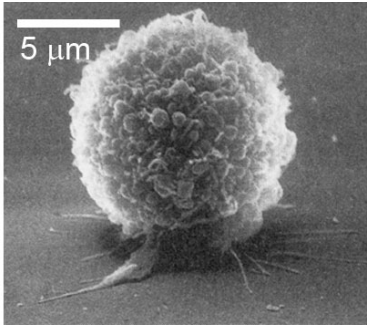


Étude du mouillage d'émulsions fonctionnalisées sur des substrats biomimétiques

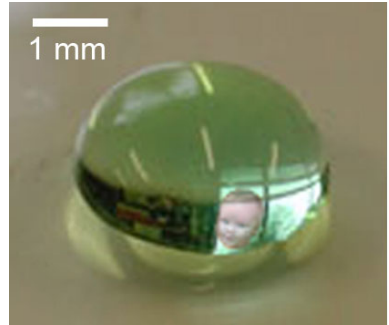
Jacques FATTACCIOLI

Laboratoire Colloïdes et Matériaux Divisés (ESPCI)
LI2C (Université Paris 6)

Direction : Jérôme BIBETTE

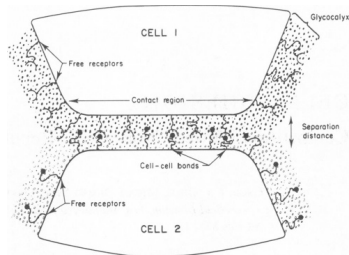


- Système vivant : hors équilibre thermodynamique
- Interactions Ligand-Récepteur

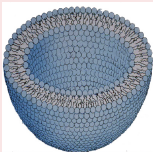


- Système inerte : équilibre thermodynamique
- Interactions de type champ moyen

Si on laisse de côté les processus biologiques
Formalisme emprunté à la physique du mouillage

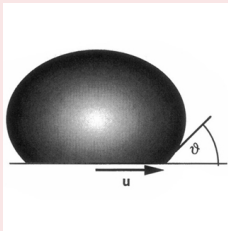


Nécessité de Surfaces Modèles : Liposome



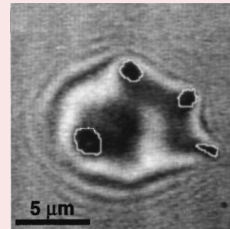
- 1 Bicouches lipidiques → membranes cellulaires
- 2 Aire constante
- 3 Tension de membrane faible et Module de courbure important
- 4 Fluctuations thermiques

Expression de l'énergie d'adhésion



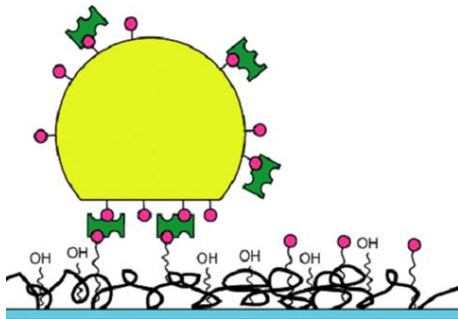
- Variation de l'angle de contact avec la formation de liens
- Expression de l'énergie d'adhésion ?
Young-Dupré ?

Structuration des récepteurs

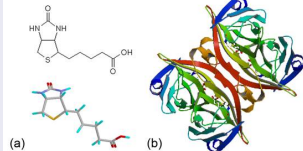


- Cas des surfaces à 2 composants (PEG/ligand ou ligand1/ligand2)
- Structure des récepteurs en milieu confiné

Questions encore très ouvertes, et nécessité de surfaces bien caractérisées pour aller vers une description quantitative



Couple Biotine-Streptavidine

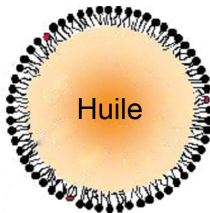


$$U = 35kT$$

$$K_a = 10^{14} \text{ M}^{-1}$$

Objectifs de ce travail

- 1 Évolution de l'angle de contact/l'énergie en fonction de la formation des liens
- 2 Structuration des protéines dans le film adhérent



Avantages des émulsions

Caractérisation
Distribution de taille
Biocompatibilité
Robustesse

Physico-chimie Différente

Monocouche de surfactants → Pas de Fluctuations de l'interface

Tension de surface de l'ordre du mN/m

Module de Courbure de l'ordre de kT

Plan de l'exposé

1 Gouttes et Lamelles

- Surfaces des émulsions
- Technique de Cytométrie en Flux
- Lamelles de verre

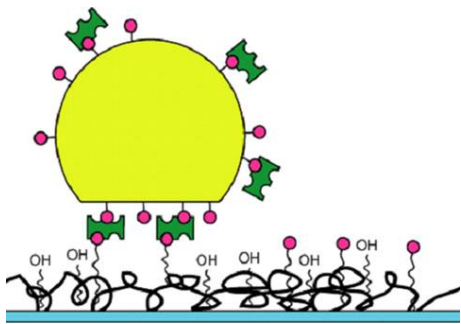
2 Étude du mouillage sur surfaces solides

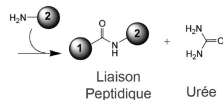
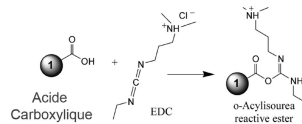
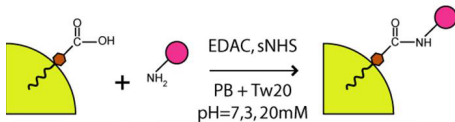
- Montage Expérimental
- Couverture en PEG importante
- Couverture en PEG plus faible

3 Implications ?

- Formation de la synapse immune

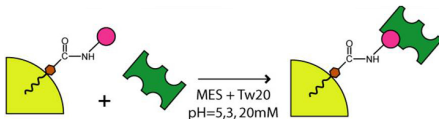
Matériaux : Émulsions et Lamelles



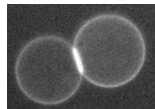


Greffage covalent sur les groupes carboxyliques

- Biotine Amino-modifiée
- Agent de couplage EDAC en phase aqueuse : liaison peptidique
- Utilisation de l'acidité libre de l'huile de soja
- Grande stabilité dans le temps de la fonctionnalisation

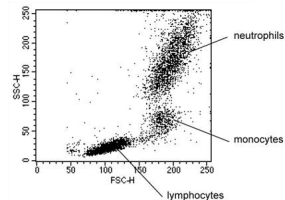
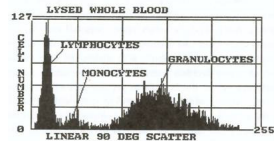
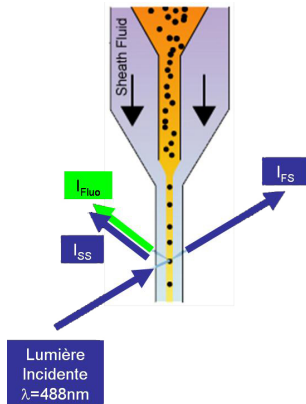


Adsorption de streptavidine FITC Les protéines peuvent diffuser à la surface



Nécessité d'un moyen de caractérisation

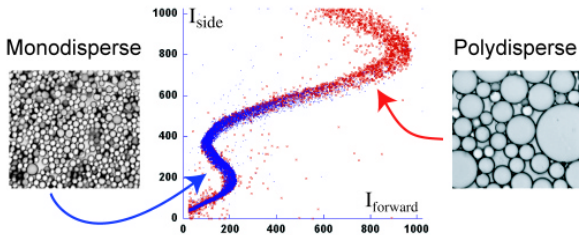
- Peu gourmand en matériaux
- Qui tire parti de la légère polydispersité : $1 < R < 4$ microns
- Qui permette de suivre les densités associées aux greffages



Technique de Cytométrie en Flux

Mesure Multiparamètre : Diffusion + Fluorescence

Analyse Individuelle HF : 10^4 objets par mesure (<0,1% total)



**Diagramme de Diffusion en S très caractéristique
La polydispersité influence l'extension de la courbe**

Exploitation des signaux

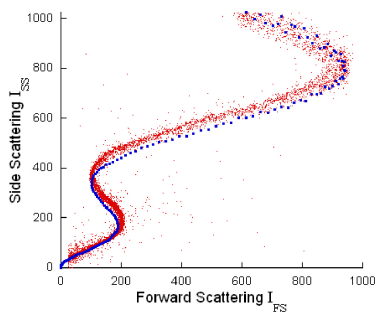
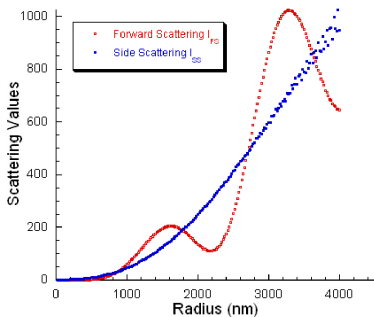
Taille de chaque objet et Distribution
Fluorescence et Dosage de la streptavidine

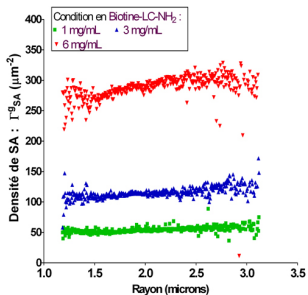
Simulation numérique des signaux de diffusion

Théorie de Mie pour des gouttes sphériques

Intégration numérique pour un pool de gouttes de tailles différentes

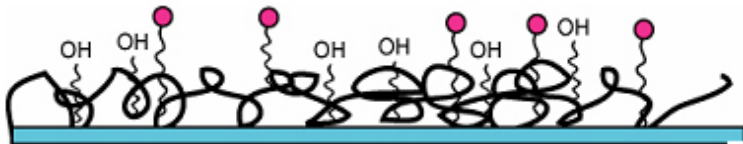
Prise en compte des instruments optiques (détecteurs, séparatrices)





Densité constante

- Fluorescence \leftrightarrow Taille
- Calibration à partir de méthodes commerciales
- $50 < \Gamma_{strep}^g < 400 \mu\text{m}^{-2}$
- Comparable aux Cellules

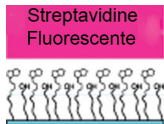


Conditions de Fonctionnalisation

- 1 Poly-L-Lysine → groupements amino sur le verre
- 2 Mélange PEG-2000 + PEG-3400-Biotine
- 3 2 concentrations C_{max} en volume

Pierres *et al.*, *Biophys. J.* **82**(6), 3214-3223 (2002)

Cuvelier *et al.*, *Phys. Rev. Lett.* **93**, 228101 (2004)



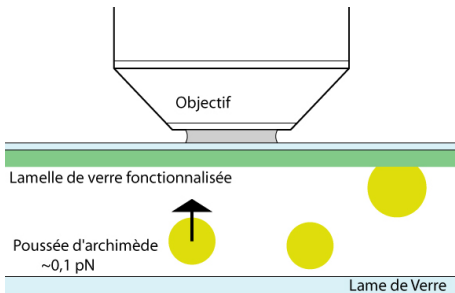
Fluorimètre

Microscope

Binding Capacity en streptavidine = Densité en PEG-3400-Biotine

- Mesure sur la lamelle au microscope → Intensité
- Mesure en retour au fluorimètre → Quantité Fixée
- $0 < \Gamma_{biot}^I < 15000 \mu\text{m}^{-2}$
- $\Gamma_{biot}^I = 10 - 100 \times \Gamma_{strep}^g$

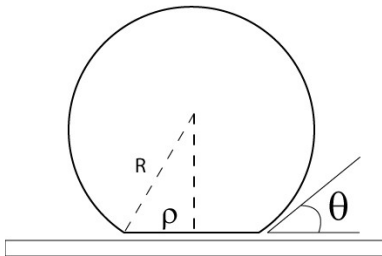
Étude du mouillage sur surfaces solides



Montage Expérimental

- Microscopie Droite
- Dynamique et Statique
- $d=0,92 \rightarrow$ Archimède 0,1 pN

Tension de surface γ

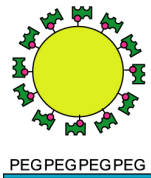
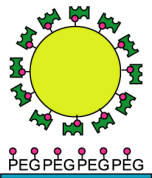


Trois mesures simultanées

- 1 Transmission → Rayon R
- 2 RICM → Rayon contact ρ
- 3 Fluo → Streptavidine

Mesure Statistique

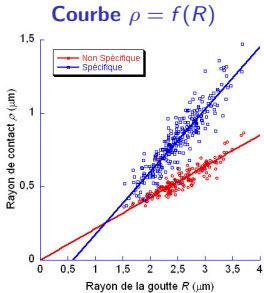
- 1 Approximation de sphère tronquée à rayon R constant ($\theta < 30^\circ$)
- 2 200 gouttes à la fois avec $1 < R < 4$ microns
- 3 Caractéristiques physico-chimiques semblables



Pour s'affranchir du non spécifique...

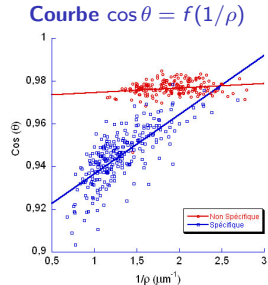
$$\epsilon_{adhesion} = \epsilon_{Spe+NonSpe} - \epsilon_{NonSpe}$$

L'angle de contact non spécifique est toujours de l'ordre de 10°



Pente de la courbe \rightarrow Sinus

$$\Gamma_{strep}^E = 195 \mu\text{m}^{-2}$$

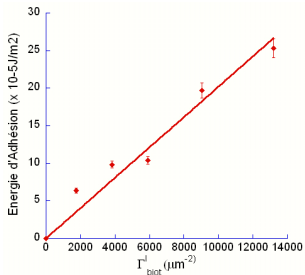


$$\cos \theta = \cos \theta_0 + \frac{\tau}{\gamma} \frac{1}{\rho}$$

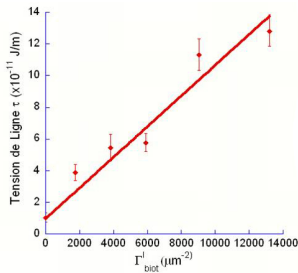
La loi d'Young-Dupré doit prendre en compte un effet de la ligne

L'énergie de surface s'écrit $\varepsilon = \gamma(1 - \cos \theta_0)$

Énergie de ligne démouillante quand des liens spécifiques se forment

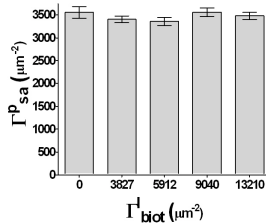
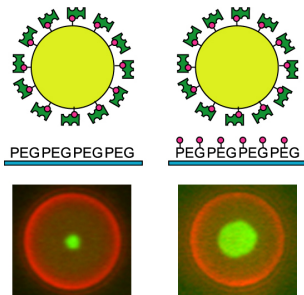


$$\Gamma_{strep}^g = 195 \mu m^{-2}$$



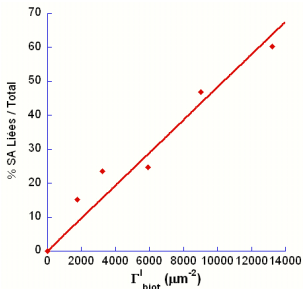
Évolution linéaire de ε et τ en fonction de Γ_{biot}^g

- L'énergie d'adhésion spécifique est de l'ordre de $\varepsilon \simeq 10^{-4} N/m$
- L'énergie de ligne est de l'ordre de $\tau \simeq 10^{-11} J/m$
- τ et ε varient linéairement en fonction de la quantité de biotine à la surface du verre



Transition de phase dans le film

- Densité en streptavidine $\Gamma_{strep}^{patch} \simeq 3000 \mu\text{m}^{-2}$
- Densité dans le patch = densité sur la goutte x10
- Modèle de solution régulière : $U \simeq 2 \text{ kT}$
- Affinité avec le PEG



Calcul de la fraction de streptavidines liées

On obtient l'énergie d'adhésion spécifique à partir des mesures d'angle de contact :

$$\cos \theta_0 \rightarrow \varepsilon$$

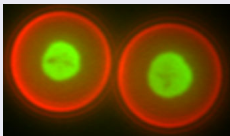
On peut déduire la fraction de streptavidines liées à de la biotine dans le film :

$$\% = \frac{\Gamma_{\text{Strep-Biot}}}{\Gamma_{\text{strep}}^{\text{patch}}} = \frac{\varepsilon}{35kT} \frac{1}{\Gamma_{\text{strep}}^{\text{patch}}}$$

Toutes les streptavidines ne sont pas liées

Malgré le fait que le nombre de biotines disponibles est dix fois plus important que les streptavidines dans le film

Films fracturés



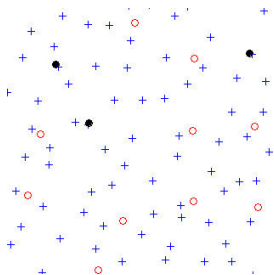
Films adhésifs fracturés ne cicatrisant pas aux temps longs

Grande densité de Streptavidine

- La surface par streptavidine est de 300 nm^2
- La distance moyenne est de $9,5 \text{ nm}$
- Pour des cristaux 2D sur monocouches de Langmuir, la distance est de $5,6 \text{ nm}$
- Dans notre cas, les PEG espacent les protéines

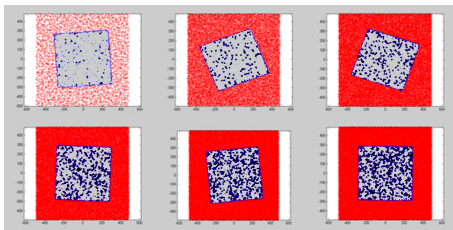
Condensat aléatoire de streptavidines

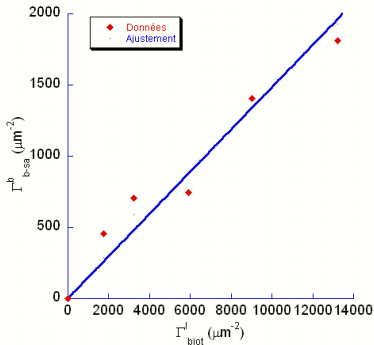
Les protéines n'ont pas la capacité de diffuser individuellement



Modèle Numérique : Principe

- Superposition de deux réseaux aléatoires solides
 - 1 Surface de verre avec biotine
 - 2 Streptavidines dans le film
- Modèle ponctuel avec prise en compte d'un rayon de capture R_c associé au PEG
- Les densités en biotine et streptavidines sont connues par la mesure

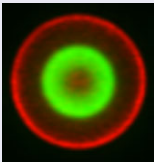




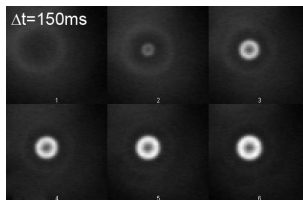
Modèle Numérique : Ajustement des données

- Seul paramètre ajustable : R_c
- Sa valeur est de $R_c = 2,2\text{nm}$
- Bon ordre de grandeur par rapport aux valeurs du rayon de gyration en volume ($\simeq 3\text{nm}$)

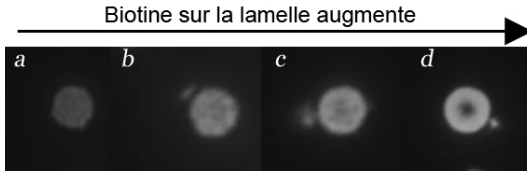
Si la densité globale en PEG diminue...



- Les streptavidines dans le film adhérent sont structurées en couronnes
- Plus de transition de phase telle qu'on l'avait vue précédemment

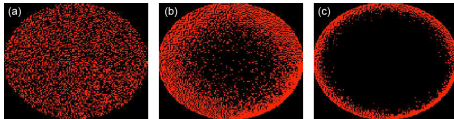


Existence de la couronne dès le début de la formation du film adhérent
Expulsion par drainage



Évolution en fonction de la densité de biotine

- Hautes densités : Film en couronne
- Basse densité : Film en couronne qui se comble par diffusion des streptavidines vers le centre



Simulation de Monte-Carlo

Coll. Jean-François Muzy

- Chaque particule peut diffuser avec un coefficient D
- et à une certaine probabilité d'arrêt modélisant la réaction avec le ligand
- Le paramètre est le ratio entre réaction et diffusion

Phénomène d'encombrement qui empêche les protéines d'avancer si la réaction est trop rapide par rapport à la diffusion

Conclusion

Matériaux et Caractérisation

- Émulsions constituent une nouvelle surface modèle
- Cytométrie : méthode de caractérisation adaptée et très précise
- Permet d'avoir un degré de caractérisation inégalé pour ces matériaux

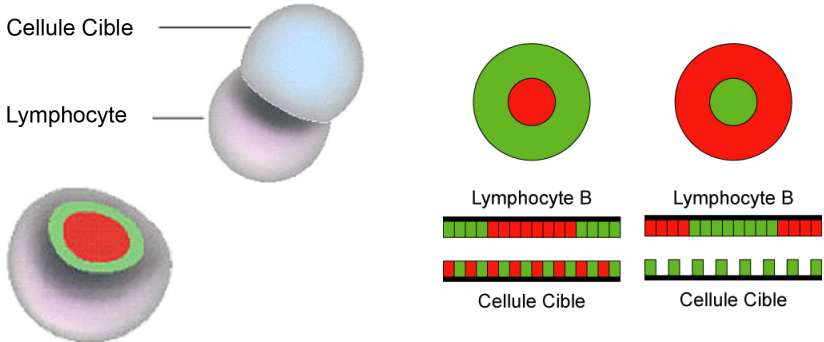
Adhésion Spécifique : Forte Densité en PEG

- Prérecrutement des protéines associé aux interactions avec le PEG : Catalyse
- Évolution linéaire de l'énergie d'adhésion et densité constante dans le film adhérent
- Modèle de réseaux solides aléatoires
- Nécessité de la prise en compte d'une énergie de ligne intrinsèquement liée aux interactions spécifiques

Adhésion Spécifique : Faible Densité en PEG

- Plus de transition de phase, mais drainage et répartition en couronne
- Influence de la densité en PEG-3400-Biotine sur la répartition
- Effet du rapport diffusion/réaction et de l'obstruction moléculaire à 2D

Synapse du Lymphocyte B



Absence de ligands ⇒ Expulsion des récepteurs
Processus Passifs
Pertinence du modèle biologique pour la physique

Prise en compte d'une énergie de ligne \Rightarrow Structure en Couronne

Origine de cette énergie de ligne ?

Complexes de Longeurs Différentes ? Non pertinent

Dans notre cas :

- Énergie de ligne intrinsèquement associée à la formation de couples ligand-récepteur
- Énergie de ligne augmente avec l'énergie d'adhésion spécifique de surface

Coombs *et al.*, *Biophysical Journal* **86** :1408-1423 (2004)

Lee *et al.*, *Trends Immunology* **23**(10) :500-502(2002)

Sensei ni rei !

Jérôme BIBETTE

Otagani rei !

Jean BAUDRY, Nelly HENRY, Emanuel BERTRAND, Cécile GOUBAULT,
Jean Francois MUZY (Université de Corse), Pierre NASSOY.

Et à tous les (nombreux) membres du laboratoire depuis ... 5 ans pile !

Ethypharm, LETI-CEA Grenoble