il recule, c'est que le débit n'est pas suffisant pour compenser l'évaporation et qu'il faut monter le réservoir ; dans le cas contraire, il faut l'abaisser pour diminuer l'arrivée d'eau.

▪ Préparation des pipettes.

De diamètre d'environ $2\mu\text{m}$, elles sont étirées à partir de tubes capillaires en verre de 1mm. Une étireuse, sous l'effet du chauffage et de la traction, permet de séparer en quelques secondes le tube de verre en deux pipettes. Cependant, les pipettes restent

fermées à leurs extrémités. Leur ouverture se fait grâce à une microforge par visualisation dans une binoculaire.

Une fois ouvertes, elles sont remplies avec du PBS :

- par aspiration tout d'abord : le liquide monte dans la partie la plus étroite de la pipette par capillarité
- puis par injection (à l'autre extrémité, plus large) à l'aide d'une pipette Hamilton

Comme pour la chambre et pour les mêmes raisons, les pipettes sont ensuite mises à incuber dans une solution de BSA avant d'être installées sur les micromanipulateurs.

▪ **Réglage de l'aspiration des pipettes.**

La pression de la pipette de gauche notamment doit être la plus précise possible puisque c'est une donnée de base pour la détermination de la raideur k du globule et donc de la force de rupture. Pour contrôler au mieux l'aspiration, la détermination du zéro de pression est une étape cruciale.

On fait varier la hauteur du réservoir d'eau relié à la pipette jusqu'à immobiliser dans la pipette une petite impureté en suspension (repérée auparavant). Lorsque cette particule est immobile, l'aspiration est nulle. On peut alors régler la valeur de l'aspiration désirée en abaissant le réservoir de la hauteur nécessaire (typiquement 2cm ce qui correspond à une aspiration de 200Pa)

▪ **Injection des globules, billes et cellules dans la chambre**

Les 3 éléments sont injectés à l'aide d'une micropipette en trois endroits nettement distincts de la chambre.

▪ **Confection de la sonde**

Il s'agit là encore d'un enchaînement d'étapes à réaliser sous microscope avec dextérité.

- aspiration d'un globule rouge dans la pipette de gauche
 - aspiration d'une bille dans celle de droite
 - contact globule – bille pour former un lien biotine - streptavidine
 - lorsque l'alignement entre le globule et la bille est satisfaisant, on relâche l'aspiration dans la pipette de droite (éventuellement en soufflant légèrement) pour libérer la bille qui reste collée au globule
 - aspiration d'une cellule dans la pipette de droite devenue libre
- **Mesure des paramètres géométriques du système :**
- diamètre de la pipette de gauche
 - diamètre du globule rouge
 - dimension du contact bille - globule

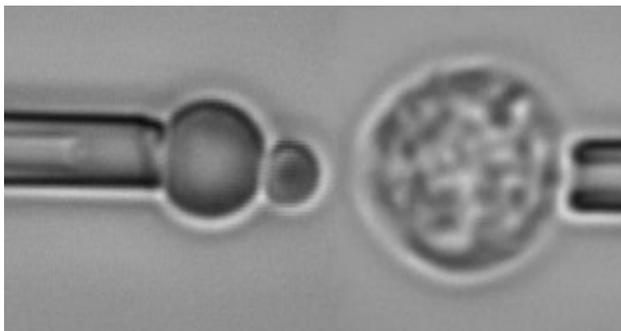


Figure 6 : Photographie d'une sonde que nous avons réalisée.

On reconnaît les deux pipettes, le globule rouge et la bille à gauche et une cellule HeLa à droite.

Après réalisation de toutes ces étapes (typiquement 2 à 3 heures de préparation), le montage est prêt pour les mesures. Notons que les cellules sont introduites au dernier moment (soit dans la dernière demi-heure) dans la chambre afin de les préserver au maximum dans leur état physiologique.

Une sonde (un trio globule, bille, cellule) peut permettre d'effectuer, si elle est réalisée correctement (bon alignement notamment) quelques centaines d'allers et retours (et de mesures de force correspondantes).

II.2. Principe de la mesure

II.2.1. Le globule rouge : un ressort de raideur contrôlable

Le globule rouge est utilisé ici comme un élément de raideur contrôlée et modulable par simple variation de l'aspiration appliquée dans la micropipette. En effet, quand elle est mise sous tension, la membrane déformable du globule rouge **se comporte comme un ressort**. D'autre part, la raideur de ce ressort dépend de la déformation initiale du globule due à l'aspiration dans la micropipette ; elle est ainsi **modulable** sur plusieurs ordres de grandeur et directement **contrôlable** par l'expérimentateur (en fonction de l'aspiration).

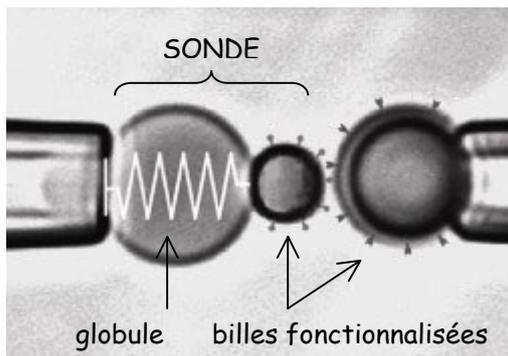


Figure 7 : Photographie / schéma de principe de la sonde

Extrait de *Dynamic Force Spectroscopy*. Evan Evans and Phil Williams in « *Physics of Bio-Molecules and cells* » Ecole des Houches d'été, LXXV. EDP Sciences (2002)

Le comportement du globule sous contrainte a été bien caractérisé tant théoriquement qu'expérimentalement^{76, 77}. La valeur de sa raideur k (pour des déformations peu importantes) dépend uniquement des paramètres géométriques du montage et peut être estimée grâce à l'expression suivante :

$$k = \frac{\pi \Delta P R_p}{\left(\ln \frac{2R_g}{R_p} + \ln \frac{2R_g}{R_b} \right) \times \left(1 - \frac{R_p}{R_g} \right)} \propto \Delta P R_p$$

ΔP : différence de pression entre chambre et pipette
 R_p : rayon de la pipette
 R_g : le rayon du globule (partie extérieure à la pipette)
 R_b : la rayon de la la zone de contact bille - globule

L'ensemble des paramètres géométriques est mesuré avant de commencer l'expérience. Les valeurs sont enregistrées dans le programme qui calcule directement la raideur correspondante du globule - ressort.

⁷⁶ Evans. *Biophysical Journal*, vol 59, April 1991

⁷⁷ Simson *et al*, *Biophysical Journal*, vol 74, April 1998, 2080-2088

II.2.2. Description de la mesure

Un piézoélectrique, monté sur la pipette de gauche, impose un mouvement de va et vient créant à chaque fois le contact entre la bille et la cellule. La position de la bille est suivie en direct par une caméra rapide (JAI 30 120Hz).

A tout instant, nous connaissons :

- la position théorique de la bille, x_{th} , qui dépend directement de la tension imposée au piézo et donc de sa vitesse de déplacement
- et sa position réelle, x_r , déterminée par le suivi vidéo.

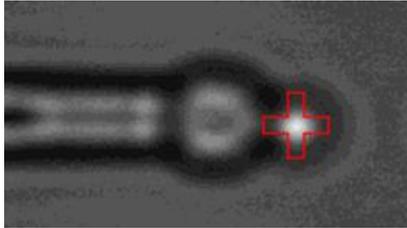


Figure 8 : Suivi vidéo de la position de la bille.
Le réglage de la focalisation du microscope et de la luminosité permet de faire apparaître une zone lumineuse au centre de la bille. A chaque instant on en détermine le centre (fit gaussien sur les niveaux de gris) ce qui permet une grande précision en X-Y pour la détermination de la position de la bille.

Lorsque le piézoélectrique recule, deux cas peuvent se présenter.

Si il n'y a pas de lien créé, la bille recule normalement en suivant le déplacement imposé par le piézo et $x_{th} = x_r$

Par contre, si il y a adhésion, c'est-à-dire si il y a eu création d'un lien entre la bille et la cellule, le globe est retenue sur la membrane de la cellule. Elle ne suit donc pas le mouvement du piézo. Le globe se déforme et on peut mesurer $\Delta x = x_{th} - x_r$. La force augmente alors proportionnellement à l'allongement :

$$f = k \Delta x$$

A chaque instant, la force est mesurée et enregistrée. C'est ce qu'on appellera par la suite la **force de rupture du lien**. La répétition de l'expérience de nombreuses fois (plusieurs centaines) permet d'obtenir une statistique sur la distribution de cette force de rupture.

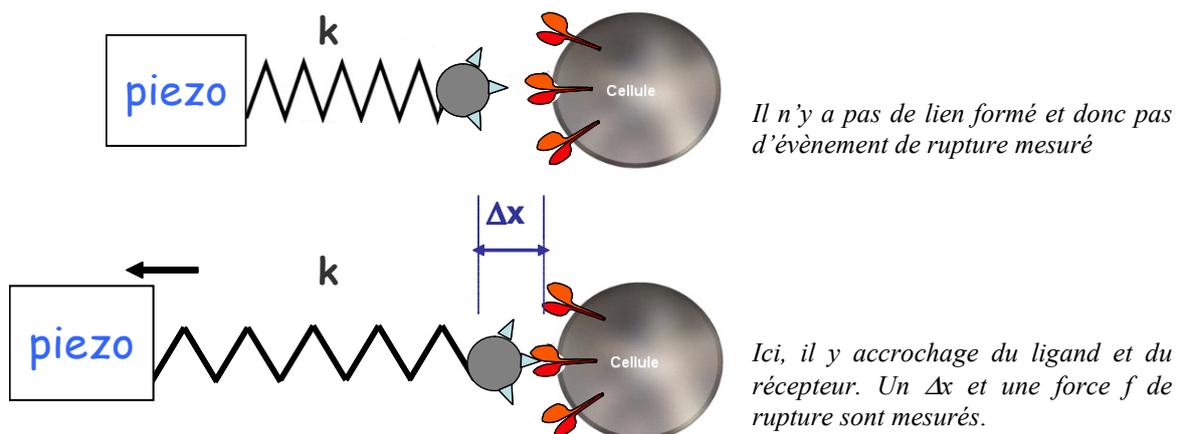


Figure 9 : Représentations schématiques de la mesure de force

Le globule rouge est représenté par un ressort de raideur k .

La force de rupture mesurée f est le produit de l'allongement maximal du ressort Δx par sa raideur k .

II.2.3. Courbes force-distance

Les forces f mesurées à chaque aller-retour du piézo sont automatiquement stockées dans un fichier informatique ce qui permet l'analyse statistique. Chaque aller-retour est donc visualisable en temps réel en terme de force.

Ci-dessous sont représentés en a), la courbe force-distance obtenue expérimentalement lors d'un évènement de rupture et en b) pour comparaison, la même courbe schématisée dans le cas théorique en l'absence de déformation du côté de la cellule (cas d'un mur rigide, sans déformation). Nous allons détailler la courbe a).

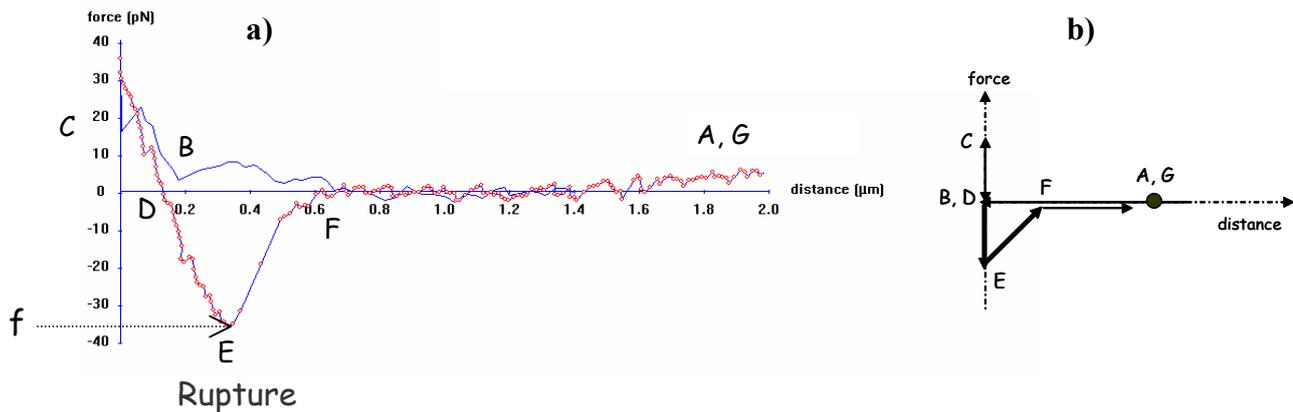


Figure 10 : Courbes force-distance. a) courbe expérimentale et b) courbe théorique

La bille fonctionnalisée se trouve initialement au point A. Lorsque l'expérience débute, le piézo avance et la bille se déplace vers la membrane cellulaire. La ligne continue bleue correspond à ce déplacement ; la force mesurée est globalement nulle (aux fluctuations près). Au contact de la surface qui lui fait face, en B, le globule se comprime et la force augmente. On observe alors une pente finie (de B vers C) due à la déformation du système (globule rouge et cellule). Lorsque la force atteint en C sa valeur maximale f_{\max} imposée ($f_{\max} = 20\text{pN}$ ici), le piézo s'arrête. Après un temps d'attente τ , il repart. En D, bille et cellule sont au contact et la force est nulle. Si un lien est formé, la bille est alors retenue sur la surface cellulaire. Le globule s'allonge, et la force (négative) augmente jusqu'au point E, où le lien rompt. La force de rupture f est obtenue au sommet du pic de force et vaut ici environ 35 pN. Ce pic est centré sur la distance à laquelle a lieu la rupture ; toutefois cette donnée n'est pas significative puisqu'on a affaire à des objets mous (la membrane plasmique de la cellule est déformable). Le globule reprend ensuite sa forme initiale et la force devient nulle en F. La bille retourne alors à son point de départ.

Dans le cas où il n'y a pas d'accrochage entre la bille et la cellule, la force est nulle jusqu'en B puis augmente pour atteindre la valeur maximale f_{\max} en C. Après attente du temps τ , le piézo repart en sens inverse. La force décroît alors rapidement et devient nulle lorsque la bille s'éloigne de la membrane de la cellule.

II.2.4. Paramètres contrôlables par l'expérimentateur

Plusieurs paramètres sont contrôlables et modulables par l'expérimentateur lors des mesures : la force maximale f_{\max} atteinte lors du contact bille - cellule, le temps τ de ce

contact et enfin le taux de charge r lié à la vitesse de rétractation du piézo après le contact. Typiquement, on fera varier f_{\max} de 10 à 50 pN ; τ peut également être modulé de 100 ms à quelques secondes.

La vitesse v de translation du piézo est également contrôlable. Plus précisément, l'expérimentateur détermine le taux de charge, noté r . Il s'agit en fait du taux de croissance de la force. En effet, si la bille de verre reste accrochée sur la cellule (= si il y a un événement d'adhésion), le lien subit une force qui croît linéairement avec le temps t écoulé :

$$f = k\Delta x = kv t$$

Le taux de charge est ainsi défini :

$$r = \frac{f}{t} = kv$$

Comme nous allons le voir dans le paragraphe suivant, c'est un paramètre capital. Les valeurs des forces mesurées sont en effet directement conditionnées par sa valeur.

II.3. Notion de force de rupture

Ce paragraphe reprend les éléments principaux permettant d'explicitier correctement la notion de force de rupture

L'idée simple mais fautive consiste à penser que la force d'un lien est une valeur intrinsèque propre au système étudié et qu'il est possible de la mesurer en détectant sous quelle force le lien se rompt. Cette approche est incorrecte. Deux raisons peuvent en effet être invoquées pour expliquer la rupture d'un lien : les phénomènes dissipatifs largement dominants dans une description mécanique classique et les fluctuations thermiques.

Ici, les liens biologiques étudiés sont des liaisons « faibles » et donc extrêmement sensibles aux fluctuations thermiques. Leur durée de vie est finie et elles peuvent se rompre de manière spontanée sous l'action seule de l'agitation thermique, sous force nulle. Ce temps de vie, maximal sous force nulle, diminue lorsque l'on sollicite le lien⁷⁸. Une force de rupture non nulle peut alors être mesurée. Néanmoins, si l'expérience est effectuée plusieurs fois et même dans des conditions similaires, les forces de rupture mesurées seront différentes à chaque fois : c'est une rupture statistique dispersée par les fluctuations thermiques.

On appellera alors **force de rupture f^*** , la force la plus fréquente obtenue lors de la répétition de l'expérience dans des conditions données. Elle dépend notamment très fortement de la vitesse avec laquelle on tire sur le lien pour provoquer sa rupture (c'est-à-dire le taux de charge r défini précédemment).

Pour explicitier plus précisément ces notions, on peut relier le problème de la rupture à celui de l'échappement d'une particule piégée dans un potentiel $E(x)$ (présenté à une seule barrière ici).

⁷⁸ Bell, 1978

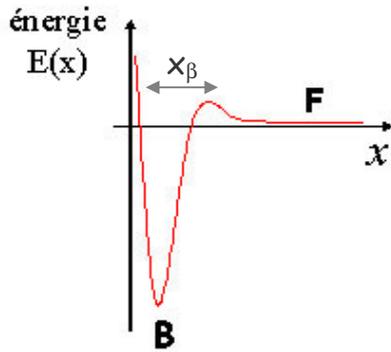
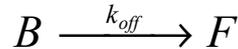


Figure 11 : Représentation du chemin énergétique correspondant à la rupture d'un lien. L'état lié (B) correspond à un potentiel $E(x)$.

Soit un état lié noté B (« bound ») et un état libre noté F (« free »).

Appelons k_{off} la fréquence de rupture de la liaison. La possibilité de recombinaison est nulle ($k_{on} \rightarrow 0$) puisque le montage rend la rupture irréversible (le piezo reculant, bille et cellule sont inévitablement séparées)

Le passage d'un état lié B à un état F où le lien est rompu peut s'écrire :



La variation du nombre d'éléments dans l'état B s'écrit :

$$\frac{dB(t)}{dt} = -k_{off}(t)B(t) \quad \text{ce qui équivaut à} \quad B(t) = \exp\left[-\int_0^t k_{off}(t')dt'\right]$$

Soit $p(t)$ la probabilité de détachement du lien entre un temps t et $t + dt$; elle représente la distribution des temps de vie de la liaison et s'écrit : $p(t) = k_{off}(t)B(t)$

Si maintenant on sollicite le lien, en le soumettant à une force f , le potentiel s'incline de la quantité $-xf$. En x_β , la profondeur du puits passe ainsi de E à $E - x_\beta f$; la probabilité de sortir du puits augmente et le temps de vie du lien diminue.

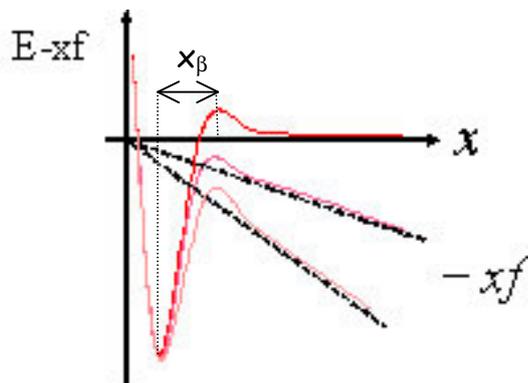


Figure 12 : Cas d'un lien soumis à une force f ; le potentiel s'incline de la quantité $-xf$.

Dans le cadre de l'expérience de BFP, nous avons vu que la force appliquée est directement liée au taux de charge fixé par l'expérimentateur : $f = rt$.

La probabilité pour le lien de rompre entre la force f et $f + df$ s'écrit alors naturellement :

$$p(f) = \frac{1}{r} p(t) = \frac{1}{r} k_{off} \exp\left[-\frac{1}{r} \int_0^f k_{off}(f')df'\right]$$

De plus, on sait que $k_{off} \propto \exp(-\frac{E}{kT})$. Par conséquent, lorsqu'on applique une force f , k_{off} augmente et s'écrit $k_{off} \propto \exp(-\frac{(E - xf)}{kT})$; le temps de vie du lien diminue et $p(f)$ augmente.

Connaissant $p(f)$, on en déduit alors la force la plus probable de cette distribution, force que nous noterons f^* . Elle se définit telle que $\frac{\partial p(f)}{\partial f} = 0$

Cette expression conduit à un résultat simple qui donne f^* en fonction du taux de charge r .

$$f^* = f_{\beta} \log\left(\frac{r}{r_0}\right)$$

$$\text{et } k_{off} \approx \frac{1}{t_0} \exp\left(\frac{f}{f_{\beta}}\right)$$

avec t_0 la durée de vie du lien sous force nulle

$$\text{avec } f_{\beta}, \text{ une force unité telle que } f_{\beta} = \frac{k_B T}{x_{\beta}} \text{ et } r_0 = \frac{f_{\beta}}{t_0}$$

La distribution des forces et f^* en particulier dépendent ainsi directement du taux de charge r .

Il faut noter que le problème peut se généraliser à plusieurs barrières. Dans cette approche, la technique de BFP permet alors en principe de sonder de manière très précise des liaisons complexes en proposant notamment des interprétations mécanistiques sur leur panorama énergétique. Elle s'appuie sur l'étude de la force f^* en fonction du taux de charge ⁷⁹. Nous ne rentrerons pas davantage dans ces considérations qui dépassent largement le cadre de notre étude.

Il faut cependant garder à l'esprit que l'on ne peut pas parler simplement de la valeur de la force d'un lien. Les résultats obtenus sont seulement des distributions de la force de rupture mesurée pour ce lien et ce dans des conditions de traction données.

Pour fixer encore les idées et les explications précédentes, présentons succinctement quelques résultats de la littérature qui illustrent et soulignent ce point important.

Merkel *et al* ⁸⁰ ont étudié la liaison biotine - streptavidine en faisant varier les conditions de sollicitation du lien (i.e. le taux de charge) sur 6 ordres de grandeur. Ils montrent que la durée de vie de la liaison passe de 1min à 1ms et que dans le même temps, la valeur de la force de rupture mesurée augmente de 5 pN à 170 pN. Ainsi, bien que faisant partie des liens non covalents les plus forts de la biologie (avec une affinité de 10^{13} à 10^{15} M⁻¹), la liaison biotine - streptavidine apparaît forte ou faible suivant la vitesse avec laquelle elle est sollicitée.

⁷⁹ E.Evans, Faraday Discuss, 1998, 111, 1-16

⁸⁰ Merkel *et al*, Nature, vol 397, 7 January 1999

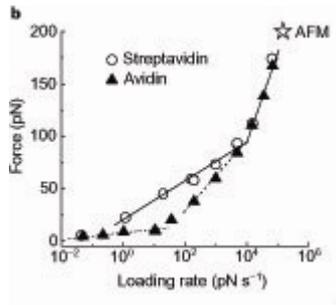


Figure 13 : Force de rupture f^* en fonction du logarithme du taux de charge r pour les systèmes biotine - streptavidine (cercles) et biotine - avidine (triangles).
Extrait de [80].

Lorsque la liaison est plus faible comme c'est le cas entre des immunoglobulines de type G (IgG) et la protéine A, un récepteur du staphylocoque pour l'IgG, le temps de vie intrinsèque du lien est compatible avec celui des expériences. La rupture spontanée peut alors être observée⁸¹.

III. Résultats expérimentaux et discussion

Cette partie a pour but de présenter les premiers résultats que nous avons obtenus sur le montage de Frédéric Pincet. Il faut souligner le caractère préliminaire de ces résultats qui doivent être reproduits avec une statistique plus élevée. Néanmoins, ils se sont révélés très encourageants pour la poursuite de l'étude.

III.1. Faisabilité et mise au point expérimentale

Dans un premier temps, nous avons cherché à **démontrer la faisabilité de la mesure** sur notre système. Deux points ont été validés en ce sens :

- la possibilité de mesurer des événements d'adhésion entre bille et cellule
- la spécificité des ces événements

III.1.1. Une configuration originale

Classiquement, la technique de Biomembrane Force Probe est utilisée pour l'étude de liens uniques. Dans ce but, la densité des molécules, ligands et récepteurs, est choisie suffisamment faible pour que la probabilité de former un lien ne dépasse pas 10% ce qui signifie que la plupart des courbes enregistrées sont sans événement. Cette précaution permet d'assurer que sur ces 10% d'événements mesurés, plus de 90% correspondent à la rupture d'un lien unique, moins de 10% à un lien double, 1% à un lien triple...etc. De plus, la plupart des études sont menées sur des systèmes modèles de type bille - bille ou bille - vésicule. Ligands et récepteurs y sont greffés ou ancrés chimiquement.

Dans notre cas, la préoccupation est différente. **Nous ne cherchons pas à mesurer l'interaction ligand/récepteur à l'échelle d'un couple de molécules unique mais plutôt à mesurer la force d'adhésion d'un colloïde sur une cellule ce qui peut impliquer plusieurs liaisons.** Par conséquent, nous avons choisi de nous placer dans des conditions permettant

⁸¹ Simson *et al*, PRL, vol 83, n°3, 1999

d'obtenir une large probabilité d'événements. La densité de ligand sur la bille doit donc être suffisamment élevée. Elle ne peut être mesurée comme nous l'avons détaillé dans le paragraphe II.1.3 mais sera maintenue constante dans toutes les mesures effectuées.

III.1.2. Choix de la zone de contact sur la cellule

Dans la démarche générale que nous suivons, nous avons fait le choix de travailler directement sur des cellules vivantes et donc accepter de prendre en compte toute la complexité de la membrane cellulaire dans nos approches.

Dès les premiers essais, il est apparu que la zone de contact sur la cellule est un paramètre essentiel. En effet, nous avons constaté de très grandes disparités dans les probabilités d'événements à quelques μm près lorsque l'on se déplace sur la membrane de la cellule. Les mesures effectuées dépendent ainsi fortement de la zone choisie par l'expérimentateur pour établir le contact. Biologiquement, cela n'a rien d'étonnant : il existe très probablement sur les cellules des zones d'adhésion privilégiée où se concentrent les intégrines.

Néanmoins, ce premier résultat souligne l'importance de définir un critère expérimental permettant de prendre en compte ce paramètre. Des cellules dépourvues de récepteurs ont été utilisées en ce sens. Dans ce cas, il est impossible de mesurer une probabilité d'événements significative et ce quelque soit l'endroit choisi par l'expérimentateur pour le contact. Au contraire, dans le cas de cellules portant les intégrines et au prix de quelques tests, il est toujours possible de trouver une zone favorable présentant une probabilité d'événements suffisante. Cette différence assure la validité de l'approche expérimentale.

Le premier critère à respecter avant de lancer une série de mesure, consiste donc à s'assurer de la pertinence de la zone choisie sur la cellule. Pour cela, on réalise quelques mesures tests. Si l'on obtient des événements en quantité raisonnable une acquisition plus longue est lancée. Si ce n'est pas le cas, une zone plus favorable est recherchée. Cette restriction est cependant minimisée par le nombre important de mesures réalisées.

III.2. Spécificité de l'interaction

Après avoir mis en place notre système expérimental et le greffage de notre peptide d'étude sur la bille, nous avons vérifié la spécificité de notre lien. Pour cela, nous avons comparé des billes témoin (non fonctionnalisées) avec des billes fonctionnalisées par le peptide de reconnaissance RGD.

Pour chacun des systèmes, plusieurs séries de mesure (plusieurs centaines d'allers-retours) ont été réalisées et les forces de rupture f mesurées à chaque fois. Le tableau ci-dessous présente les résultats que nous avons obtenus

(taux de charge = 400pN/sec)

	Billes RGD Cellules HeLa avec intégrines $\alpha_v\beta_3$.	Billes témoin Cellules HeLa avec intégrines $\alpha_v\beta_3$.	Billes RGD Cellules HeLa sans intégrines $\alpha_v\beta_3$.
Probabilité P d'événements (en %)	66	13	7
Forces de rupture mesurées en pN	$10 < f < 50$	$f < 15$	$f < 15$

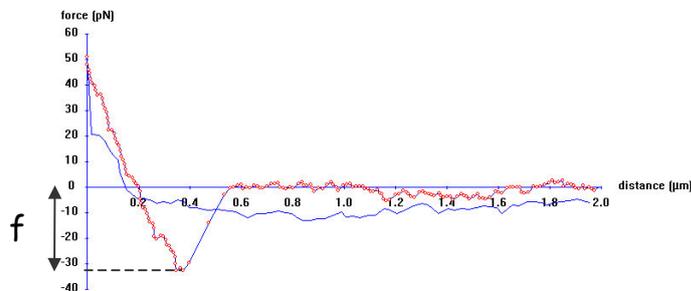
Nous constatons en premier lieu que les probabilités d'événements sont très différentes. Nous recensons 66% d'événements adhésifs dans le cas des billes RGD contre seulement 13% pour des billes témoin. Ce dernier résultat est rassurant et montre qu'il n'y a donc pas d'interaction entre la streptavidine qui recouvre ces billes et la surface de nos cellules HeLa. De la même façon l'utilisation de cellules HeLa dépourvues d'intégrines $\alpha_v\beta_3$, donne des probabilités d'accrochage très faibles de l'ordre de 7%. Plus précisément encore, les forces de rupture mesurée entre bille RGD et cellules donnent des valeurs comprises entre une dizaine et une cinquantaine de pN. Au contraire, dans le cas des billes témoin, les quelques forces mesurables et mesurées n'excèdent pas la quinzaine de pN.

Ces expériences confirment la spécificité de notre lien puisque l'absence de ligands comme de récepteurs conduisent à une diminution très nette du nombre d'événements mesurés et de leur intensité. C'est donc bien le lien GRGDSP / intégrines $\alpha_v\beta_3$ que nous sondons dans cette expérience.

III.3. Des distributions de forces quantifiées

III.3.1. Résultats

Les mesures réalisées correspondent à un taux de charge fixe de 400pN/sec. La force maximale, f_{max} , lors du contact varie de 10 à 50 pN. Le temps de contact, ou délai τ , varie de 0.1 à 2s. Plusieurs séries de mesures sont réalisées en faisant varier ces conditions. Nous obtenons pour chaque aller-retour du piézo des courbes force - distance (nous en avons discuté dans la partie II.2.3 de ce chapitre). Chacune d'entre elles est traitée et le saut de force f mesuré.



L'ensemble des valeurs de f mesurées est ensuite rassemblé sous forme d'histogrammes. L'histogramme suivant présente ainsi 411 événements de rupture (la probabilité d'accrochage est dans ce cas de 75%).

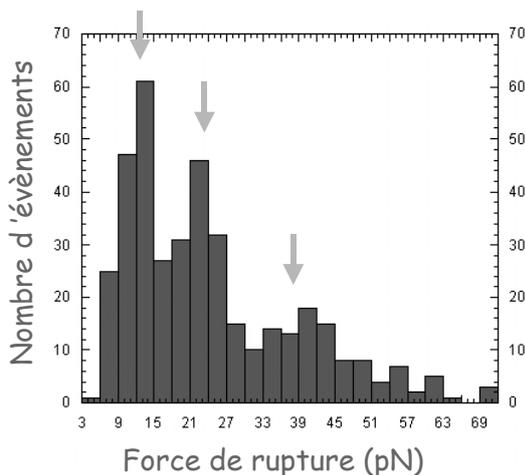


Figure 14 : Distribution des forces de rupture obtenue pour le couple bille GDRGSP-cellules HeLa.

Il s'agit d'un histogramme ; on lit en abscisse la force de rupture mesurée en pN et en ordonnée le nombre d'événements. Les forces < 3pN ne sont pas reportées sur ce graphe. Elles correspondent aux courbes répertoriées comme « sans événement visible qui sorte du bruit »

On constate que 3 forces (repérées les flèches) apparaissent comme les plus probables.

Il apparaît de façon assez frappante **une quantification de ces forces de rupture** sous forme de 3 pics que nous pouvons ajuster par la somme de 3 gaussiennes respectivement centrés sur $12.4 \pm 0.2 \text{ pN}$, $22.8 \pm 0.2 \text{ pN}$ et $39.6 \pm 1.6 \text{ pN}$ pN (graphe A). Les hauteurs obtenues valent respectivement 58 ± 3 , 42 ± 3 et 13 ± 1.5 ; les largeurs sont estimées à 4.5 ± 0.3 , 3.8 ± 0.4 et 13.5 ± 2.5 .

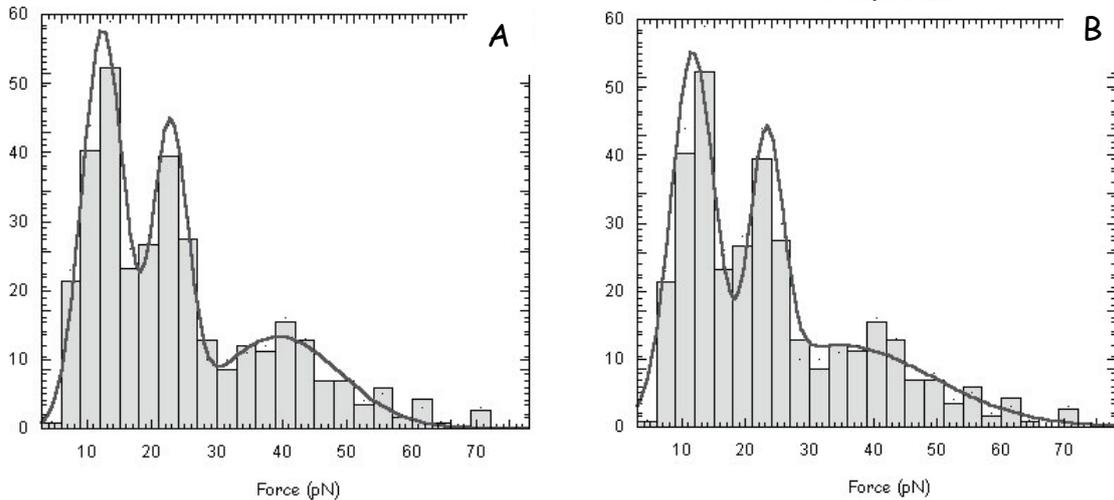


Figure 15 : Ajustements de l'histogramme

A : somme de 3 gaussiennes avec 9 paramètres libres (hauteurs, positions et largeurs).

B : somme de 3 gaussiennes avec 7 paramètres libres (hauteurs, largeurs et une position (les autres étant respectivement le double et le triple de la première))

Dans le cas du graphe B, nous avons imposé la position relative des 3 gaussiennes, la deuxième et la troisième étant des multiples de la première. Les deux premiers pics sont correctement ajustés (avec une valeur unité de $11.6 \pm 0.2 \text{ pN}$). Par contre, l'ajustement du troisième pic est un peu moins satisfaisant.

Il faut souligner que cet ajustement primaire à partir de gaussiennes est simplement destiné ici à quantifier les caractéristiques (et en particulier les positions) des pics que nous voyons apparaître ; il ne s'agit pas d'une interprétation en soit. En revanche, nous avons vu dans le paragraphe II.3 qu'un potentiel $E(x)$ correspond à un profil $p(f)$ calculable. Nous sommes actuellement en train d'analyser ces histogrammes en proposant un ajustement à partir de l'expression de $p(f)$. Ceci va permettre une meilleure compréhension du système mais il est encore trop tôt pour en présenter ici une vision claire.

Bien entendu, ces histogrammes correspondent à la superposition de plusieurs centaines d'acquisitions. Il s'agit donc de différentes séries d'expériences et donc de groupes de courbes n'appartenant pas nécessairement à la même série de mesure (la sonde, la cellule peuvent être différentes). Nous avons donc vérifié que la quantification observée n'était pas le jeu de fichiers* différents juxtaposés. Ce n'est pas le cas. **La structure générale de ces distributions est très robuste.** On la retrouve au sein de toutes les séries de mesure (20 à 100 allers-retours) traitées séparément ; la structure est donc conservée au niveau d'un fichier unique et ce avec les mêmes valeurs malgré le peu de statistique. Il semble donc que nous observons bien plusieurs niveaux de rupture du lien.

* On appelle **fichier** un groupe de courbes successives mesurées dans des conditions identiques (même sonde, même cellule, même endroit sur la cellule). C'est donc une série de mesures « homogènes »

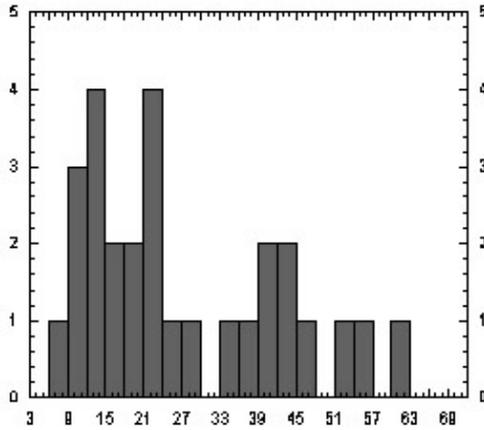


Figure 16 : Distribution des forces de rupture obtenue sur une seule acquisition.

Il s'agit donc d'un seul fichier de mesure qui comporte 26 événements de rupture. En raison de la statistique nécessairement faible à l'échelle d'un fichier unique, l'histogramme n'est pas lissé. Cependant, on retrouve déjà la structure quantifiée observée précédemment et ce pour les mêmes valeurs. Cela se retrouve sur tous les fichiers que nous avons enregistrés.

Avec toutes les précautions qui s'imposent, **nous pouvons postuler que la valeur du premier pic (11 à 12 pN dans les conditions de l'étude) correspond à une unité de l'interaction GRGDSP- $\alpha_v\beta_3$** . S'agit-il d'un lien seul ? Il est impossible avec ces seuls éléments de le dire. L'unité adhésive dont on observe la rupture peut être composée de n liens (impliquant ainsi n récepteurs) ; les autres ruptures mesurées pourraient alors correspondre respectivement à $2n$ et $3n$ liens.

Cette hypothèse de forces quantifiées impliquant respectivement n , $2n$ et $3n$ liens est certainement la plus probable ; pour autant, nous ne pouvons éliminer la possibilité d'une seule liaison mais formée de façon plus ou moins forte dans les différents cas (dans des « puits d'interaction » différents par exemple). Il n'est donc pas possible de conclure définitivement au jour d'aujourd'hui quant à l'interprétation exacte de ces quantum.

III.3.2. Discussion

Bien que totalement exploitables, ces résultats sont étonnants. En effet, nous n'en avons pas trouvé de semblables dans la littérature de la technique de BFP.

Tout d'abord, les histogrammes de force de rupture obtenus en BFP comporte traditionnellement un seul pic centré sur une valeur moyenne qui représente la force de rupture la plus probable du lien. L'expérience étant utilisée pour sonder des liens uniques, tout est fait expérimentalement pour s'affranchir des liaisons multiples (diminution des densités de ligands et de récepteurs). Dans les cas où les densités de ligands sont trop importantes et où les événements multiples deviennent probables, les distributions de forces de rupture sont alors inexploitables car très larges ; c'est d'ailleurs ce qui a poussé les expérimentateurs du BFP à diminuer leurs densités de ligands et de récepteurs pour s'affranchir de ce problème et obtenir des résultats exploitables.

Quelles sont les raisons susceptibles d'expliquer ces différences de comportements ?

Nous ne pouvons pas répondre définitivement à cette question ; cependant, tout laisse à penser que le fait de travailler directement sur des cellules vivantes est un paramètre important. En effet, les expériences traditionnelles de BFP sont menées sur des billes ou des vésicules fonctionnalisées par un ligand ou un récepteur. On peut imaginer que ces molécules biologiques, dans un environnement modèle type bille ou vésicule se comportent différemment qu'*in vivo* au sein de la membrane cellulaire. Les configurations des protéines, qui jouent un rôle prépondérant dans tous les mécanismes de reconnaissance et d'adhésion, peuvent être altérées ou moins « mobiles » dans ces systèmes modèles. La diffusion des récepteurs dans les membranes biologiques peut aussi jouer un rôle non négligeable dans les

mécanismes d'adhésion. Des récepteurs ancrés sur une bille ou une vésicule pourraient donc se comporter différemment. Dans cette hypothèse, travailler sur cellules, loin de complexifier l'étude, pourrait au contraire simplifier les interprétations et permettre d'étudier le lien dans sa configuration naturelle, *in vivo*. Cette configuration est probablement beaucoup plus favorable à l'établissement de liaisons que l'on sait par ailleurs très fortement dépendantes de leur environnement (configuration des protéines, signalisation intracellulaire, diffusion au sein des membranes biologiques, activation des récepteurs par transduction du signal...)

Néanmoins, le cas de liaisons multiples en BFP a été envisagé et de nombreux travaux théoriques ont été réalisés sur ce point⁸². Expérimentalement, des résultats de quantification de liens multiples ont également été obtenus sur des systèmes modèles de type bille-bille⁸³. Dans ce cas, c'est le lien biotine - streptavidine, particulièrement fort, qui a été sondé. Cette étude, menée sur des systèmes bien contrôlés, semble ainsi confirmer nos résultats. En effet, dans notre cas, la quantification a pu être observée, à notre connaissance pour la première fois, sur cellule vivante. Elle permet (et ce de façon beaucoup plus précise en comparant les valeurs relatives des différents pics) d'obtenir beaucoup plus simplement la valeur du lien (qu'il s'agisse d'une liaison unique ou d'une unité adhésive comportant plusieurs liaisons). Bien entendu, ce résultat devra être complété. En particulier, l'évolution des pics en fonction du taux de charge est un point crucial à étudier ; elle permettra de déterminer la valeur intrinsèque d'un lien colloïde-cellule.

III.3.3. Comparaison avec la littérature

L'interprétation en terme de liens multiples est par ailleurs confortée par des études faites en AFM⁸⁴. Entre autres, Florin *et al*^{*} ont obtenu une distribution des forces de rupture du couple biotine-avidine permettant de remonter à un quanta de force pour une unité moléculaire. Lehenkari et Horton⁸⁵ ont également mesuré la liaison entre les intégrines $\alpha_v\beta_3$ de cellules ostéoblastes et ostéoclastes et plusieurs de leurs ligands contenant tous la séquence RGD. Les forces mesurées sont réparties en plusieurs groupes ajustés par des gaussiennes comme le montre la figure ci-dessous, extraite de l'article. Les forces mesurées sont là encore quantifiées et les auteurs en déduisent entre autre une force d'accrochage de 127 ± 16 pN entre un ligand (l'anticorps F11) et les ostéoclastes.

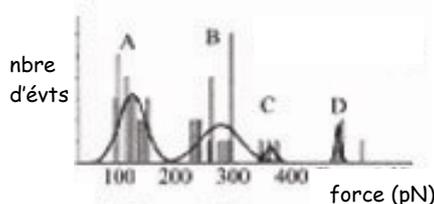


Figure 17 : Distribution des forces d'interaction entre un anticorps F11 et les intégrines $\alpha_v\beta_3$ d'ostéoclastes de rats.

Figure extraite de [85].

L'étude compare également différents ligands RGD (peptide GRGDSP linéaire, vitronectine, osteopontine, echistatine) et rapporte des valeurs d'interactions qui peuvent être très

⁸² Williams P., Evans E. Physique des biomolécules et des cellules. Les Houches session LXXV. EDP Sciences

⁸³ S.Pierrat. Thèse de doctorat de l'Université Paris 6. 2004

⁸⁴ Williemsen *et al*, Biophysical Journal, vol 79, December 2000 3267-3281

* Florin *et al*, 1994. [73].

⁸⁵ Lehenkari et Horton, Biochemical and Biophysical Research Communications 259, 645-650 1999

différentes soulignant ainsi l'importance de l'environnement dans lequel se trouve la séquence RGD au sein d'une protéine sur la force du lien engendré.

Ces résultats ne sont pas directement comparables à ceux que nous avons obtenus en BFP. Toutefois, en tenant compte des différences de taux de charge appliqué sur la liaison GRGDSP - intégrines $\alpha_v\beta_3$ avec ces deux techniques, AFM et BFP, nous pouvons tenter de vérifier si ils sont du même ordre.

Dans cet article, Lehenkari et Horton, ont travaillé avec un cantilever de raideur $k=0.03\text{N/m}$ et sa vitesse de rétractation v est de $1\mu\text{m/s}$ pour les mesures effectuées sur le peptide GRGDSP. Cela correspond à un taux de charge $r=kv$ de 3.10^4 pN/s .

Pour ce qui nous concerne, nous avons obtenu une force de rupture de 12 pN pour la même liaison (mais sur un autre type cellulaire) pour un taux de charge de 400 pN/s .

Connaissant la relation entre force de rupture f^* et taux de charge (se reporter au paragraphe II.3), nous pouvons évaluer la force f^* attendue pour un taux de charge de 3.10^4 pN/s . En prenant la distance moléculaire x_β égale à 0.5 nm , on trouve une force de rupture de l'ordre de 28 pN . Cette force correspond à celle que nous aurions mesurée pour ce taux de charge avec notre système GRGDSP – intégrines $\alpha_v\beta_3$ des cellules HeLa.

Cette valeur est proche de celle rapportée par les auteurs sur les ostéoblastes (32 pN), valeur rappelons le fortement dépendante du type cellulaire étudié (42 pN sur les ostéoclastes).

Ainsi pour conclure, nous pouvons dire que les résultats que nous avons obtenus, si ils sont étonnants en BFP, semblent toutefois valides et confirmées par des études en AFM utilisant des systèmes proches. Ils mettent en évidence une quantification des forces de rupture mesurées suggérant ainsi que la liaison bille-cellule met en jeu plusieurs liens (n, 2n, 3n).

Dans la suite, nous nous sommes attachés à faire varier certains paramètres expérimentaux et notamment le temps de contact bille-cellule. Les résultats, très préliminaires, sont présentés ci-après.

III.4. Variation du temps de contact

Dans cette partie, nous avons tenté de modifier le temps de contact bille – cellule et d'en mesurer les effets sur la distribution des forces de rupture. En travaillant avec la même sonde et la même cellule, plusieurs mesures ont été réalisées en changeant le temps de contact τ de 0.1 à 2 s . Les mesures sont réalisées à taux de charge constant (400pN/s) et la force maximale de contact n'est pas modifiée au cours de l'expérience ($f_{\text{max}}=20\text{pN}$).

Le premier effet observé concerne la probabilité d'événement d'adhésion qui augmente de 50 à 75% avec le temps de contact. Ainsi, globalement, un facteur 10 dans le temps de contact (entre 200ms et 2s) permet d'augmenter la probabilité d'événements d'un facteur 1.5 . **La formation du lien est donc favorisée par le temps d'attente, ce qui semble naturel.**

De plus, on observe à nouveau une quantification des forces de rupture mesurées centrées autour d'une valeur unité de l'ordre de 12.5pN (puis de multiples pour les pics suivants) comme nous l'avons déjà observé. Par contre, la répartition des événements dans ces 3 pics est modifiée comme on peut le voir sur la les figures suivantes.

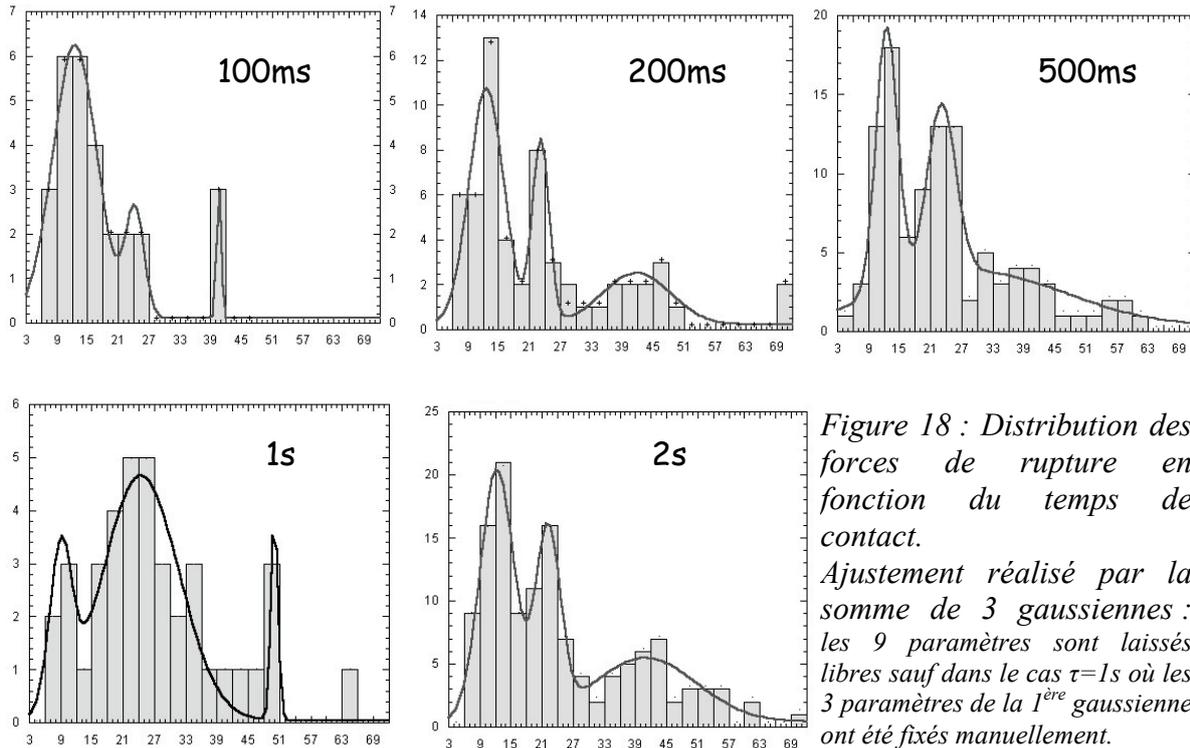


Figure 18 : Distribution des forces de rupture en fonction du temps de contact. Ajustement réalisé par la somme de 3 gaussiennes : les 9 paramètres sont laissés libres sauf dans le cas $\tau=1s$ où les 3 paramètres de la 1^{ère} gaussienne ont été fixés manuellement.

On remarque que l'augmentation du temps de contact favorise les forces de rupture plus importantes. On peut tenter de quantifier cette évolution en évaluant dans chaque cas la proportion d'événements dans le 1^{er} pic. Le résultat d'un tel traitement est présenté ci-dessous :

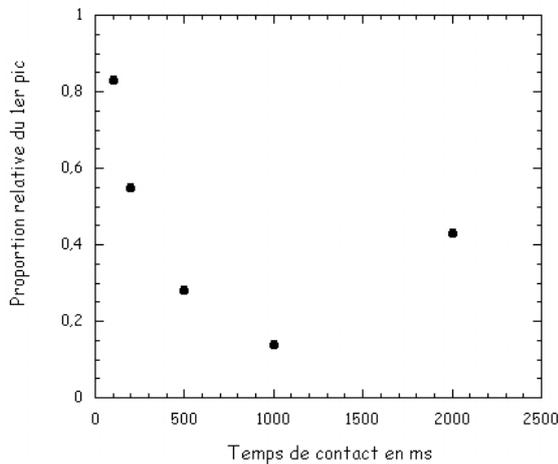


Figure 19 : Evolution de la proportion d'événements à faible force de rupture (1^{er} pic) en fonction du temps d'attente τ lors du contact bille – globule.

Chaque point représente l'aire du 1^{er} pic par rapport à l'aire totale ; la détermination des aires est réalisée à partir des valeurs des ajustements à 3 gaussiennes ci-dessus.

Nous constatons que le 1^{er} pic est largement majoritaire pour des temps courts de 0.1 et 0.2 s. Pour son importance diminue fortement au profit des suivants. Les forces de rupture impliquant une seule unité (1^{er} pic) deviennent alors minoritaires devant celles qui en impliquent davantage.

L'augmentation du temps de contact entre le ligand et son récepteur favorise donc d'une part la création du lien au sens général mais plus encore le création de liens multiples.

Pour expliquer ces observations, plusieurs hypothèses peuvent être avancées et discutées. On peut penser dans un premier temps que l'augmentation du temps de contact peut permettre aux récepteurs présents en périphérie de la zone d'étude de diffuser librement dans la zone de

contact. Plus nombreux, les récepteurs favorisent ainsi la création de liens multiples. Un rapide calcul * peut confirmer cette hypothèse qui conduit à des coefficients de diffusion des intégrines dans une membrane cellulaire cohérents.

Par ailleurs, nous savons que la configuration du récepteur (ici l'intégrine) joue un rôle clé dans le mécanisme de reconnaissance du ligand et donc dans la création du lien adhésif. On peut imaginer qu'un certain temps (biologique) est nécessaire pour le récepteur afin qu'il soit dans une configuration active qui lui permette d'accrocher son ligand. Ce temps peut correspondre à l'activation du récepteur par des voies de transduction du signal par exemple. Ainsi des temps d'attente plus longs peuvent permettre l'activation de davantage de récepteurs et donc rendre possible la création de liens plus nombreux.

Dans tous les cas, il paraît naturel que la probabilité de former un lien augmente avec le temps. C'est d'ailleurs ce qu'ont décrit de nombreux articles. Benoit *et al*⁸⁶ ont ainsi étudiés par des mesures d'AFM les interactions cellules - cellules médiées par une glycoprotéine (csA) exprimée par *Dictyostelium.discoideum* et impliquée dans le développement d'organismes pluricellulaires. Les mesures (réalisées pour un taux de charge de $2.5 \pm 0.5 \mu\text{m s}^{-1}$) montrent là encore une quantification des forces de rupture d'unité 23 ± 8 pN mais plus précisément, les auteurs ont étudié l'influence du temps de contact sur les distributions des forces de rupture. Qualitativement, les observations rapportées sont les mêmes que dans notre cas :

- la probabilité d'évènements diminue de 57% à 34% lorsque le temps de contact diminue de 2s à 0.2s (soit une diminution d'un facteur 1.6 ce qui est tout à fait comparable à ce que nous avons observé pendant le même laps de temps)
- les forces de rupture apparaissent globalement plus faibles : les évènements multiples disparaissent au profit d'évènements uniques.

Les auteurs suggèrent que des liens multiples, si ils sont plus forts et plus stables nécessitent aussi un temps plus long pour se former.

III.5. Conclusion et Perspectives

Cette étude menée au LPS depuis un peu plus d'un an en collaboration avec Frédéric Pincet nous a permis dans un premier temps **de démontrer la faisabilité et l'intérêt de l'approche dans le cadre de notre problématique**. Plus particulièrement, nous avons pu :

- mettre en place notre système expérimental (greffage des billes, mise au point des densités de ligands) et vérifier la spécificité du lien testé
- mettre en évidence une quantification du nombre de liens et mesurer l'effet du temps du contact

Ces résultats bien que très préliminaires nous apparaissent encourageants et confirment de façon très convaincante la validité de cette approche pour étudier l'interaction colloïde - cellule. Fort de ces conclusions, le montage doit être très prochainement mis en place au CRPP par Damien van Effenterre. Ce nouvel outil expérimental disponible sur place

* Par diffusion pendant un temps t , les intégrines explorent une région de rayon R tel que $R = \sqrt{Dt}$. Si la probabilité d'évènements augmente par diffusion des récepteurs entre $\tau = 200\text{ms}$ et $\tau = 2\text{s}$, c'est que des intégrines ont pu diffuser en 1.8s vers la zone de contact que nous évaluons à $R = 1\mu\text{m}$. On en déduit une valeur du coefficient de diffusion des intégrines $D = 5.5 \cdot 10^{-13} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$, compatible avec les valeurs connues par ailleurs.

⁸⁶ Benoit *et al*, Nature Cell Biology, vol 2, June 2000

permettra d'approfondir l'étude en complétant avantageusement les expériences de cytométrie de flux déjà bien au point au laboratoire.

Dans cette optique, de nombreux points d'étude pourront être approfondis. Tout d'abord, il semble important de regarder comment évoluent nos résultats, qualitativement et quantitativement en fonction du taux de charge. De quelles façons nos distributions sont-elles affectées par ce paramètre ?

De plus, il apparaît capital de modifier l'environnement de la liaison et d'en mesurer les effets sur la force du lien créée. Pour cela, nous pouvons moduler d'une part les propriétés physico-chimiques de l'objet colloïdal et de ses ligands et de l'autre les caractéristiques membranaires de la cellule. Pour ce qui est des objets, il est envisageable de greffer des polymères sur leur surface pour étudier leur effet plus localement et apporter ainsi des éléments complémentaires à l'étude déjà bien amorcée en cytométrie. De la même façon, l'effet de la longueur du bras espaceur qui sépare le colloïde du motif de reconnaissance pourra être étudié. Bien entendu, d'autres ciblage (sous unité B de la toxine de Shiga/Gb3, transferrine/récepteur Trf) pourront également être testés. Du côté des cellules, les propriétés biochimiques du glycocalyx peuvent être modifiées (digestion enzymatique, modification de l'expression des récepteurs par transfection...).

Il sera également possible d'étudier l'influence de colloïdes libres en solution. On pourra se demander en quoi la liaison est affectée par ces colloïdes libres compétiteurs.

Enfin, la technique de BFP peut permettre d'obtenir des données cinétiques quantitatives qui pourraient dans notre cas confirmer ou compléter encore l'étude en cytométrie de flux. C'est en tout cas ce qu'on a montré Chesla, Selvaraj et Zhu⁸⁷. Ils proposent un modèle mathématique permettant à partir des données expérimentales du BFP (et notamment les probabilités d'accrochage en fonction du temps de contact) de déterminer les constantes cinétiques à 2D de deux espèces moléculaires immobilisées sur deux surfaces en contact. La méthode proposée a permis de mesurer les constantes cinétiques de l'interaction entre le récepteur CD16A de cellules CHO (Chinese hamster ovary cells) et d'immunoglobulines G.

⁸⁷ Chesla, Selvaraj et Zhu, *Biophysical Journal*, 1998, vol 75, 1553-1572

Chapitre 6

Quelques perspectives sur l'internalisation des colloïdes

L'ensemble du travail présenté jusqu'à présent s'est intéressé uniquement à l'étape de fixation des colloïdes sur la membrane cellulaire ; les expériences ont pour cela été conduites à 4°C, bloquant ainsi le métabolisme cellulaire et l'entrée des objets dans la cellule. Ici au contraire, nous allons nous placer dans des conditions plus physiologiques, à 37°C, pour nous intéresser à l'étape d'internalisation. Bien entendu, notre ambition à ce niveau est restreinte et ce n'est qu'une étude préliminaire que nous allons présenter dans ce chapitre.

Tout d'abord, nous verrons qu'avec les deux types de ciblage utilisés (peptide RGD et sous unité B de la toxine de Shiga), les colloïdes sont capables de pénétrer dans les cellules. Nous illustrerons ce point par des photos de microscopie de fluorescence confocale. Nous montrerons également que comme pour l'adhésion, la cytométrie de flux peut permettre de mesurer et de suivre les cinétiques d'internalisation de ces objets. Puis, nous aborderons les questions du devenir intracellulaire des colloïdes. Nous verrons que face à la variété des voies de transport qui existent, le suivi de nos objets constitue un enjeu majeur. Nous présenterons les premières observations réalisées dans ce but. Enfin, nous proposerons quelques perspectives et pistes d'exploration qui pourraient s'avérer intéressantes dans le travail d'investigation considérable qu'il reste à mener sur cette problématique complexe.

I. Internalisation des colloïdes

I.1. Observation en microscopie confocale de fluorescence

Ce premier point a pour objectif de présenter, après un très bref rappel sur la microscopie confocale, quelques clichés révélateurs des observations que nous avons réalisées sur nos systèmes.

I.1.1. Intérêt de la microscopie confocale

L'imagerie de colloïdes fluorescents en contact avec des cellules et plus particulièrement la question de leur localisation (dans le volume) est un sujet délicat. En particulier, le manque de résolution axiale de la microscopie classique est un inconvénient majeur et **c'est la microscopie confocale qui s'impose alors comme moyen d'investigation volumique des échantillons**. L'utilisation d'une source laser cohérente permet en effet dans ce cas de pratiquer des coupes optiques virtuelles dans l'objet observé et de n'enregistrer que l'image de fluorescence émise dans le plan, s'approchant ainsi de la limite théorique de résolution d'un système optique. L'exploitation des différentes coupes permet ainsi la reconstruction de l'échantillon dans les 3 dimensions.

La figure 1 rappelle le principe de la microscopie confocale à balayage laser.

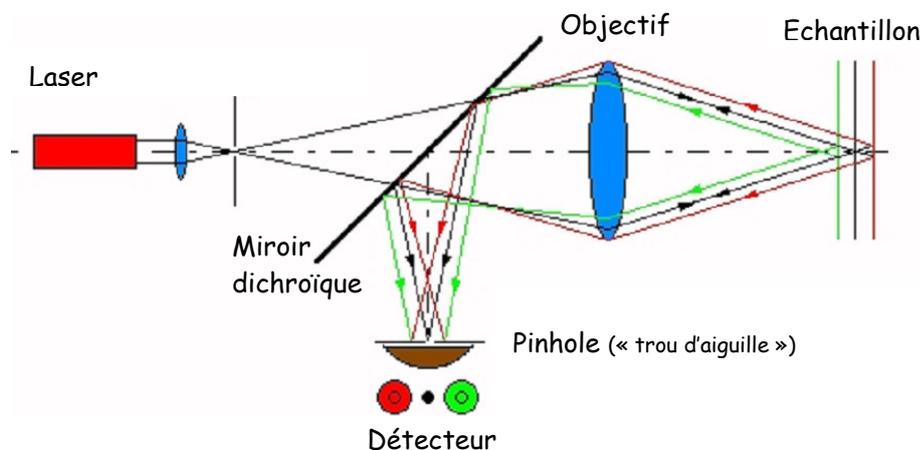


Figure 1 : Principe de la microscopie confocale.

Le rayon laser exciteur pénètre dans l'échantillon marqué. Lors de l'impact optique, il y a émission de rayons lumineux provenant de différents plans de la préparation. Un diaphragme variable (pinhole) permet alors de sélectionner les rayons émis par un seul plan et d'éliminer les autres. L'information n'étant alors récoltée que sur un petit élément de volume, un balayage dans le plan XY est nécessaire pour reconstruire l'image. Sur le principe de la microscopie de fluorescence conventionnelle, chaque rayon réfléchi est ensuite filtré suivant sa longueur d'onde, détecté par des photo-multiplieurs et enfin converti en signal numérique pour la création d'une image.

Soulignons que le laboratoire s'est doté d'un tel microscope en 2002. Les observations ont ainsi été réalisées sur un appareil Leica TCS-SP2 avec un objectif 63X d'ouverture numérique 1.4.

I.1.2. Observation de l'internalisation de colloïdes fonctionnalisés par la sous unité B de la toxine de Shiga

Pascale Chenevier, au cours de son travail de thèse *, a montré l'internalisation des colloïdes RGD par certains types cellulaires (lignée endothéliales EAhy 926, cellules ostéoprogénitrices et cellules dendritiques). Nous avons de notre côté regardé ce qu'il en était dans le cas des colloïdes fonctionnalisés par la sous unité B de la toxine de Shiga mis en contact avec des cellules HeLa.

Les photographies A à D présentées page suivante représentent des coupes équatoriales de cellules HeLa en suspension réalisées en microscopie confocale. Les cellules sont mises à incuber à 4°C (clichés A et B) ou à 37°C (C et D) en présence de colloïdes Shiga fluorescents (lipide bodipy vert) à une fraction volumique typique de $3 \cdot 10^{-4}$. Le contact se fait par simple agitation manuelle dans des puits montés sur des lamelles adaptées pour l'observation au microscope. Après 1h d'incubation, le surnageant contenant les objets non adhérents est éliminé et un tampon propre non fluorescent (milieu blanc) est ajouté. Cette étape est indispensable pour éliminer la fluorescence du volume qui sans quoi parasite énormément l'observation.

A 4°C, nous observons une fluorescence périphérique uniquement au niveau de la membrane plasmique: les colloïdes sont fixés sur la surface (photographies A et B). A 37°C, au contraire la présence de fluorescence à l'intérieur de toutes les cellules (photographies C et D), est le signe que des objets fluorescents ont été internalisés. Précisons à ce niveau que l'information exacte concerne uniquement le lipide fluorescent. Il n'est pas possible par exemple de savoir si le colloïde est resté intact ou bien au contraire si il a été détruit. On peut par exemple imaginer que l'objet est dégradé après son passage dans des compartiments de pH acide, les lipides triés et séparés, les observations ne révélant alors que la localisation du lipide bodipy.

De plus, l'observation des photographies C et D montre qu'il ne s'agit pas d'une fluorescence cytosolique diffuse mais d'un marquage fin « punctiforme » qui pourrait correspondre à celui de compartiments intracellulaires.

Les photographies E (en transmission) et F (en fluorescence) représentent des cellules HeLa adhérentes. Il s'agit en fait de cellules incubées à 37°C en suspension 30 minutes avec des objets fluorescents (même protocole que pour les clichés C et D) ; après rinçage et élimination des colloïdes du volume, les cellules sont remises à adhérer sur des lamelles. L'observation est alors réalisée 24h après.

Nous observons là encore une fluorescence cellulaire importante ; cytoplasmique, elle semble plus diffuse. Cela peut s'expliquer d'une part par le caractère adhérent des cellules et d'autre part peut être par le métabolisme plus avancé (ici 24h) des lipides ingérés.

* Pascale CHENEVIER. « Vésicules multilamellaires de type onions comme vecteurs biologiques ciblés ». Thèse de doctorat de l'université Bordeaux 1. 2001.[19].

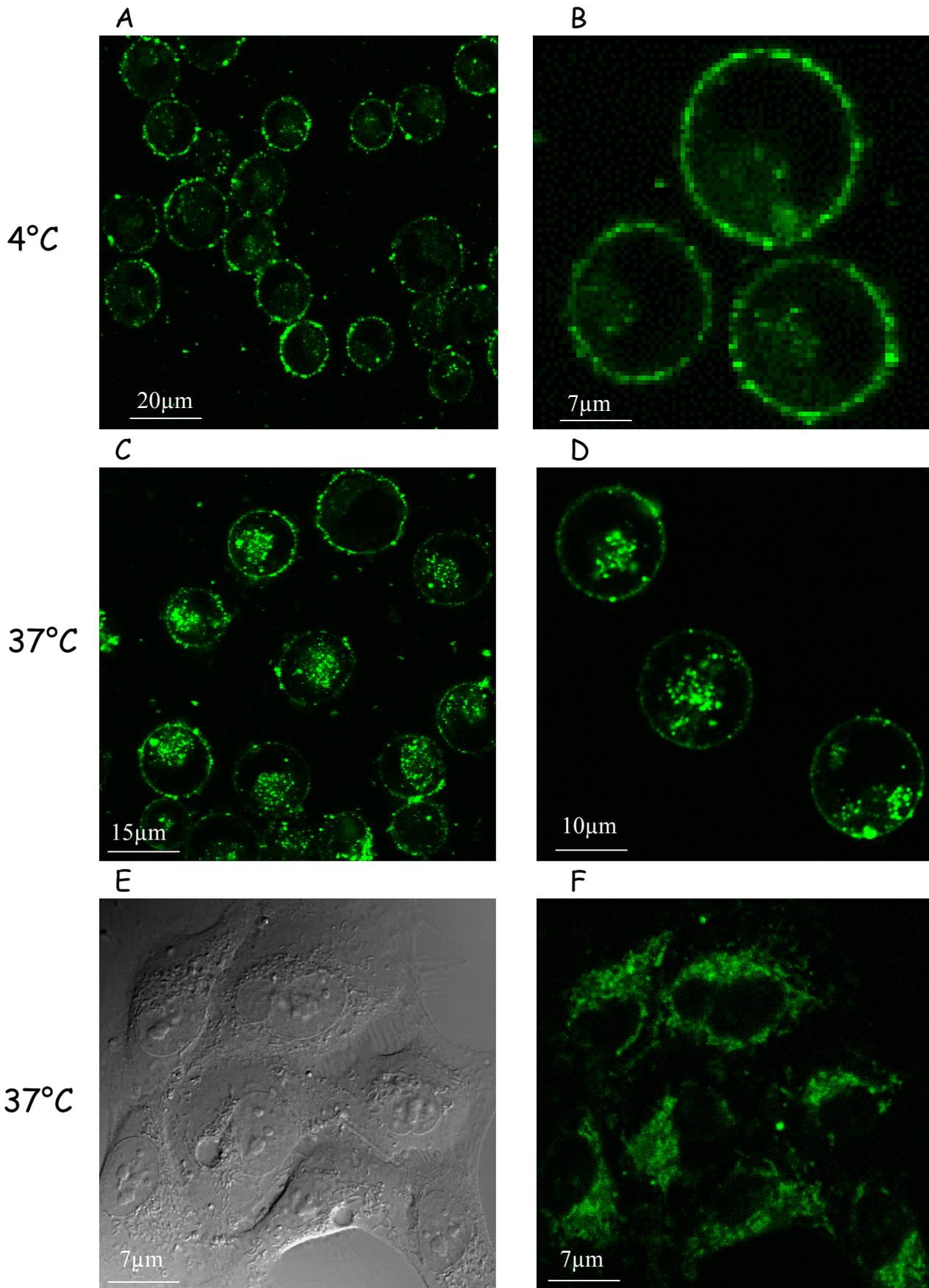


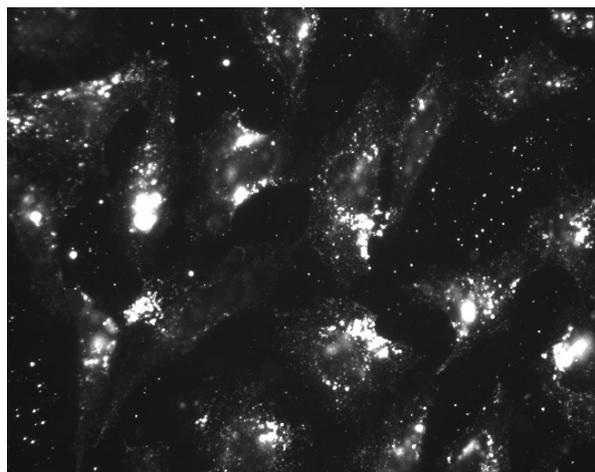
Figure 2 : Photographies de microscopie confocale de fluorescence réalisées sur des cellules HeLa en suspension (A à D) ou adhérentes (E et F).

I.1.3. Contrôle de la spécificité de l'interaction

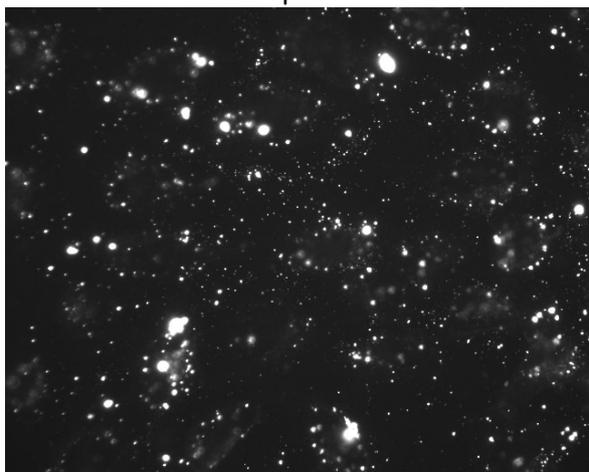
Nous avons vérifié dans le chapitre 2 la spécificité de l'adhésion des colloïdes Shiga ; en effet, l'absence de ligands sur les objets ou de récepteurs Gb3 sur la membrane cellulaire entraîne une diminution très importante du signal de fluorescence mesuré en cytométrie de flux. Nous allons ici confirmer ces effets par des observations microscopiques.

Les photographies ci-dessous représentent des cellules HeLa adhérentes mises en contact 30 minutes à 37°C avec une concentration 3.10^{-4} de colloïdes Shiga. On compare le cas de cellules HeLa normales possédant des récepteurs Gb3 (cliché G) et de cellules HeLa cultivées pendant 5 jours avec 5µM de PPMP, un inhibiteur de la synthèse de Gb3 (cliché H).

G : Cellules HeLa non traitées



H : Cellules HeLa dépourvues de Gb3



*Figure 3 : Photographies de microscopie confocale de fluorescence sur cellules adhérentes
Clichés réalisés à l'Institut Curie par D. van Effenterre, D.Patin et M.Amessou*

Nous observons une fluorescence cellulaire bien marquée dans le puits contrôle (G) ce qui confirme là encore les observations précédentes : les colloïdes Shiga adhèrent puis pénètrent bien à l'intérieur des cellules. Au contraire, en l'absence de récepteurs Gb3 (H), nous observons une fluorescence complètement aspécifique ; non marquées, on ne distingue d'ailleurs pas les cellules. Ce résultat est ainsi tout à fait en accord avec les expériences réalisées dans les mêmes conditions en cytométrie de flux où nous avons observé une diminution très forte de l'adhésion en l'absence de récepteurs Gb3 (partie B paragraphe I.2 du chapitre 2).

Ainsi, nous confirmons que c'est la reconnaissance spécifique du ligand Shiga par le glycolipide Gb3 qui permet l'adhésion et l'internalisation des colloïdes fonctionnalisés par la sous unité B de la toxine de Shiga.

Nous allons maintenant tenter de voir si, comme pour l'adhésion, il est possible de quantifier l'internalisation par des mesures de cinétiques.

I.2. Cinétiques d'internalisation

La toxine de Shiga est connue pour pénétrer rapidement dans les cellules. Ainsi, elle est internalisée en 5 minutes environ et se retrouve dans l'appareil de Golgi après une vingtaine de minutes. Les observations microscopiques laissent penser que dans le cas des

colloïdes Shiga le processus est un peu plus long (de l'ordre de 30min pour l'observation de l'internalisation). L'utilisation de la cytométrie de flux peut aussi permettre d'apporter des réponses sur ce point.

Le suivi des cinétiques est réalisé par cytométrie de flux suivant exactement le même protocole que celui détaillé dans le chapitre 2 pour le suivi cinétique de l'adhésion. **Nous mesurons alors à 37°C la fluorescence moyenne par cellule, fluorescence proportionnelle à l'ensemble des objets en contact avec la cellule, c'est-à-dire à la somme des objets adhérents sur la surface et des objets internalisés à l'intérieur même de la cellule.**

L'expérience consiste à suivre l'évolution de la fluorescence de cellules HeLa en contact à 37°C avec des colloïdes Shiga à quatre fractions volumiques différentes (de haut en bas 10^{-3} , $3 \cdot 10^{-4}$, 10^{-4} et $3 \cdot 10^{-5}$). Les résultats sont présentés sur le graphe ci-après.

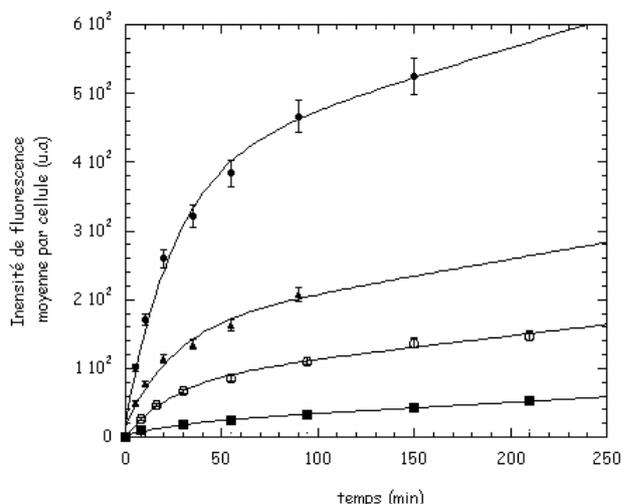


Figure 4 : Evolution de la fluorescence de cellules HeLa en contact avec des colloïdes Shiga à différentes concentrations.

Ajustement $m_1 + m_2(1 - \exp(-m_3x)) + m_4x$
d'après le modèle $O+R \rightleftharpoons OR \rightarrow O_{int} + R$

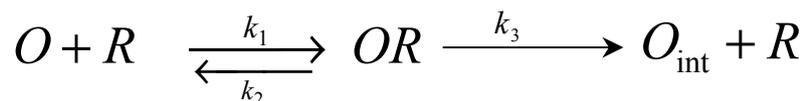
Nous constatons en premier lieu une fluorescence globale de la cellule d'autant plus importante que la concentration de colloïdes augmente : **la somme des deux phénomènes (adhésion+internalisation) croît donc avec la concentration de colloïdes.** Plus précisément, nous pouvons observer une évolution en deux temps :

- une augmentation rapide de la fluorescence au début dont l'allure est de type exponentiel
- une évolution plus lente ensuite, linéaire, qui traduit l'accumulation de la fluorescence à l'intérieur de la cellule

Compte tenu de ces remarques, on choisit ici de rendre compte simplement de la situation par la succession :

- d'une étape d'adhésion représenté par un équilibre (constantes k_1 et k_2)
- d'une étape d'internalisation, nécessairement irréversible (constante k_3)

Nous pouvons les représenter ainsi :



OR représente le complexe formé par le colloïde et son récepteur à la surface de la cellule et O_{int} représente le colloïde internalisé. On considère ici que le récepteur est recyclé vers la membrane plasmique.

Avec R_T le nombre total de récepteurs et C_0 la concentration initiale d'objets en large excès (à tout instant $C=C_0$), les équations cinétiques qui régissent ce système s'écrivent :

$$\frac{dOR}{dt} = k_1(R_T - OR)C_0 - k_2OR - k_3O_{int} \quad \text{et} \quad \frac{dO_{int}}{dt} = k_3OR$$

La résolution du système d'équations permet d'obtenir l'expression de $OR(t) + O_{int}(t)$ qui correspond à la somme des espèces fluorescentes que nous mesurons expérimentalement :

$$OR(t) + O_{int}(t) = \frac{k_1 C_0 R_T}{k_1 C_0 + k_2 + k_3} \left[\frac{k_1 C_0 + k_2}{k_1 C_0 + k_2 + k_3} (1 - \exp(-(k_1 C_0 + k_2 + k_3)t)) + k_3 t \right] \quad (1)$$

Nous remarquons qu'il s'agit de la somme d'une exponentielle et d'une droite ce qui correspond à ce que nous observons expérimentalement (figure 4).

Pour déterminer précisément les constantes cinétiques, des expériences sur une plus grande gamme de concentration serait nécessaire pour explorer les différents régimes. Néanmoins, il est déjà possible d'évaluer l'ordre de grandeur de k_2 et k_3 grâce à l'ajustement. Ainsi, nous estimons $k_2 = 6.10^{-2} \text{ min}^{-1}$ et $k_3 = 4.5.10^{-3} \text{ min}^{-1}$.

Nous avons démontré dans cette partie que les colloïdes Shiga sont bien internalisés par les cellules HeLa de manière spécifique et que des mesures cinétiques en cytométrie de flux peuvent permettre une étude plus quantitative du phénomène. Cette étude très préliminaire pourra bien entendu être approfondie ; elle permettra d'obtenir les valeurs des constantes cinétiques et des temps caractéristiques associés. Par ailleurs, il faut noter que nous n'avons à l'heure actuelle aucune idée des voies d'entrées empruntées par ces objets. C'est cette question du devenir intracellulaire que nous allons aborder dans la suite.

II. Devenir des objets dans la cellule : notions de trafic intracellulaire et perspectives d'étude

Nous avons déjà évoqué dans le chapitre 1 les nombreuses voies d'entrée qui existent dans les cellules ^{88, 89}. Nous essaierons ici de faire ressortir les questions soulevées par l'internalisation des colloïdes ciblant dans ce contexte complexe du transport intracellulaire. Nous proposerons quelques perspectives d'étude sur ces systèmes.

II.1. Des voies d'entrées et des parcours intracellulaires variés pour les ligands

Nous allons présenter ici les voies d'entrées connues pour les ligands RGD et la toxine de Shiga que nous utilisons. Nous nous appuyerons sur un système de référence bien connu des biologistes : la transferrine.

⁸⁸ A.BENMERAH and C.LAMAZE. *Medecine/Sciences*. 2002; n°11, vol 18.

⁸⁹ L.JOHANNES and C.LAMAZE. *Traffic*, 2002, 3, p. 443-451.

II.1.1. Endocytose « classique » avec recyclage du récepteur

Nous avons déjà évoqué dans le premier chapitre le cas de l'endocytose médiée par des récepteurs. Nous avons ainsi vu que les LDL sont internalisés avec leurs récepteurs, puis que l'ensemble est dissocié au niveau de l'endosome pour permettre d'une part le recyclage des récepteurs vers la membrane plasmique et d'autre part la dégradation des LDL. Nous allons voir que ce mécanisme très classique est aussi celui de la transferrine, et très probablement d'un ligand type RGD.

Les transferrines⁹⁰ regroupent une large famille de glycoprotéines (80kDa) impliquées dans la fixation du fer. Elles sont présentes majoritairement dans le sang et les fluides biologiques (bile, liquide amniotique, lymphe...) où elles assurent le transport du fer du système circulatoire systémique vers les cellules et les tissus. Pour cela, elles se fixent avec une haute affinité sur des récepteurs de la membrane cellulaire, appelés récepteurs à la transferrine. Le fer étant un élément vital pour la plupart des organismes vivants, ce récepteur est présent sur toutes les cellules nucléées (mais avec des niveaux d'expression variables en fonction des besoins en fer de ces cellules). Le cycle de la transferrine et en particulier son entrée dans la cellule via son récepteur ont ainsi été très étudiés ce qui en fait un des systèmes les mieux connus aujourd'hui. L'utilisation de la transferrine constitue pour ces raisons un contrôle de première importance lorsque l'on s'intéresse aux mécanismes d'entrée dans la cellule. C'est dans ce contexte que nous avons utilisé nous aussi de la transferrine fluorescente comme contrôle et élément de comparaison. Elle pénètre rapidement dans les cellules et après 10min d'incubation à 37°C à 1µM, on observe un marquage intracellulaire important.

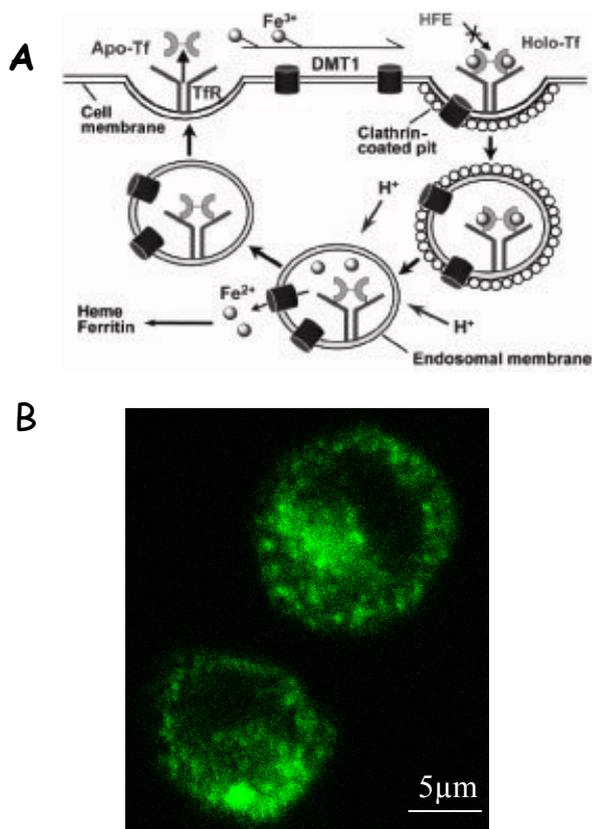


Figure 5 : Internalisation de la transferrine.

A : Représentation du cycle de la transferrine (Tf) et de son récepteur (TfR) pour le transport du fer à l'intérieur de la cellule.

La transferrine chargée en fer (holo-Tf) se fixe sur son récepteur). Le complexe formé est internalisé par un mécanisme clathrine dépendant. L'acidification du compartiment endosomal permet le relargage du fer dans le cytosol. La transferrine déchargée du fer (Apo-Tf) et le récepteur sont alors recyclés vers la surface où ils sont finalement dissociés et ainsi disponibles pour amorcer un nouveau cycle.

Extrait de 90.

B : Coupe équatoriale de 2 cellules HeLa après 30min à 37°C en présence de transferrine-bodipy (concentration 1µM)

⁹⁰ QIAN *et al.* Pharmacol Rev. 2002, 54, p. 561-567.

De nombreux récepteurs suivent ainsi des voies de recyclage : ils sont internalisés avec leur ligand, le distribuent dans le cytosol puis sont recyclés vers la membrane pour assurer un nouveau transport. Les intégrines en particulier suivent elles aussi une voie de recyclage⁹¹ via les endosomes précoces puis les endosomes de recyclage. On imagine alors qu'un ligand RGD fixé, tout comme les LDL ou la transferrine, pénétrerait de la même façon à l'intérieur de la cellule. Un peptide GRGDSP fluorescent que nous venons de nous procurer permettra de visualiser l'internalisation via le récepteur intégrine $\alpha_v\beta_3$.

II.1.2. Une voie atypique : le cas de la toxine de Shiga :

Le cas de la toxine de Shiga (et de sa sous unité B noté Stx-B) est plus particulier ; s'agissant d'un pathogène, elle n'emprunte pas les voies classiquement décrites dans le fonctionnement normal de la cellule. Comme nous l'avons vu dans le premier chapitre, elle a développé des stratégies atypiques pour atteindre sa cible, les ribosomes qu'elle inactive. Ce transport, dit **rétrograde**, permet le passage direct des endosomes précoces vers l'appareil de Golgi puis dans le réticulum endoplasmique évitant ainsi les voies de dégradations lysosomales. La figure 6, extraite de⁹² résume ce transport.

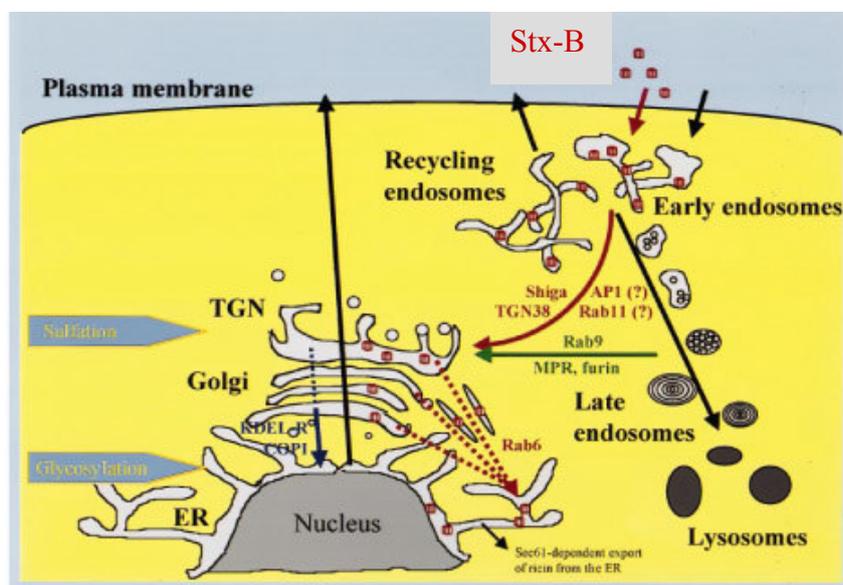


Figure 6 : Trafic intracellulaire de la sous unité B de la toxine de Shiga. Extrait de 92.

Cette particularité en fait un outil particulièrement étudié et de nombreux travaux s'intéressent aujourd'hui à identifier au plus près les nombreux acteurs moléculaires qui déterminent ce transport rétrograde^{93, 94}. La compréhension et le contrôle d'un tel transport permettrait d'envisager de nombreuses applications thérapeutiques en permettant une translocation cytosolique indispensable par exemple dans la présentation d'antigènes⁹⁵.

Qu'il s'agisse de la transferrine, d'un peptide RGD ou de la toxine de Shiga, la reconnaissance entre le ligand et son récepteur détermine l'activation de voies cellulaires qui

⁹¹ M.S.ROBERTS. Molecular and cellular biology. 2004, vol.24, n°4. p 1505-1515.

⁹² L.JOHANNES and B.GOUD. Traffic 2000 1, p. 119-123.

⁹³ S.U.LAUVRAK, M.L.TORGERSEN and K.SANDVIG. Journal of Cell Science. 2004, 117, p. 2321-2331.

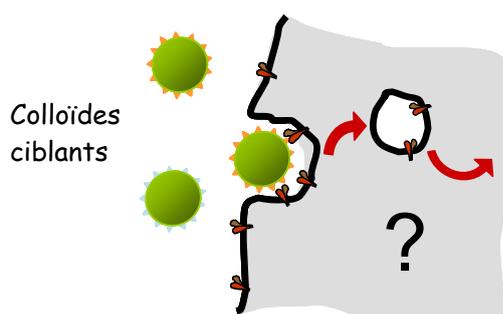
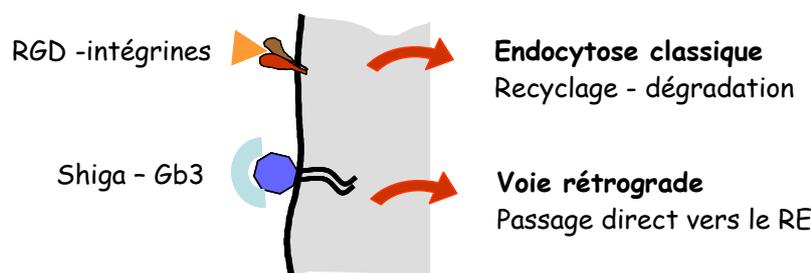
⁹⁴ F.MALLARD *et al.* The Journal of Cell Biology. 1998, vol 143, N° 4.

⁹⁵ D.C.SMITH *et al.* Traffic. 2002; 3. p. 697-704.

déclenchent l'internalisation d'une part et un chemin intracellulaire particulier ensuite. La biologie cellulaire s'intéresse ainsi très largement au trafic de nombreuses molécules ligands. L'identification de nouvelles voies, des acteurs moléculaires intervenant dans ces mécanismes complexes fait ainsi l'objet de très nombreux travaux de recherche. Toutefois, dans le cas où ces molécules sont utilisées pour fonctionnaliser la surface de colloïdes, on peut se demander en quoi cela affecte le comportement de l'objet.

II.2. Problématique : devenir intracellulaire de colloïdes ciblant

Le cas de l'entrée de particules colloïdales dans les cellules, a déjà été évoqué dans le premier chapitre à travers l'exemple des virus. Les adénovirus, par exemple, peuvent emprunter des voies très variées (pinocytose, phagocytose, endocytose par récepteurs)⁹⁶. Concernant nos colloïdes synthétiques, nous savons qu'ils sont capables de pénétrer à l'intérieur des cellules. En revanche, nous avons aujourd'hui très peu d'informations sur les voies d'entées qu'ils utilisent et de nombreuses questions se posent. Empruntent-ils une voie propre à leur nature colloïdale ou bien au contraire leur trafic intracellulaire est-il déterminé par le ligand qu'ils portent ? Dans ce dernier cas, est-il possible de contrôler le devenir de l'objet par un choix approprié du ligand porté en surface ?



Les intégrines sont connues pour suivre un cycle classique de recyclage qui permet leur retour vers la membrane ; un peptide RGD fixé suit probablement la même voie d'entrée avant d'être dégradé (endosomes tardifs puis lysosomes). Au contraire la toxine de Shiga détourne ces voies classiques pour atteindre le réticulum endoplasmique où elle inactive les ribosomes.

Qu'en est-il pour des colloïdes portant ces ligands ?

Dans ce cadre, le ciblage se conçoit au niveau intracellulaire. Il permettrait de diriger le colloïde (et l'actif transporté dans le cas d'un vecteur) vers le compartiment cellulaire adapté à son action (le noyau pour les acides nucléiques, le cytoplasme pour les antibiotiques inhibiteurs de la synthèse protéique, les mitochondries pour induire ou inhiber l'apoptose*).

⁹⁶ O.MEIER and U.F.GREBER. J Gene Med. 2004, 6 :S152-S136

* L'**apoptose** est une forme de mort cellulaire appelée aussi suicide cellulaire programmé. C'est un phénomène normal, sous le contrôle régulé de la cellule ; il conduit lorsqu'il est activé à la fragmentation de l'ADN, à des modifications membranaires et à la mort cellulaire.

De grands enjeux accompagnent donc cette vaste problématique qui dépasse largement le cadre de ce travail. Néanmoins, de façon très exploratoire, nous avons essayé de nous y intéresser et commencé à développer quelques outils pour amorcer l'étude.

II.3. Premiers résultats exploratoires

II.3.1. Transferrine, colloïdes Shiga et colloïdes RGD : des marquages intracellulaires qui semblent différents

Les photographies de microscopie confocale figure 7 représentent des coupes confocales de cellules HeLa mises en contact à 37°C, en suspension, avec de la transferrine (a), des colloïdes Shiga (b) et des colloïdes RGD (c).

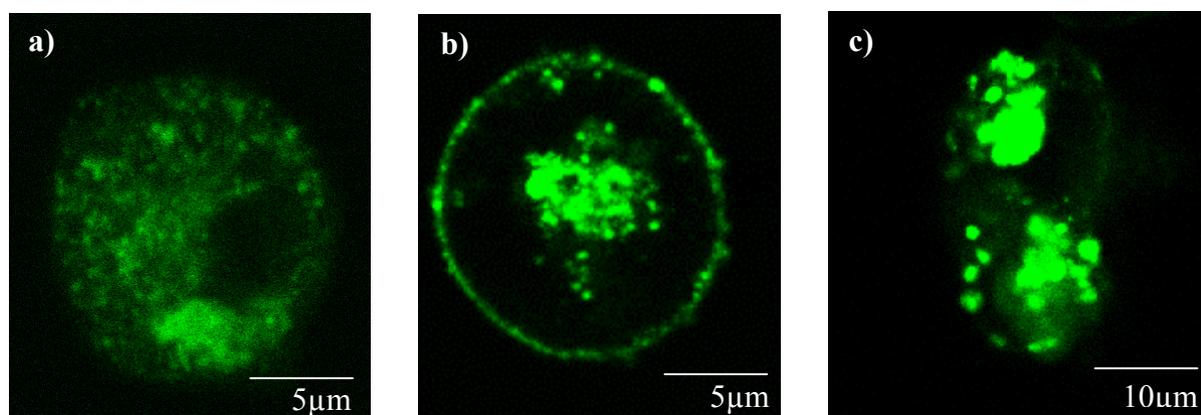


Figure 7 : Coupes équatoriales de cellules en suspension
a). Transferrine après 30 min d'incubation à 37°C puis rinçage.
b). Colloïdes Shiga après 1h à 37°C puis rinçage.
c). Colloïdes RGD : centrifugation au moment du contact, 4h à 37°C puis rinçage.
Attention, deux cellules sont visibles sur ce dernier cliché.

Tout d'abord, nous constatons dans les trois cas de la fluorescence à l'intérieur de la cellule signe que la transferrine et les colloïdes ont bien été internalisés.

Au-delà, on peut remarquer que la distribution de la fluorescence n'est pas la même dans les trois cas. Dans le cas de la transferrine, on note un marquage intracellulaire plutôt diffus et qui semble réparti dans l'ensemble du cytoplasme. Pour les colloïdes Shiga, au contraire, le marquage est beaucoup plus localisé, d'une part au centre de la cellule et d'autre part sous forme d'une couronne fluorescente sur la membrane cellulaire. Le marquage membranaire bien visible souligne que tous les colloïdes n'ont pas été internalisés ; de plus, le rinçage effectué avant l'observation n'a pas décroché ces colloïdes simplement adhérents ce qui confirme là encore l'absence de décrochage de ces objets que nous avons déjà largement évoqué dans le chapitre 2. Enfin, pour les colloïdes RGD, on peut remarquer en premier lieu le peu de marquage membranaire, signe au contraire des colloïdes Shiga, qu'il s'agit là d'un accrochage au moins en partie réversible (les colloïdes simplement fixés sur la membrane sont pour la plupart éliminés lors du lavage). Le marquage intracellulaire est également différent, en particulier moins localisé.

Ces observations de nature très qualitative sont néanmoins robustes et se sont confirmés sur l'ensemble des observations que nous avons pu réalisés. Elles ne permettent pas de définir les localisations intracellulaires mais **elles semblent suggérer que :**

- **le comportement des colloïdes est différent de celui d'une molécule type transferrine.**
- **les deux types de colloïdes, fonctionnalisés par différents ligands (Shiga et RGD) ne sont pas localisés aux mêmes endroits dans la cellule.**

Pour aller plus avant dans l'étude, il faudrait maintenant déterminé avec précision les localisations intracellulaires observées. Les biologistes disposent de nombreux outils spécifiques pour les identifier. Néanmoins, nous allons voir que ces techniques ne sont pas toutes utilisables dans le cas de nos systèmes ce qui complique l'étude.

II.3.2. Outils et techniques de biologie cellulaire

Nous avons vu que le trafic intracellulaire de molécules ligands est un sujet largement étudié et que de nombreux outils ont été mis au point dans ce but par les biologistes de la cellule. Une technique couramment utilisée consiste à réaliser des co-marquages fluorescents. La molécule à suivre est marquée par un fluorophore 1 ; son parcours est alors suivi tout en marquant en parallèle par un fluorophore 2 le compartiment, ou la protéine potentiellement impliqué dans son cheminement ; la co-localisation des deux marquages, si elle est observée, est le signe d'une interaction entre les deux éléments fluorescents. Ce type de technique nécessite donc de marquer spécifiquement des éléments intracellulaires (par des anticorps par exemple) d'où la nécessité d'une préparation particulière des échantillons cellulaires qui reposent sur deux points :

- la « fixation » des cellules qui permet de figer le système (par utilisation de paraformaldéhyde 4%)
- la perméabilisation de la membrane pour permettre le passage de l'anticorps spécifique dans le cytosol pour le marquage interne. Cette opération, qui consiste à former des pores dans les membranes, repose sur l'extraction des lipides membranaires (par du triton par exemple).

Sans entrer dans davantage de détails et même si quelques essais ont été réalisés, on comprend aisément que l'utilisation de telles techniques (nécessitant la perméabilisation) n'est pas très adaptée au suivi de nos particules de nature lipidique... Ce point complique largement l'étude, nécessitant la mise en place d'outils de biologie moléculaire (transfection par exemple) beaucoup plus lourds pour le physico-chimiste. Néanmoins, en collaboration avec l'équipe de Ludger Johannes, nous avons pu réalisé quelques premiers essais en ce sens.

II.3.3. Y-a-t-il co-localisation entre les colloïdes Shiga et l'appareil de Golgi ?

Nous avons noté précédemment un marquage bien particulier des cellules ayant internalisé des colloïdes Shiga ; dans ce cas, en effet, c'est une fluorescence localisée au centre de la cellule que nous observons. Cette localisation particulière nous a interpellé et nous nous sommes demandés si il ne s'agissait pas de l'appareil de Golgi. En effet, on sait que la toxine de Shiga, seule, est véhiculée via ce compartiment central... Ainsi, on peut la colocaliser avec la protéine CTR433, marqueur de l'appareil de Golgi⁹⁷. Il a semblé crucial, compte tenu de l'enjeu, de tenter directement de vérifier ce point dans le cas des colloïdes fonctionnalisés par la sous unité B de la toxine de Shiga.

⁹⁷ L.JOHANNES and B.GOUD. Trends in Cell Biology. 1998, vol 8.

L'expérience a été réalisée au laboratoire sur des cellules adhérentes HeLa transfectées de façon stable de sorte qu'elles expriment une protéine Rab6, spécifique de l'appareil de Golgi, marquée à la GFP (vert). Ces cellules, fournies par l'équipe de Ludger Johannes, sont mises en culture sur des lamelles adaptées à la microscopie. Après 24h, elles sont adhérentes et mises en contact à 37°C avec des colloïdes Shiga marqués avec un lipide fluorescent rhodamine (0.1% en masse). Après 1h de contact, les cellules sont rincées pour éliminer les colloïdes fluorescents du volume puis l'observation est réalisée. Comme le montre la photographie ci-dessous, aucune co-localisation entre l'appareil de Golgi (en vert) et les colloïdes Shiga (rouge) n'a pu être observée.

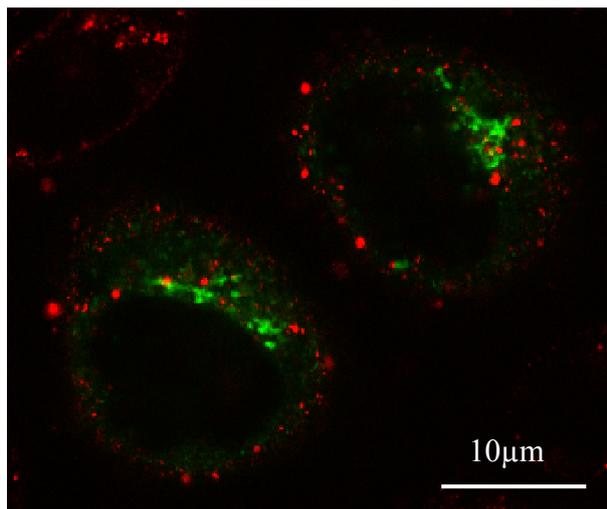


Figure 8 : Coupe équatoriale de deux cellules en microscopie confocale de fluorescence.

Double marquage :

- Expression Rab6-GFP (vert) = marquage de l'appareil de Golgi
- marquage rhodamine (rouge) des colloïdes Shiga.

Il n'y a pas de colocalisation.

Au jour d'aujourd'hui, nous n'avons donc pas pu mettre en évidence la présence de colloïdes Shiga dans l'appareil de Golgi. Ce premier résultat, plutôt négatif, reste à reproduire.

II.4. Perspectives

Bien entendu, il reste beaucoup à faire dans le domaine du suivi intracellulaire des colloïdes. Ainsi, pour les colloïdes RGD comme pour les colloïdes Shiga, des essais de co-localisation avec les endosomes précoces, les endosomes de recyclage, les lysosomes pourraient être menés. Ces compartiments sont en effet aujourd'hui bien caractérisés et des outils pour les marquer spécifiquement existent (marquage des lysosomes par LysoTracker® par exemple).

Plus particulièrement dans le domaine de l'endocytose, l'implication de l'actine pourrait être testée. L'utilisation de drogues qui dépolymérise le réseau d'actine (type latrunculine) peut être envisagée. Notons à ce sujet que nous avons réalisé un essai dans ces conditions (100nM de latrunculine) sans effet sur l'internalisation des colloïdes RGD mais l'expérience demanderait à être reproduite. Nous disposons également de cellules HeLa transfectées* dont l'expression de la dynamine (une protéine impliquée dans la formation des vésicules d'endocytose à clathrine) est sous contrôle. Le suivi de l'internalisation de colloïdes Shiga sur ces cellules pourrait permettre de déterminer l'implication de la dynamine dans leur entrée.

* Cellules HeLa type K44 fournies par l'équipe de Ludger Johannes

Enfin, le cycle de la transferrine étant bien connu, l'utilisation de colloïdes fonctionnalisés par cette protéine constituerait un atout supplémentaire. En effet, ce système renforcerait l'étude en proposant un élément de comparaison.

Ainsi, la microscopie confocale et les nombreux outils de biologie cellulaire et moléculaire largement mis au point aujourd'hui par les biologistes de trafic intracellulaire devraient permettre d'avancer sur ces questions complexes.

Conclusion générale

L'objectif de ce travail était de proposer **une description quantitative de l'interaction spécifique entre colloïdes et cellules**. Plus particulièrement, c'est à l'adhésion de particules lipidiques recouvertes de ligands ciblant spécifiquement un type de récepteur membranaire que nous nous sommes intéressés. Nous montrons de quelle façon une approche quantitative macroscopique peut apporter des réponses dans la description des mécanismes moléculaires au niveau microscopique.

Notre premier travail a été de **mettre au point une méthode de mesure permettant le suivi cinétique de l'adhésion d'un ensemble de colloïdes sur une population de cellules**. En s'appuyant sur la cytométrie de flux, nous avons ainsi pu obtenir sur ces systèmes des mesures statistiques quantitatives qu'il est possible de comparer avec des modèles cinétiques. Les constantes cinétiques et thermodynamiques caractéristiques de l'interaction colloïdes–cellules mesurée peuvent alors être déterminées.

En particulier, cette technique de mesure a été appliquée à un système de **colloïdes ciblant utilisant la sous unité B de la toxine de Shiga**, ciblage spécifique que nous avons développé au cours de ce travail en collaboration avec Ludger Johannes (UMR 144 CNRS/Institut Curie, Paris). Nous avons obtenu avec ces nouveaux colloïdes des résultats quantitatifs et robustes sur des populations de cellules vivantes. Les comportements observés se sont toutefois révélés inattendus : d'apparence irréversible, l'adhésion de ces objets fonctionnalisés par la sous unité B de la toxine de Shiga reste pourtant dépendante de leur concentration. Dans ces conditions, l'interprétation par un modèle simple (type équilibre) n'est pas possible et ce sont des modèles plus complexes qu'il faut mettre en œuvre pour rendre compte de façon cohérente des résultats obtenus. Nous avons proposé en particulier un modèle à plusieurs étapes reposant sur **des équilibres successifs et faisant intervenir le recrutement progressif de plusieurs récepteurs** pour l'accrochage des objets. Cette interprétation, qui doit encore être approfondie, fait notamment intervenir des temps caractéristiques différents pour l'accrochage et le décrochage des objets. En accord avec la connaissance microscopique de l'interaction toxine de Shiga – récepteur Gb3, elle décrit les effets coopératifs qui interviennent dans le comportement d'une population de colloïdes portant la sous unité B de la toxine de Shiga en contact avec leurs récepteurs cellulaires.

Dans un second temps, nous avons modifié les caractéristiques physico-chimiques de nos colloïdes pour en mesurer les effets sur l'adhésion. Par exemple, nous avons montré que **l'ajout de polymères de type PEG** sur la surface des colloïdes entraîne une diminution exponentielle de la constante cinétique d'accrochage. Ce résultat a pu être interprété par un effet de pression osmotique des polymères sur la surface, mettant ainsi en évidence le **rôle de répulsion non spécifique joué par l'environnement membranaire** (réseau polymérique du

glycocalyx). De plus, l'adhésion de colloïdes utilisant un autre ciblage reposant sur une séquence peptidique de type RGD visant les intégrines a été étudiée ; elle s'est révélée en apparence plus faible, nécessitant la mise en œuvre d'un protocole particulier de centrifugation. Cette différence de comportement peut s'expliquer par les caractéristiques propres à chaque couple ligand - récepteur (affinité, nombre de récepteurs...) ; toutefois, nous avons montré que la présence du glycocalyx, en tant que réseau dense à la surface des cellules, pouvait là encore jouer un rôle.

Par ailleurs, pour aborder la question de l'interaction colloïdes – cellules différemment, nous avons utilisé en collaboration avec Frédéric Pincet (Laboratoire de Physique Statistique/ENS, Paris) une technique de micromanipulation (Biomembrane Force Probe). Ces **mesures de force locale entre un colloïde unique et une cellule** se sont révélées très encourageantes ; elles nous ont permis de mettre en évidence une quantification des forces de rupture du lien colloïde - cellule ce qui renforce l'idée d'un mécanisme coopératif faisant intervenir plusieurs récepteurs. La technique permet d'envisager d'étudier avec précision l'influence de l'environnement du lien (tant du côté du colloïde que de la cellule) ouvrant ainsi de larges perspectives ; elle propose une approche locale complémentaire des informations statistiques obtenues en cytométrie de flux.

Enfin, nous avons très partiellement abordé le devenir intracellulaire des colloïdes. En nous appuyant sur la microscopie confocale de fluorescence, nous avons montré qu'ils sont capables de pénétrer à l'intérieur des cellules et qu'il est également possible de mesurer leur cinétique d'internalisation. Il semblerait également qu'ils puissent être localisés différemment en fonction du couple ligand - récepteur utilisé pour le ciblage. Cette information, si elle était validée, permettrait d'envisager le ciblage à un niveau intracellulaire.

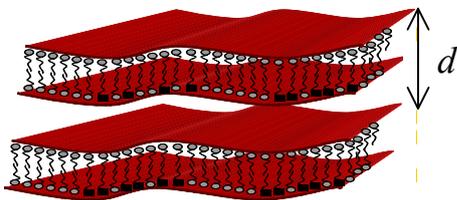
Ainsi, nous avons montré dans ce travail, qu'**il est possible de réaliser des mesures statistiques sur des systèmes biologiques pourtant complexes et d'en tirer des informations quantitatives permettant d'apporter des réponses dans la description microscopique des mécanismes**. De façon générale, il serait intéressant d'approfondir encore, tant en cytométrie de flux qu'en BFP, l'approche développée ici. En particulier, l'étude de l'adhésion de nouveaux systèmes utilisant des couples ligands-récepteurs différents (colloïdes fonctionnalisés avec la transferrine par exemple, virus) permettrait de confronter les modèles proposés à des situations biologiques nouvelles et d'étendre ainsi la portée de la description. Au niveau intracellulaire, des expériences de marquage de compartiments cellulaires, des colocalisations de protéines permettraient de suivre le parcours des objets au cœur de la cellule.

Annexe n°1

Calcul de la fraction de lipides présents sur la bicouche externe d'un colloïde

Soit un colloïde multilamellaire de rayon $R = 150\text{nm}$.

Dans les formulations à base de phosphatidylcholine que nous utilisons, les études de diffraction de rayons X ont permis de déterminer avec précision le pas smectique de la phase lamellaire. Dans ce calcul, nous allons considérer l'épaisseur d d'une bicouche lipidique et d'une couche de solvant égale à 8nm .



Soit ζ la fraction de l'objet occupée par la dernière bicouche ; elle s'écrit comme le rapport du volume de cette dernière couche sur le volume total du colloïde soit :

$$\zeta = \frac{V}{V_{tot}} = \frac{4\pi R^2 d}{\frac{4}{3}\pi R^3} = \frac{3d}{R}$$

L'application numérique conduit à

$$\underline{\zeta = 0.16}$$

Ainsi la bicouche externe représente 16% en surface de l'ensemble de la surface lipidique de l'objet.

16% des lipides sont donc présents dans cette dernière bicouche. Néanmoins, seulement la moitié est directement dirigée vers l'extérieur.

Ainsi, c'est environ 8% des lipides introduits que l'on retrouve dans la partie extérieure du colloïde.

Annexes n° 2 à 9

Protocoles expérimentaux

Il s'agit dans ces annexes de reprendre avec précision l'ensemble des protocoles expérimentaux que nous avons utilisés tout au long de ces trois années.

Ces annexes ne sont pas destinées à étayer la compréhension du manuscrit mais plutôt à permettre à un lecteur expérimentateur intéressé de reproduire les expériences décrites dans le manuscrit.

Annexe n°2

Protocole général pour la préparation de phases lamellaires

Produits nécessaires

- Phosphatidylcholine de soja : (S100 lipoid) : elle est stockée au congélateur ; la sortir environ 1h avant en la mettant au noir à température ambiante
- Eventuellement un cotensioactif type monooléine (Sigma)
- Lipopeptide R5 - ancre COCHO – ancre maléimide ou tout autre lipides permettant l'ancrage d'un motif de reconnaissance pour le ciblage
- Lipide PEG
- Lipide fluorescent solubilisé et de concentration connue : type bodipy
- Chloroforme
- Méthanol
- Eau ultra pure

Matériel

- Tube eppendorf 0.5mL
- Spatule
- Balance de précision
- Evaporateur Speed vac
- Cloche sous vide (type dessiccateur branché sur une pompe)

Notations

On note :

m_{tube} , la masse du tube vide.

m_{lip} , la masse de tous les lipides.

m_{eau} , la masse d'eau

$m_{tot} = m_{lip} + m_{eau}$, la masse de phase lamellaire obtenue

Formulation

- Pour $m_{lip}=10\text{mg}$:
 - 0.785 μmol d'ancre (ou assimilé) (dans chaque préparation, la proportion en moles d'ancre par rapport au reste des lipides doit rester constante. Ce nombre de moles correspond pour le lipopeptide R5 à 10% en masse du total des lipides)
 - compléter à 10mg en ajoutant la masse nécessaire de mélange S100-cotensioactif
 - 0.1% en masse de lipide fluorescent
- $m_{eau} = 0.48 \times m_{tot}$ (ou $m_{lip} = 0.52 \times m_{tot}$)

1) Préparation du premix de lipides

- Marquer et tarer un tube eppendorf 0.5mL. Noter m_{tube} .
- Peser en premier lieu le produit de plus petite quantité : lipopeptide R5 ou ancres
- Peser dans un deuxième temps le mélange PC-cotensioactif

Remarque : Si les quantités à peser sont trop faibles, il peut être utile de mettre les lipides en solution (chloroforme) et de prélever alors un volume.

- Ajouter le marqueur fluorescent : lipide bodipy
 - Déterminer la masse à ajouter (soit 0.1% de la masse totale de lipide)
 - Convertir en volume à ajouter car le lipide bodipy est en solution dans l'éthanol (la concentration est déterminée au préalable lors de la solubilisation de chaque lot ; typiquement elle correspond à $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$)
- Cosolubiliser l'ensemble des lipides dans un mélange chloroforme/méthanol (50/50 en volume). Prévoir environ $30\mu\text{L}$ de mélange pour solubiliser 10mg de lipides.
- Bien homogénéiser au vortex : la solution doit être limpide.
- Fermer le tube par un parafilm ; le percer plusieurs fois à l'aide d'une aiguille.
- Evaporer au speed vac entre 15 et 30 minutes : cette étape est très importante et nécessite d'être attentif ! L'intérêt est d'évaporer le maximum de solvant tout en gardant une consistance visqueuse pour le mélange. Arrêter le speed vac lorsque le mélange est visqueux mais encore capable de s'étaler sur les parois du tube.
- Répartir le mélange sur les parois du tube de façon à former un film et placer le tube horizontalement dans la cloche. Mettre sous vide et laisser de 30min à 1h.
- Contrôler la masse. On doit retrouver la masse des lipides seuls soit m_{lip} .

2) Réhydratation et formation de la phase lamellaire

- Ajouter l'eau ultra pure telle que $m_{eau} = 0.48 \times m_{tot}$
- Homogénéiser le tout pour former la phase lamellaire. Pour cela, on effectue plusieurs centrifugations alternativement « tube tête en haut » puis « tube tête en bas ». Il faut compter entre 5 et 10 cycles jusqu'à ce que la phase lamellaire apparaisse homogène macroscopiquement.

Les phases lamellaires se conservent à l'abri de la lumière pour éviter d'altérer la fluorescence.

Annexe n°3

Préparation des vésicules multilamellaires par cisaillement

Produits nécessaires

- Phase lamellaire
- Tampon HBSS

Matériel

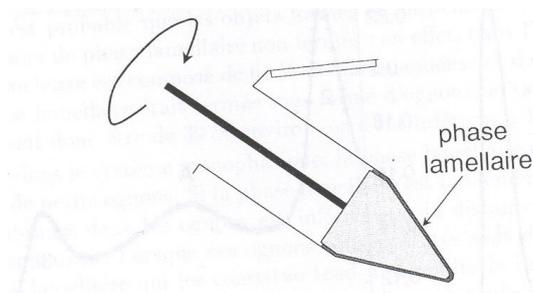
- Tubes eppendorf 0.5mL
- Spatule
- Piston
- Balance de précision

Notations

Soit : m_{tube} , la masse du tube vide.
 $m_{pâte}$, la masse de phase lamellaire.

Préparation des dispersions d'oignons au 1/50^{ème}

- Travailler sous la hotte de façon à rester le plus possible dans des conditions stériles.
- Marquer et tarer un tube eppendorf stérile 0.5mL. Noter m_{tube} .
- Prélever à la spatule une masse $m_{pâte}$ de phase lamellaire et la déposer dans le tube (sur le bord près du fond). Déterminer avec précision la masse prélevée.
- Cisailier au piston en appuyant bien sur les bords du tube pour avoir le meilleur cisaillement possible (compter 20 tours de piston)
- Disperser rapidement dans de l'HBSS de façon à obtenir une dispersion au 1/50^{ème}.
 Il faut donc ajouter un volume d'HBSS : $v_{HBSS} = 49 \times m_{pâte}$



Cisaillement de la phase lamellaire
Figure empruntée à la thèse de Pascale Chenevier

Annexe n°4

Protocole de ligation

1). Ligation ancre COCHO - Hydrazino peptide

Produits nécessaires

- Peptide à liquer
- Dispersion de colloïdes au 1/50^{ème}
- Tampon acétate 0,1 M à pH=5

Notations

Soit : m_{tube} , la masse du tube vide.
 $m_{pâte}$, la masse de phase lamellaire.

A. Préparation des solutions de peptides à 10^{-3} M

- Pour préparer 1mL de solution, peser précisément 10^{-6} mole de peptide dans un eppendorf.
Se reporter au tableau ci-dessous pour la correspondance en masse.
- Rajouter 1mL d'eau.
- Bien homogénéiser au vortex

Ces solutions peuvent se conserver au réfrigérateur à 4°C ou mieux au congélateur à – 20°C.

Peptides	n moles	M en g/mol	m en mg
RGD 0	10^{-6}	821	0,82
RGD 1	10^{-6}	1140	1,14
RGD 2	10^{-6}	1458	1,46
RGD 3	10^{-6}	1776	1,77
RGD 6	10^{-6}	2960	2.96
RGD peg	10^{-6}	2959	2.96

B. Préparation du tampon acétate 0.1M pH=5

- Préparer une solution A d'acide acétique à 0,2M en mettant par exemple 1,14 ml d'acide pur de densité $d=1,05$ dans 100mL d' H_2O .
- Préparer une solution B d'acétate de sodium à 0,2M en solubilisant 2,72 g de $C_2H_3O_2Na, 3H_2O$ ou 1,64g de $C_2H_3O_2Na$ dans 100mL d' H_2O .

- Dans un bécher, mettre 14,8 mL de A + 35,2 mL de B. Vérifier que l'on est bien à pH=5. Si nécessaire, ajuster en rajoutant de la solution A ou B. Transvaser dans une fiole jaugée de 100mL. Rincer le bécher plusieurs fois avec de l'eau. Compléter jusqu'au trait de jauge. Contrôler à nouveau le pH.

C. Ligation

- Mélanger 50 μL de suspensions d'ognons au $1/50^{\text{ème}}$ + 10 μL de tampon acétate 0,1 M + 40 μL de solution de peptide 10^{-3} M. La réaction se fait avec un large excès de peptide.
 - Homogénéiser au vortex
 - Agiter au thermomixer dans le noir à 20°C et 600 rpm pendant 3 heures.

On récupère 100 μL de dispersion au $1/100^{\text{ème}}$. Il faut alors séparer sur colonne pour éliminer le peptide non ligué. (voir annexe n°)

2). Ligation ancre maléimide - B.Shiga.Cys

Produits nécessaires

- Sous unité B de la toxine de Shiga portant une cystéine libre
La solution à une concentration de 6mg/mL dans 0.1M d'Hepes est gentiment fournie par Ludger Johannes .
- Dispersion au $1/25^{\text{ème}}$ dans un tampon PBS-EDTA pH=7.5 de colloïdes fonctionnalisés par l'ancre maléimide

La phase lamellaire contenant l'ancre maléimide ne doit pas être conservée en raison de l'hydrolyse de la fonction maléimide. Les vésicules multilamellaires sont donc préparées puis couplées dans les heures suivant la préparation de la phase lamellaire.

Notations

Soit : m_{tube} , la masse du tube vide.
 $m_{\text{pâte}}$, la masse de phase lamellaire.

Couplage

- Mélanger dans un rapport volumique $\frac{2}{3} / \frac{1}{3}$ la suspension d'ognons au $1/25^{\text{ème}}$ et la solution de Shiga.
 - Agiter au thermomixer dans le noir à 20°C et 600 rpm pendant une nuit.
 - Séparer sur colonne pour éliminer la toxine de Shiga non couplée (voir annexe n°5)

Annexe n°5

Filtration sur colonne des dispersions d'objets après ligations

La **gel filtration** ou **chromatographie par exclusion stérique** repose sur le principe suivant : les éléments à séparer sont filtrés sur un gel constitué de billes de diamètre connu et comportant des pores. La sortie de ces éléments du gel se fait alors dans l'ordre décroissant de leur poids moléculaire. En effet, les petites molécules passent dans les pores des billes et parcourent un trajet plus long dans la colonne, tandis que les objets de taille supérieure aux pores passent entre les billes ce qui représente un chemin moins important et donc un temps plus court.

Dans notre cas, la technique est utilisée pour séparer, après la réaction de ligation, les objets fonctionnalisés du ligand en excès qui n'a pas réagi.

La technique reposant sur le rapport de taille entre les pores et la molécule à séparer, le gel utilisé doit être adapté au ligand.

Nous concernant, deux types de ligands et donc de colonnes de séparation ont été utilisés adaptées respectivement à :

- la sous unité B de la toxine de Shiga
- un peptide GRGDSP (portant soit une cystéine, soit une fonction hydrazine en fonction de la ligation maléimide ou COCHO utilisée)

1). Cas de la sous unité B de la toxine de Shiga

La masse molaire du fragment Stx-B est de 38500 kDa.

Le gel utilisé pour le retenir est un gel SephacrylTM S300 (référence 17-05-99-10 chez Amersham Biosciences)

Matériel et produits

- colonne plastique hauteur \approx 15cm munie en bas d'un robinet.
- Sephacryl S300
- Eluant type PBS ou HBSS (tampon phosphate pH=7.4) stérile si possible

Protocole

➤ Préparation de la colonne

- Bien agiter le gel Sephacryl conservé au réfrigérateur. Prélevez environ 5mL dans un bécher et ajouter 2mL de tampon PBS. Bien mélanger avec un agitateur en verre
- Robinet fermé, remplir la colonne (préalablement nettoyée à l'alcool et rincée avec du PBS) de moitié avec du PBS
- Verser doucement le gel séphacryl préparé et ouvrir le robinet : le gel se dépose doucement dans la colonne. Laisser le système se stabiliser environ 30min. Normalement la colonne est environ $\frac{3}{4}$ pleine de gel.

- Ajouter du PBS et rincer ainsi plusieurs fois la colonne remplie (environ 50 à 100mL d'éluant à faire passer). Le tampon s'écoule lentement.
- Filtration de l'échantillon
 - Laisser s'écouler le milieu tampon jusqu'à obtenir une interface air/gel
 - Prélever et conserver une petite fraction de la dispersion de colloïdes avant filtration pour réaliser une droite abaque de fluorescence (un volume de 5 à 10μL suffit)
 - Déposer alors l'échantillon avec une pipette (le volume du dépôt doit être compris entre 60 et 150μL environ)
 - Attendre que l'échantillon pénètre entièrement dans le gel Sephacryl. Lorsque c'est le cas, ajouter délicatement du tampon PBS jusqu'au remplissage de la colonne.
 - Récupérer les fractions qui s'écoulent en bas de la colonne. Typiquement, il faut laisser environ 800μL s'écouler (volume mort de la colonne) avant de récupérer les objets. Néanmoins, il faut surveiller très attentivement cette étape. La détection des objets en bas de la colonne se fait à l'œil lorsque la goutte qui tombe devient turbide.
 - Récupérer alors l'ensemble des gouttes contenant des objets (soit un volume compris entre 200 et 300μL en général)
 - Déterminer la concentration de cette dispersion (voir annexe n°)
- Rinçage de la colonne et stockage
 - Après la filtration, rincer la colonne en faisant passer environ 50mL de tampon PBS
 - Rincer ensuite avec 20mL d'une solution NaOH 0.1M pour éliminer les bactéries.
 - Rincer à nouveau avec 50mL de tampon PBS
 - Stocker la colonne à 4°C. Elle peut être utilisée entre 5 et 10 fois.

2). Cas d'un peptide GRGDSP

Les masses molaires des peptides utilisés varient de $M=800\text{g/mol}$ à $M=3000\text{g/mol}$ pour les peptides hydrazino en fonction de la longueur du groupement espaceur (voir annexe 4)
 Pour séparer ces peptides, un gel type SephadexTM type G25 convient.

Matériel et produits

- Colonne prête à l'emploi NAPTM 5 (référence 17-0853-01 chez Amersham Biosciences)
- Eluant type PBS ou HBSS (tampon phosphate pH=7.4) stérile si possible

Protocole

Le protocole de filtration est exactement le même que pour les colonnes Sephacryl. Seul le volume mort change ; il est légèrement plus faible et vaut environ 500μL. Les objets sortent donc plus rapidement en bas de la colonne.

(Se reporter à la partie « Filtration de l'échantillon » page précédente)

Le rinçage et le stockage de ces colonnes se fait de la même manière.

Annexe n°6

Détermination de la concentration d'une dispersion de colloïdes

Les mesures de fluorescence sont effectuées avec un spectromètre de fluorescence (Fluorolog 3 FL 1008).

Elles sont réalisées dans des cuves en plastique à usage unique de 1cm de côté dans un milieu tampon phosphate type PBS.

1). Configuration de l'appareil pour la mesure

La mesure s'effectue dans les conditions suivantes :

- photomultiplicateur : 950V
- ouverture des fentes : 1.75nm pour l'excitation et l'émission
- excitation : 488nm
- mode S/R (pour optimiser le rapport signal/bruit)
- spectre réalisé entre 500 et 530nm

La valeur est mesurée au maximum d'émission soit à 515nm.

2). Abaque de fluorescence

L'abaque est réalisé à partir d'un échantillon de concentration connue comme suit :

- Placer 2mL de tampon PBS dans une cuve
- Mesurer la fluorescence et relever la valeur de l'intensité à 515nm. Cette intensité I_1 constitue la fluorescence du milieu en l'absence de colloïdes c'est-à-dire pour $C=0$.
- Ajouter alors 1 μ L de la dispersion d'objets et mesurer à nouveau l'intensité I_2
- Toujours dans cette même cuve, ajouter à nouveau 1 μ L et mesurer I_3
- Faire de même jusqu'à obtenir au moins 5 mesures.

- Tracer ensuite l'évolution de l'intensité mesurée en fonction de la concentration de colloïdes dans la cuve de mesure. L'évolution de la fluorescence est linéaire.
- Ajuster les points de mesure par une droite : **c'est la droite abaque.**

Cette droite dépend de l'échantillon et de sa formulation. Elle doit être remesurée à chaque expérience utilisant des objets provenant de phases lamellaires différentes.

3). Détermination d'une concentration inconnue

Après une opération de gel filtration par exemple, la dispersion colloïdale est diluée d'un facteur inconnu. Pour déterminer la concentration de cette suspension, on peut utiliser l'abaque préalablement réalisé en suivant le protocole suivant :

- Dans une cuve de mesure, placer 2mL de tampon PBS
- Ajouter 4 μ L de la solution de concentration inconnue (ce qui correspond à une dilution d'un facteur 500 de la solution initiale)
- Mesurer la fluorescence dans la cuve et relever l'intensité émise à 515nm. Elle est notée I.
- A l'aide de l'équation de la droite abaque, déterminer la concentration d'objets C_{cuve} dans la cuve d'intensité I
- En déduire la concentration C de la dispersion de départ : $C=500 C_{cuve}$

4). Normalisation de la fluorescence entre des échantillons de formulation différente

Il faut souligner ici que des objets formulés différemment peuvent avoir un rendement de fluorescence différent. L'utilisation d'un marqueur membranaire du type bodipy limite ces effets. Néanmoins, même si ils sont de faibles amplitudes, il peut être nécessaire de normaliser la fluorescence de différents échantillons afin de pouvoir les comparer entre eux.

Pour cela :

- Réaliser des droites abaques pour l'ensemble des échantillons de nature différentes qui vont devoir être comparés (des colloïdes présentant différentes quantités de polymères en surface par exemple)
- Comparer les pentes de ces droites. Si des différences significatives apparaissent, il faudra normaliser les résultats après la mesure en cytométrie de flux.
- Dans ce cas :
 - Choisir une formulation comme référence. Noter a_{ref} la pente de l'abaque correspondante.
 - Calculer les différences entre les différentes formulations (indexées i) en faisant les rapports des pentes des abaques par a_{ref}
 Nous appellerons facteurs de correction f_i ces rapports de sorte que :

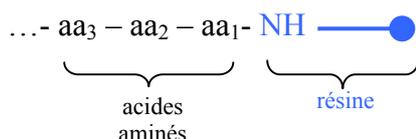
$$f_i = \frac{a_i}{a_{ref}}$$

- Les résultats de cytométrie doivent alors être corrigés de ce facteur : **ils doivent être divisés par f_i** . En effet :
 - Si $f_i > 1$, alors cela signifie que l'échantillon de formulation i est plus fluorescent que la référence. Il faut donc « abaisser » son signal de fluorescence.
 - Si $f_i < 1$, c'est l'inverse, il faut « remonter » le signal mesuré en cytométrie

Annexe n°7

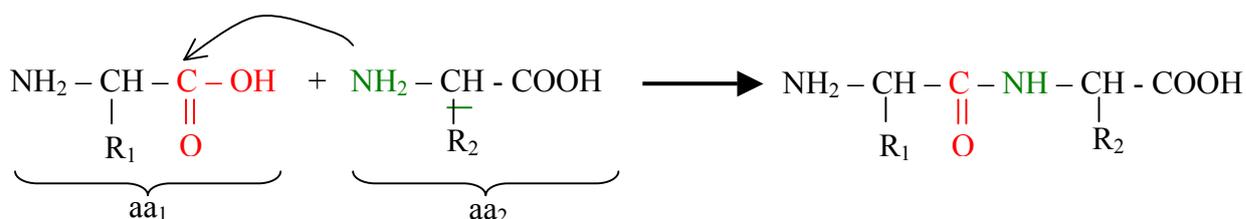
Principe général de la synthèse en phase solide

La synthèse peptidique en phase solide se fait par greffage successif d'acides aminés sur une résine polymère fonctionnalisée par un groupement amine NH_2 .



Les acides aminés sont couplés les uns aux autres par réaction de la fonction amine de l'acide aminé 1 (aa_1) sur la fonction acide carboxylique de l' aa_2 .

Cette réaction se fait à l'aide d'agents de couplage (type HOBt / HBTU).



Toutefois, la fonction amine terminale de l' aa_1 ne doit pas réagir durant le couplage. Elle doit donc être protégée par une « protection parallèle ». C'est le groupe **Fmoc** qui est utilisé pour la protection des amines terminales.

De la même façon, suivant les acides aminés, les chaînes latérales R_1 et R_2 peuvent porter des fonctions réactives qu'il convient également de protéger. Ce type de protection est alors appelée perpendiculaire et est assurée généralement par des groupements **Tbu**.

On parle alors de stratégie de synthèse « Fmoc – Tbu ».

On utilise donc pour ce type de synthèse des acides aminés protégés (Fmoc / Tbu) qui existent commercialement.

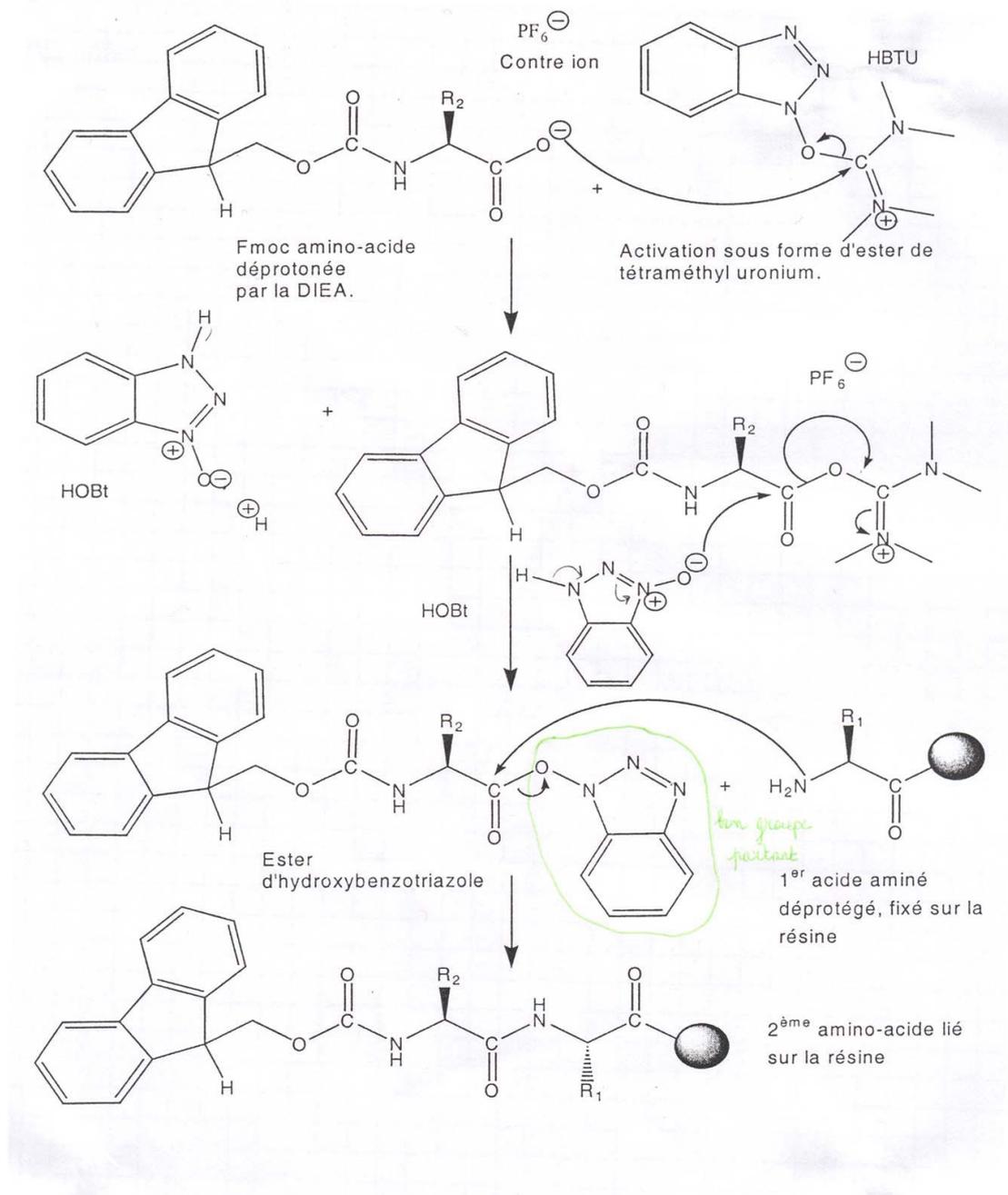
Entre chaque couplage, il est nécessaire de déprotéger les fonctions amines terminales. Cette opération (le « défmocage ») se fait par ajout de pipéridine.

Quant aux protections perpendiculaires, elles sont conservées durant toute la synthèse. La déprotection n'intervient qu'en fin de processus lorsque l'on « cleave » le peptide de la résine.

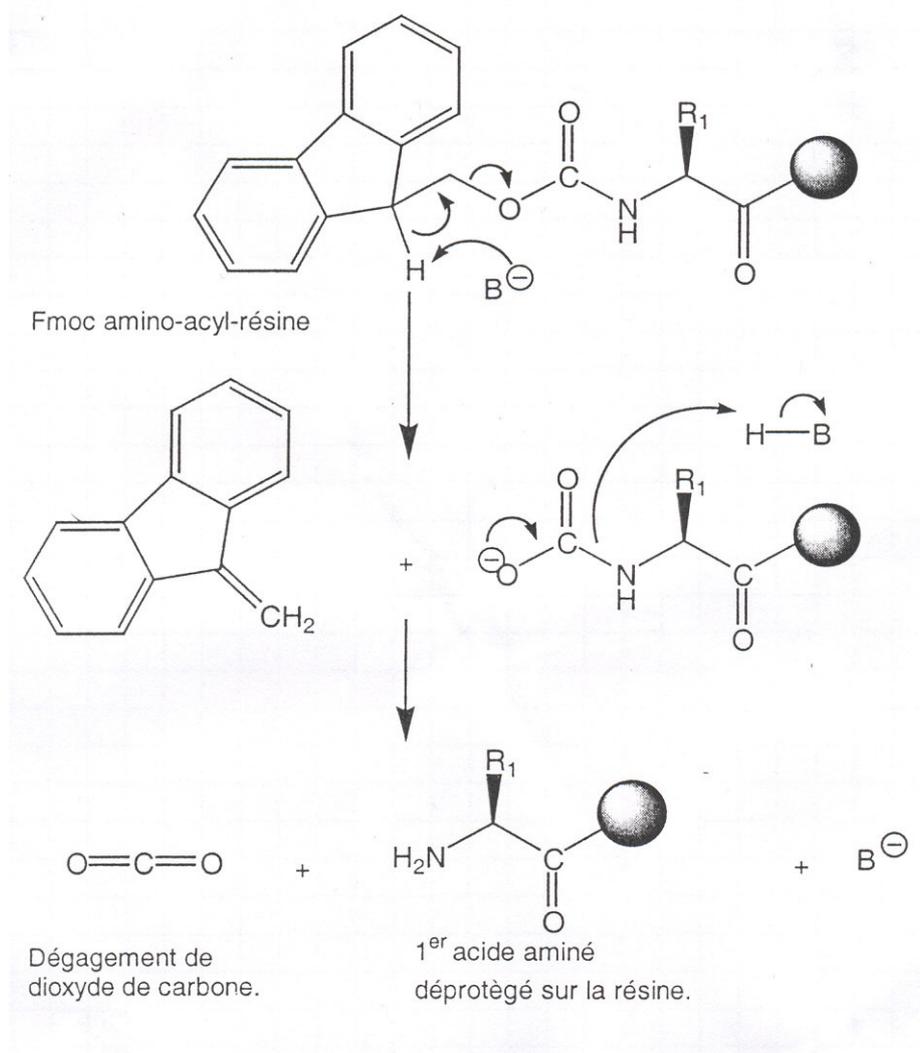
Le principe général de la synthèse peptidique en phase solide et en stratégie Fmoc – Tbu est donc le suivant :

- Résine fonctionnalisée avec une fonction amine terminale protégée par un groupement Fmoc
- Déprotection de la résine Fmoc

- Vérification du défmocage par un test permettant de vérifier la présence d'amines terminales (test TNBS).
- Couplage de l'aa₁ dont l'amine terminale est Fmoc
Utilisation d'agents de couplage HOBT / HBTU qui activent le couplage



- Défmocage de l' aa₁ (en vue du couplage de l'aa₂)



- Vérification du défmocage par un test TNBS
- Couplage de l'aa₂ dont l'amine terminale est Fmoc
- Poursuite des couplages amino acide après amino acide

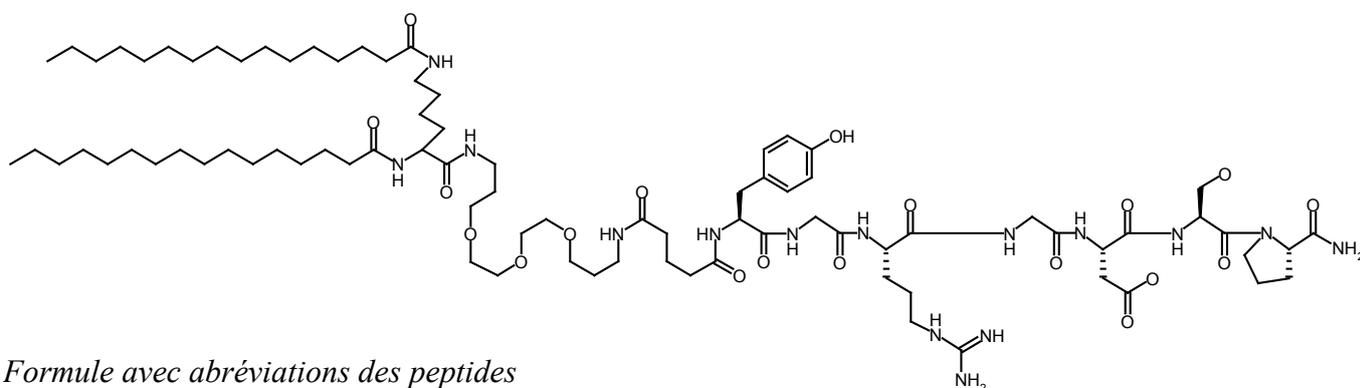
Annexe n°8

Protocole expérimental pour la synthèse du lipopeptide R5

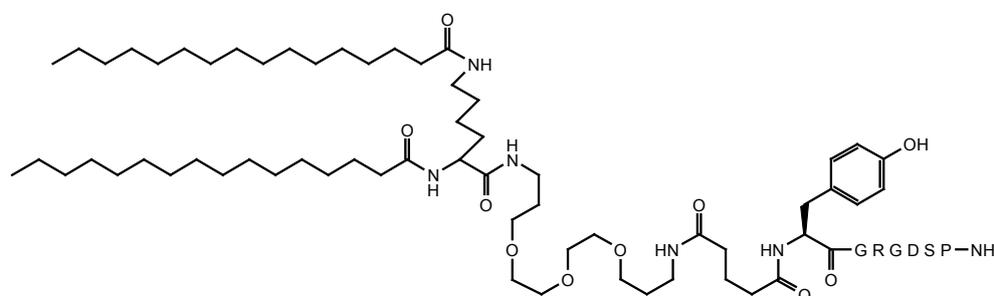
Ce protocole a été écrit après formation à la synthèse par Pascale Jolimaître (IBL-Lille).

Lipopeptide R5

Formule développée



Formule avec abréviations des peptides



Molecular Weight = 1671,20

Exact Mass = 1669

Molecular Formula = C₈₄H₁₄₇N₁₅O₁₉

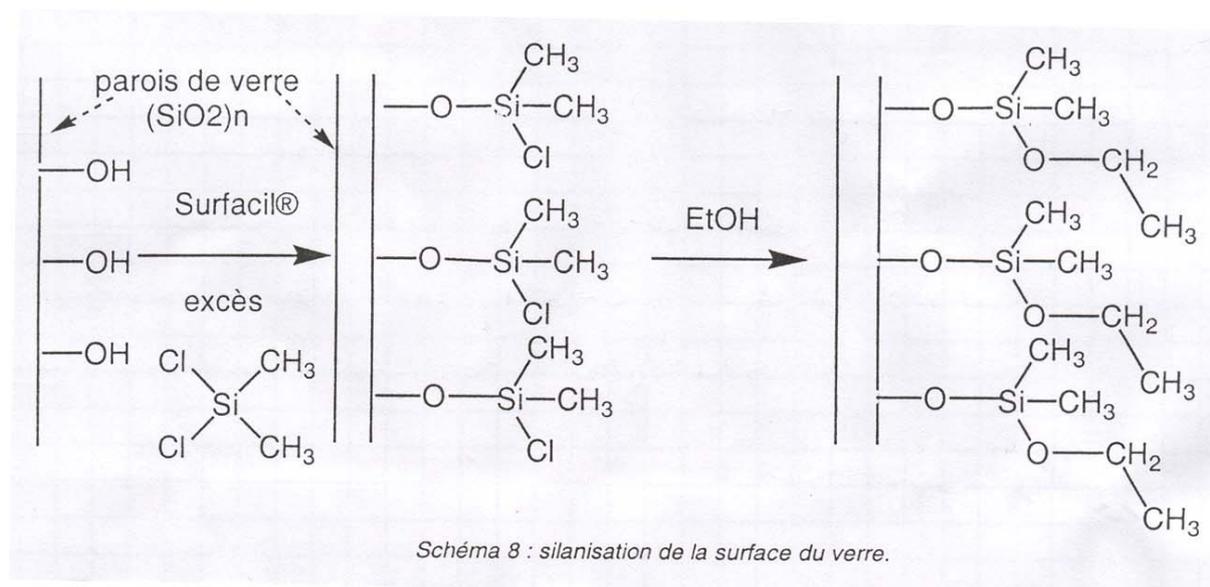
Molecular Composition = C 60.37% H 8.87% N 12.57% O 18.19%

Règles à garder en mémoire tout au long de la synthèse

- Suivre les consignes de sécurité habituelles, notamment en travaillant sous hotte
- Si les couplages, ne s'enchaînent pas, **la résine doit être conservée dans le DCM**. Par conséquent, la résine ne doit pas rester au repos dans le DMF (quelques minutes au maximum)
- De même, **on ne doit pas conserver un produit présentant des fonctions amines libres**. Ainsi, il faut prévoir de conserver des produits protégés (par Fmoc) entre deux couplages

1). Silanisation du réacteur

Pour éviter que les billes de polymères de la résine ne s'attachent aux parois de verre du réacteur, il est nécessaire de bloquer les fonctions hydroxyles de la silice par un traitement de la surface : la silanisation.



Pour silaniser le réacteur :

- Silaniser le réacteur avec le minimum de produit SurfaSil™ en évitant au maximum le contact avec le fritté
- Rincer le réacteur à l'éthanol puis au DCM sans tirer par le fritté dans un premier temps
- Rincer à nouveau avec du DCM ; tirer sous vide par le fritté

2). Préparation de la résine

Au départ, la résine se présente sous la forme :



- Déterminer la quantité de lipopeptide R5 à synthétiser
- En fonction de la charge de la résine, peser la quantité de résine appropriée directement dans le réacteur de synthèse.
- Faire gonfler la résine dans le DCM
- Conditionner la résine dans le DMF
 - Tirer sous vide le DCM
 - Ajouter du DMF dans le réacteur jusqu'à recouvrir très largement la résine
 - Agiter doucement à la main
 - Mettre sous agitation 3 min
 - Tirer sous vide le DMF
 - Recommencer l'opération 2 fois supplémentaires

⇒ Tout changement de milieu de la résine se fait de cette façon avec trois lavages de 3 minutes dans le nouveau solvant

- Conditionner la résine dans le DMF (ou DCM si on s'arrête à cette étape)
 - Déprotéger (« défmocquer ») la résine
 - Tirer sous vide le solvant présent dans le réacteur
 - Ajouter une solution de pipéridine à 20% en volume dans le DMF
 - Mettre à agiter 5 minutes
 - Tirer à nouveau sous vide
 - Ajouter à nouveau la solution de pipéridine à 20% dans le DMF
 - Mettre à agiter 15 minutes
- ⇒ Cette procédure sera appelée « défmocage » par la suite. Elle sera répétée de nombreuses fois !

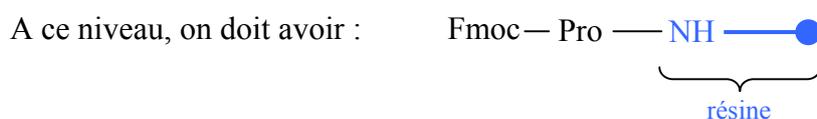
A ce niveau, la résine est prête pour le couplage du premier acide aminé puisqu'elle possède une fonction amine terminale libre.



3). Synthèse de l'heptapeptide : Y-G-R-G-D-S-P-●

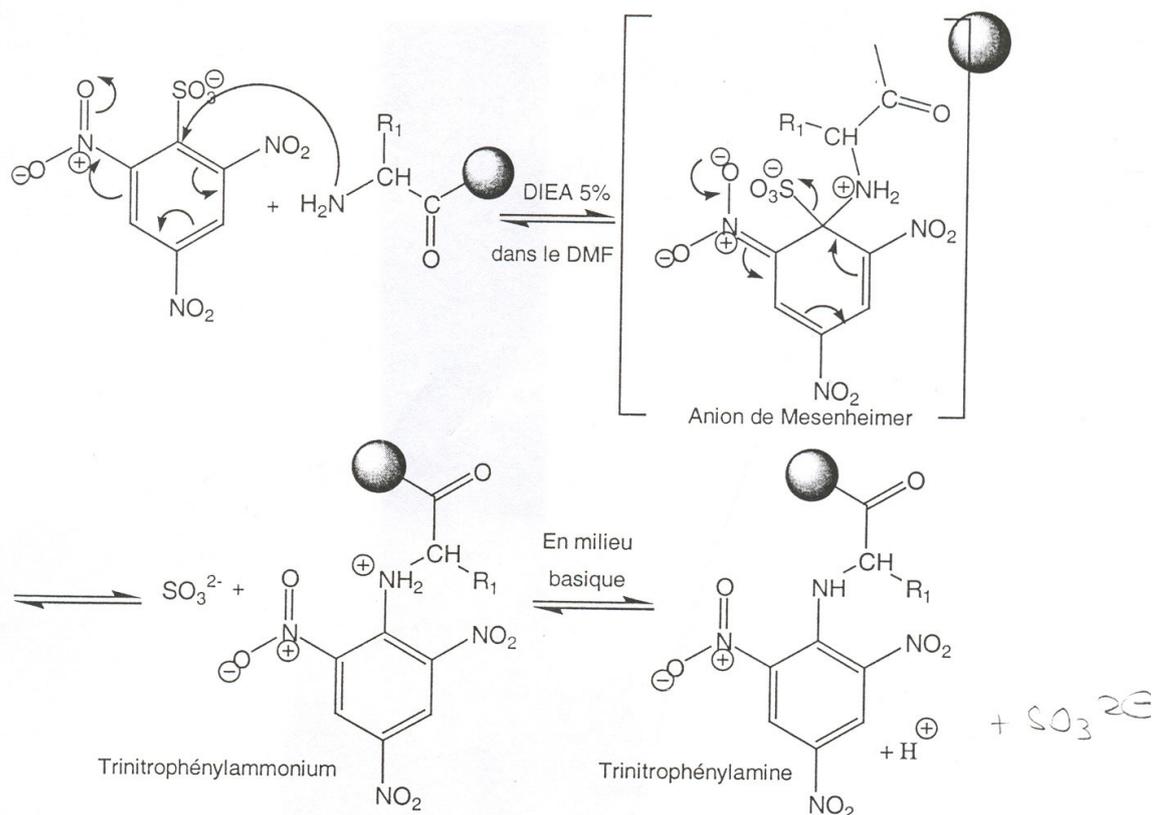
Couplage de la proline

- Conditionner la résine dans le DMF (3 X 3min)
- Dans 3 tubes séparés, peser :
 - 4 équivalents de proline
 - 4 équivalents d'HOBt
 - 4 équivalents d'HBTU
- Toujours dans les 3 tubes séparés, dissoudre chacun des 3 constituants dans le minimum de DMF
 - Pour 270mg de HOBt, compter environ 750μL de DMF
 - HBTU est plus difficile à dissoudre : ne pas rajouter trop de DMF. Si tout l'HBTU n'est pas dissous, la dissolution se terminera par la suite...
- Rajouter l'HOBt dans le tube d'HBTU
- Rincer le tube ayant contenu l'HOBt avec 100μL de DMF
- Bien agiter : à ce niveau, tout doit être absolument bien dissous.
- Rajouter (HOBt + HBTU) sur la proline
- Rincer le tube (HOBt + HBTU)
- Bien agiter
- Ajouter 12 équivalents de DIEA
- Agiter quelques secondes
- Déposer le tout sur la résine « sable mouillée »
- Mettre à agiter 45 minutes
- Tirer sous vide
- Conditionner la résine en DMF (ou DCM si on s'arrête à cette étape)



La proline étant protégée par le groupement Fmoc, il n'y a pas d'amine libre. On le vérifie par un test simple appelé test TNBS.

- Faire un test TNBS
 - Conditionner la résine en DMF (si ce n'est pas le cas)
 - Prélever quelques grains de résine et les déposer au fond d'un tube
 - Basifier la résine en ajoutant de la DIEA à 10% en volume dans le DMF
 - Agiter puis laisser décanter quelques secondes
 - Prélever le liquide en prenant garde à ne pas aspirer les billes des résine
 - Ajouter une goutte de TNBS
 - Vérifier que toutes les billes de résine sont bien en contact avec le produit
 - Rajouter de la solution de DIEA à 10% pour activer
 - Agiter et laisser réagir quelques secondes
 - Prélever à nouveau le liquide
 - Rincer au DMF ; agiter ; laisser décanter et prélever le DMF
 - Observer les billes restées au fond du tube avec une loupe
 - Billes rouges : le test est positif : il y a des amines libres
 - Billes incolores : le test est négatif : il n'y a pas d'amine libre



- Dans le cas présent, le test doit être négatif puisque la proline est protégée par un groupe Fmoc
- Conditionner la résine en DMF (ou DCM si on s'arrête à cette étape)

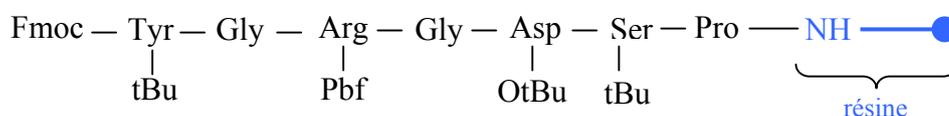
Couplage de la sérine

- Conditionner la résine en DMF si ce n'est pas le cas
- Défmocquer la proline avec la pipéridine
- Faire un test TNBS qui doit alors être positif
- Coupler alors la sérine avec HOBt et HBTU comme précédemment pour la proline

Le couplage des amino acides se fait de la sorte, un à un, avec des cycles successifs de

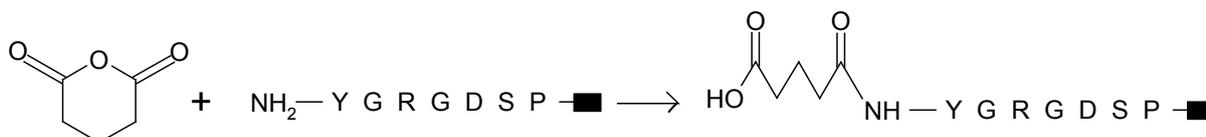
- défmocage
- test TNBS positif
- couplage de l'acide aminé de 45 minutes
- test TNBS négatif

Lorsque tous les acides aminés sont couplés, on obtient donc l'heptapeptide suivant :



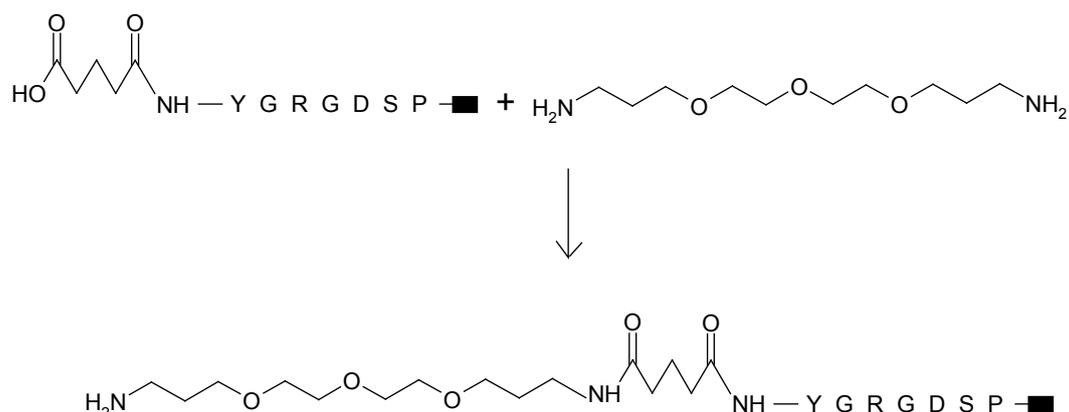
Remarque : on a encore l'ensemble de toutes les protections perpendiculaires.

4). Couplage de l'anhydride glutarique



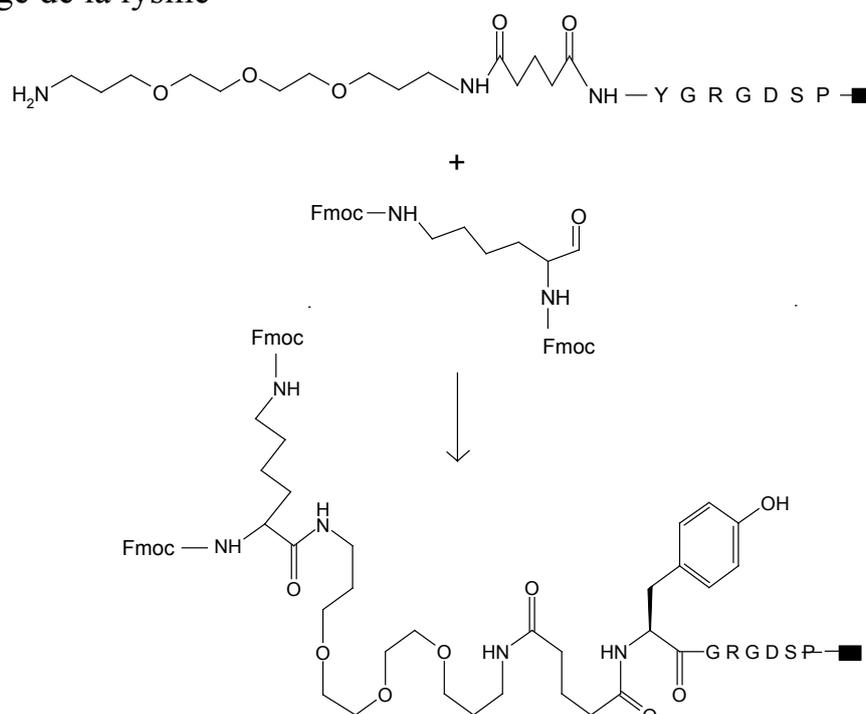
- Conditionner la résine en DMF si ce n'est pas le cas
- Défmocquer la tyrosine
- Vérifier le défmocage par un test TNBS positif
- Peser 4 équivalents d'anhydride glutarique
- La solubiliser dans le minimum de DMF (compter environ 200 μ L pour 0.115g)
- Mettre la résine « sable mouillée »
- Déposer sur la résine « sable mouillée » 6 équivalents de DIEA pure
- Agiter manuellement
- Déposer l'anhydride sur la résine
- Rincer le tube ayant contenu l'anhydride par 100 μ L de DMF
- Mettre à agiter 30 minutes
- Conditionner la résine en DMF (ou DCM)
- Faire un test TNBS qui doit être négatif

5). Couplage de la diamine



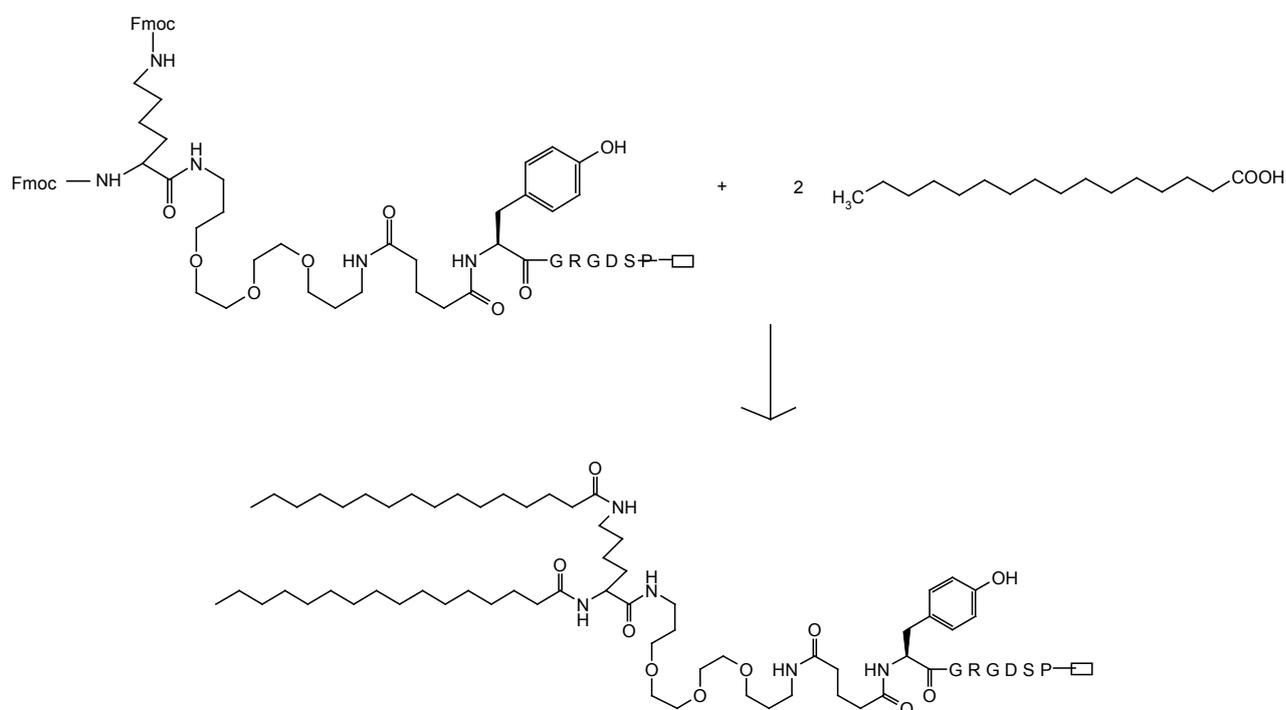
- Conditionner la résine en DMF
- Peser 2 équivalents de PyBOP
- Solubiliser le PyBOP dans le minimum de DMF (environ 400 μ L pour 0.260g)
- Mettre la résine « sable mouillé »
- Ajouter sur la résine 4 équivalents de DIEA pure
- Déposer ensuite 10 équivalents de diamine
- Déposer le PyBOP solubilisé sur le tout
- Mettre à agiter pendant 45 minutes
- Conditionner la résine en DMF (ou DCM)
- Faire un test TNBS qui doit être positif

6). Couplage de la lysine



- Conditionner la résine dans le DMF
- Peser 4 équivalents de PyBOP et solubiliser dans le minimum de DMF
- Peser 4 équivalents de lysine
- Solubiliser la lysine dans le minimum de DMF (environ 1500 μ L pour 0.6g)
- Rajouter le PyBOP sur la lysine
- Rajouter 12 équivalents de DIEA pure sur le mélange (PyBOP + lysine)
- Agiter fortement au vortex pendant environ 1 minute pour former l'ester activé
- Déposer le tout sur la résine « sable mouillé »
- Mettre à agiter pendant 45 minutes
- Conditionner la résine en DMF (ou DCM)
- Faire un test TNBS qui doit être négatif

7). Couplage des chaines grasses palmitoyl



Cette étape nécessite deux couplages différents afin de s'assurer que l'on greffe bien deux chaines grasses sur chacune des fonctions amines de la lysine.

a) Premier couplage classique

- Conditionner la résine dans le DMF
- Défmoquer la lysine
- Faire un test TNBS qui doit être positif
- Peser dans trois tubes différents :
 - 8 équivalents d'acide palmitique
 - 8 équivalents d'HOBt
 - 8 équivalents d'HBTU

- Dissoudre l'acide palm dans le minimum de DMF (environ 1.5mL pour 0.520g)
- Dissoudre HOBt et HBTU (voir couplage de la proline)
- Rajouter (HOBt + HBTU) sur l'acide palmitique
- Rincer le tube (HOBt + HBTU) avec du DMF
- Bien agiter
- Ajouter 30 équivalents de DIEA pure
- Agiter manuellement quelques secondes
- Déposer le tout sur la résine « sable mouillé »
- Mettre à agiter pendant 1 heure ; la résine prend alors une couleur brune
- Conditionner la résine dans le DMF (ou DCM)
- Faire un test TNBS qui normalement est négatif mais attention il peut s'agir d'un faux négatif car à ce niveau on a très souvent un produit « monopalm » qui possède donc une amine libre !

b). Deuxième couplage avec un fluorure d'acide

- Synthèse du fluorure d'acide
 - Préparer à l'avance un ballon (avec un barreau aimanté) et le placer à l'étuve ; préparer de même un tamis moléculaire de 4 Å
 - Préparer un mélange sec de DCM / tBuOMe dans les proportions 4 / 1
 - Peser dans le ballon 8 équivalents d'acide palmitique
 - Dissoudre l'acide palmitique dans le mélange DCM / tBuOMe. (Il faut mettre 6.25mL de mélange pour 0.510g d'acide palmitique)
 - Se placer sous Argon
 - Si l'acide précipite, ajouter quelques gouttes de tBuOMe
 - Ajouter avec une seringue 32 équivalents de fluorure cyanurique
 - Ajouter avec une autre seringue, 8 équivalents de pyridine ; il se forme un précipité blanc
 - Agiter deux heures sous Argon
 - Placer le tout dans une ampoule à décanter
 - Extraire rapidement avec 45 mL de DCM et 50 mL d'eau
 - Récupérer la phase organique qui se trouve en bas
 - Laver la phase organique avec 50 mL d'eau ; la sécher
 - Evaporer
- Couplage
 - Conditionner la résine dans le DMF
 - Mettre la résine « sable mouillé »
 - Déposer 12 équivalents de DIEA sur la résine ; agiter
 - Solubiliser le fluorure d'acide dans le DMF (1mL de DMF pour 2mmol d'acide palmitique pesé au départ)
 - Déposer le fluorure d'acide solubilisé sur la résine
 - Mettre à agiter pendant 3 heures
 - Laver la résine :
 - avec du DMF : 3min, 10min puis à nouveau 3min
 - avec du DCM : 3min, 10min puis à nouveau 3min
 - avec la mélange DCM / tBuOMe (4 / 1) : 3min, 10min, 3min
 - Conditionner la résine dans le DMF (ou DCM)

8). Coupure

Cette opération consiste à couper le lipo R5 de la résine et en même temps à éliminer les protections perpendiculaires des acides aminés (Tyr, Arg, Asp et Ser)

- Préparation du mélange de coupure
 - Prévoir environ 18mL de mélange de coupure pour 0.25mmol de résine
 - Pour préparer 18 mL de mélange :
 - peser 1.2g de phénol cristallin
 - ajouter 0.4 mL d'éthanedithiol
 - ajouter 0.8 mL de thioanisole
 - ajouter 0.8 mL d'eau
 - ajouter enfin 16 mL de TFA

Remarque : se placer sous hotte car le mélange sent très mauvais !

- Sécher la résine (préalablement lavée au DCM) à la trompe à vide pendant 15min
- Déposer le mélange de coupure sur la résine
- Mettre à agiter pendant 1h30
- Préparer 400 mL d'un mélange heptane / éther dans les proportions 1 / 1
- Placer le mélange au congélateur
- Lorsque la coupure est achevée, sortir le mélange heptane / éther du congélateur et le placer dans un erlenmeyer avec un barreau aimanté
- Se placer sous agitation dans un bain de glace
- Laisser tomber goutte à goutte le contenu du réacteur dans l'erlemeyer
- Rincer la résine deux fois avec 1mL de TFA
- Agiter un peu

⇒ Le lipopeptide R5 doit précipiter dans l'erlenmeyer

- Transvaser le mélange dans des tubes et centrifuger 10min, à 4°C et 4000 rpm
- Jeter les surnageants
- Laver à nouveau les culots deux fois avec le mélange heptane / éther
 - Ajouter 20 mL de mélange sur les culots
 - Centrifuger
 - Jeter les surnageants
- Solubiliser les culots dans le minimum d'acide acétique
- Compléter avec de l'eau de sorte à pouvoir lyophiliser (environ 10% d'AcOH)
- Lyophiliser

⇒ Après lyophilisation, on a la masse de produit brut obtenu.

9). Purification

La purification se fait par chromatographie en phase liquide. A priori, il est possible de la faire sur colonne de silice

- Colonnes Si – C₃
- 2 tampons sont utilisés :

- tampon A : Eau + 0.05% TFA
 - tampon B : acétonitrile 80% + eau 20% + 0.05% TFA
 - Faire des lots de produit brut de 100mg environ et purifier un lot après l'autre

 - Dissoudre 100 mg de produit brut dans 1mL d'acide acétique + 9 mL
 - Utiliser les ultrasons si nécessaire pour aider à la dissolution
 - HPLC analytique du produit brut : on constate que notre produit sort pour 83% de tampon B environ
 - HPLC préparative avec un gradient :
 - 20 min de 0 à 50 % de tampon B
 - 20 min de 50 à 70 %
 - 66 min de 70 à 90% (0.3% par min)
 - palier à 90%
- ⇒ on récolte plusieurs tubes
- HPLC analytique des différents tubes recueillis
 - Pool de tous les tubes contenant du lipopeptide R5
 - Ajouter de l'eau pour pouvoir lyophiliser
 - Lyophiliser

Annexe n°9

Liste des produits nécessaires à la synthèse du lipopeptide R5

	nom du produit	fournisseur	référence
<i>résine</i>	rink amide MBHA resin	Novabiochem	01-64-0037
<i>acides aminés</i>	Proline : Fmoc-Pro-OH	Novabiochem	04-12-1031
	sérine : Fmoc-Ser(tBu)-OH	Novabiochem	04-12-1033
	acide aspartique : Fmoc-Asp(OtBu)-OH	Novabiochem	04-12-1013
	glycine : Fmoc-Gly-OH	Novabiochem	04-12-1001
	arginine : Fmoc-Arg(Pbf)-OH	Novabiochem	04-12-1145
	tyrosine : Fmoc-Tyr(tBu)-OH	Novabiochem	04-12-1037
	lysine : Fmoc-Lys(Fmoc)-OH	Novabiochem	04-12-1085
<i>réactifs à coupler</i>	anhydride glutarique	Aldrich	G380-6
	4,7,10-trioxa-1,3-tridécanediamine	Aldrich	36,951-9
	acide palmitique	Aldrich	25,872-5
<i>agents de couplage</i>	1,hydroxybenzotriazole anhydre (HOBt)	Acros Organics	16916-0250
	HBTU	Novabiochem	01-62-0010
	PyBOP	Acros Organics	27072-0050
<i>réactifs de couplage</i>	diisopropylethylamine (DIEA)	Sigma	D3887
	pipéridine	Sigma	P5881
	fluorure cyanurique	Avocado	15666
	pyridine	Acros Organics	41854-5000
	terbutylméthyléther (tBuOMe)	Acros Organics	17704-0010
	2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid solution	Sigma	P2297
	(TNBS)		
<i>réactifs de coupure</i>	cristalline phenol loose crystals	Aldrich	24 232-2
	ethanedithiol (EDT)	Aldrich	39,802-0

	thioanisole	Acros Organics	13 867-0250
	acide trifluoroacétique (TFA)	Acros Organics	29381-1000
<i>solvants divers</i>	dichlorométhane (DCM)	Sigma	D6,510-0
	diméthylformamide	Aldrich	D15,855-0
	heptane 99%	Aldrich	49,452-6
	éther	Aldrich	29-608-2
	acide acétique	Aldrich	32,009-9
	acétonitrile		
<i>Divers</i>	Surfa-Sil™ Siliconizing Fluid	Pierce Biothechnology	42855
	1-méthyl-2-pyrrolidone (NMP)	Sigma	M6762

Bibliographie

- [1] MAJOU *et al.* *Journal of Cell Science*, 2002, 115, p. 817-826.
- [2] ALBERTS, JOHNSON, LEWIS, RAFF, ROBERTS and WALTER. « *Biologie Moléculaire de La Cellule* » 4ème édition, Flammarion, 2004
- [3] RUPONEN *et al.* *J Gene Med.* 2004, 6, p. 405-414.
- [4] SABRI *et al.* *J of Cell Science*, 2000, 113, p. 1589-1600.
- [5] Gao *et al.* *PNAS.* 2005, vol.102, n°27, p. 9469-9474.
- [6] Patrick COUVREUR et Didier ROUX. « *Nanotechnologies et nouveaux médicaments* »
- [7] HEURTAULT *et al.* *Biomaterials*, 2003, 24, p. 4283-4300
- [8] BATIST *et al.* *Journal of Clinical Oncology*, 2001, vol 19, n° 5, p. 1444-1454
- [9] O.LYASS, A.HUBERT, and A.A.GABIZON *Clinical Cancer Research*, 2001.vol. 7, p. 3040–3046.
- [10] NOBS *et al.* *J Pharm Sci.* 2004, 93, p. 1980-1992.
- [11] ZHONG MING QUIAN *et al.* *Pharmacol Rev.* 2002, 54, p. 561-587
- [12] MASTROBATTISTA *et al.* *Advanced Drug Delivery Reviews.* 1999, 40, p. 103–127
- [13] JANSSEN *et al.* *International Journal of Pharmaceutics.* 2003, 254, p. 55-58
- [14] MAEDA *et al.* *Journal of Controlled Release.* 2004, 100, p. 41-52.
- [15] D.PERSSON *et al.* *Biochemistry.* 2004, 43, p. 11045-11055
- [16] O.DIAT « *Effet du cisaillement sur des phases lamellaires lyotropes* ». Thèse de doctorat, Université de Bordeaux 1, 1992.
- [17] DIAT, ROUX and NALLET. *J.Phys.II France* 3, 1993, p. 1427-1452
- [18] T.GULIK-KRZYWICKI *et al.* *Langmuir*, 1996, 12, p. 4668-4671.
- [19] Pascale CHENEVIER. « *Vésicules multilamellaires de type oignons comme vecteurs biologiques ciblés* ».Thèse de doctorat Université de Bordeaux 1, 2001.
- [20] T.POTT, R.LAVERSANNE et D.ROUX Brevet FR.9916191. Dépôt PCT 21/12/99, 1999.
- [21] T.POTT and D.ROUX. *Febs Letters*, 2001, 511, p. 150-154.
- [22] D.ROUX *et al.* *Current Med Chem* 2004, 10, p. 1241-125.
- [23] N.MIGNET, A.BRUN, C.DEGERT *et al.* *Nucleic Acids Research*, 2000, vol.28, n°16.
- [24] S .GAUBERT, B.DELORD, J.AMEDEE *et al.* *Drug Delivery*, 2004
- [25] Résultats confidentiels- non publiés
- [26] Fabienne GAUFFRE. « *Utilisation de vésicules préparées par cisaillement d'une phase lamellaire comme microréacteurs chimiques* ». Thèse de doctorat, Université de Bordeaux 1. 1997
- [27] E.BELAMIE, F.ARGOU and C.FAURE. *J. Electrochem. Soc.* 2001, 148, 4, C301-C309
- [28] A.D.O'BRIEN and R.K.HOLMES. *Microbiological reviews*, 1987, 51:2, p. 206-220
- [29] SANDVIG *et al.* *Histochem Cell Biol*, 2002, 117, p. 131-141
- [30] HAGNERELLE *et al.* *Journal of Structural Biology.* 2002, 139, p. 113-121
- [31] LING *et al.* *Biochemistry.* 1998, 37, 1777-1788
- [32] FALGUIERES *et al.* 2005, article soumis.

- [33] K.SANDVIG. *Toxicon* . 2001, 39, p. 1629-1635.
- [34] S.U.LAUVRAK *et al.* *Journal of Cell Science*. 2004. 117, p. 2321-2331.
- [35] TAI *et al.* *Molecular Biology of the Cell*. 2004, vol.15, p. 4011-1022.
- [36] Ludger JOHANNES. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2002, 283 :G1-G7.
- [37] SU *et al.* *Infection and Immunity*. 1992. vol 60, n°8, p. 3345-3359.
- [38] PINA *et al.* *Biochemistry* 2003, 42, p. 9498-9506.
- [39] Nobs *et al.* *Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol 93, n° 8, 2004
- [40] M.J.HUMPHRIES *et al.* *Trends in Biochemical Sciences*. 2003, Vol 28, n°6.
- [41] A.P.MOULD and M.J.HUMPHRIES. *Current Opinion in Cell Biology*. 2004. 16, p. 544-551
- [42] XIONG *et al.* *Science*. 2001, vol 294.
- [43] Sophie VERRIER. Thèse de Doctorat. Université Paris 7. 1998 « Etude des mécanismes d'adhésion des cellules ostéoprogénitrices humaines : Rôle et intérêt des séquences RGD »
- [44] P.CHENEVIER, L.BOUREL, D.ROUX. *J.Am.Chem.Soc.* 2003. 125 (52) p. 16261-16270.
- [45] HEAD, KARMALI et LINGWOOD , *J. Biol. Chem.* 266, 3617-3621, 1991
- [46] NAKAJIMA *et al.*, *J. Biol. Chem*, 276, n°46, 2001
- [47] P.CHENEVIER *et al.* « Interaction of cationic colloids at the surface of J774 cells : a kinetic analysis » *Biophysical Journal*. 2000, vol 79, p. 1298-1309.
- [48] CHENEVIER *et al.* *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*. 2002, vol 1593, I, 17-27.
- [49] MOULD and M.J HUMPHRIES. A.P. *Current opinion in cell biology*. 2004, 16, p. 544-551.
- [50] MOULD *et al.*, *J Biol Chem*. 2003 : 51629-51662
- [51] CHEN *et al.*, *Nat Struct Biol*. 2003, 10, p. 995-1001
- [52] ALLEN *et al.* *Bioscience Reports*. 2002, vol.22, n°2.
- [53] HUA *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta*. 2001, 78070 :1-13.
- [54] VERMEHREN *et al.* *Biochim. Biophys. Acta*. 1998, 1373 :27-36.
- [55] VERT and DOMURADO. *Biomater. Sci. Polymer Edn*. 2000, 11 :1307-1317.
- [56] KLIBANOV *et al.* *FEBS Lett*. 1990, 368 :235-237
- [57] YUDA *et al.*, *Biol. Pharm. Bull*. 1996. 19 :1347-1351
- [58] BELSITO *et al.* *Biophysical Chemistry*. 2001, 93, p. 11-22.
- [59] de Gennes. *Macromolecules*. 1980, 13, p. 1069-1075.
- [60] Jacob Israelachvili. « Intermolecular and Surface Forces » Academic Press
- [61] ARCASOY *et al.*, *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol*. 1997, vol.17, p. 422-435.
- [62] PICKLES *et al.*, *Journal of Virology*. 2000, vol.74, n°13, p. 6050-6057
- [63] G.WANG *et al.*, *Gene Therapy*. 2002, 9, p. 922-931.
- [64] MAEDA *et al.* *Bioorganic et medicinal chemistry letters*. 2004, 14, p. 1015-1017.
- [65] JANSSEN *et al.* *International Journal of Pharmaceutics*. 2003, 254, p. 53-58.
- [66] J.Y.WONG, T.L.KUHL, J.N.ISRAELACHVILI, N.MULLAH, S.ZALIPSKY. *Science*. 1997, vol.275.
- [67] EVANS, *Nature*, 1999, vol 397
- [68] EVANS *et al.*, *PNAS*, 2004, vol 101 n°31, 11281-11286
- [69] MERKEL., *Physics Reports* 346 (2001) 343-385
- [70] LECKBAND. *Current Opinion in Structural Biology*, 2004, 14 :524-530
- [71] « Testing bond strength with Biomembrane Force Probe (BFP) » de mars 2004
- [72] FLORIN *et al.*, *Science*, 1994
- [73] HOCHMUTH *et al.*, *Biophysical Journal*. 1996, vol 70, 358-369.
- [74] PIERRES *et al.*, 1995
- [75] EVANS. *Biophysical Journal*. 1991, vol 59.

-
- [76] SIMSON *et al*, Biophysical Journal. 1998, vol 74, 2080-2088.
- [77] BELL. 1978
- [78] E.EVANS. Faraday Discuss, 1998, 111, 1-16
- [79] MERKEL *et al*, Nature, vol 397, 7 January 1999
- [80] SIMSON *et al*, PRL. 1999, vol 83, n°3.
- [81] WILLIEMSEN *et al*, Biophysical Journal. 2000, vol 79, p. 3267-3281.
- [82] WILLIAMS P., EVANS E. Physique des biomolécules et des cellules. Les Houches session LXXV. EDP Sciences
- [83] S.PIERRAT. Thèse de doctorat de l'Université Paris 6. 2004
- [84] LEHENKARI and HORTON, Biochemical and Biophysical Research Communications. 1999, 259, 645-650.
- [85] BENOIT *et al*, Nature Cell Biology. 2000, vol 2.
- [86] CHESLA, SELVARAJ and ZHU, Biophysical Journal. 1998, vol 75, p. 1553-1572.
- [87] A.BENMERAH and C.LAMAZE. Medecine/Sciences. 2002; n°11, vol 18.
- [88] L.JOHANNES and C.LAMAZE. Traffic, 2002, 3, p. 443-451.
- [89] QIAN *et al*. Pharmacol Rev. 2002, 54, p. 561-567.
- [90] M.S.ROBERTS. Molecular and cellular biology. 2004, vol.24, n°4. p 1505-1515.
- [91] L.JOHANNES and B.GOUD. Traffic 2000 1, p. 119-123.
- [92] S.U.LAUVRAK, M.L.TORGERSEN and K.SANDVIG. Journal of Cell Science. 2004, 117, p. 2321-2331.
- [93] F.MALLARD *et al*. The Journal of Cell Biology. 1998, vol 143, N° 4.
- [94] D.C.SMITH *et al*. Traffic. 2002; 3. p. 697-704.
- [95] O.MEIER and U.F.GREBER. J Gene Med. 2004, 6 :S152-S136
- [96] L.JOHANNES and B.GOUD. Trends in Cell Biology. 1998, vol 8.

