



HAL
open science

Etude des phénomènes de reconnaissance moléculaire spécifique aux interfaces biologiques par AFM : investigation de l'influence de la multivalence sur les interactions sucre-lectine

Amira Mastouri

► **To cite this version:**

Amira Mastouri. Etude des phénomènes de reconnaissance moléculaire spécifique aux interfaces biologiques par AFM : investigation de l'influence de la multivalence sur les interactions sucre-lectine. Sciences agricoles. Université de Technologie de Compiègne, 2013. Français. NNT : 2013COMP2108 . tel-01067126

HAL Id: tel-01067126

<https://theses.hal.science/tel-01067126>

Submitted on 23 Sep 2014

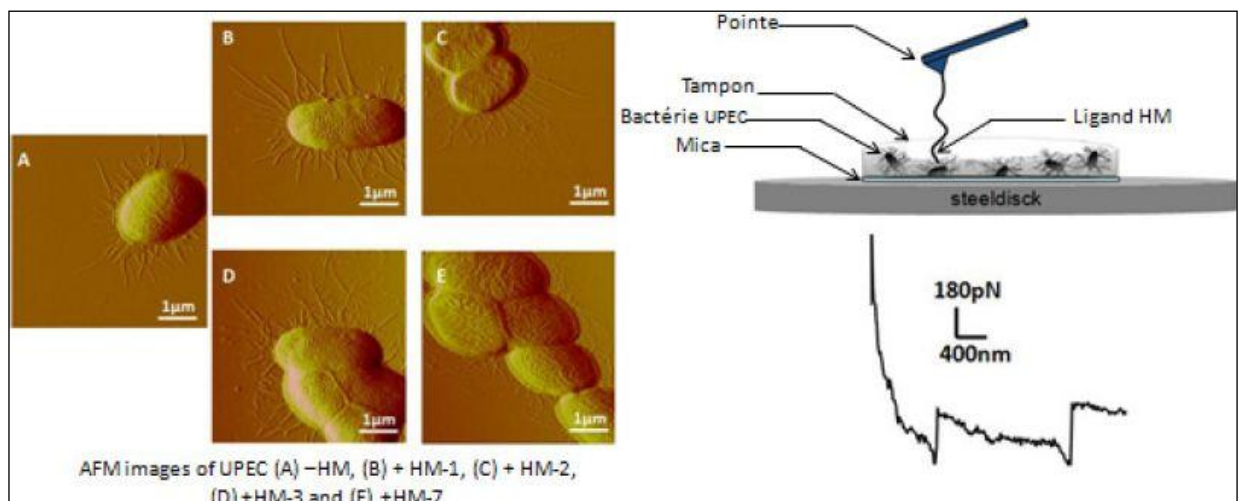
HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

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.

Par Amira MASTOURI

Étude des phénomènes de reconnaissance moléculaire spécifique aux interfaces biologiques par AFM : investigation de l'influence de la multivalence sur les interactions sucre-lectine

Thèse présentée
pour l'obtention du grade
de Docteur de l'UTC



Soutenue le 25 octobre 2013

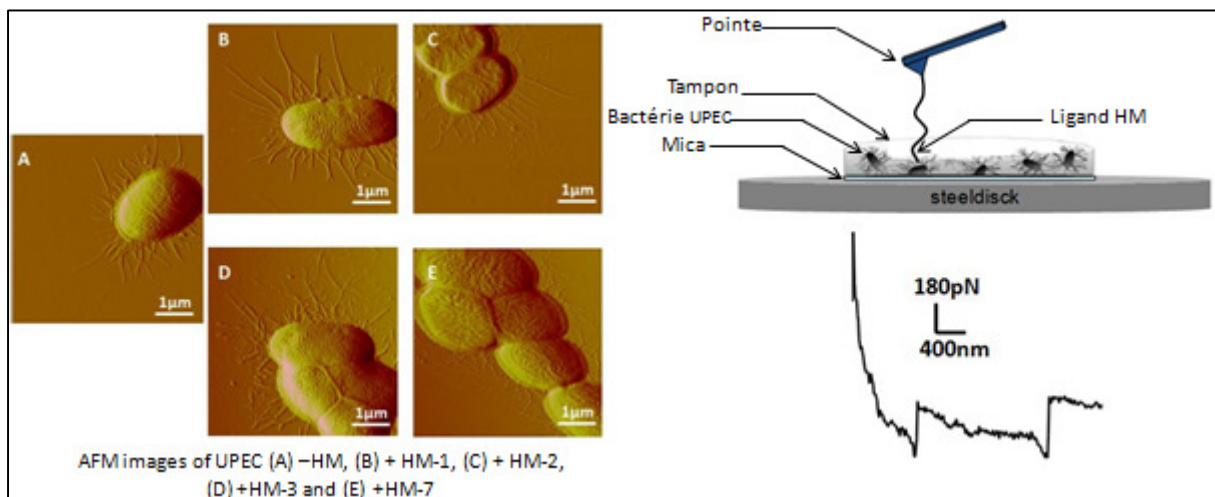
Spécialité : Bio-ingénierie, Biomécanique, Biomatériaux

D2108

Par Amira MASTOURI

**Etude des phénomènes de reconnaissance moléculaire
spécifique aux interfaces biologiques par AFM :**
*Investigation de l'influence de la multivalence sur les
interactions sucre-lectine.*

Thèse présentée
pour l'obtention du grade
de Docteur de l'UTC.



Soutenue le : 25 octobre 2013

**Champ disciplinaire : Bio-ingénierie, Biomécanique,
Biomatériaux**

THÈSE

Présentée pour l'obtention du grade de
Docteur de l'Université de Technologie de Compiègne

Spécialité : **Bio-ingénierie, Biomécanique, Biomatériaux**

Par

Amira MASTOURI

**ETUDE DES PHÉNOMÈNES DE RECONNAISSANCE MOLECULAIRE
SPÉCIFIQUE AUX INTERFACES BIOLOGIQUES PAR AFM :
*INVESTIGATION DE L'INFLUENCE DE LA MULTIVALENCE SUR LES
INTERACTIONS SUCRE-LECTINE.***

Soutenu le 25 octobre 2013

Devant le jury composé de :

- Pr. Marie-Christine Ho Ba Tho professeur de l'UTC, UMR-CNRS 7338
- Pr. Sylvie Ricard Blum professeur de l'université de Lyon 1, UMR-CNRS 5086
- Dr. Grégory Francius chargé de recherche CNRS, UMR-CNRS 7564
- Dr. Sébastien Gouin chargé de recherche, UMR- CNRS 6230
- Pr. Michael Molinari professeur de l'université de Reims, LRN - EA 4682
- Dr. Karim El Kirat maître de conférences, UTC, UMR-CNRS 7338
- Dr. Sandrine Morandat maître de conférences, UTC, FRE-CNRS-3580
- Pr. Catherine Marque professeur de l'UTC, UMR-CNRS 7338

Remerciements

Mon travail de thèse a été effectué au sein du laboratoire biomécanique bio-ingénierie (BMBI UMR 7338), dirigé par Pr. Marie-Christine Ho Ba Tho, de l'université de technologie de Compiègne. Je tiens à la remercier chaleureusement pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire et m'avoir permis de réaliser ce travail de thèse au sein d'une structure dynamique et polyvalente. Je tiens également à la remercier d'avoir surveillé l'avancement de mon projet de thèse dans les meilleures conditions.

J'aimerais également remercier le directeur de l'école doctorale, Pr. Olivier Gapenne, ainsi que Mme. Marion Kaczowski pour leurs encouragements et leur soutien pendant ces trois années.

Je tiens également à remercier tous les membres de mon jury de thèse qui ont accepté d'évaluer mon travail. Je remercie :

- Pr. Catherine Marque pour avoir présidé le jury de thèse.*
- Pr. Sylvie Ricard-Blum et Dr. Grégory Francius pour avoir jugé mon travail et pour l'avoir enrichi par leurs remarques et leurs conseils bienveillants.*
- Pr. Michael Molinari, Dr. Sébastien Gouin et Pr. Marie-Christine Ho Ba Tho pour avoir accepté d'examiner et de juger mon travail.*

Je remercie également mes codirecteurs de thèse, Dr. Karim El Kirat et Dr. Sandrine Morandat pour m'avoir offert cette opportunité et m'avoir fait confiance sur ce projet de thèse.

Je souhaite également exprimer ma sincère reconnaissance pour les partenaires du projet. Je remercie Dr. Julie Bouckaert pour sa gentillesse, son aide non négligeable, ses encouragements, son implication dans l'avancement de mon travail et pour tout ce qu'elle a fait pour moi. Je remercie également Mehdi Almant pour ses encouragements, son aide et sa bonne humeur. J'ai pu grâce à ce projet de thèse découvrir deux personnes de grande qualité humaine et scientifique. Je vous remercie vraiment du fond du cœur.

Pour leur amitié, leur présence, leur soutien quotidien, je remercie tous mes amis du BMBI : Anne-virginie, Murielle D, Jeremy, Ulysse, Thibault, Timothée, Patrick, Pascale, Jean Luc, Christophe, Murielle V, Marie et Catherine. J'espère n'avoir oublié personne.

Je tiens particulièrement à adresser toute ma gratitude à mes amies du L2, Raouia Ben Naya, Claire Loussouarn et Sonia Rippa pour m'avoir assisté dans mes manipulations de microbiologie.

Estelle, ma co-bureau préférée, merci pour ta joie de vivre, merci d'avoir toujours été là, d'avoir partagé les hauts et les bas de la thèse. Merci d'avoir fait le déplacement jusqu'en Tunisie pour être à mes côtés pendant mon mariage. Merci d'être ce que tu es, ne changes jamais ! you are the best ;)

Un énorme merci à Dr. Abdelghani Idrissi pour avoir été un véritable coach pour moi, merci pour ton aide (agrémentée d'humour) en particulier pendant la rédaction. Merci d'avoir accepté de corriger mon manuscrit, pour m'avoir soutenu et encouragé.

Pour son éternelle bonne humeur, pour sa générosité et son humour je remercie Laetitia Nowacki. Merci à toi bella !

Je tiens également à remercier mes chères compatriotes et amies Jihen, Imen et Raouia. Je vous adore les filles, sans vous je ne sais vraiment pas à quoi pouvaient ressembler trois années à Compiègne. Vous êtes un rayon de soleil à Compiègne et Dieu seul sait combien cela est rare!

Pour m'avoir conduit là où je suis aujourd'hui, pour avoir toujours compris ce que je voulais, pour m'avoir toujours encouragé, pour m'avoir aidé dans mon cheminement, je remercie mes parents Ibrahim et Farha Mastouri. Je remercie également mes frères Mohamed et Ikbel pour m'avoir soutenu et avoir cru en moi.

Finalement, je tiens à remercier avec tout mon amour mon cher et tendre mari, Mohamed Anouar Abderrahim, qui a partagé ces trois longues années de thèse. Je te remercie pour ta présence tendre et apaisante au quotidien, pour m'avoir supporté dans tous les sens du terme, pour avoir cru en moi et pour tout ton amour qui me fait pousser des ailes.

Table des matières

Table des matières	7
Liste des abréviations	13
Liste des figures	15
Liste des tableaux	21
INTRODUCTION GÉNÉRALE	23
CONTEXTE BIBLIOGRAPHIQUE	29
Chapitre 1 : La reconnaissance moléculaire spécifique aux interfaces biologiques	31
1.1 Bases fondamentales de la reconnaissance moléculaire spécifique.....	32
1.1.1 Interactions monovalentes	32
1.1.1.1 Aspects thermodynamiques des interactions monovalentes	32
1.1.1.2 Aspects cinétiques des interactions monovalentes.....	34
1.1.2 Caractéristiques d'une interaction multivalente	36
1.1.2.1 Différents modes d'interactions multivalentes.....	38
1.1.2.2 Influence de la multivalence sur l'aspect thermodynamique des interactions	42
1.1.2.3 Aspects cinétiques des interactions multivalentes	43
1.2 Outils d'étude de la reconnaissance moléculaire	44
1.2.1 Techniques basées sur la filtration sélective	45
1.2.2 Techniques spectroscopiques et cinétiques	46
1.2.3 Techniques chromatographiques	46
1.2.4 Techniques calorimétriques.....	47
Chapitre 2 : Les interactions sucre-lectine	49
2.1 Généralités sur les lectines.....	49
2.1.1 Historique des lectine	49
2.1.2 Classifications, rôles biologiques et utilisations.....	51
2.1.3 Natures de l'interaction lectine-sucre	53
2.1.3.1 Liaisons hydrogène	54
2.1.3.2 Contacts non polaires.....	54

2.1.3.3 Interactions ioniques.....	55
2.1.3.4 Chélation d'un métal.....	56
2.1.3.5 Rôle des molécules d'eau.....	56
2.2 Les lectines bactériennes.....	57
2.2.1 Généralité sur les lectines bactériennes.....	57
2.2.1.1 Les lectines solubles.....	57
2.2.1.2 Les toxines.....	58
2.2.1.3 Les lectines fimbriales.....	58
2.2.2 Lectine d' <i>Escherichia coli</i> uropathogène.....	59
2.2.2.1 Les infections urinaires chroniques.....	59
2.2.2.2 Cycle d'infection des cellules uroépithéliales à <i>E. coli</i>	59
2.2.2.3 <i>Pili</i> de type I et lectine fimbriale FimH.....	60
2.2.2.4 Stratégie antiadhésive contre les infections urinaires chroniques.....	65
2.3 Les lectines végétales.....	68
2.3.1 Généralité sur les lectines végétales.....	69
2.3.2 Lectine d' <i>Arachis hypogaea</i>	70
2.3.2.1 Affinité et caractéristique.....	70
2.3.2.2 Structure.....	71
2.3.2.3 Rôle et utilisations.....	74
2.4 Outils d'analyse des interactions sucre-lectine.....	75
2.4.1 Inhibition de l'hémagglutination (HIA).....	75
2.4.2 Enzyme-Linked Lectin Assay (ELLA).....	76
Chapitre 3 : La microscopie à force atomique.....	79
3.1 Histoire de l'AFM.....	80
3.2 Utilisations et principes physiques.....	81
3.2.1 Imagerie AFM.....	84
3.2.1.1 Principe.....	84
3.2.1.2 Modes d'imagerie.....	84
3.2.2 Spectroscopie de force.....	87
3.2.2.1 Principe.....	87
3.2.2.2 Techniques de mesure de force.....	88
Chapitre 4 : L'AFM des échantillons biologiques.....	92
4.1 Préparation des échantillons biologiques.....	92
4.1.1 Les surfaces.....	92

4.1.1.1 Le mica muscovite	92
4.1.1.2 Le verre	94
4.1.1.3 L'oxyde de silicium	94
4.1.2 Les pointes	95
4.2 Imagerie AFM des échantillons biologiques.....	96
4.2.1 Les biomolécules.....	96
4.2.2 Les films lipidiques	97
4.2.3 Les cristaux 2-D de protéines.....	97
4.2.4 Les cellules	98
4.3 Applications de la spectroscopie de force aux échantillons biologiques.....	100
4.3.1 L'étude des propriétés mécaniques d'éléments biologiques.....	100
4.3.2 Le dépliement de polymères	100
4.3.3 L'analyse de la reconnaissance moléculaire spécifique.....	102
4.3.3.1 Fonctionnalisation de la pointe AFM	102
4.3.3.2 Analyse des résultats.....	105
4.3.3.3 Explorer la dynamique de l'interaction ligand récepteur.....	107
4.3.3.4 Cas particulier des interactions multiples	108
4.3.4 Cartographie de récepteurs à la surface cellulaire	110
4.4 Investigation des interactions sucre-lectine par AFM.....	112
PRÉSENTATION DU PROJET DE RECHERCHE	117
MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	123
Chapitre 1 : Matériel.....	125
1.1 Les ligands synthétiques.....	125
1.1.1 Ligands à terminaison galactose	126
1.1.2 Ligands à terminaison α -D-mannoside d'heptyle	127
1.2 Les récepteurs purifiés	128
1.2.1 La lectine d' <i>Arachis hypogaea</i> (PNA)	128
1.2.2 La lectine de <i>Concanavalia ensiformis</i> (ConA)	129
1.2.3 L'adhésine fimbriale FimH	129
1.3 Les souches d' <i>Escherichia coli</i>	129
1.3.1 <i>E. coli</i> uropathogène WT-UTI89.....	129
1.3.2 Mutant d' <i>E. coli</i> Q133K	130
1.4 Les réactifs chimiques	130

Chapitre 2 : Microscopie à force atomique	131
2.1 Préparation des échantillons.....	131
2.1.1 Fonctionnalisation des surfaces.....	131
2.1.1.1 Greffage de la PNA	132
2.1.1.2 Greffage du FimH	133
2.1.2 Immobilisation des bactéries sur surfaces de mica	133
2.1.2.1 Immobilisation à l'air	133
2.1.2.2 Immobilisation en liquide.....	133
2.1.3 Fonctionnalisation des pointes AFM.....	134
2.2 Acquisition des données.....	136
2.2.1 Imagerie AFM.....	136
2.2.1.1 Imagerie AFM à l'air	136
2.2.1.2 Imagerie AFM sous liquide	137
2.2.2 Spectroscopie de force	137
2.2.2.1 Etude de l'interaction ligands-récepteurs.....	138
2.2.2.2 Etude de la dynamique de l'interaction	138
2.2.3 Calibration des pointes AFM.....	139
2.3 Traitement des données.....	140
2.3.1 Traitement des images.....	140
2.3.2 Traitement des Forces-volumes.....	140
RÉSULTATS.....	143
Chapitre 1 : Influence de la multivalence sur l'interaction entre une lectine modèle et les ligands multivalents à galactose	146
1.1 Visualisation de l'effet de la multivalence par imagerie AFM.....	146
1.2 Etude de l'interaction PNA-Gal-L par spectroscopie de force	150
1.2.1 Vérification des surfaces.....	150
1.2.2 Quantification de l'interaction PNA-Gal-L par spectroscopie de force.....	153
1.3 Exploration de la dynamique de l'interaction PNA-Gal-L par spectroscopie de force	160
1.3.1 Dépendance de la force d'adhésion du complexe PNA-ligand au taux de chargement appliqué.....	160
1.3.2 Dépendance de la probabilité d'adhésion au temps de contact.....	165
1.4 Conclusions.....	167

Chapitre 2 : Investigation de l'effet thérapeutique de nouveaux ligands multivalents à α -D-mannoside d'heptyle	169
2.1 Exploration de l'interaction entre les ligands HM et l'adhésine FimH purifiée	170
2.1.1 Etude préliminaires par spectroscopie de force sur une lectine analogue : la Concanavoline A.....	170
2.1.2 Etude de l'interaction entre le FimH purifié et les Ligands à HM par spectroscopie de force.....	172
2.1.3 Exploration de la dynamique de l'interaction FimH purifié-Ligands HM par spectroscopie de force.....	175
2.2 Exploration de l'interaction entre les ligands HM et les bactéries.....	178
2.2.1 Effet de la multivalence des ligands sur l'agrégation des bactéries	179
2.2.1.1 Evaluation de l'influence des ligands multivalents sur la souche WT-UTI89 par imagerie AFM.....	179
2.2.1.2 Contrôle négatif : influence de l'ajout des ligands multivalents au mutant Q133K	182
2.2.1.3 Etude statistique de l'agrégation	184
2.2.2 Etude de l'interaction bactérie-ligands à HM par spectroscopie de force	186
2.2.2.1 Adsorption des bactéries sur les surfaces.....	186
2.2.2.2 Interaction entre les bactéries WT-UTI89 et les ligands HM	189
2.2.2.3 Contrôle de la spécificité de l'interaction	194
2.3 Conclusions.....	197
DISCUSSION	201
Chapitre 1 : Exploration de l'interaction entre la PNA et les ligands à galactose	204
1.1 Reconnaissance moléculaire spécifique entre la PNA et le galactose	204
1.2 Mécanisme de reconnaissance des ligands multivalents par la PNA.....	208
Chapitre 2 : Exploration de l'interaction entre le FimH et les ligands à α -D-mannoside d'heptyle (HM).....	211
1.1 Reconnaissance moléculaire spécifique entre HM et FimH.....	211
1.2 Potentiel thérapeutique des ligands multivalents à HM.....	215
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	219
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	227
VALORISATION SCIENTIFIQUE	247

Liste des abréviations

AFM: microscopie à force atomique
BR : bactériorhodopsine
ConA : concanavaline A
CRD : domaine de reconnaissance des sucres
DFS : spectroscopie de force dynamique
 ΔG : énergie libre
 ΔH : enthalpie
 ΔS : entropie
 $\Delta\theta$: angle d'incidence
ELLA : dosage enzymatique de lectine
FimH : lectine fimbriale de UPEC
Gal-L : ligands à base de galactose
HIA : inhibition de l'hémagglutination
HM : mannoside d'heptyle
HM-L : ligands à base de mannosides d'heptyle
 IC_{50} : concentration inhibitrice médiane
ITC : calorimétrie de titration isotherme
 K_a : constante d'équilibre d'association
 K_d : constante d'équilibre de dissociation
 k_{off} : constante cinétique de dissociation
 k_{on} : constante cinétique d'association
L: ligand
LR : taux de chargement (« loading rate »)
MIC : concentration minimale d'inhibition
PLL : poly-L-lysine
PNA : lectine d'arachide
R: récepteur
RCA : lectine de *Ricinus communis*
RMS : moyenne quadratique, « root mean square »
SLB : bicouche lipidique supportée

SMFS : spectroscopie de force à l'échelle d'une molécule unique

SPR : résonance plasmonique de surface

STM : microscope à effet tunnel

τ_{off} : temps de vie d'une liaison ligand-récepteur

UPEC: *Escherichia coli* uropathogène

UTI : Infection du tractus urinaire

x_β : longueur de la barrière énergétique.

Liste des figures

Figure 1. Représentation schématique des interactions monovalentes et multivalentes.....	32
Figure 2. Représentation graphique de l'évolution cinétique d'une interaction ligand-récepteur. (A) Courbe hyperbolique de l'évolution des concentrations des partenaires de la réaction et (B) linéarisation selon le modèle de Schatchard.....	35
Figure 3. Mode de reconnaissance binaire d'une interaction multivalente.....	36
Figure 4. Phagocytose d'une bactérie par l'intermédiaire d'interaction IgG-macrophage.....	37
Figure 5. Représentation schématique de la sélectivité des récepteurs selon la distribution des ligands sur la surface.....	37
Figure 6. Représentation schématique des différents mécanismes d'association intramoléculaires. (A) Effet chélate, (B) regroupement de récepteur, (C) association de sous-unité secondaire et (D) fixation et recapture (glissement interne) [20].	39
Figure 7. Formation des réseaux réticulés sous l'effet de la multivalence. (A) réseau de type 1 obtenu à faible valence, (B) réseau de type 2 obtenu à plus forte valence.....	40
Figure 8. Diminution de la valence fonctionnelle d'une structure multivalente au cours des associations avec le récepteur.....	43
Figure 9. Processus d'association de (A) une interaction divalente et (B) deux interaction multivalente.....	44
Figure 10. Analyse de la reconnaissance par chromatographie d'éluion	47
Figure 11. Réseau de liaisons hydrogène lors de l'interaction entre le sialyl-lactose et Maackia amurensis leucoagglutinine (Mal) [20].	54
Figure 12. Structure cristallographique du complexe maltose-MBP [20].	55
Figure 13. Structure cristallographique du complexe acide sialique-tête de fibre de l'adénovirus canin [20].	55
Figure 14. Structure cristallographique d'un oligomannoside avec DC-SIGN (Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin) [20].	56
Figure 15. Les différents types de lectines bactériennes [45].	57
Figure 16. Cascade pathogénique d'E. coli uropathogène dans les infections urinaires [51].	60
Figure 17. Pili de type I d'Escherichia coli uropathogène. (A) Micrographie électronique à haute résolution d'un pilus de type pili I, révélant sa structure composite ; La flèche indique l'extrémité du pilus contenant l'adhésine FimH. (B) Structure cristalline du FimH en complexe avec l'oligomannose-3. (C) Schématisation de la voie de synthèse chaperonne-usher des pili de type I chez E.coli. (D) Organisation génétique des pili de type I [48], [54], [58].	62
Figure 18. Configuration de la partie distale des pili de type I. (A) Structure cristallographique de la partie distale des pili. (B) Modélisation de la modulation de la configuration de la partie distale du pilus en présence d'une force de traction [65].	64
Figure 19. Réseau des interactions PNA-ligands. Schématisation de la structure du site de reconnaissance en présence du (A) T-antigène et (B) lactose [85].	71
Figure 22. Structuration de la lectine d'arachide. (A) arrangement de monomère dos à dos, (B) schématisation de l'arrangement du tétramère de la lectine d'arachide canonique et dos à dos et (C) structure tridimensionnelle de la lectine d'arachide [92] et [93].	72
Figure 20. Cristallisation de la PNA. (A) Cristaux de PNA en présence du lactose et (B) Cristaux de PNA sans lactose [94].	73
Figure 21. Modèle d'assemblage de la PNA par des ligands divalents. L'assemblage A-B présenté ici est semblable aux assemblages C-D et A-C [97].	74
Figure 23. Schéma représentatif de la réticulation des globules rouges induite par les lectines lors du test positif, la sédimentation des globules rouges lors du test négatif et l'inhibition de l'hémagglutination par ajout de ligands spécifiques aux lectines [4].	76

Figure 24. Représentation schématique du principe général du microscope à force atomique.....	82
Figure 25. Représentation schématique des interactions pointe-surface en fonction de la distance entre les deux [124]. * = pour les surfaces fonctionnalisées.....	83
Figure 26. Représentation des forces et interactions entre pointe et surface [124].	84
Figure 27. Les modes d'imagerie AFM ; (A) le mode contact, (B) le mode intermittent et (C) le mode non-contact.	86
Figure 28. Représentation schématique de courbes d'approche et de retrait type pour une surface non déformable (A) approche pointe-surface, (B) saut au contact sous l'effet des forces de van der Waals, (C) appui de la pointe de la surface jusqu'à une force prédéterminée, (D) retrait pointe-surface, (E) pic d'adhésion et (F) courbes d'approche types pour une surface non déformable (haut) et une surface déformable (bas) [130].	88
Figure 29. Les différentes options de l'utilisation de mica pour l'immobilisation d'échantillons biologiques pour l'AFM ; (A) changement de charge selon le tampon, (B) adsorption électrostatique de protéines, (C) liaisons électrostatiques de l'ADN via des cations divalents, (D) introduction de groupes amines par traitement du mica à l'APTES et fixation covalente de protéine et (E) introduction de groupes amines par traitement du mica à l'Epoxy-silane et fixation covalente de protéines [147].	93
Figure 30. Etude du dépliement de la bactériorhodopsine (BR) par spectroscopie de force. (A) Image AFM de la membrane pourpre de <i>H. salinarum</i> . (B) Courbe de force type enregistrée pour l'expérience de dépliement de la BR. (C) Image AFM de la membrane après extraction de la BR de son emplacement. (D) Représentation schématique du dépliement de la BR. [227].	101
Figure 31. Représentation schématique de la courbe de force typique dans les expériences d'étude des interactions intermoléculaires par spectroscopie de force, (a) approche, (b) saut au contact, (c) appui (d) retrait et pic d'adhésion [147].	102
Figure 32. Représentation schématique des chimies de surfaces utilisées dans la fonctionnalisation des pointes AFM pour les expériences de SMFS. (A) Système BBSA sur pointe d'or, (B) Système de monocouche d'alcane-thiols sur pointe d'or, (C) système d' amino-fonctionnalisation des pointes en silicium et (D) système de cellules sur pointes. [228].	105
Figure 33. Distribution des forces d'adhésion entre l'azurine (immobilisée sur le support) et le cytochrome c_{551} (immobilisé sur la pointe) en absence (barres striées) et en présence (barres noires) d'azurine libre. [239].	107
Figure 34. Caractérisation de l'interaction entre le fullerène C60 et la porphyrine mono et divalente par spectroscopie de force. (A) Représentation schématique de l'expérience, (B) courbes de force obtenues dans le cas de l'interaction monovalente (gauche) et divalente (droite) et (C) les histogrammes de distribution des forces dans le cas de l'interaction monovalente (gauche) et divalente (droite). [242].	109
Figure 35. Caractérisation de l'interaction mucine-anticorps anti-mucine. (A) Courbes de forces type obtenues pour les interactions mono, di et trivalentes, (B) variation de la force en fonction des taux de chargement et (C) corrélation entre valence et force. [243].	109
Figure 36. Image topographique (à gauche) montrant deux mycobactéries sur un support. Carte de force d'adhésion (à droite) enregistrée sur une seule cellule avec une pointe modifiée avec l'héparine. Dans les régions localisées, la carte révèle des événements d'adhésion (pixels clairs) en raison de la présence du récepteur spécifique de l'héparine (HBHA). Barres d'échelle, 2 μm (à gauche) et 100 nm (à droite). [153].	111
Figure 37. Imagerie simultanée de la topographie et de la reconnaissance. (A) oscillation du levier et conversion du signal en U_{max} et U_{min} . (B) molécules d'avidine individualisées détectées par imagerie de la topographie (gauche) et de la reconnaissance (droite). [252].	112
Figure 38. Imagerie AFM à l'air de réseau de ConA en présence de ligands (A) divalents et (B) trivalents. Représentation schématique du maillage du réseau obtenu avec le ligand (C) divalent et (D) trivalent. [167].	113
Figure 39. Interaction entre PA-IL et ligand tétravalent à galactose. (A) Image AFM de filament constitué par une succession de PA-IL reliées par les ligands, (B) structure du ligand synthétisé et (C) modèle proposé pour l'interaction PA-IL et le ligand. [68].	113

Figure 40. Détection, localisation et analyse de la reconnaissance des polysaccharides à mannoses et à galactoses à la surface de souche sauvage et mutante de LGG. (A) interaction entre Con-A et LGG sauvage, (B) interaction entre Con-A et LGG mutant, (C) interaction entre PA-1 et LGG sauvage et (D) interaction entre PA-1 et LGG mutant. [190].	116
Figure 41. Représentation schématique de la stratégie antiadhésive (A) fixation des bactéries sur les cellules saines (B) En présence d'inhibiteurs, les bactéries ne peuvent plus se fixer. [256].	121
Figure 42. Structure de la charpente saccharidique utilisée dans la conception des ligands glycosylés, n=valence. Charpente dessinée avec ISIS Draw 2.3.	125
Figure 43. Structure des ligands à galactose. (A) CC1Gal, (B) CC2Gal, (C) CC3Gal, (D) CM1Gal, (E) CM2Gal, (F) CM3Gal, (G) CL1Gal, (H) CL2Gal et (I) CL3Gal. Ligands dessinés avec ISIS Draw 2.3.	127
Figure 44. Structure du mannoside d'heptyle.	127
Figure 45. Structure des ligands à mannoside d'heptyle. (A) HM-1, (B) HM-2, (C) HM-3 et (D) HM-7. Ligands dessinés par ISIS Draw 2.3.	128
Figure 46. Représentation schématique des principales étapes pour conjuguer les ligands sur les pointes AFM via des bras PEG. (Molécules acétal-PEG829-NHS dessiné sur ISIS Draw 2.3).	135
Figure 47. Effet de l'ajout des Gal-L mono, di et trivalent à une solution de PNA. PNA 4,5 μM dans PBS pH 7,2, Ligands 100 μM dans PBS pH 7,2, milieu réactionnel PBS pH 7,2 + CaCl_2 0,5 mM + MnCl_2 0,5 mM. Images AFM à l'air (z = 10 nm, vitesse de scan= 2 Hz, nombre de pixels = 512 \times 512); (A) PNA sans ajout de ligand, (B) PNA+ligand CL1Gal, (C) PNA+ligand CL2Gal et (D) PNA+ligand CL3Gal.	147
Figure 48. Représentation schématique des différentes dispositions de la PNA.	148
Figure 49. Effet de l'ajout des ligands di et trivalents à deux ratios différents. Image AFM à l'air (z = 7 nm, vitesse de scan = 3 Hz pour A et C, 2 Hz pour B et D, nombre de pixels = 256 \times 256 pour A et C, 512 \times 512 pour B et D); (A) PNA+CL2Gal à 4,5/100 μM , (B) PNA+CL2Gal à 4,5/1000 μM , (C) PNA+CL3Gal à 4,5/100 μM et (D) PNA+CL3Gal à 4,5/1000 μM .	150
Figure 50. Image AFM d'une surface d'or non fonctionnalisée. Surface imagée sous PBS pH 7,2 (z= 10 nm, vitesse de scan = 4 Hz, nombre de pixels = 256 \times 256).	151
Figure 51. Images AFM de (A) PNA greffée sur surface d'or, imagée sous PBS pH 7,2 (z = 10 nm, vitesse de scan = 4 Hz, nombre de pixels = 256 \times 256) et (B) carré de grattage de 2,5 \times 2,5 μm scanné à 10 Hz à force maximale, surface imagée sous PBS pH 7,2 (z = 10 nm, vitesse de scan = 4 Hz, nombre de pixels = 256 \times 256). (C) section du carré de grattage présenté en B.	153
Figure 52. Quantification de l'interaction PNA-Gal-L par spectroscopie de force. (A) Représentation schématique de l'expérience et (B) courbe de retrait type présentant un pic d'adhésion spécifique (flèche).	154
Figure 53. Histogrammes de distribution des forces d'adhésion enregistrées entre la PNA et les ligands (A) CC1GAL, (B) CC2Gal, (C) CC3Gal, (D) CM1Gal, (E) CM2Gal, (F) CM3Gal, (G) CL1Gal, (H) CL2Gal et (I) CL3Gal. Traitement des Forces-volumes n=256 courbes par PUNIAS3D, traçage des gaussiennes par Origin 8.5.	157
Figure 54. Représentation du contrôle négatif par ajout de galactose libre. (A) Représentation schématique de l'expérience et (B) courbe de retrait type.	158
Figure 55. Histogrammes de distribution des forces d'adhésion enregistrées entre la PNA et les ligands (A) CC1GAL, (B) CC2Gal, (C) CC3Gal, (D) CM1Gal, (E) CM2Gal, (F) CM3Gal, (G) CL1Gal, (H) CL2Gal et (I) CL3Gal, en présence de 500mM de galactose. Traitement des Forces-volumes n=256 courbes par PUNIAS3D.	159
Figure 56. Représentation du contrôle négatif par interaction PNA-glucose. (A) Représentation schématique de l'expérience et (B) courbe de retrait type.	160
Figure 57. Influence du taux de chargement sur la force d'adhésion. (A) comparaison entre les ligands à chaîne courte et à différentes valences, (B) comparaison entre les ligands à chaîne longue et de différentes valences et (C) comparaison entre les ligands monovalents à différentes longueurs de chaîne. Chaque point expérimental correspond à un Force-volume de n=256. Les courbes de force sont traitées avec PUNIAS3D. Les forces sont déterminées par un « fit gaussien » tracé sur Origin 8.5.	161
Figure 58. (A) Profil d'énergie de l'état lié en absence et en présence de force. (B) Représentation schématique de x_g .	163

Figure 59. Influence du temps de contact entre le ligand et la PNA sur la probabilité des événements d'adhésion. Chaque point expérimental correspond à un Force-volume de $n=256$	166
Figure 60. Histogrammes de distribution des forces d'adhésion enregistrées entre la ConA et les ligands HM (A) HM-1, (B) HM-2, (C) HM-3, (D) HM-7 et (E) Exemple d'histogramme de blocage. Traitement des forces-volumes, $n=256$ courbes, par PUNIAS3D. Traçage des gaussiennes par Origin 8.5.	171
Figure 61. Histogrammes de distribution des forces d'adhésion enregistrées entre l'adhésine FimH et les ligands HM (A) HM-1, (B) HM-2, (C) HM-3, (D) HM-7. Exemple de résultats du contrôle négatif par (E) blocage par ajout de mannose libre et (B) test de pointe non fonctionnalisée. Traitement des Forces-volumes, $n=256$ courbes, par PUNIAS3D. Traçage des gaussiennes par Origin 8.5.	173
Figure 62. Influence du taux de chargement sur la force d'adhésion. Comparaison entre les interactions entre le FimH et les différents HM. Chaque point expérimental correspond à un force-volume de $n=256$. Les courbes de force sont traitées avec PUNIAS3D. Les forces sont déterminées par un « fit gaussien » tracé sur Origin 8.5.	176
Figure 63. Imagerie AFM à l'air. Images en déflexion de bactéries WT-UTI89 (A) en absence de ligands, (B) incubées avec HM-1, (C) incubées avec HM-2, (D) incubées avec HM-3 et (E) incubées avec HM-7 (Vitesse de scan=2 Hz, Nombre de pixels=512×512).	180
Figure 64. Imagerie AFM à l'air. Images en déflexion de bactéries WT-UTI89 (A) en absence de ligands, (B) incubées avec HM-1, (C) incubées avec HM-2, (D) incubées avec HM-3 et (E) incubées avec HM-7 (Vitesse de scan=2 Hz, Nombre de pixels=512×512).	181
Figure 65. Imagerie AFM à l'air. Images en déflexion de bactéries WT-UTI89 (A) en absence de ligands, (B) incubées avec HM-7 (Vitesse de scan=2 Hz, Nombre de pixels=512×512).	182
Figure 66. Imagerie AFM à l'air. Images en déflexion des mutants Q133K (A) en absence de ligands, (B) incubés avec HM-1, (C) incubés avec HM-2, (D) incubés avec HM-3 et (E) incubés avec HM-7 (Vitesse de scan=2 Hz, Nombre de pixels=512×512).	183
Figure 67. Imagerie AFM à l'air. Images en déflexion du mutant Q133K (A) en absence de ligands, (B) incubées avec HM-7 (Vitesse de scan=2 Hz, Nombre de pixels=512×512).	184
Figure 68. Histogramme de distribution des bactéries sur les surfaces ($n=5$) imagées par AFM.....	185
Figure 69. Imagerie AFM des WT-UTI89 sous PBS pH 7,2. (A) Images de déflexion de bactéries sur surfaces cotées à 0,01% (m/v) PLL dans l'eau, (B) images de déflexion de bactéries sur surfaces cotées à 0,1% (m/v) de PLL dans PBS pH 7,2. (vitesse de scan=6 Hz, nombre de pixels = 256×256).	187
Figure 70. Imagerie AFM des WT-UTI89 dans PBS pH 7,2. Etude de l'influence de la dilution sur la densité de surface en bactérie ; (A) Images de déflexion de la suspension bactérienne non diluée, (B) Images de déflexion de la suspension bactérienne diluée deux fois et (c) Images de déflexion de la suspension bactérienne diluée quatre fois. (vitesse de scan=6 Hz, nombre de pixels = 256×256).	189
Figure 71. Représentation schématique de l'expérience de spectroscopie de force sur bactéries.	190
Figure 72. (A) Image de bactérie en 3D imagée sous PBS à pH 7,2. (B) Courbes d'approche-retrait enregistrées en spectroscopie de force sur bactérie.	191
Figure 73. Histogrammes de distribution des forces d'adhésion enregistrées entre les bactéries WT-UTI89 et les ligands HM ; (A) HM-1, (B) HM-2, (C) HM-3, (D) HM-7 et (E) Exemple d'histogramme de blocage. Traitement des Forces-volumes, $n=256$ courbes, par PUNIAS3D. Traçage des gaussiennes par Origin 8.5. ..	192
Figure 74. Histogrammes de distribution des distances de rupture enregistrées sur les courbes de retrait dans les expériences de spectroscopie de force entre la bactérie WT-UTI89 et (A) HM-1, (B) HM-2, (C) HM-3 et (D) HM-7.	195
Figure 75. Histogrammes de distribution des forces d'adhésion enregistrées entre le mutant Q133K et les ligands HM ; (A) HM-1, (B) HM-2, (C) HM-3, (D) HM-7. Traitement des Forces-volumes, $n=256$ courbes, par PUNIAS3D.	197
Figure 76. Effet de l'ajout des Gal-L di et trivalent à une solution de PNA. PNA 4,5 μ M dans PBS pH 7,2, Ligands 100 μ M dans PBS pH 7,2, milieu réactionnel PBS pH 7,2 + CaCl ₂ 0,5 mM + MnCl ₂ 0,5 mM. Images AFM à l'air ($z = 7$ nm, vitesse de scan = 2 Hz, nombre de pixels = 512×512); (A) PNA+ligand CL2Gal, (B)	

PNA+ligand CL3Gal, (C) représentation schématique du réseau PNA+CL2Gal et (D) représentation schématique du réseau PNA+CL3Gal..... 205

Figure 77. Mécanisme de fixation et recapture proposé par Almant et al. [261]. 210

Figure 78. Analyse de l'effet des ligands synthétiques à HM sur l'inhibition de l'adhésion des bactéries pathogènes aux cellules mannosylées. Adapté de [72]...... 226

Liste des tableaux

<i>Tableau 1. Lectines spécifiques pour les monosaccharides [29].....</i>	<i>51</i>
<i>Tableau 2. Paramètres cinétiques et thermodynamiques déterminés pour l'interaction de composés mannosylés avec le FimH [69].....</i>	<i>66</i>
<i>Tableau 3. Récapitulatifs des faits marquant le développement de l'AFM.....</i>	<i>81</i>
<i>Tableau 4. Résultats d'étude d'interactions ligand-récepteur par spectroscopie de force. [147].</i>	<i>108</i>
<i>Tableau 5. Force d'adhésion enregistrée entre la PNA et les ligands de différentes longueurs et valences (n=256).</i>	<i>158</i>
<i>Tableau 6. Paramètres cinétiques déterminés pour les ligands Gal-L de différentes valences et longueurs de chaînes vis-à-vis de la PNA.</i>	<i>164</i>
<i>Tableau 7. Force d'adhésion enregistrée entre la ConA et les ligands HM de différentes valences (n=256)..</i>	<i>172</i>
<i>Tableau 8. Force d'adhésion enregistrée entre le FimH et les ligands HM de différentes valences (n=256)...</i>	<i>174</i>
<i>Tableau 9. Paramètres cinétiques déterminés pour les ligands HM de différentes valences vis-à-vis du FimH.</i>	<i>177</i>
<i>Tableau 10. Forces et fréquences d'adhésion enregistrées entre WT-UTI89 et les ligands HM de différentes valences (n=256).</i>	<i>193</i>
<i>Tableau 11. Distance de rupture de l'adhésion entre l'adhésine FimH à l'extrémité des pili de WT-UTI89 et les ligands HM de différentes valences.</i>	<i>196</i>

INTRODUCTION GÉNÉRALE

De nombreux processus vitaux, ayant lieu dans un organisme vivant, sont basés sur la communication cellulaire. Cette communication passe par des phénomènes de reconnaissance moléculaire spécifique qui s'établissent entre les cellules et leur environnement.

Une des classes d'interactions moléculaires spécifiques rencontrées dans les organismes vivants nous intéresse particulièrement : les interactions sucre-lectine. Les lectines sont des protéines capables de reconnaître spécifiquement des sucres (simples, oligo ou polymériques) ^[1]. L'origine des lectines est assez ubiquitaire. En effet, elles sont retrouvées dans la quasi-totalité des organismes vivants, allant des organismes les plus simples, virus et bactéries, vers les organismes les plus complexes, végétaux et animaux ^[1]. Les sucres, dotés d'une variabilité inégalée, représentent la classe de biomolécules naturelles la plus abondante. L'ubiquité des lectines et l'abondance des sucres impliquent les interactions sucre-lectine dans de nombreux phénomènes biologiques tels que la migration, la différenciation et la communication cellulaire ou encore les phénomènes d'adhésion hôtes-pathogènes ^[2].

Une caractéristique prédominante des lectines est leur faible affinité, vis-à-vis de leurs ligands, qui est de l'ordre du micro voire millimolaire ^{[3], [4]}. Cette faible affinité ne permet pas une fixation suffisamment forte pour pouvoir induire un signal. D'un point de vue cellulaire, cette faible affinité est compensée par des interactions multiples et simultanées entre les lectines et les sucres ^[5]. Dans le même schéma qu'un « effet Gecko », les multiples contacts que les lectines établissent avec les surfaces biologiques hautement glycosylées permettent une fixation plus efficace. Comme évoqué par Confucius depuis très longtemps, « *le tout est plus grand que la somme des parties* », le gain d'affinité constaté est généralement bien supérieur à la simple addition des interactions individuelles : cela est appelé l'effet multivalent ou « effet cluster » ^[5].

La compréhension des phénomènes biologiques passe par l'étude des fondements des interactions multivalentes. Une des voies envisagées, durant ces vingt dernières années, est l'utilisation de molécules multivalentes de synthèse ayant pour but de mimer ce processus naturel. Le mime de la multivalence naturelle permet d'avoir un modèle représentatif des processus ayant lieu dans l'organisme. En plus de présenter une approche pour la

compréhension fondamentale de la multivalence, la synthèse chimique d'éléments glycosylés permet de développer de nouvelles stratégies de diagnostic et/ou de lutte contre les maladies impliquant des interactions sucre-lectine ^[6].

L'étude des interactions entre lectines et ligands glycosylés est possible par l'intermédiaire de plusieurs techniques. La microscopie à force atomique (AFM) s'en distingue par nombreux atouts. Inventée depuis moins de 30 ans ^[7], l'AFM a émergé depuis comme un outil performant pour l'imagerie de structures nanométriques ^[8]. De plus, grâce à une sensibilité de l'ordre du piconewton et la possibilité d'opérer sous conditions physiologiques et en temps réel, elle présente un excellent outil d'étude des forces d'interaction entre les lectines et les ligands multivalents synthétiques ^[9].

Le présent projet, conduit dans les unités CNRS UMR-7338 et FRE-3580, s'inscrit dans ce contexte. En collaboration avec des équipes externes, une étude par AFM de l'interaction entre des ligands synthétiques de différentes valences et leurs lectines spécifiques a été entreprise. Dans le cadre de cette étude, une première caractérisation fondamentale de l'interaction sucre-lectine a été menée en collaboration avec nos partenaires chimistes ; Dr. Sébastien Gouin (laboratoires CEISAM à Nantes, UMR-6230) et Dr. Mehdi Almant (laboratoire des glucides à Amiens, UMR-6219). Cette caractérisation concerne plus particulièrement l'influence de la multivalence sur les forces d'adhésion et la dynamique de l'interaction entre les ligands synthétiques multivalents et une lectine modèle. Une seconde caractérisation, d'aspect plus appliqué, a fait intervenir un troisième partenaire microbiologiste, Dr. Julie Bouckaert (unité de glycobiologie structurale et fonctionnelle à Lille, UMR-8576). Cette caractérisation concerne l'utilisation des ligands synthétiques multivalents dans une approche thérapeutique antiadhésive pour le traitement des infections urinaires chroniques dues à *Escherichia coli* uropathogène (UPEC).

Le caractère innovant des ligands (obtenus par une synthèse chimique rationnelle) ainsi que l'approche utilisée pour caractériser leurs interactions avec les lectines à l'échelle moléculaire par AFM témoigne de l'originalité du projet. La première partie de ce manuscrit est dédiée à placer le projet dans un contexte bibliographique plus large présentant plus en profondeur les interactions moléculaires spécifiques, notamment les interactions spécifiques sucre-lectine. Il sera également question dans cette partie de présenter la technique AFM et particulièrement son utilisation dans l'étude des interactions sucre-lectine. Ensuite, et après

avoir présenté l'objectif de notre étude et la méthodologie utilisée, l'ensemble des résultats des différentes études AFM sera présenté dans la quatrième partie. Ces résultats seront discutés plus en détails dans la cinquième partie. Enfin, une conclusion générale nous permettra de dresser le bilan des travaux effectués et de discuter des différentes perspectives qui en découlent.

*CONTEXTE
BIBLIOGRAPHIQUE*

Chapitre 1 : La reconnaissance moléculaire spécifique aux interfaces biologiques

La communication cellulaire s'opère souvent par l'intermédiaire de phénomènes de reconnaissance moléculaire spécifique qui s'établissent dans les cellules ou entre les cellules et leur environnement. Deux acteurs y sont impliqués, un récepteur et une entité, reconnue par le récepteur, communément appelée ligand. Le ligand se fixe spécifiquement sur le récepteur, via des interactions moléculaires plus ou moins fortes, ce qui a pour conséquence la génération d'une réponse biologique. La force de l'interaction permet de réguler l'intensité de la réponse. Généralement, les liaisons qui interviennent dans la reconnaissance entre biomolécules sont des liaisons non covalentes (hydrogènes, hydrophobes, ioniques et de Van der Waals). La spécificité de la reconnaissance est basée sur une complémentarité, structurale, fonctionnelle et chimique, entre les partenaires moléculaires.

La reconnaissance moléculaire spécifique intervient dans la majorité des systèmes de l'organisme. À titre d'exemple, elle intervient dans le système immunitaire lors de la lutte contre les corps étrangers. Dans ce système, la reconnaissance moléculaire hautement spécifique la plus connue est l'interaction des anticorps avec leurs antigènes spécifiques. Dans le système nerveux, et suite à la libération de neurotransmetteurs, la reconnaissance moléculaire intervient pour leur fixation sur les récepteurs membranaires au niveau des synapses nerveuses. La reconnaissance moléculaire spécifique joue également un rôle prépondérant dans l'adhésion de pathogène sur les cellules cibles. Elles sont également indispensables dans toutes les communications inter et intracellulaires.

Les interactions peuvent avoir lieu entre partenaires moléculaires en solution, tel est le cas de la reconnaissance entre les enzymes solubles et leurs substrats. Plus généralement, les interactions spécifiques s'effectuent aux interfaces biologiques, illustrées à titre d'exemple, par l'adhésion des cellules (eucaryotes et procaryotes) et virus à la matrice extracellulaire.

Les interactions moléculaires impliquées dans les divers processus biologiques peuvent avoir lieu via un seul ou plusieurs contacts (Figure 1). Dès lors, apparaît la notion de la multivalence des systèmes biologiques.

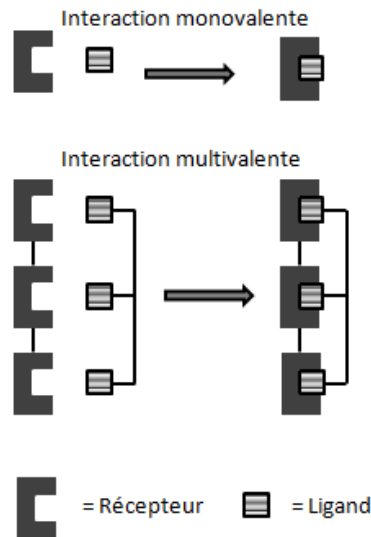


Figure 1. Représentation schématique des interactions monovalentes et multivalentes.

Les interactions multivalentes résultent de la liaison entre plusieurs ligands de même nature et plusieurs sites de reconnaissance du récepteur. Elles peuvent améliorer l'affinité entre les partenaires moléculaires par stabilisation du complexe ligand-récepteur. Ainsi, une modulation de la réponse biologique est possible en variant l'affinité sous l'influence de la multivalence ^[10]. La multivalence est un phénomène très répandu dans les systèmes biologiques. Par exemple, une surface présentant plusieurs exemplaires d'un même ligand, tel que la matrice extracellulaire, interagit avec les récepteurs transmembranaires d'une autre cellule par une interaction multivalente. Le concept mimétique de la multivalence représente une excellente approche pour étudier les interactions biomoléculaires et développer de nouvelles stratégies thérapeutiques et de diagnostic.

1.1. Bases fondamentales de la reconnaissance moléculaire spécifique

1.1.1. Interactions monovalentes

1.1.1.1. Aspects thermodynamiques des interactions monovalentes

La fixation d'un ligand (L) et un récepteur (R) est réversible. A l'équilibre, les deux entités s'associent en un complexe (RL). L'interaction peut être décrite selon l'équation suivante :



La formation du complexe peut être décrite par sa constante d'équilibre d'association K_a (M^{-1}), définie par l'Equation 2, ou sa constante d'équilibre de dissociation $K_d = 1/K_a$ (M), définie par l'Equation 3.

$$K_a = \frac{[RL]}{[L][R]} \quad \text{Équation 2}$$

$$K_d = \frac{1}{K_a} = \frac{[L][R]}{[RL]} \quad \text{Équation 3}$$

Ces constantes sont des caractéristiques propres au complexe ligand-récepteur. Elles indiquent l'état des entités présentes et les proportions des entités libres et associées à l'équilibre.

Les caractéristiques énergétiques de cet équilibre peuvent être déduites suivant le premier principe de la thermodynamique relatif à la conservation de l'énergie. Quant au sens de ces échanges d'énergie, il est déduit en se basant sur le deuxième principe de la thermodynamique relatif au désordre du système ($\Delta S_{\text{global}} \geq 0$). La contribution de l'enthalpie est relative à la force des interactions qu'entretient le ligand avec le récepteur par rapport à celles qu'il entretient avec le solvant. Ces interactions sont principalement basées sur des liaisons hydrogène et des interactions de van der Waals. Une enthalpie (ΔH) d'interaction favorable requiert un placement correct des groupes donneurs et accepteurs d'électrons dans le site de fixation. Naturellement, les systèmes tâchent à avoir l'énergie la plus basse possible, ΔH tend donc à être négative. La contribution entropique, quant à elle, peut provenir de deux phénomènes. Le premier est dû au réarrangement des molécules d'eau déplacées par le ligand lorsque ce dernier se positionne dans son site de liaison. Lorsque l'interaction fait intervenir des contacts hydrophobes, la contribution sera plus favorable. En effet, les molécules d'eau entourant la protéine et/ou le ligand sont, en quelque sorte, chassées par le rapprochement des surfaces hydrophobes et lâchées dans la solution. Le deuxième phénomène est dû à une diminution des degrés de liberté (possibilité d'évoluer dans une direction non contrainte) du ligand et/ou de la protéine au moment de l'interaction. Cette contribution entropique est souvent défavorable. En effet, un ligand en solution peut adopter plusieurs conformations dues aux rotations autour des angles de

torsion par exemple. L'interaction avec la protéine contraint le ligand dans une seule conformation, ce qui engendre une perte en entropie.

Les changements d'énergie libre ΔG_{mono} , d'enthalpie ΔH_{mono} et d'entropie ΔS_{mono} peuvent être reliés à la constante d'association selon les équations suivantes :

$$\Delta G_{mono} = -RT \ln(K_a) \quad \text{Équation 4}$$

$$\Delta G_{mono} = \Delta H_{mono} - T\Delta S_{mono} \quad \text{Équation 5}$$

$$\ln(K_a) = -\frac{\Delta H_{mono}}{RT} + \frac{\Delta S_{mono}}{R} \quad \text{Équation 6}$$

Le changement d'enthalpie (ΔH) d'un système lors d'une interaction reflète le changement de son état thermique. En effet, à pression constante, l'état d'équilibre nécessite l'absorption ou l'émission d'une quantité de chaleur. Dans les systèmes biologiques, au cours de la formation d'un complexe via des interactions non-covalentes, l'enthalpie est générée par l'énergie stabilisatrice des différentes liaisons de l'interaction.

D'autre part, le changement d'entropie (ΔS) fait référence à un changement du désordre du système. Le désordre s'en suit d'une dispersion de l'énergie et un changement de l'état microscopique des partenaires moléculaires.

La mise en coprésence de deux entités moléculaires ayant une affinité l'une pour l'autre les amène à interagir ensemble afin d'atteindre un équilibre. Cet équilibre est exprimé par une minimisation de l'énergie libre (ΔG) et de l'enthalpie (ΔH) et une maximisation de l'entropie (ΔS).

1.1.1.2. Aspects cinétiques des interactions monovalentes

Les vitesses de la combinaison et de la dissociation des partenaires moléculaires dépendent des concentrations du ligand et du récepteur et de la concentration du complexe ligand-récepteur.

$$v_{asso} = k_{on}[R][L] \quad \text{Équation 7}$$

$$v_{disso} = k_{off}[RL] \quad \text{Équation 8}$$

À l'équilibre, les vitesses de la combinaison et de la dissociation s'égalisent : $v_{asso} = v_{disso}$. À ce moment de la réaction, la formation et la dissociation se font à la même vitesse et le milieu réactionnel n'évolue plus. Cela suggère que des concentrations constantes ne signifient pas l'absence de réaction. Au contraire le système reste dynamique même à l'équilibre et l'association et dissociation du complexe s'opèrent encore.

À l'équilibre, la constante d'affinité K_a peut être déduite, selon l'équation ci après, à partir des constantes cinétiques d'association et de dissociation ;

$$\text{A l'équilibre } v_{asso} = v_{disso} \rightarrow k_{on}[R][L] = k_{off}[RL]$$

$$\text{Donc} \quad \frac{k_{on}}{k_{off}} = \frac{[RL]}{[L][R]} = K_a \quad \text{Équation 9}$$

$$\text{Inversement} \quad \frac{k_{off}}{k_{on}} = \frac{[L][R]}{[RL]} = K_d \quad \text{Équation 10}$$

La constante K_d indique la dissociation du complexe ligand-récepteur en ligands libres et récepteurs libres. Dans le cas particulier où la moitié des récepteurs se trouvent saturés par le ligand on aurait : $[R] = [RL] \rightarrow K_d = [L]$. En conséquence, la concentration molaire en ligand libre requise pour saturer la moitié des sites récepteurs reflète l'affinité du récepteur pour le ligand. En d'autres termes, plus cette concentration est faible, plus l'affinité du récepteur pour le ligand est élevée.

La détermination de K_d est de ce fait indispensable pour la caractérisation de l'interaction de deux entités lors d'une réaction. En biochimie classique, on peut considérer, de manière additive, que $[R_t] = [R] + [RL] \rightarrow [R] = [R_t] - [RL]$, avec R_t la totalité des récepteurs, R les récepteurs libres et RL les récepteurs complexés aux ligands. Il est à rappeler qu'à l'équilibre $K_d = \frac{[L][R]}{[RL]}$. En remplaçant R par sa valeur dans l'équation on obtient une équation reliant le complexe ligand-récepteur au ligand libre. Cette relation est représentée par une courbe en hyperbole (Figure 2 A) sur laquelle la valeur de K_d peut être déduite, mais, de manière peu précise. Pour une détermination plus précise de la valeur de K_d , George Scatchard a proposé un modèle pour linéariser l'équation reliant $[RL]$ à $[L]$. La courbe hyperbolique devient donc linéaire avec la pente égale à $\frac{1}{K_d}$ (Figure 2 B).

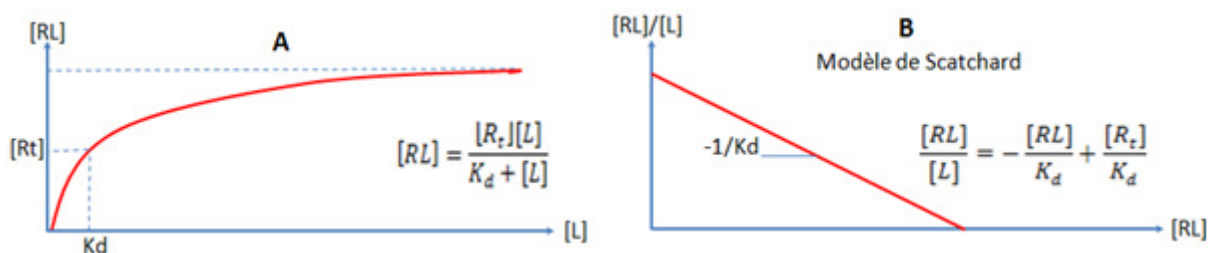


Figure 2. Représentation graphique de l'évolution cinétique d'une interaction ligand-récepteur. (A) Courbe hyperbolique de l'évolution des concentrations des partenaires de la réaction et (B) linéarisation selon le modèle de Schatchard.

1.1.2. Caractéristiques d'une interaction multivalente

La valence est un terme de chimie qui se réfère au nombre de liaisons chimiques qu'un atome est susceptible de former avec un autre atome. Le terme valence peut être extrapolé à des structures plus complexes. Ainsi, on parle de valence d'un récepteur en désignant le nombre de site de reconnaissance qu'il peut impliquer dans une interaction. D'autre part, la valence d'un ligand correspond au nombre d'épitopes (motifs reconnaissables par le récepteur) investis dans une interaction. Il faut par ailleurs différencier le terme multimérique du terme multivalent. Le multimère est l'association de plusieurs monomères pour former la structure quaternaire d'un récepteur. Donc le terme mono ou multimérique se réfère à une composante structurale alors que la valence se réfère à la composante fonctionnelle de reconnaissance.

Une interaction multivalente est définie comme une interaction entre un récepteur multivalent et un ligand multivalent. L'affinité des interactions multivalentes est supérieure à celle des interactions monovalentes. À titre d'exemple, une augmentation considérable de l'affinité a été notée suite à l'étude de l'interaction entre des protéines multi-glycosylées et des lectines (protéines reconnaissant spécifiquement les sucres) ^{[11], [12]}. Les résultats de ces travaux ont soutenu l'augmentation de l'affinité *in vivo* sous l'effet de la multivalence dans les processus biologiques. Cet effet a été désigné comme « Glycoside Cluster Effect » que l'on pourrait traduire littéralement par « l'effet du regroupement des glycosides » ^{[5], [13]}. Il explique la force plus importante des interactions multivalentes *in vivo*.

Les interactions multivalentes génèrent différents états métastables. En effet, lorsqu'on considère une interaction monovalente, le récepteur et le ligand peuvent être ou bien liés ou libres dans un mode d'action binaire 0/1. Cependant, lorsqu'on considère une interaction multivalente, l'interaction entre plusieurs sites de reconnaissances et plusieurs ligands génèrent, selon un mode de liaison multiple, divers états métastables désignés par diverses combinaisons binaires (Figure 3).

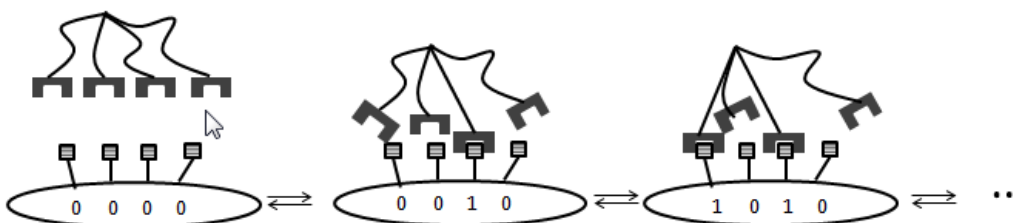


Figure 3. Mode de reconnaissance binaire d'une interaction multivalente.

Les différentes combinaisons sont porteuses d'une information. La multivalence est, de ce fait, responsable d'une large gamme de réponses dans les systèmes biologiques et est parfois cruciale pour assurer la fonction biologique. La réponse graduelle générée par la multivalence dans le processus de phagocytose de pathogènes, faisant intervenir les anticorps IgG, en est un exemple. Suite à l'infection d'un organisme, les bactéries sont détectées et sont entourées par des anticorps IgG. Un macrophage est capable de se lier au domaine Fc des anticorps de manière multivalente et graduelle ^[10]. Lorsque suffisamment de contact macrophage-IgG sont établis, la bactérie est ingérée (Figure 4).

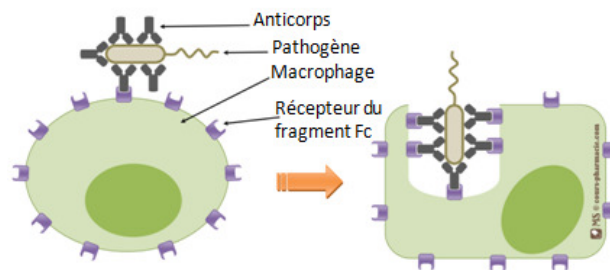


Figure 4. Phagocytose d'une bactérie par l'intermédiaire d'interaction IgG-macrophage.

La sélectivité comme la spécificité dans les interactions multivalentes sont toutes les deux des composantes de l'affinité. La sélectivité provient exclusivement de la géométrie des sites de reconnaissance et de la densité de surface en ligands. Si on considère deux lectines divalentes possédant la même spécificité pour un sucre mais dont les structures quaternaires (notamment la distance entre les sites de reconnaissance) sont différentes, la distribution des ligands sur la surface (leur éloignement et leur densité) définit la sélectivité de l'interaction entre les récepteurs et les ligands (Figure 5). Ce raisonnement, extrapolé au processus biologiques, suggère qu'une structure peut se lier sur une cellule préférentiellement selon la densité de surface de la cellule en ligands. Cependant, ce concept de sélectivité se heurte à la flexibilité des membranes biologiques et aux nombreuses possibilités de regroupement des ligands à leurs surfaces.



Figure 5. Représentation schématique de la sélectivité des récepteurs selon la distribution des ligands sur la surface.

Appliqué au cas particulier des interactions multivalentes entre lectines et mono ou oligosaccharides, ce raisonnement stipule que le site de liaison sera déterminant de la spécificité envers le sucre. La structure quaternaire de la lectine (géométrie/topologie) sera, quant à elle, déterminante de la sélectivité et de l'assemblage de structures glucidiques.

1.1.2.1. Différents modes d'interactions multivalentes

L'interaction multivalente, présentée précédemment comme l'interaction entre un récepteur multivalent et un ligand multivalent, passe par différents mécanismes d'association. Ces mécanismes dépendent de la nature des récepteurs et des ligands mis en jeu dans l'interaction (architecture, valence, densité, etc.). La multitude de mécanismes d'association enrichit davantage le spectre de processus biologiques *in vivo*. Ces mécanismes sont principalement intramoléculaires, intermoléculaires et parfois coopératifs.

➤ Mécanismes intramoléculaires d'association multivalente

Le mode de liaison chélate fait partie des interactions intramoléculaires les plus étudiées. Il engendre les augmentations d'affinité les plus importantes. Un effet chélate est obtenu lorsque la distance entre les épitopes d'une structure multivalente est suffisante pour qu'ils se fixent aux différents sites de reconnaissance du récepteur (Figure 6 A). Lors de la liaison chélate, la fixation d'un épitope secondaire nécessite un faible coût entropique ^[14]. Il a été démontré que l'effet chélate génère une forte affinité entre le ligand et le récepteur. Cette augmentation de l'affinité a été, par exemple, mise en évidence par Fan et *al.* suite à l'étude de l'interaction entre un ligand galactosylé pentavalent et une entéro-toxine pentavalente d'*E. coli* ^[15]. La fixation simultanée des cinq épitopes galactoses aux cinq sites de la toxine engendre une affinité 10^5 fois supérieure à celle du galactose monovalent ^[15].

Dans certains cas particuliers, **un regroupement des récepteurs** peut avoir lieu (Figure 6 B). Cet effet, une variante de l'effet chélate, est possible grâce à une diffusion bidimensionnelle des récepteurs ancrés dans les membranes biologiques. Généralement, le regroupement des récepteurs est à l'origine du processus de transduction du signal ^[16].

Une seconde variante de l'association chélate est relative à la présence sur le ligand d'une sous unité capable de se lier à une partie de récepteur (Figure 6 C). **La fixation à un site secondaire du récepteur** stabilise le complexe protéine-ligand par effet enthalpique et entropique. Une étude représentative de ce mécanisme a été menée par Banerjee et *al.* ^[17].

Les auteurs ont synthétisé deux ligands divalents de l'anhydrase carbonique humaine I, possédant une fonction iminodiacétate de cuivre et sulfonamide reliés par des espaceurs de tailles et de structures chimiques différentes. Les études spectrométriques et cinétiques ont révélé les constantes de dissociation et d'inhibition pour les ligands L1 ($K_d = 1.1 \mu\text{M}$, $K_i = 1.2 \mu\text{M}$) et L2 ($K_d = 0.017 \mu\text{M}$, $K_i = 0.027 \mu\text{M}$). Le ligand L2 exprime donc une affinité supérieure reliée à la présence de deux sites de fixation avec une sous unité supplémentaire dans le récepteur.

Le mode de fixation et recapture (pour les ligands à faible valence) dit aussi **mode de diffusion interne** (pour les ligands à forte valence) fait partie des modes d'association intramoléculaires (Figure 6 D). Dans ce mode un récepteur glisse d'un épitope à un autre fixé sur une même charpente. Une forte concentration locale en ligand autour du récepteur et la proximité des épitopes sur le ligand multivalent favorisent ce mode. Le mode de fixation et recapture est limité par l'affinité. En effet, la fixation du récepteur au site ne doit pas être trop forte pour favoriser la dissociation et le glissement. Pour les ligands à faibles valences, l'augmentation de l'affinité n'est pas conséquente^[18] relativement à celle constatée pour des ligands multivalents à fortes valences^[19].

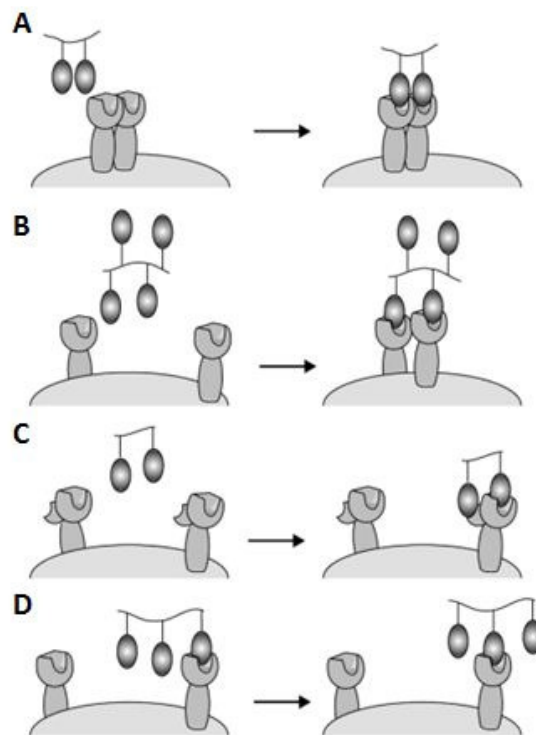


Figure 6. Représentation schématique des différents mécanismes d'association intramoléculaires. (A) Effet chélate, (B) regroupement de récepteur, (C) association de sous-unité secondaire et (D) fixation et recapture (glissement interne) [20].

➤ Mécanismes intermoléculaires d'association multivalente

Le mode d'association intermoléculaire génère par réticulation un **effet agrégatif**. En effet, des réseaux réticulés peuvent être formés suite à la mise en coprésence de ligands et de récepteurs multivalents ^[21]. La taille et la réticulation du réseau dépendent de la valence du récepteur et du ligand. A titre d'exemple, pour un ligand divalent en contact avec un récepteur divalent, un réseau réticulé linéaire de type 1 peut être obtenu (Figure 7 A). Pour de faible degré de réticulation, les réseaux demeurent solubles et flexibles. Pour des valences plus importantes, les réseaux formés sont plus complexes. En effet, des réseaux à deux et même à trois dimensions sont envisageables (Figure 7 B). Ces structures, dites réseaux de type 2, sont le plus souvent cristallines et engendrent une précipitation des partenaires moléculaires mis en jeu dans l'interaction.

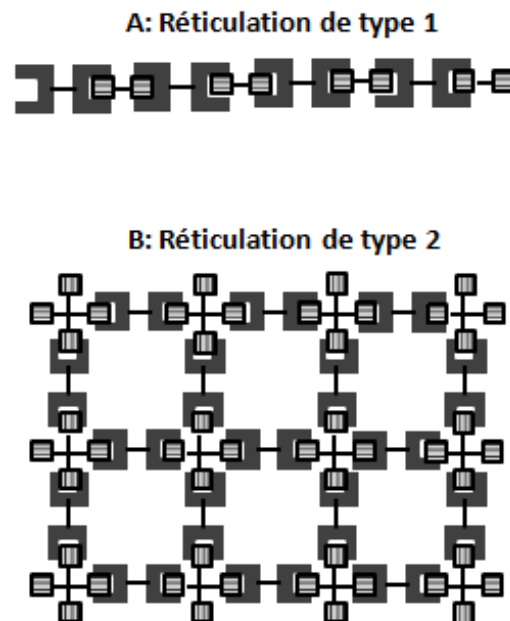


Figure 7. Formation des réseaux réticulés sous l'effet de la multivalence. (A) réseau de type 1 obtenu à faible valence, (B) réseau de type 2 obtenu à plus forte valence.

La formation des réseaux réticulés joue un rôle prépondérant dans un nombre de processus biologiques. À titre d'exemple, Baum et *al.* ont constaté la formation de réseaux réticulés entre la galectine-1 (lectine reconnaissant les galactoses) et des glycoprotéines à la surface de cellules T ^[22]. Une transduction d'un signal d'apoptose est induite suite à la réticulation de la galectine-1 avec les glycoprotéines.

L'effet agrégatif se heurte aux contraintes stériques. En effet, la formation d'agrégats ligands-récepteurs de tailles variables n'est possible que si la structure multivalente possède

une distance suffisante entre les ligands. Ceci permettra à plusieurs récepteurs de se lier sans contraintes stériques ^[4].

➤ Mécanisme coopératif d'association multivalente

La coopérativité a lieu lorsque l'association d'un ligand influence l'affinité d'un second site de reconnaissance pour un second ligand. Une distinction entre coopérativité et multivalence est néanmoins indispensable. Alors que la multivalence décrit l'éventuelle augmentation d'affinité pour le récepteur, la coopérativité décrit l'interdépendance entre les sites de reconnaissance. Ainsi, plusieurs processus multivalents, qui engendrent une forte augmentation d'affinité, se sont avérés non coopératifs. Une coopérativité peut être positive si la fixation d'un premier ligand augmente l'affinité pour un deuxième ligand. La coopérativité peut être négative si l'affinité devient plus faible après la fixation d'un premier ligand. Enfin, la coopérativité peut être nulle si les affinités des sites de liaisons restent constantes et ne sont pas influencées par les différentes associations. Ces coopérativités sont souvent dues à des changements de conformation, des changements de polarisation des récepteurs ou à l'apparition de contraintes stériques suite à la fixation d'un premier ligand.

La coopérativité peut être constatée dans le cas de l'association successive de ligands monovalents sur récepteurs multivalents. La fixation sur un récepteur multivalent à x sites de reconnaissance d'un premier ligand génère un complexe RL_1 . Ensuite, la fixation d'un second ligand engendre un complexe RL_2 . La fixation de i ligands génère un complexe RL_i jusqu'à occupation de la totalité des sites. Un complexe RL_x est alors obtenu. Une constante d'équilibre K_i permet de décrire chacune de ces associations. Dans une approche proposée par G. Ercolani ^[23], les constantes d'équilibre de chaque association peuvent être décrites sous la forme suivante :

$$K_i = K_{interne} \frac{(x-i+1)}{i} \quad \text{Équation 11}$$

Un ratio $\frac{K_{i+1}}{K_i} = \frac{i(x-i)}{(i+1)(x-i+1)}$ permet d'apprécier le sens de la coopérativité (positive, négative ou nulle).

1.1.2.2. Influence de la multivalence sur l'aspect thermodynamique des interactions

Les bases fondamentales d'une interaction multivalente sont beaucoup plus complexes que celles d'une interaction monovalente. Néanmoins, cette complexité confère une richesse aux processus biologiques en modulant la manière avec laquelle les biomolécules interagissent. La multivalence participe souvent dans l'amélioration de l'affinité. Alors qu'une augmentation de l'affinité peut être constatée suite aux interactions intermoléculaires entre molécules multivalentes, les augmentations d'affinité les plus impressionnantes sont, le plus souvent, le résultat d'interactions intramoléculaires. Dans la littérature, quelques interprétations ont été proposées afin d'expliquer les effets de la multivalence. L'additivité des composantes thermodynamiques est l'interprétation la plus adoptée ^[10]. Plus récemment, d'autres théories, découlant de la chimie de coordination et de la synthèse organique, ont été proposées ^[20]. Dans la littérature, toutes ces théories ont été rarement discutées. Bien qu'elles ne se contredisent pas, les différentes théories proposent des modèles très différents ^[20]. Quelque soit le modèle, il est limité par le grand nombre d'approximations et d'hypothèses émises pour permettre sa conception.

Dans une étude exhaustive de l'influence de la multivalence sur la thermodynamique d'une interaction, Dam et *al.* ont étudié l'affinité d'un récepteur à sucres, la lectine de soja SBA (lectine spécifique au GalNAc) en interaction avec une glycoprotéine multivalente, la mucine porcine modifiée ^[19]. Une amélioration significative de l'affinité, avec un facteur de 10^6 , a été constatée pour l'interaction multivalente en comparaison avec l'interaction monovalente. Un modèle d'association intramoléculaire de diffusion interne a été proposé pour expliquer cette augmentation de l'affinité. Les interactions sucre-lectine ont ainsi servi de modèle à plusieurs autres études pour comprendre davantage le phénomène de la multivalence. Dans leurs études, Dam et *al.* se sont focalisés sur les interactions multivalentes sucre-lectine. Ces travaux visaient à étudier plus en détails les phénomènes inter et intramoléculaires qui régissent ces interactions et de proposer une explication thermodynamique à ces phénomènes ^{[24], [25]}. Les auteurs ont évoqué la différence d'évolution des profils enthalpiques et entropiques lors de l'association de la lectine sur une structure glycosylée multivalente. Dans leur proposition, l'enthalpie suivrait un modèle additif des gains enthalpiques. Contrairement, l'entropie globale ne serait pas

proportionnelle au nombre d'associations. Enfin, une diminution des constantes d'association est constatée au fur et à mesure de la saturation des sites de reconnaissance, due à une coopérativité de plus en plus négative. Ceci est expliqué par la diminution de la valence des structures multivalentes au cours des associations successives (Figure 8).

L'analyse et l'interprétation de la thermodynamique des associations purement intermoléculaires sont soumises à plusieurs contraintes, notamment relatives à la formation par effet chélate de complexes insolubles et probablement de précipités. Ainsi, deux problèmes fondamentaux se posent suite à la formation de complexes insolubles. Le premier, basé sur la loi d'action de masse, est relatif à la perturbation de l'équilibre entre les espèces solubles suite à la précipitation irréversible des complexes formés. Le deuxième problème correspond à la non applicabilité de certaines équations thermodynamiques aux processus irréversibles.

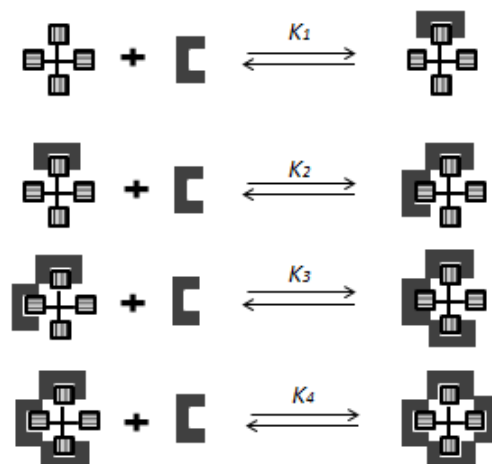


Figure 8. Diminution de la valence fonctionnelle d'une structure multivalente au cours des associations avec le récepteur.

1.1.2.3. Aspects cinétiques des interactions multivalentes

La différence de l'aspect cinétique entre les interactions monovalentes et multivalentes provient principalement de la composante intramoléculaire ayant lieu lors de la formation d'un complexe chélate dans l'interaction multivalente. Afin d'élucider cette différence, considérons l'interaction multivalente entre un récepteur divalent (dont les deux sites sont interconnectés) et un ligand divalent (dont les deux épitopes sont également reliés) (Figure 9 A). Considérons d'un autre côté deux interactions monovalentes entre récepteurs et ligands monovalents (Figure 9 B). Il est tout à fait raisonnable de penser que l'affinité récepteur-ligand est plus forte dans l'interaction multivalente que dans l'interaction

monovalente. Intuitivement, on pense qu'un ligand multivalent aura une cinétique d'association plus rapide et une cinétique de dissociation plus lente.

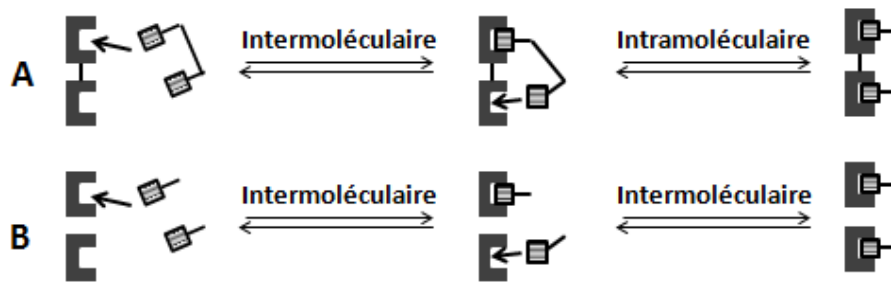


Figure 9. Processus d'association de (A) une interaction divalente et (B) deux interaction multivalente

Dans les deux cas de figure, la première association, forcément intermoléculaire, est similaire en terme cinétique. Dans le cas de l'association monovalente, la deuxième fixation est également intermoléculaire et donc cinétiquement similaire à la première association. Cependant, dans une association divalente, la deuxième association, intramoléculaire, est favorisée par une concentration locale plus élevée et une proximité géométrique du deuxième épitope. Ainsi, la vitesse de formation du complexe divalent final est augmentée significativement.

Au regard de l'interconnexion des sites de reconnaissance du récepteur et des épitopes du ligand, il apparaît évident que la dissociation du complexe divalent est soumise à plus de contraintes que la dissociation d'un complexe monovalent. En effet, la dissociation du complexe divalent doit passer par le même mécanisme intramoléculaire. Dans le même schéma que pour l'association, la distribution géométrique et la concentration locale élevée en épitopes ralentissent la dissociation.

L'association favorisée ainsi que la dissociation défavorisée des systèmes multivalents apportent l'explication cinétique de l'amélioration de l'affinité dans ces systèmes.

1.2. Outils d'étude de la reconnaissance moléculaire

La quantification des interactions ligands-récepteurs n'est pas évidente. La constante de dissociation K_d permet de caractériser correctement l'association du ligand au récepteur. En solution diluée, la K_d est normalement non influencée par les conditions expérimentales. Cependant, pour les expériences en milieu hétérogène, la K_d mesurée est fortement dépendante des conditions opératoires ^[13].

Les techniques d'analyse de la reconnaissance sont diverses ^[26]. Chacune basée sur un principe qui lui est propre et mesure des caractéristiques différentes. La compréhension des résultats et des données fournies par ses techniques passe nécessairement par la compréhension des principes de base de chacune d'elles.

1.2.1. Techniques basées sur la filtration sélective

Le principe général de ces techniques tire profit de la différence de taille entre les entités mises en jeu dans la réaction et le complexe qu'elles forment. Comme exemples à ces techniques, on cite la dialyse à l'équilibre et la « filter-based binding assay ».

La dialyse à l'équilibre est une méthode courante dans l'analyse des interactions moléculaires. Elle implique l'utilisation d'un tube de dialyse constitué de deux cellules séparées par une membrane semi-perméable (qui ne permet pas au récepteur de passer, mais qui permettra au ligand libre de diffuser librement) ^[26]. Le ligand et le récepteur sont placés de part et d'autre de la membrane. Les concentrations initiales ainsi que les concentrations à l'équilibre des entités mises en jeu permettent de déduire la constante K_d de l'interaction. Le système de dialyse à l'équilibre est simple à mettre en œuvre. De plus, plusieurs compagnies mettent en vente des systèmes prêts à l'utilisation ^[26]. Cependant, la détermination du K_d à un point unique génère beaucoup d'erreurs par rapport à un résultat obtenu à partir de plusieurs mesures. Ainsi, des concentrations différentes de ligand devraient être faites pour garantir la répétabilité des résultats.

La « filter-based binding assay » est une technique couramment utilisées en pharmacologie pour détecter la fixation des ligands sur des récepteurs membranaires. Dans la pratique, des membranes de cellules isolées, des cellules entières ou des cellules lysées sont utilisées. Ces expériences impliquent donc l'interaction entre une petite molécule (ligand) et un récepteur qui fait partie d'une superstructure gigantesque ^[26]. Les cellules/membranes contenant le récepteur sont mélangées avec le ligand. Le mélange est ensuite filtré de telle sorte que les cellules/membranes ayant fixé le ligand soient collées sur le filtre. Le filtre est lavé pour éliminer tout ligand non lié. Il est par la suite soumis à un comptage pour détecter et quantifier la quantité de ligand. Bien qu'elle permette d'étudier l'interaction avec des structures cellulaires, cette technique présente un inconvénient

majeur relatif au temps de vie du complexe ligand-récepteur. En effet, le complexe doit avoir une durée de vie supérieure au temps qu'il faut pour réaliser la filtration et le rinçage.

1.2.2 Techniques spectroscopiques et cinétiques

Les biomolécules interagissent souvent avec les radiations électromagnétiques, tel que la lumière. La quantification de l'interaction prend en compte la perturbation du signal ou le changement des propriétés de la biomolécule soumise aux radiations. Le principe général de l'analyse de la reconnaissance par spectroscopie considère les signaux spécifiques du ligand libre et du récepteur libre. Cependant, lorsqu'un complexe est formé, son signal serait différent de ceux du récepteur et du ligand libre. Dans ce cas, le changement du signal spectroscopique peut servir à déterminer la constante K_d de la formation du complexe ^[26]. Parmi les techniques spectroscopiques utilisées dans l'analyse de la reconnaissance on cite la spectrophotométrie UV (qui mesure l'absorbance à une longueur d'onde déterminée), la spectrophotométrie de fluorescence (qui quantifie l'émission de signal par les biomolécules sous une excitation), la spectroscopie résonance magnétique nucléaire (RMN ; qui mesure la radiation absorbée en fonction de la fréquence imposée), le dichroïsme circulaire (qui mesure l'absorbance sous lumière polarisée) et la résonance plasmonique de surface (SPR ; technique cinétique qui suit l'angle de résonance en fonction du temps).

Les méthodes spectroscopiques ne sont, cependant, efficaces que lorsque la différence des signaux des entités moléculaires (ligand seul, récepteur seul et complexe ligand-récepteur) est significativement différente.

1.2.3 Techniques chromatographiques

L'analyse de la reconnaissance par chromatographie se base sur la différence de la taille ou de l'affinité. Dans le premier cas, il s'agit d'équilibrer une colonne d'exclusion avec un flux constant d'une solution de ligand. L'ajout d'un petit volume d'une solution de récepteur implique la disparition suivie d'une concentration du ligand dans l'éluat. En effet, les récepteurs se fixent sur le ligand dans la colonne (disparition de celui-ci dans l'éluat). Le complexe formé, de taille plus importante que celle du ligand, a une vitesse d'exclusion plus rapide. La Figure 10 explique le principe général d'une analyse de la reconnaissance par chromatographie d'exclusion.

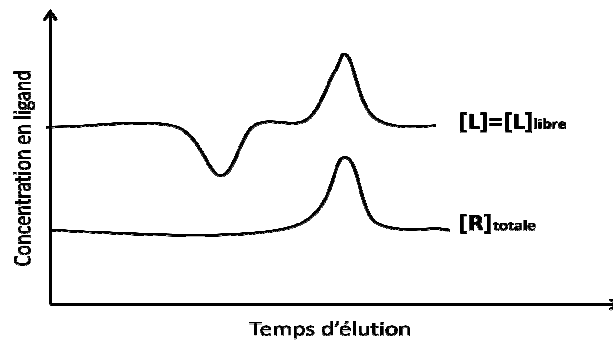


Figure 10. Analyse de la reconnaissance par chromatographie d'éluion

La chromatographie d'affinité implique la fonctionnalisation de la colonne par le ligand. Ensuite, une solution du récepteur est injectée dans la colonne. Ainsi, un complexe se forme sur la résine. L'éluion se fait avec un gradient de concentration d'un second ligand dont l'affinité vis-à-vis du récepteur est connue. La concentration à laquelle le récepteur est élué de la colonne est directement reliée à la constante de dissociation du complexe ligand-récepteur.

Les méthodes chromatographiques ne sont efficaces que lorsque la durée de vie du complexe est supérieure au temps qu'il faut pour réaliser l'éluion.

1.2.4 Techniques calorimétriques

Parmi les techniques calorimétriques d'analyse de la reconnaissance on cite la calorimétrie de titration isotherme (ITC). L'association d'un ligand à un récepteur engendre un changement de la température. Le changement dépend de l'enthalpie de l'interaction. Cette dernière peut être exothermique (émission de chaleur) ou endothermique (absorption de chaleur). Le changement de température est proportionnel au nombre de complexes qui se forment au fur et à mesure de l'expérience. Ainsi, des isothermes de fixation sont générées en traçant les changements de température en fonction de la concentration de ligand libre. Bien que cette méthode d'analyse de la reconnaissance soit assez sensible, elle ne permet pas d'exclure les changements thermiques dus à des processus secondaires (souvent non spécifiques).

Ces méthodes sont parmi les plus utilisées mais ne sont pas les seules qui existent (ELISA, suivi de la cinétique, essais de compétition, etc.).

Chapitre 2 : Les interactions sucre-lectine

Les lectines sont des protéines fonctionnelles qui, tout comme les enzymes et les anticorps, ont la capacité de reconnaître spécifiquement et de fixer de manière non covalente et réversible un ligand, particulièrement les sucres. Dotées d'un domaine de liaison des sucres dit CRD pour « carbohydrate recognition domain » (séquence peptidique invariante ou très bien conservée qui forme le domaine structural minimal nécessaire à la reconnaissance du sucre), les lectines sont capables de fixer de manière réversible un sucre simple ou sous forme d'oligosaccharide. Les interactions sucre-lectine se produisent en général via des liaisons hydrogène, des contacts hydrophobes ou par l'intermédiaire de cations. Bien qu'au début, les lectines n'étaient qu'un simple outil de biochimie, leur découverte chez tous les organismes vivant, y compris les virus, les bactéries, les plantes et les animaux, a attisé des recherches plus avancées quant à leurs rôles biologiques. Ainsi, ces recherches ont permis d'attribuer aux interactions sucre-lectine d'importants rôles dans la médiation et la reconnaissance cellulaire. Dans la nature, la faible affinité d'une lectine envers un sucre, de l'ordre du mM, est compensée par des interactions multivalentes qui augmentent l'adhésion des lectines à leurs sucres spécifiques.

Dans ce chapitre, nous nous sommes intéressés aux lectines dans une première section dédiée aux généralités à travers la présentation de quelques éléments historiques des lectines ainsi que la structure générale, la classification et les différents rôles que peuvent jouer les lectines dans les processus biologiques. Nous présentons par la suite un aperçu sur deux types de lectines ; les lectines bactériennes et les lectines végétales. Nous détaillerons pour chaque type un exemple de lectine qui a fait objet d'étude dans notre projet, à savoir, la lectine bactérienne d'*Escherichia coli* uropathogène et la lectine d'arachide.

2.1 Généralités sur les lectines

2.1.1 Historique des lectine

Vers la fin du 19^{ème} siècle, des preuves de la présence dans la nature de protéines qui possèdent la capacité d'agglutiner les érythrocytes, ont commencé à s'accumuler. À

l'époque et au regard de leurs provenances essentiellement d'extrait de plantes, ces protéines sont appelées phyto-agglutinines ou hémagglutinines. Les prémices de la découverte des hémagglutinines viennent avec la description et l'isolement vers 1888 par Peter Hermann Stillmark d'une protéine hautement toxique extraite de *Ricinus communis* et baptisée ricine ^[1]. Par la suite, H. Hellin a démontré la présence d'une autre hémagglutinine toxique, l'abrine, dans des extraits *Abrus precatorius*. Les recherches menées simultanément avec ses deux lectines ont ainsi montré la spécificité de la réponse et le phénomène de la mémoire immunologique, et le transfert de l'immunité humorale.

L'extraction et la purification en 1919 de la concanavaline A à partir de *Canavalia ensiformis* par James B. Sumner a marqué le début d'une nouvelle ère pour la recherche des hémagglutinines ^[1]. Entre 1954 et 1956, Olavi Mäkelä, alors doctorant à Renkonen, a examiné des extraits de graines représentant 743 espèces végétales de 165 genres, tous de la famille des légumineuses, et a détecté une activité hémagglutinante dans plus d'un tiers d'entre eux, et près d'un dixième des hémagglutinines exposaient une spécificité pour un groupe sanguin ^[27].

La capacité des agglutinines de plantes à distinguer entre les érythrocytes de différents groupes sanguins conduit à proposer pour eux le nom des lectines, du latin *legere* ce qui signifie « choisir, discriminer ». Ce terme a été généralisé par la suite pour englober toutes les protéines d'origine non immune qui lient des structures saccharidiques de manière réversible et ne possédant pas d'activité enzymatique ^[1].

Dans les années 1960, l'attitude de la communauté scientifique envers les lectines, particulièrement les biochimistes et les immunologistes, a changé. Les scientifiques se sont penchés sur l'aspect structural des lectines. Ces études vont de la caractérisation physico-chimiques des lectines au séquençage des acides aminés et l'élucidation de leur structure 3D ^[1]. En 1970, a été introduite la purification des glycoprotéines basée sur les lectines immobilisées ^[28]. Depuis lors, l'intérêt que portent les scientifiques aux lectines ne cesse d'augmenter. Les lectines représentent des réactifs extrêmement précieux pour l'investigation des sucres aux surfaces cellulaires, l'évaluation du rôle de ceux-ci dans la croissance cellulaire et la différenciation, l'analyse des interactions des cellules avec leur environnement et l'étude de leurs implications dans divers processus pathologiques ^[1].

2.1.2 Classifications, rôles biologiques et utilisations

Une classification basée sur la spécificité des lectines, souvent désignée comme la «spécificité primaire», est possible. Ainsi, cinq groupes différents sont distingués selon le monosaccharide pour lequel elles présentent la plus forte affinité: i) les lectines à mannose, ii) les lectines à fucose, iii) les lectines à galactose/acide N-acétylgalactosamine (Gal/GalNAc), iv) les lectines à l'acide N-acétylglucosamine (GlcNAc) et v) les lectines à l'acide N-acétylneuraminique (NeuNAc) ^{[3], [29]}. Ces monosaccharides et leurs dérivés sont les principaux constituants des épitopes des surfaces cellulaires eucaryotes ^[29].

Tableau 1. Lectines spécifiques pour les monosaccharides [29].

Monosaccharide	Lectine
Man	<i>Allium sativum</i> ; <i>Canavalia ensiformis</i> ; <i>Crocus sativus</i> ; <i>Dioclea grandiflora</i> ; <i>E.Coli type 1 fimbriae</i> ; <i>ERGIC-53</i> ; <i>Galanthus nivalis</i> ; <i>MBLs of animals</i> ; <i>Pisum sativum</i> ; <i>Vicia faba</i>
Fuc	<i>Aleuria aurantia</i> ; <i>Anguilla Anguilla</i> ; <i>Lotus tetragonolobus</i> ; <i>Pseudomonas aeruginosa lectin II</i> ; <i>Ulex europaeus lectin I</i> ; <i>Ulva lactuca</i> ; <i>Chromobacterium violaceum lectin</i>
Gal/GalNAc	<i>Arachis hypogaea</i> ; <i>Coprinus cinereus</i> ; <i>Entamoeba histolytica</i> ; <i>Erythrina corallodendron</i> ; <i>Dolichos biflorus</i> ; <i>Glycine max</i> ; <i>Griffonia simplicifolia lectin I</i> ; <i>helix pomatia</i> ; <i>Hygrophorus hypothejus</i> ; <i>Phaseolus limensis</i> ; <i>Moluccella laevis</i> ; <i>Polyandracarpa misakiensis</i> ; <i>Ptilota filicina</i> ; <i>Ricinus communis</i> ; <i>Pseudomonas aeruginosa lectin I</i>
GlcNAc	<i>Conglutinin</i> ; <i>Griffonia simplicifolia lectin II</i> ; <i>Tachylectin-2</i> ; <i>Triticum aestivum</i> ; <i>Ulex europaeus lectin II</i> ; <i>Psathyrella velutina</i>
NeuNAc	<i>Achatina fulica</i> ; <i>Cancer antennarius</i> ; <i>Hericium arinaceum</i> ; <i>Homarus americanus lectin I</i> ; <i>Limax flavus</i> ; <i>Scylla serrata</i> ; <i>Triticum aestivum</i> ; <i>Psathyrella velutina</i>

Généralement, l'affinité des lectines vis-à-vis des sucres est de l'ordre du millimolaire (mM) ^{[3], [4]}. Cependant, cette faible affinité est le plus souvent compensée par la multivalence des lectines ^[5]. Elles sont également capables de reconnaître des structures oligosaccharidiques plus complexes. Tel est le cas pour la toxine de choléra qui est spécifique pour le mono-sialo-ganglioside GM1 présent sur la surface de cellules épithéliales ^[30]. L'affinité exprimée pour les oligosaccharides est généralement plus élevée que celle exprimée pour les monosaccharides.

Les lectines expriment une sélectivité relativement importante vis-à-vis de leurs ligands. En effet, les lectines spécifiques du galactose ne réagissent pas avec le glucose, son épimère en C4 ni avec le mannose, son épimère en C2. Également, les lectines spécifiques du mannose ne reconnaissent pas le galactose. Cependant, certaines exceptions sont parfois constatées. Par exemple, la plupart des lectines qui fixent le galactose, dont l'agglutinine du soja (SBA) et la lectine d'arachide (PNA), reconnaissent aussi son homologue *N*-acétylé^[31]. La lectine de *Pseudomonas aeruginosa* PA-IIL peut également reconnaître aussi bien le mannose que le fucose^[32]. La reconnaissance, par la même lectine, de ligands différents pourrait être due à la présence des groupements hydroxyles dans une topologie très similaire.

Une deuxième classification basée sur la structure tridimensionnelle est possible. La détermination de la séquence en acides aminés et la structures 3D de centaines de lectines a permis la classification selon les similarités structurales. La plupart des lectines appartiennent aux lectines simples, aux lectines multi-domaines (dites en mosaïque) ou aux lectines en assemblage macromoléculaire^[29]. Cependant, cette classification est entravée par un nombre important de structures tertiaires et quaternaires des lectines. La plus adaptée serait une première classification selon l'origine suivie d'une deuxième classification basée sur la similitude dans les domaines de liaison du sucre. Enfin, une base de données a été mise en place par l'équipe « Glycobiologie Moléculaire » du Centre de Recherches sur les Macromolécules Végétales du CNRS. Elle regroupe les lectines des différentes classes et leurs structures cristallines. Elle peut être consultée sur le lien internet suivant : <http://lectin3d.cermav.cnrs.fr/search.php>.

Le spectre des processus biologiques faisant intervenir les lectines est large^[33]. Les lectines bactériennes et virales sont principalement impliquées dans l'adhésion du pathogènes aux cellules cibles^{[3], [10]}. Les recherches menées sur les lectines végétales ont mis en évidence leur implication dans la protection et la défense contre les phytopathogènes et les animaux prédateurs^{[34], [35]}. D'autres auteurs ont stipulé un rôle des lectines dans l'association entre les plantes (particulièrement les légumineuses) et le rhizobium pour la fixation de l'azote^[36]. Les lectines animales sont impliquées dans divers processus biologiques cruciaux notamment les reconnaissances cellules-cellules, la migration cellulaire et la communication inter et intracellulaires^[3]. L'étude des rôles joués par les

lectines dans les processus biologiques a été au centre de plusieurs travaux de recherche. Ainsi, Bevilacqua et *al.* ont mis en évidence l'implication des sélectines dans le recrutement des lymphocytes via les glycoconjugués présents sur leurs surfaces ^[37]. Les lectines animales ont des rôles particulièrement importants dans la croissance et dans le développement des organismes supérieurs. Lors du processus de fertilisation, le premier contact entre les cellules reproductrices fait intervenir une reconnaissance spécifique entre une lectine du spermatozoïde (spermadhésine) et un glycoconjugué présent sur la surface des ovocytes ^[38].

L'intérêt porté aux lectines s'est intensifié suite aux différentes découvertes relatives à leurs rôles biologiques. Ainsi, elles ont été utilisées comme outil de biochimie pour analyser les membranes cellulaires.

Basées sur leurs spécificités, les interactions sucre-lectine aux surfaces cellulaires peuvent fournir des informations sur l'état et les fonctions des cellules. Des travaux ont confirmé que certaines lectines, tel que la ConA, agglutinent les cellules cancéreuses mais pas les saines ^[39]. Ces travaux ont fourni des preuves convaincantes que le cancer engendre un changement dans la glycosylation de la surface cellulaire. Cette idée avait été considérée, quelques années auparavant, comme totalement infondée ^[3]. D'autre part, des études structurales de membranes cellulaires faisant intervenir les lectines ont permis de mettre en évidence le modèle de la mosaïque fluide ^[40].

La PHA (la lectine du haricot rouge) et la ConA sont reconnues comme mitogènes en stimulant la croissance et la division des lymphocytes ^[3]. Ces recherches ont engendré une croissance explosive de l'utilisation des lectines mitogéniques dans la recherche biologique. Les lymphocytes stimulés produisent des facteurs de croissance tels que les lymphokines et les cytokines. Lorsque le système immunitaire est défaillant, la réponse mitogénique est affectée ^[41]. Les lectines offrent alors un moyen d'évaluer la compétence immunitaire des patients et de surveiller les effets des différents traitements immunothérapeutiques ^[3]. Elles sont régulièrement employées dans les laboratoires cliniques.

2.1.3 Natures de l'interaction lectine-sucre

L'interaction sucre-lectine est le résultat de différents types de liaisons entre des éléments de la lectine avec des éléments du sucre, faisant intervenir parfois des éléments du milieu réactionnel.

2.1.3.1 Liaisons hydrogène

Grâce à la multitude de groupements hydroxyles (OH) présents sur les sucres, les liaisons hydrogène jouent un rôle important dans l'interaction sucre-lectine (Figure 11). Pour que cette liaison s'établisse, il faut être en présence d'un donneur de liaisons hydrogène (un composé porteur d'un hydrogène) et d'un accepteur (composé d'un hétéroatome porteur de doublets libres). Les hydrogènes ainsi que les doublets libres présents sur les oxygènes des groupements OH les rend à la fois accepteur et donneur de liaisons hydrogène. La plupart des contacts surviennent entre les groupements OH du sucre et les fonctions COOH, CO-NH₂ des acides aminés de type acide glutamique, acide aspartique ou asparagine. Des liaisons hydrogène multiples peuvent également être établies sur un même atome. L'orientation des liaisons hydrogène est cruciale pour la définition de la spécificité de la lectine vis-à-vis du sucre. Les liaisons hydrogène possèdent ainsi toutes les composantes énergétiques et directionnelles favorisant l'interaction spécifique d'une lectine et un sucre.

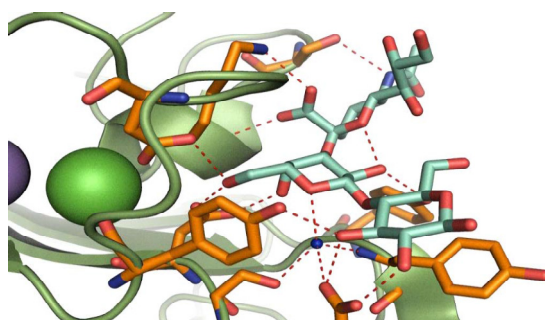


Figure 11. Réseau de liaisons hydrogène lors de l'interaction entre le sialyl-lactose et *Maackia amurensis leukoagglutinine* (Mal) [20].

2.1.3.2 Contacts non polaires

Au regard des nombreux groupements hydroxyles présents sur un sucre, son interaction avec la lectine via des contacts hydrophobes serait paradoxale. Cependant il n'est pas inconcevable de trouver des zones hydrophobes sur les sucres. En effet, dans le cas de la disposition des groupements hydroxyles en position équatoriale, les hydrogènes axiaux portés par les carbones du cycle peuvent former des surfaces hydrophobes. D'autre part, certaines lectines présentent, dans leur site de reconnaissance des sucres, des acides aminés non polaires (aromatiques ou aliphatiques). Le terme interaction hydrophobe, bien qu'il soit employé en physicochimie, est difficile à transposer à l'échelle moléculaire. Nous parlerons plutôt de contacts non polaires. Ainsi, selon la structure chimique du sucre et la nature des acides aminés formant le site de reconnaissance de la lectine, des contacts non polaires sont

possibles. A titre d'exemple, le galactose, présentant un OH axial en position C4, peut établir des interactions hydrophobes via sa face β . De plus, la présence de résidus méthyles sur certains sucres (l'acide N-acétyl-glucosamine, acide N-acétylneuraminique) leur confère la possibilité d'établir des contacts non polaires. Un des exemples rencontrés dans la littérature où un contact non polaire, entre un sucre et une protéine, est mis en évidence serait l'interaction du maltose avec la MBP (maltose binding protein) illustré par dans la Figure 12.

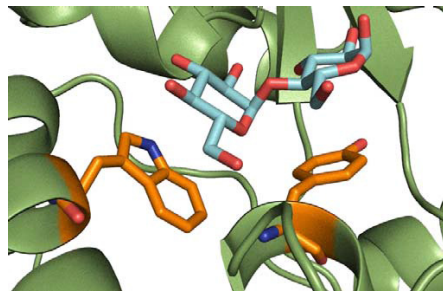


Figure 12. Structure cristallographique du complexe maltose-MBP [20].

2.1.3.3 Interactions ioniques

Il existe plusieurs sucres présentant naturellement des charges (l'acide sialique, l'acide glucuronique, etc.) ou qui ont été modifiés par l'introduction d'un groupement chargé (par phosphorylation ou sulfatation) ^[42]. Ces sucres peuvent interagir avec les protéines. Ces interactions, principalement ioniques, dépendent fortement de la composante électrostatique (Figure 13). Les interactions ioniques sont certes possibles mais pas systématiques. En effet, un exemple bien connu serait celui de l'acide sialique avec le site de reconnaissance spécifique sur l'hémagglutinine du virus *Influenza*. Bien que chargé, le sucre se fixe via des liaisons hydrogène et non pas des liaisons ioniques avec le virus.

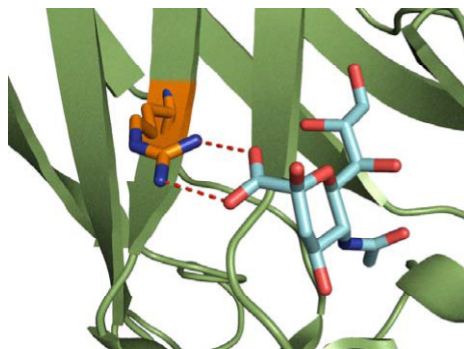


Figure 13. Structure cristallographique du complexe acide sialique-tête de fibre de l'adénovirus canin [20].

2.1.3.4 Chélation d'un métal

Certaines lectines peuvent lier un ion métallique (Figure 14). Néanmoins, il faut différencier la nécessité structurale de la présence des ions métalliques et leur participation dans l'interaction avec le sucre. En effet, les ions métalliques, tels que Ca^{2+} , Mg^{2+} et Mn^{2+} , peuvent être engagés par la lectine dans un but structural de cette dernière sans interagir avec le sucre. Ainsi, la présence d'ions métalliques est indispensable pour maintenir l'intégrité structurale de la lectine et garantir ainsi son interaction avec le sucre [43]. L'ion métallique peut aussi interagir avec le sucre. Ainsi, l'ion Ca^{2+} semble être le plus souvent engagé, via sa charge, par des acides aminés chargés négativement. Le sucre peut ainsi établir des contacts avec le métal. Ce dernier joue alors un rôle dans la reconnaissance spécifique du sucre. A titre d'exemple, la lectine de *Pseudomonas aeruginosa*, investit deux ions calcium lors de la reconnaissance, à haute affinité, du ligand.

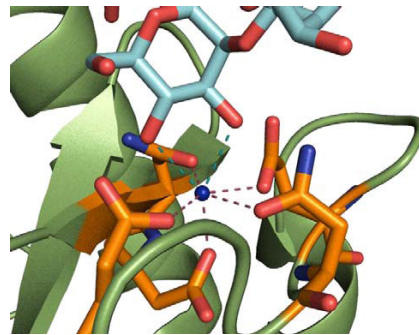


Figure 14. Structure cristallographique d'un oligomannoside avec DC-SIGN (Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin) [20].

2.1.3.5 Rôle des molécules d'eau

Les molécules d'eau sont indispensables dans la reconnaissance spécifique entre lectines et sucres. En effet, au regard de son aptitude à agir à la fois comme accepteur et donneur dans les liaisons hydrogène, l'eau joue un rôle d'intermédiaire en formant un réseau de liaisons hydrogène entre la lectine et le sucre. Elles interviennent ainsi dans la formation de ponts hydrogènes permettant d'établir une liaison non-covalente.

D'autre part, le second rôle crucial des molécules d'eau est relatif à l'état de solvataion des partenaires moléculaires mis en jeu. En effet, lorsque la lectine et le sucre ne sont pas en interaction, ils sont solvatés. Des molécules d'eau occupent alors le site de fixation et entourent le sucre. Les molécules d'eau participent ainsi au maintien de l'intégrité

du site de fixation et des sucres. La mise en place de l'interaction nécessite la désolvatation des molécules.

2.2 Les lectines bactériennes

La pathogénicité des microorganismes (virus, bactéries, champignons ou parasites eucaryotes) fait intervenir la reconnaissance moléculaire spécifique entre des lectines du pathogène et des sucres présents sur la surface des cellules hôtes. A titre d'exemple, les interactions sucre-lectine interviennent dans l'adhésion de pathogènes sur les tissus richement glycosylés présents dans les voies respiratoires, digestives ou dans l'appareil urogénital^[44].

2.2.1 Généralité sur les lectines bactériennes

Les bactéries disposent, dans leur arsenal, de plusieurs types de lectines pour cibler les sucres sur les cellules hôtes. Les lectines bactériennes ont été classées en trois familles: les lectines solubles, les toxines et les lectines fimbriales (Figure 15)^[45].

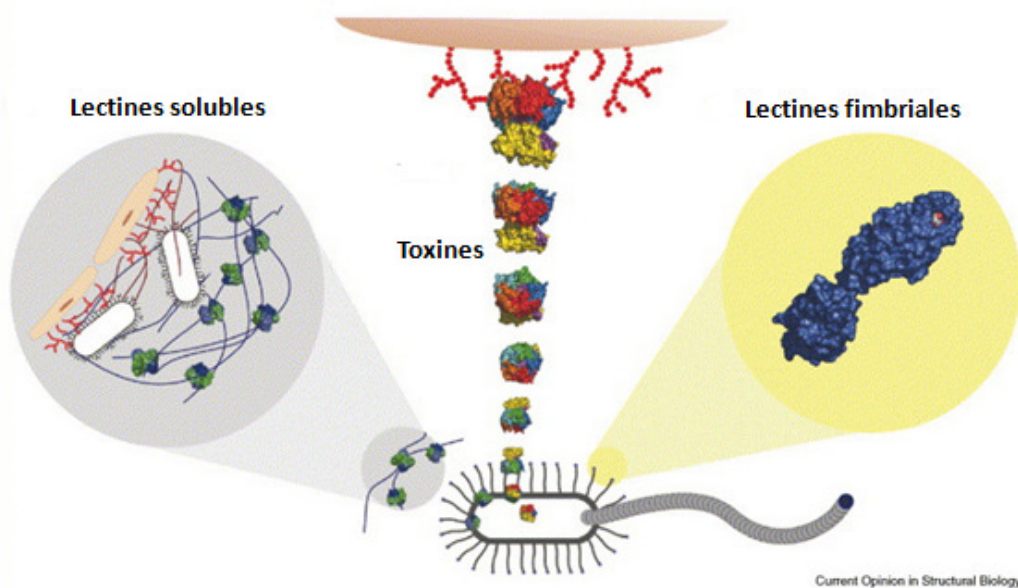


Figure 15. Les différents types de lectines bactériennes [45].

2.2.1.1 Les lectines solubles

Les lectines solubles regroupent toutes les protéines solubles exprimées par la bactérie se liant spécifiquement à des glucides et ne montrant pas d'activité enzymatique. Elles peuvent être cytoplasmiques ou secrétées dans le milieu extracellulaire de la bactérie. Peu de structures de lectines bactériennes solubles ont été caractérisées dans la littérature. La

bactérie *Pseudomonas aeruginosa*, par exemple, produit deux lectines solubles PA-IL et PA-III particulièrement associées aux facteurs de virulence lors des infections survenant chez les patients atteints de mucoviscidose ^[32].

2.2.1.2 Les toxines

Les toxines bactériennes sont des protéines, secrétées par la bactérie, dotées d'une activité toxique directe dans les cellules cibles. Plusieurs processus induit par la toxine sont responsables de l'endommagement de la cellule, notamment, la rupture de la paroi cellulaire, l'inhibition de la synthèse protéique ou encore l'activation des métabolismes secondaires. Parmi les toxines bactériennes les plus étudiées on cite les toxines du type AB₅. Elles sont secrétées par différents microorganismes tels que *Vibrio cholerae*, certaines souches d'*Escherichia coli*, *Shigella dysenteriae* et *Borderella pertussis*. Ces toxines sont formées d'une sous-unité A, responsable de l'activité enzymatique, et d'une ou plusieurs sous-unités B, conçues pour reconnaître spécifiquement les sialogangliosides présents sur la surface cellulaire ^[46].

2.2.1.3 Les lectines fimbriales

Certaines bactéries, principalement les Gram négatif et exceptionnellement les Gram positif, présentent à leurs surfaces des organelles dites fimbriae ou *pili*. Les *pili* interviennent dans divers processus, notamment, la reconnaissance et l'adhésion sur les cellules. Ils sont donc les principaux responsables de processus pathogènes envers les organismes eucaryotes. Les *pili* sont des structures protéiques filamenteuses de 1 à 2 µm de longueur exprimés en centaines de copies à la surface de la bactérie. Trois types de *pili* ont été distingués; les *pili* de type IV, les *pili* de type P et les *pili* de type I. Bien que de natures différentes, l'organisation structurale des *pili* est similaire ^[47]. Le mode d'assemblage des *pili* de type I et ceux de type P est le même. Il fait intervenir une voie dite chaperone-usher ^[48], ^[49]. La partie principale qui émerge de la surface de la bactérie est une longue structure hélicoïdale polymérique rigide, assemblée à partir des nombreux monomères. Les sommets des *pili* peuvent contenir une lectine (adhésine) reliée au dernier monomère du *pilus* par une partie flexible (monomères adaptateurs).

2.2.2 Lectine d'*Escherichia coli* uropathogène

Les *pili* de type I et de type P d'*Escherichia coli* ont été largement étudiés et sont bien caractérisés. Bien que normalement un germe commensal du tractus intestinal des mammifères, *E. coli* est également souvent associée à un certain nombre de maladies infectieuses. Sa pathogénicité est reliée aux *pili* qu'elle exprime à sa surface. L'infection du tractus urinaire est l'une des maladies infectieuses dont *E. coli* serait responsable.

2.2.2.1 Les infections urinaires chroniques

Les infections du tractus urinaire (UTIs dites aussi cystites) sont fréquentes dans la population. Aux USA, les UTIs sont responsables pour plus de 7 millions de visites médicales par an ^[50]. En France on estime qu'il s'agit du deuxième motif de consultation et surtout de prescription par un médecin d'antibiotiques. Ayant une anatomie plus sujette à l'infection, les femmes sont les plus touchées par les infections ^[50]. On estime qu'environ 50% des femmes souffriront d'une UTI au moins une fois dans leur vie ^[51]. Au regard de ces données, il apparaît urgent de considérer les UTIs comme un problème de santé publique. Un fait problématique serait la récurrence de l'infection et son caractère chronique avec le retour des symptômes de la maladie après quelques mois de la première infection. Comme toutes les infections bactériennes, les UTIs sont traitées aux antibiotiques. Cependant, face à l'explosion des résistances bactériennes aux antibiotiques, la nécessité de rationaliser leurs utilisations semble devenir indispensable. Plusieurs études ont été menées afin de pouvoir comprendre le mécanisme de l'infection et de concevoir de nouvelles stratégies thérapeutiques.

2.2.2.2 Cycle d'infection des cellules uroépithéliales à *E. coli*

La première étape de l'infection a lieu suite au contact entre la bactérie *E. coli* uropathogène (UPEC) et les cellules superficielles du tractus urinaire. En effet, l'adhésine FimH à l'extrémité des *pili* de type I reconnaît spécifiquement les mannoses terminaux sur les uroplakines Ia, une glycoprotéine abondamment exprimée par les cellules uroépithéliales en parapluie (« Umbrella cells ») ^[52]. Malgré la réponse immunitaire déclenchée suite à l'infection, une sous-population d'UPEC échappe aux mécanismes de défense immunitaire (sécrétion de cytokines et recrutement de neutrophiles). Une invasion des cellules

uroépithéliales survient alors via un mécanisme dépendant des *pili* de type I. l'invasion peut s'étendre aux cellules profondes du tractus. Cependant, les individus dotés d'un système immunitaire robuste réussissent à se débarrasser de cette nidification intracellulaire de bactéries par exfoliation des cellules superficielles et l'évacuation de ces cellules infectées avec l'urine ^[53]. Généralement, les bactéries restent dans le cytosol des cellules profondes où elles s'y répliquent et se développent en communautés bactériennes intracellulaires (IBCs) (Figure 16). Après maturation des IBCs, les bactéries se dispersent dans la lumière du tractus urinaire sous forme filamenteuse ce qui leur permet d'échapper à la phagocytose par les neutrophiles ^[54]. Une invasion des cellules avoisinantes rétablit alors l'infection. En effet, même après la guérison d'une première infection, une récurrence est souvent constatée due à l'emmagasinement des bactéries pendant plusieurs jours et même plusieurs semaines dans les cellules. Dans la Figure 16 est résumé le cycle de l'infection urinaire.

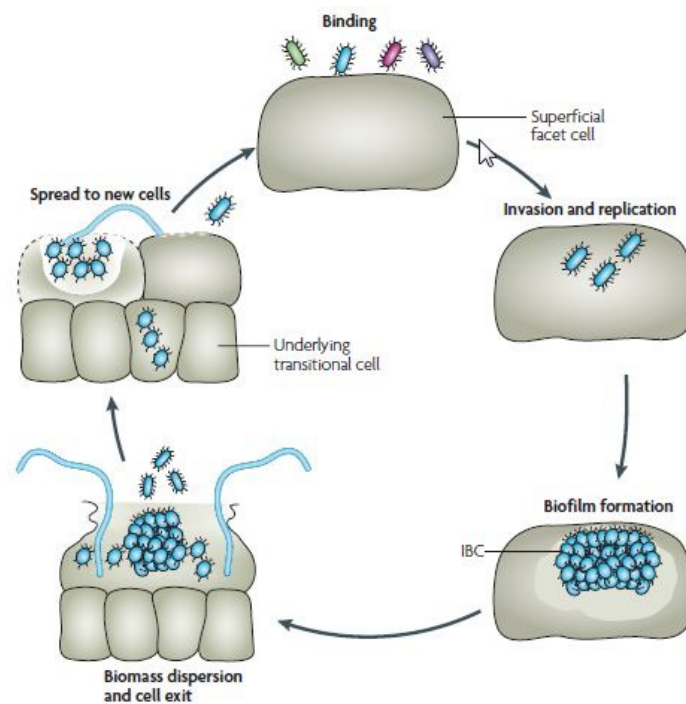


Figure 16. Cascade pathogénique d'*E. coli* uropathogène dans les infections urinaires [51].

2.2.2.3 *Pili* de type I et lectine fimbriale FimH

Chez la bactérie UPEC, les *pili* de type I sont responsables de l'attachement de la bactérie au niveau du tractus urinaire, de son invasion et de la formation des biofilms ^[51]. Selon la construction génétique du gène *fim*, la structure des *pili* de type I est composée de deux parties distinctes : une tige hélicoïdale rigide sur laquelle est connectée une partie

distale plus souple (Figure 17 C). La partie rigide de 7 nm d'épaisseur ^[55], est constituée de 500 à 3000 sous unités FimA, la piline majeure dans la structure du *pilus*. Les sous unités FimA sont entassées dans une forme hélicoïdale ^[55]. La partie distale, de 3 nm d'épaisseur ^[55], se compose d'une succession de protéines adaptatrices FimF, FimG et de la sous-unité FimH qui est elle-même composée d'une piline FimH (responsable de la fixation aux *pili*) et d'une adhésine FimH (responsable de la fixation aux cellules hôtes). La piline et l'adhésine FimH sont reliées entre elles par un inter-domaine. La longueur du *pilus* de type I varie d'un peu moins que 1 µm et peut atteindre 3 µm ^[55].

Les *pili* sont synthétisés via une voie de synthèse hautement conservée dite voie chaperonne-usheer (Figure 17 C) ^[48]. Selon cette voie, la protéine néo-synthétisée est prise en charge dans le périplasme par les protéines chaperonnes, FimC. Ces dernières sont chargées de conduire chaque sous unité composant le *pilus*, au niveau de la protéine usheer, FimD, localisée dans la membrane externe et qui sert comme base de fixation pour le *pilus*.

Les *pili* de type I portent à leurs extrémités des adhésines FimH (Figure 17 A) ^[55] qui leur confèrent leur propriété adhésive. En effet, la présence du FimH à l'extrémité des *pili* permet à la bactérie de se fixer à leurs hôtes par l'intermédiaire d'une interaction sucre-lectine spécifique entre les FimH et les uroplakines Ia. Ces dernières, fortement mannosylées, sont présentes dans le glycocalyx des cellules uroépithéliales ^{[52], [54]}.

L'adhésine FimH a été caractérisée par cristallographie en présence d'oligomannose-3 (Figure 17 B) ^[54]. Le mannose semble être piégé dans une poche profonde chargée négativement entre deux résidus tyrosine (Tyr 48 et Tyr 137), appelée à juste titre la poche tyrosine. Une mutation du FimH au niveau du site de liaison au mannose (comme par exemple le mutant Q133) engendre une diminution significative de la virulence constatée dans un modèle murin d'infection urinaire ^{[56], [57]}.

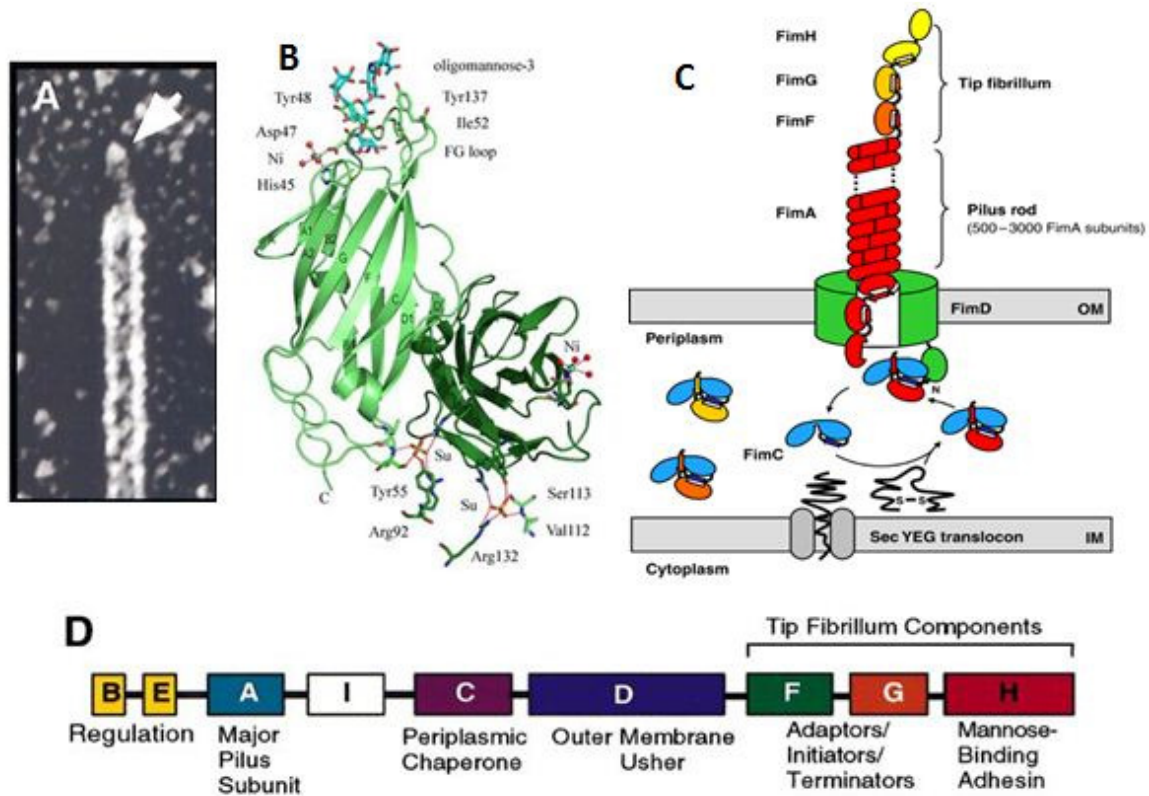


Figure 17. Pili de type I d'*Escherichia coli* uropathogène. (A) Micrographie électronique à haute résolution d'un pilus de type *pili* I, révélant sa structure composite ; La flèche indique l'extrémité du pilus contenant l'adhésine FimH. (B) Structure cristalline du FimH en complexe avec l'oligomannose-3. (C) Schématisation de la voie de synthèse chaperonne-usher des pili de type I chez *E.coli*. (D) Organisation génétique des pili de type I [48], [54], [58].

Suite à la mise en évidence de la préférence des FimH envers les uroplakines Ia fortement mannosylées, plusieurs équipes de recherche se sont intéressées à l'étude et la caractérisation de l'affinité de l'adhésine FimH vis-à-vis de différents mono ou oligomannosides. Un des premiers travaux menés à ce sujet a été consacré à l'étude de l'inhibition de l'agglutination d'érythrocytes et de levures par *E.coli* en présence de $\text{Man}\alpha 1,3\text{Man}\beta 1,4\text{GlcNAc}$ [59]. Les résultats de cette étude démontrent un fort potentiel inhibiteur de ce tri-saccharide et suggèrent sa forte fixation dans la poche de fixation du mannose. Récemment, cette suggestion a été confirmée suite à la détermination par SPR de la constante d'affinité de l'interaction FimH- $\text{Man}\alpha 1,3\text{Man}$ évaluée à $K_d \approx 200 \text{ nM}$ [60]. Dans la même étude, Bouckaert et al. constatent que l'interaction du FimH à l'oligomannose-3 et l'oligomannose-5 portant un chitobiose en position $\beta 1,4$ présente une affinité plus importante avec un $K_d \approx 20 \text{ nM}$ [60].

Un effet de multivalence a été noté dans la littérature. En effet, Zhou et *al.* constatent que l'interaction entre une seule adhésine FimH et une uroplakine Ia présente une faible affinité. Cependant, l'interaction entre plusieurs FimH et plusieurs uroplakines Ia présente une forte affinité et une stabilité du complexe FimH-uroplakine ^[52].

Bien que l'adhésine FimH soit le principal responsable de l'adhésion aux cellules uroépithéliales, des recherches récentes ont mis en évidence que les autres sous unités Fim (piline FimH, FimF et FimG) jouent un rôle important dans le maintien et la résistance de l'adhésion aux forces externes. Ainsi, une dépendance de la force d'adhésion à la structure du *pilus* a été notée. En effet, une altération de la spécificité de la reconnaissance, entre le FimH et les mannoses des uroplakines Ia, a été reportée suite à l'expression du FimH dans une structure hétérologue au *pilus* de type I ou à la considération du FimH en dehors de son cadre d'origine (le *pilus*) ^[61]. De plus, l'affinité de l'adhésine FimH aux résidus mannosylés est largement améliorée (jusqu'à 300 fois) suite à une mutation au niveau de l'inter-domaine reliant la piline à l'adhésine FimH ^[62]. En effet, ces travaux ont prouvé la présence, dans l'inter-domaine, d'un site de fixation induit par le ligand (LIBS ; « ligand induced binding site ») qui n'est exposé, dans le FimH, qu'en présence du mannose. Ces constatations rappellent un mécanisme allostérique ^[63]. Par ailleurs, une notion de résistance au force de cisaillement par l'établissement de « catch-bonds » entre le FimH et les résidus mannosylés qu'il fixe, a été évoquée par l'équipe de Thomas et *al.*, pour expliquer la résistance des bactéries et des biofilms bactériens aux flux urinaires ^[62]. Dans leur étude, Thomas et *al.* ont suggéré que la mise en place des « catch-bonds », définies comme étant des liaisons renforcées par la traction mécanique, fait appel à un mécanisme allostérique ^[62]. Ces résultats ont permis de mettre en évidence qu'une traction mécanique appliquée au *pilus* facilite l'altération de l'inter-domaine et engendre ainsi la séparation des deux domaines (piline et adhésine). Cela décale le FimH d'une faible affinité vers une forte affinité pour le mannose. La même équipe a repris la notion de résistance à la traction mécanique, évoquée précédemment, dans une étude par spectroscopie de force réalisée par O. Yakovenko et *al.* ^[64]. Leurs travaux ont confirmé les suggestions et constatations obtenues précédemment. En travaillant sur la partie distale du *pilus* de type I de *E.coli*, ils ont reporté des forces d'adhésion passant de 60 pN à 180 pN en augmentant la force de séparation du complexe FimH-mannose. Ils ont ainsi ramené une preuve indiscutable de l'allostérie de la liaison

FimH-mannose soumise aux forces de traction mécanique. Dans le même contexte, une étude structurale a été menée pour caractériser les changements structuraux qui touchent la partie distale des *pili* soumis à une traction mécanique (Figure 18) [65]. Le domaine de fixation du mannose sur l'adhésine FimH est relié au domaine piline dans un modèle de crochet. La configuration en crochet est très stable dans les situations de dynamique moléculaire où aucune force externe n'est exercée. Cependant, en présence d'une force de traction externe, la configuration en crochet facilite la séparation des domaines adhésine et piline, permettant à l'adhésine FimH de passer d'une faible à une forte affinité. La configuration entre le domaine piline du FimH et la sous-unité FimG suivante est ouverte et stable, même lorsqu'une force de traction est appliquée. Cette configuration ouverte qui relie FimH à FimG forme un bras de levier permettant la résistance au cisaillement. Enfin, la configuration entre la sous-unité FimG et la sous-unité FimF est très flexible, même en l'absence de force de traction, ce qui confère à l'adhésine FimH une liberté d'orientation et une plus forte probabilité de liaison.

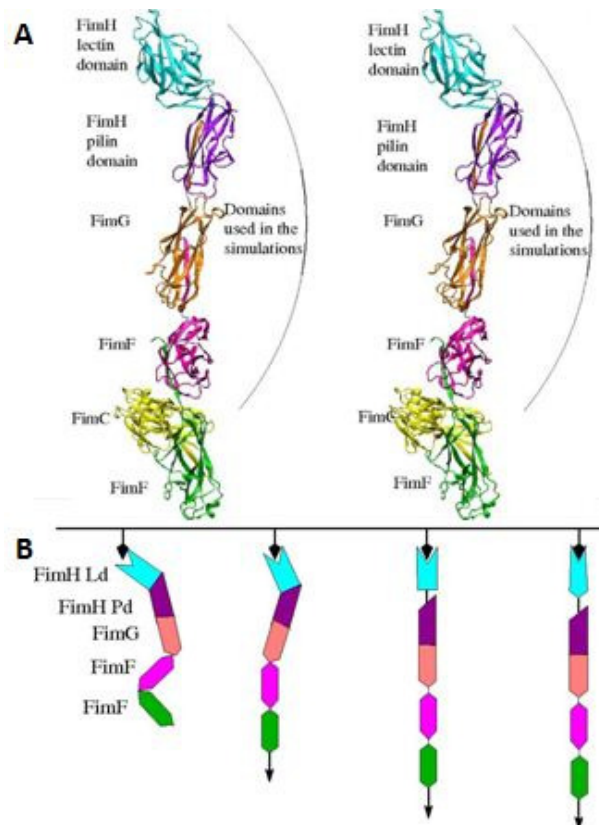


Figure 18. Configuration de la partie distale des pili de type I. (A) Structure cristallographique de la partie distale des pili. (B) Modélisation de la modulation de la configuration de la partie distale du *pilus* en présence d'une force de traction [65].

La configuration de la partie distale du *pilus* de type I d'*E.coli* est optimisée afin de lui permettre une double fonctionnalité ; une exploration flexible et une liberté d'orientation pour une meilleure probabilité de fixation d'un côté et une résistance aux forces de traction et au détachement de l'autre côté. La comparaison avec d'autres systèmes suggère que cette propriété est commune aux complexes adhésifs bactériens et eucaryotes indépendants qui doivent fonctionner dans des conditions dynamiques ^[65].

2.2.2.4 Stratégie antiadhésive contre les infections urinaires chroniques

En plus de démontrer sans équivoque que la reconnaissance par les lectines bactériennes des sucres à la surface cellulaire est une condition préalable à l'infection par les bactéries, les données ci-dessus constituent une preuve irréfutable de la validité du concept de la stratégie antiadhésive dans la thérapie des maladies infectieuses ^[66]. D'un point de vue médical, l'intervention moléculaire de ce type d'agent thérapeutique peut être considéré comme moins agressive, plus écologique et plus sécurisée, par rapport aux approches de thérapies chimiques actuelles. Etant peu toxiques et peu immunogènes, les sucres sont idéaux à cet effet ^[66]. En particulier, étant donné que beaucoup de ceux qui inhibent l'adhésion bactérienne sont des constituants physiologiques de la surface des cellules ou des fluides corporels, tels que le lait maternel ^[66]. En outre, puisque les agents antiadhésifs n'agissent pas en détruisant ou en inhibant la croissance des agents pathogènes, il est très probable que les souches résistantes à ces agents vont émerger à un taux nettement inférieur à celles qui sont résistantes aux antibiotiques, et que leur propagation dans l'environnement sera minime ^[66].

Les nombreux atouts que présente la stratégie antiadhésive ont suscité l'attention de plusieurs équipes de recherche et les ont incitées à développer les connaissances sur le sujet. Une des clés de réussite de cette stratégie concerne l'affinité des lectines bactériennes pour les ligands synthétiques qui doit obligatoirement être plus forte que celle pour les saccharides des cellules hôtes. Dès lors, la recherche des molécules candidates efficaces est en plein essor. Dans ce contexte, trois approches ont été développées : le mime de la multivalence naturelle des interactions sucre-lectine ^{[67], [68]}, la conception de ligands basée sur une chimie rationnelle favorisant la fixation du sucre dans la lectine ^{[54], [69], [70],[71], [72]} où encore la combinaison des deux en développant des systèmes multivalents à base de molécules résultantes d'une conception rationnelle ^{[6], [73], [74], [75]}.

La stratégie antiadhésive comme nouvelle approche thérapeutique pour les infections urinaires chroniques a ainsi été investie par plusieurs équipes de recherche. Disney et *al.* se sont basés sur la première approche et ont synthétisé et étudié, par microscopie confocale à balayage laser, des glyco-polymères multivalents fluorescents [67]. Ils ont ainsi constaté la formation d'agrégats fluorescents de bactéries (*E. coli*) sous l'effet de l'ajout des ligands synthétiques multivalents fluorescents à la suspension bactérienne [67].

Dans une autre approche, Bouckaert et *al.* ont opté pour la rationalisation de la chimie des molécules candidates pour une meilleure fixation sur les lectines bactériennes [69]. Dix molécules candidates ont été testées par SPR et les constantes d'équilibre ont été rapportées à celle obtenue dans l'interaction FimH-mannose simple [69]. Dans les résultats présentés dans le Tableau 2, un composé, le mannoside d'heptyle, se distingue des autres. Avec un K_d de 5 nM, il présente une affinité 460 fois meilleure pour le FimH que le mannose simple.

Tableau 2. Paramètres cinétiques et thermodynamiques déterminés pour l'interaction de composés mannosylés avec le FimH [69]

Ligand	K_d SPR(nM)
Mannose	2.3×10^3
Methylaman	2.2×10^3
Ethylaman	1.2×10^3
Propylaman	300
Butylaman	151
Pentylaman	25
Hexylaman	10
Heptylaman	5
Octylaman	22
PNPaman	44
MeUmbaman	20

Les mannosides aromatiques sont de puissants inhibiteurs du FimH. Ils sont jusqu'à 1000 fois plus actifs que le méthyle-mannose. Ils expriment des affinités de l'ordre du nano-molaire [76]. Cela est dû à la présence, dans le FimH, d'une région hydrophobe à côté du site de fixation du sucre et la possibilité d'établir des liaisons de type π - π entre la partie aglycone du composé aromatique avec la poche tyrosine dans le FimH [70], [76]. Ainsi, des mannosides aromatiques ont été étudiés par Hartmann et *al.*, tel que le *para*-nitrophenyl α -D-mannopyranoside (pNPMAN), le *para*-[N-(4-Ethylamino-2,3-dioxocyclobut-1-enyl)amino]phenyl α -D-mannopyranoside (SAMAN), ou encore le *E-para(ortho-*

Methoxycarbonyl-phenylazo)phenyl α -D-mannopyranoside(AzoMan) ^[72]. La cytotoxicité ainsi que l'efficacité des différents composés ont été évaluées. Le SAMan exprime un fort potentiel inhibiteur du FimH mais présente un problème de solubilité. L'AzoMan exprime aussi un potentiel inhibiteur considérable, cependant, il présente une cytotoxicité relativement élevée. Le choix des molécules candidates pour des fins thérapeutiques sera donc un compromis entre l'efficacité, la solubilité et la cytotoxicité du composé testé ^[72].

Les avancées réalisées dans ces deux approches (multivalence et synthèse rationnelle) ont profité au développement de la troisième approche. A titre d'exemple, Schierholt et *al.* ont synthétisé et étudié des glycopeptides à mannopyranosides di et trivalents qui diffèrent par leurs propriétés conformationnelles et par l'arrangement spatial des résidus mannoses ^[70]. Le potentiel des composés synthétisés à inhiber l'adhésion d'*E.coli* a été rapporté à celui du méthyle α -D-mannopyranoside comme molécule de référence. Il a été démontré que les échafaudages de α -D-mannopyranosides sur un squelette peptidique étaient importants pour la performance des glycopeptides synthétisés comme inhibiteurs de l'adhésion bactérienne ^[70].

Au regard des résultats obtenus précédemment par Bouckaert et *al.*, rapportant la forte affinité du heptyle-mannoside (HM) vis-à-vis du FimH, les équipes de Gouin et Kovensky ont procédé à la conception de composés multivalents à HM ^{[73], [75]}. Dans une première étude, Gouin et *al.* ont synthétisé des ligands à base de HM différents par leur valence portant 1, 2, 3 ou 4 HM, par « copper-catalysed azide alkyne cycloaddition » (CuAAA) et sur une base triazole, ^[73]. Le potentiel des molécules synthétisées à inhiber l'adhésion des bactéries UPEC sur les cellules humaines du conduit urinaire a été évalué par « Binding Bladder Assay » (BBA). Le composé tétravalent a exprimé un potentiel inhibiteur 6000 et 64 fois meilleur que le mannose et le HM, respectivement ^[73]. Plus récemment, les équipes de Gouin et Kovensky ont développé de nouvelles molécules glycosylées multivalentes (1, 2, 3 et 7 HM) montées sur une charpente d'hydrate de carbone ^[75]. Un effet de la multivalence a été constaté suite à l'étude de l'inhibition de l'hémagglutination par les ligands HM de différentes valences. De plus, l'analyse de l'affinité des ligands synthétisés par titration calorimétrique isotherme (ITC) ont confirmé l'influence positive de la valence pour les ligands mono, di et trivalents ^[75].

La capacité des sucres à protéger les animaux contre l'infection urinaire par des bactéries a été démontrée pour la première fois par l'équipe de Sharon et *al.* en 1979, dans un modèle d'infection des voies urinaires chez la souris^[77]. La co-administration de méthyle α -mannoside avec UPEC dans des modèles murins d'infection urinaire réduit de 67% le taux de l'infection^[77]. L'effet protecteur des sucres antiadhésifs a été démontré par la suite dans une série d'études menées avec différentes bactéries pathogènes et des animaux modèles. Par exemple, des veaux nouveau-nés privés de colostrum, qui avaient reçu une dose mortelle de la bactérie *E. coli* K99 ont été guéris en leur administrant de l'eau contenant des glycopeptides (préparés à partir de glycoprotéines de plasma de vache). Le traitement a diminué de 100 fois le nombre de bactéries qui ont adhéré aux cellules épithéliales de l'intestin des veaux^[78]. Bien que les glycopeptides utilisés n'aient pas été analysés en détail, il est très probable qu'ils contenaient le résidu NeuGc(α 2–3)Gal-R reconnu par les bactéries. Chez les lapins et les rats nouveau-nés, la pneumonie expérimentale causée par *S. pneumoniae* a été nettement réduite par l'administration de néoglycoprotéines ou d'oligosaccharides par voie nasale ou trachéale^[79]. Dans une autre étude, douze singes rhésus infectés par *H. pylori* ont été traités avec le sel de sodium de Sia3'Lac seul ou en combinaison avec l'un des médicaments antiulcéreux couramment utilisés (par exemple le sous-salicylate de bismuth qui est un agent d'enrobage gastrique) et/ou l'oméprazole (un inhibiteur de la pompe à protons)^[80]. Sur les six singes qui ont reçu le trisaccharidique seul, deux ont été complètement guéris, et un troisième animal a été partiellement guéri, les autres n'ont pas été guéris. Les six autres singes ont reçu le tri-saccharidique avec les médicaments antiulcéreux dans différentes combinaisons. Une baisse transitoire du nombre de colonies a été observée chez trois de ces animaux dont deux ont été complètement guéris. Aucun effet secondaire n'a été observé suite à ce traitement, démontrant par là, la sécurité de la stratégie antiadhésive. Bien qu'étudiée depuis une trentaine d'années, le succès de la stratégie antiadhésive dans une application médicale n'a toujours pas été rapporté à ce jour^[3].

2.3 Les lectines végétales

Les lectines végétales ont marqué les débuts de la lectinologie lorsqu'en 1888 un extrait de *Ricinus communis* a montré la capacité à agglutiner les érythrocytes^[59]. Il a été

démontré que la ricine était à l'origine de l'agglutination par des interactions de type sucre-lectine ^[59]. Par ailleurs, la ConA a été la première lectine extraite et purifiée de graine de *Concanavalia ensiformis*. L'abondance des lectines végétales, leur solubilité et leur large gamme de reconnaissance font d'eux de bons modèles d'étude et de précieux outils dans les applications biomédicales et biotechnologiques ^[81].

2.3.1 Généralité sur les lectines végétales

Les lectines de légumineuses représentent la plus grande et la plus étudiée famille des lectines simples. Ces lectines sont constituées d'un petit nombre de sous unités, pas forcément identiques, chacune ayant une masse moléculaire généralement inférieure à 40 kDa ^[81]. Environ 100 lectines ont été identifiées dont la majorité proviennent de graines de légumineuses ^[81]. Les lectines de légumineuses possèdent une grande homologie de structures et de séquences. Appartenant à la famille des lectines simples, elles sont généralement composées de 2 ou 4 monomères de 25-30 kDa. Chaque monomère est constitué d'une chaîne de polypeptides de 250 acides aminés présentant une ou deux chaînes d'oligosaccharides. Les monomères présentent chacun un site de reconnaissance spécifique à un sucre. Un ion métallique Ca^{2+} ainsi qu'un ion de transition, souvent le Mn^{2+} , sont généralement présents au niveau des sites de reconnaissance. Chez les lectines des légumineuses, approximativement, 20% des acides aminés sont invariants et 20% sont similaires. La résolution des structures 3D d'une dizaine de lectines de légumineuses a montré que chaque sous-unité est constituée en grande partie, soit près de 60%, de feuillets β reliés entre eux par des boucles. Pour toutes les lectines connues à ce jour, la structure tertiaire est formée de deux feuillets β , six brins avant et sept brins arrière, connectés entre eux par cinq feuillets β . Cet arrangement génère une structure bien connue des lectines en « jellyroll » dite aussi « lectin fold » ^[81]. La structure des sous-unités des différentes lectines peut être superposée, indépendamment de la spécificité des lectines. Malgré leurs structures primaires, secondaires et tertiaires similaires, les lectines de légumineuses présentent une très grande variabilité de structures quaternaires ^[81]. De petites différences dans les séquences en acides aminés au niveau de l'interface entre monomères ainsi que la présence ou non de glycosylation affectent le mode d'association des sous-unités formant la lectine. Dans le cas des lectines avec une structure quaternaire canonique, tel que la ConA, la dimérisation implique l'alignement côte à côte dans un sens antiparallèle des six feuillets β

de chaque monomère. Cette arrangement conduit à la formation d'une continuité de douze feuilletts qui s'étendent au long de l'interface du dimère. Une deuxième dimérisation successive à la première engendre le tétramère de lectine retrouvé dans des conditions physiologiques.

2.3.2 Lectine d'*Arachis hypogaea*

La lectine d'arachide (PNA pour « peanut agglutinin »), localisée dans le corps protéique de la graine, a été largement étudiée dans la littérature depuis une quarantaine d'années. Elle a été purifiée pour la première fois en 1975 par chromatographie d'affinité dans l'équipe de Nathan Sharon^[82]. L'établissement d'un protocole de purification de la PNA a ouvert les portes à sa caractérisation structurale et biochimique.

2.3.2.1 Affinité et caractéristique

La PNA appartient à la famille des lectines spécifiques au galactose/acide N-acétylgalactosamine^{[3], [29]}. Elle a par ailleurs démontré une forte affinité vis-à-vis du Gal β 3GalNAc (dit T-antigène), un glycane caractéristique des O-glycoprotéines^[83]. L'affinité de la PNA vis-à-vis des résidus galactosylés a été étudiée dans la littérature en se basant sur la détermination des paramètres cinétiques de l'interaction entre la PNA et le méthyle α et β -D-galactopyranoside^[84]. L'interaction de la PNA avec le méthyle-D-galactopyranoside (α et β) a révélé des k_{on} de $4,6 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ et $3,6 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ respectivement^[84]. Dans une autre étude, Pratap et *al.* ont combiné l'étude de la dynamique moléculaire et la cristallographie afin d'élucider l'interaction entre la PNA et le T-antigène d'une part et le lactose d'autre part^[85]. Les résultats de l'étude de l'interaction ont révélé une affinité de la PNA, plus élevée pour le T-antigène que pour le lactose. La structure cristalline des complexes PNA-sucre indique que la forte affinité envers le T-antigène fait intervenir un nombre plus élevé de ponts entre les partenaires de l'interaction via plus de molécules d'eau (Figure 19).

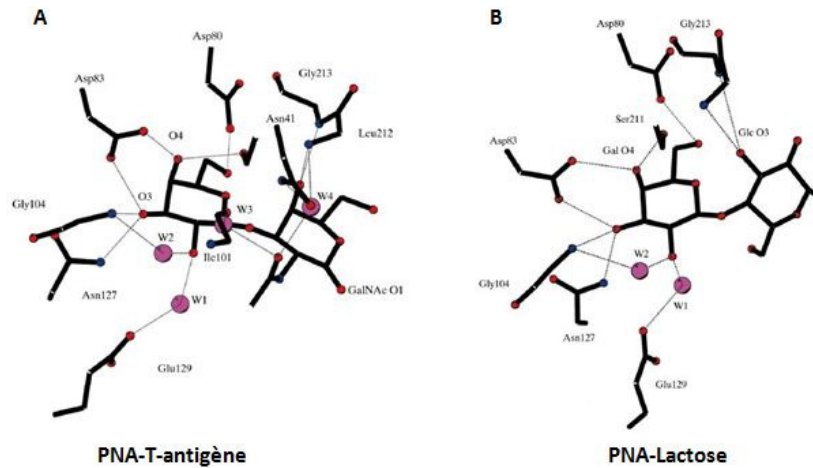


Figure 19. Réseau des interactions PNA-ligands. Schématisation de la structure du site de reconnaissance en présence du (A) T-antigène et (B) lactose [85]

Dans le même contexte d'étude de l'interaction de la PNA avec le T-antigène, Adhikari *et al.* ont étudié le rôle du résidu Asn41 dans l'interaction en se basant sur une mutation de la PNA [86]. En effet, il a été reconnu que l'interaction entre le résidu Asn41 et l'oxygène du groupe acétamide présent sur le ligand est impliquée dans la spécificité envers le T-antigène [85]. Les résultats de l'étude, par inhibition de l'hémagglutination et par SPR, de l'interaction entre les différentes PNA (recombinantes et mutantes) et le T-antigène ont mis en évidence le rôle joué par le résidu Asn41 dans la reconnaissance spécifique. Des constantes cinétiques d'association et de dissociation de $5,9 \pm 0,15 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ et de $0,03 \pm 0,0007 \text{ s}^{-1}$, respectivement, ainsi qu'une constante d'affinité K_a de $1,96 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$ ont été déduites pour l'interaction de la PNA avec le T-antigène. Parmi les mutants étudiés une baisse de l'affinité voire même une non reconnaissance ont été notées. Cependant, une nette amélioration de l'affinité a été constatée pour l'un des mutants avec une constante d'équilibre de dissociation de $3,15 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$. Ce résultat valide le concept de l'amélioration de l'affinité par mutation dirigée de site de reconnaissance des lectines [86].

2.3.2.2 Structure

➤ Structure dépendante du pH

Comme la majorité des lectines végétales, l'état d'assemblage des monomères constituant la PNA dépend du pH [81]. La PNA est tétramérique à pH neutre et elle se dissocie réversiblement à pH inférieur à 5,1 [87]. A pH inférieur à 3,4 la PNA est complètement et irréversiblement dimérique [88]. La taille de la PNA, à deux pH différents, a été évaluée par

Dev et *al.* qui ont utilisé la technique DLS (« dynamic light scattering ») pour évaluer le rayon hydrodynamique de la PNA. Le rayon de la PNA globulaire a été évalué théoriquement à 3,15 nm. Cependant, les mesures DLS ont révélé un rayon hydrodynamique de la PNA tétramérique de 3,9 nm ^[89].

➤ *Assemblage des sous unités*

La PNA se présente sous forme d'un homo-tétramère non-glycosylé et dont chaque monomère fait 27 kDa ^{[82], [90]}. Comme la majorité des lectines de légumineuses, la PNA présente une structure tertiaire classique avec deux feuillets β , six brins avant et sept brins arrière, connectés entre eux par cinq feuillets β . Cependant, la PNA se distingue des autres lectines de légumineuses par une structure quaternaire ouverte ^[81] (Figure 20 C). La PNA a été reconnue comme formant un dimère de dimère. Chaque dimère est composé par l'association dos à dos de monomères 1-4 et 2-3 ^[91] (Figure 20 A). La dimérisation des monomères 1 et 2 est canonique. Ainsi, l'interface entre ces deux monomères consiste en un alignement côte à côte des feuillets β pour former une continuité de feuillets ^[92] (Figure 20 B). À la différence des autres lectines à dimérisation canonique, le dimère 1-2 de la PNA est stabilisé par des ponts via des molécules d'eau ^[92]. Le second dimère reliant les monomères 3 et 4 est unique à la PNA.

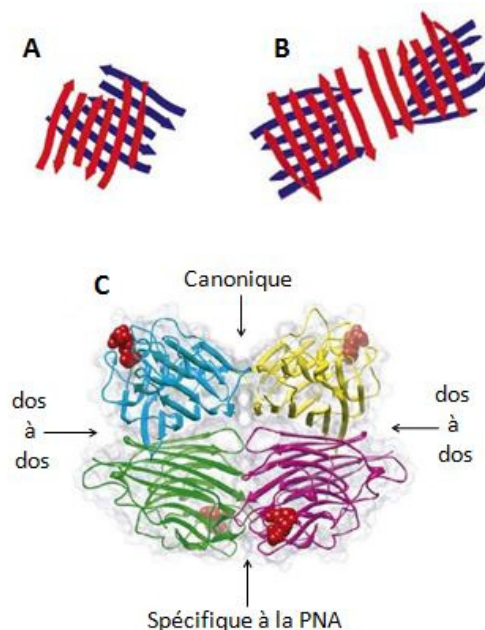


Figure 20. Structuration de la lectine d'arachide. (A) arrangement de monomère dos à dos, (B) schématisation de l'arrangement du tétramère de la lectine d'arachide canonique et dos à dos et (C) structure tridimensionnelle de la lectine d'arachide [92] et [93].

➤ *Structure cristalline*

La PNA a été cristallisée et analysée par diffraction aux rayons X. Une première cristallisation de la PNA a été effectuée par Salunke et *al.* ainsi que par Olsen et Miller en 1982. Olsen et Miller ont mis en place une méthode pour la cristallisation de la PNA en présence et en absence du lactose ^[94]. Les morphologies des cristaux obtenus sont très différentes. Les cristaux du complexe PNA-lactose ont une forme orthorhombique (prismes rectangulaires), tandis que ceux obtenus en l'absence du lactose sont jumelés et rhomboédriques (Figure 21) ^[94]. Dans leur étude, seuls les cristaux contenant du lactose ont été adaptés pour les études de diffraction. Le cristal présentait des dimensions spatiales de $a = 130$, $b = 127$ et $c = 78$ Å. Le volume d'un cristal est de $1,3 \times 10^6$ Å³, avec quatre unités asymétriques ^[94]. Bien que les dimensions spatiales n'aient pas pu être déterminées pour les cristaux jumelés obtenus en l'absence de lactose, elles sont visiblement inférieures à celles obtenues pour le complexe PNA-Lactose ^[94].

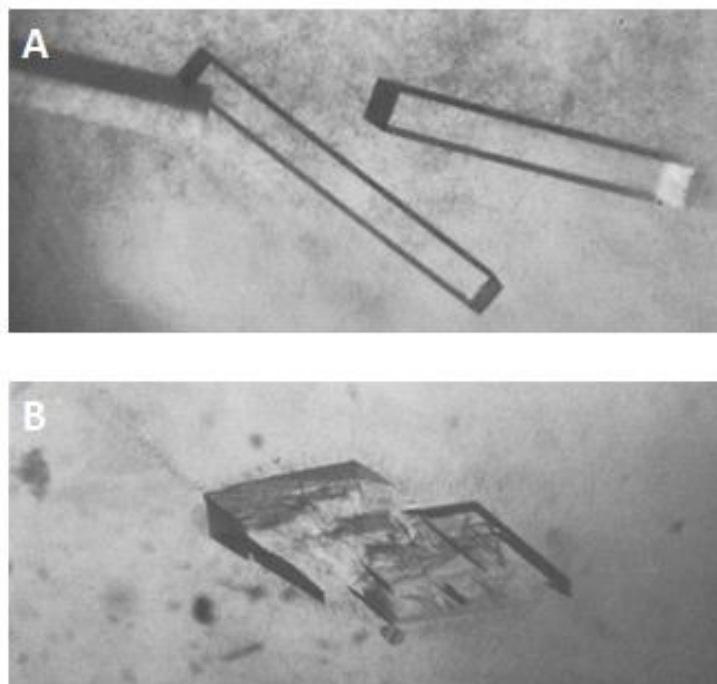


Figure 21. Cristallisation de la PNA. (A) Cristaux de PNA en présence du lactose et (B) Cristaux de PNA sans lactose [94].

Simultanément, Salunke et *al.* ont reporté la cristallisation de la PNA, en l'absence de lactose ^[95]. Leurs cristaux semblent être très semblables à ceux obtenus par Olsen et Miller en présence du lactose. Les dimensions spatiales du cristal ont été évaluées par diffraction à $a = 129,3$, $b = 126,9$ et $c = 76,9$ Å ^[95]. Les résultats des deux travaux combinés suggèrent que la fixation du lactose n'engendrerait pas de transition de la structure. Une deuxième

hypothèse stipule que les cristaux de Salunke et *al.* contiendraient du lactose, qui aurait été utilisé pour purifier la PNA à partir d'une colonne d'affinité ^[94]. Pareillement, un cristal de forme orthorhombique a été obtenu pour la PNA en complexe avec le lactose par Zaluzec et *al.* et dont les dimensions spatiales ont été évaluées à $a = 128,8$, $b = 126$ et $c = 76$ Å ^[96]. De plus, Zaluzec et *al.* reportent pour la première fois la forme et les dimensions du cristal de PNA obtenu en présence d'une phytohormone, la N6-benzylaminopurine (BAP) ^[96]. Le BAP n'étant pas spécifiquement reconnu par la PNA, on pourrait penser que les dimensions obtenues sont celles du cristal de la lectine PNA seule. Ce cristal, stabilisé par la présence du BAP, présente une forme monoclinique et des dimensions spatiales de $a = 67,0$, $b = 35,2$ et $c = 68,6$ Å et $\beta = 68,6^\circ$ ^[96].

Dans la littérature, la cristallographie n'a pas été seulement utilisée pour la caractérisation structurale de la PNA. Elle a également été utilisée dans une approche tout a fait nouvelle par Natchiar et *al.* pour mettre en évidence la multivalence de l'interaction entre la PNA (tétravalente) et un ligand divalent (lactose–azobenzène–lactose, LAL) ^[97]. Les résultats de leur recherche indiquent que la réticulation impliquant les lectines multivalentes et les ligands multivalents pourrait conduire à un ensemble de réseaux périodiques distincts (Figure 22).

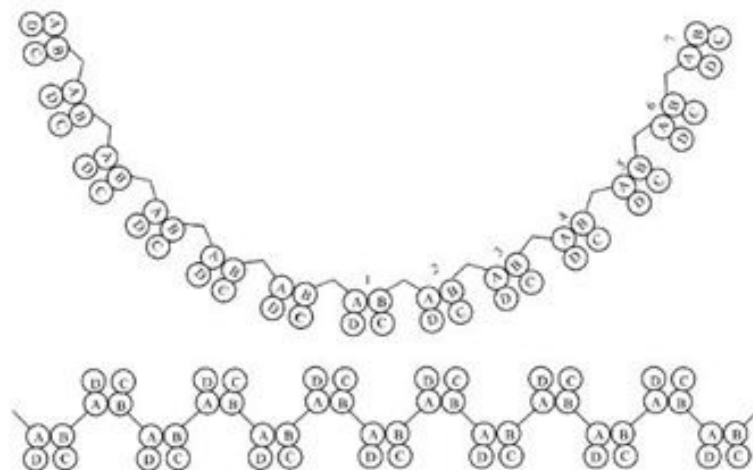


Figure 22. Modèle d'assemblage de la PNA par des ligands divalents. L'assemblage A-B présenté ici est semblable aux assemblages C-D et A-C ^[97].

2.3.2.3 Rôle et utilisations

La spécificité de la PNA vis-à-vis du Gal β 3GalNAc (T-antigène) a permis son utilisation comme outil de biochimie, notamment, comme marqueur de sous populations de lymphocytes. Dans ce contexte, Reiner et *al.* ont constaté la capacité de la PNA à agglutiner

les thymocytes corticaux immatures de souris contrairement aux thymocytes médullaires matures ^[98]. Ces résultats ont servi à mettre en place pour la première fois une méthode facile et efficace pour la séparation, par agglutination sélective, des deux sous populations de thymocytes avec une grande viabilité des cellules. Au regard des nombreux atouts qu'elle présente, cette méthode est devenue très utilisée depuis sa mise en place dans la séparation des sous populations de thymocytes, dans l'étude de la maturation de thymocyte et dans la définition des régions corticales et médullaires du thymus ^[3].

2.4 Outils d'analyse des interactions sucre-lectine

En plus des techniques d'analyse de la reconnaissance discutées précédemment dans la section 1.2, il existe des techniques spécifiques aux interactions sucre-lectine. ces techniques sont le plus souvent basées sur l'analyse de la compétition entre ligands différents pour le même site de reconnaissance de la lectine.

2.4.1 Inhibition de l'hémagglutination (HIA)

L'inhibition de l'hémagglutination (HIA) représente une des premières techniques utilisées pour étudier les interactions sucre-lectine. L'HIA tire profit de la présence, à la surface des globules rouges, de glycoprotéines et de glycolipides permettant à la plupart des lectines de se lier à ces cellules. En déposant les globules rouges en suspension dans un puits à fond conique, une sédimentation naturelle est constatée et un dépôt de globules rouges au fond du puits est observé (test négatif). En absence d'un ligand inhibiteur, la lectine mise en solution réticule les érythrocytes en formant une matrice gélatineuse en suspension dans le puits qui contraste avec la solution homogène de globules rouges (test positif). La mesure de l'inhibition exercée par un ligand sur la réticulation des globules rouges par une lectine est alors possible. En effet, en présence d'un ligand inhibiteur de la lectine, cette agglutination est supprimée et on observe un précipité d'érythrocytes au fond du puits. La Figure 23 ci-dessous résume le principe de la technique HIA.

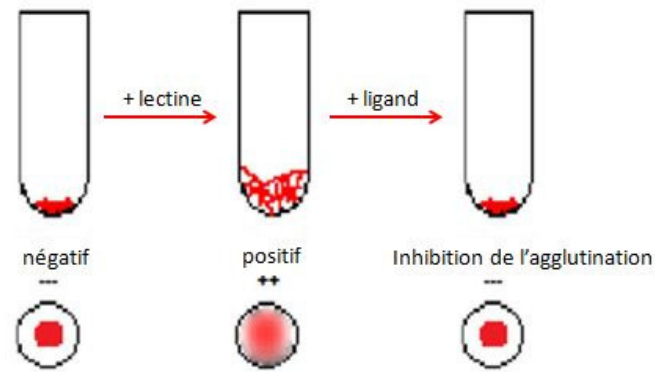


Figure 23. Schéma représentatif de la réticulation des globules rouges induite par les lectines lors du test positif, la sédimentation des globules rouges lors du test négatif et l'inhibition de l'hémagglutination par ajout de ligands spécifiques aux lectines [4]

Après avoir déterminé la concentration minimale de lectine nécessaire pour observer une hémagglutination, il est possible de quantifier l'inhibition de l'hémagglutination sous l'effet d'un ligand. Lorsque le ligand se fixe sur les sites de liaison de la lectine, l'interaction de cette dernière avec les globules rouges sera inhibée. En utilisant des dilutions en série, il est possible de mesurer la concentration minimale du ligand (MIC) qui empêche l'hémagglutination. Cependant, les dilutions induisent une erreur relativement importante puisque une erreur de mesure, correspondant au facteur de dilution, subsiste d'un puits au suivant. Un deuxième inconvénient de cette approche est la dégradation relativement rapide des globules rouges. D'autre part, la provenance du sang, son type, la concentration en globules rouges, la concentration et l'activité de la lectine testée peuvent fortement influencer la valeur de la concentration inhibitrice.

Ainsi, l'approche d'étude des interactions sucre-lectine par HIA est rapide, sa mise en œuvre est simple, mais permet seulement d'évaluer l'affinité des ligands de façon comparative et non de fournir des valeurs absolues d' IC_{50} qui peuvent être comparables [4].

2.4.2 Enzyme-Linked Lectin Assay (ELLA)

L'« enzyme-linked lectin assay » (ELLA) est une variante de la bien connue technique de biochimie l'« Enzyme-linked immunosorbent assay » (ELISA). Avec un principe proche de celui de l'ELISA, l'ELLA utilise une lectine liée à une enzyme afin de quantifier la quantité de lectine accrochée à une surface glycosylée par l'intermédiaire d'une réaction enzymatique catalysée par l'enzyme liée à la lectine. La réaction enzymatique convertit un substrat en un produit coloré dont on peut mesurer la concentration par mesure de l'absorbance en

spectrophotométrie. L'intensité de la couleur mesurée par spectrophotométrie est proportionnelle à la quantité de lectine liée à la surface glycosylée. L'enzyme utilisée est le plus souvent une peroxydase ou une phosphatase. Elle est généralement fixée à la lectine via des liaisons non-covalentes entre une lectine biotinylée et un conjugué streptavidine-enzyme.

Comme pour toute approche biochimique, des contrôles positifs et négatifs sont indispensables afin de confirmer le résultat obtenu. Des tests en absence de ligand et en absence de lectine, permettant d'obtenir les valeurs d'absorbance correspondant à 0% et à 100% d'inhibition respectivement, servent comme référence pour exprimer les résultats des mesures spectrophotométriques en pourcentage d'inhibition de l'adhésion. Ainsi, des courbes d'inhibition sont obtenues desquelles on peut déduire la valeur de l'IC₅₀.

Comme toutes les techniques d'analyse, l'ELLA présente des avantages et des inconvénients qui lui sont propres. Son principal avantage est relatif à sa grande précision. En effet l'obtention de courbes à partir de points expérimentaux permet de déterminer la valeur de l'IC₅₀ et de comparer des IC₅₀ de différents ligands avec une grande précision. Cependant, la technique ELLA est relativement contraignante à mettre en œuvre. En effet, la lectine doit être biotinylée et il est indispensable de vérifier que la biotinylation de la lectine ne modifie pas les caractéristiques de son interaction avec les sucres. De plus, dans le cas de ligands et lectines multivalentes, l'éventuelle formation de réseaux de type glycopolymère-lectine-ligand-lectine peut entraver la conduite de l'expérience.

Un inconvénient commun à ces techniques serait l'incapacité d'étudier les interactions entre sucres et lectines situés sur des surfaces en regard. Cependant, les associations sucre-lectine ayant lieu dans un organisme ne se passent pas exclusivement en solution. En effet, il est fréquent que les partenaires moléculaires soient situés sur des surfaces différentes et que l'interaction se passe à l'interface. On peut citer à titre d'exemple, l'interaction entre la lectine bactérienne FimH à la surface d'UPEC et le mannose des uroplakines Ia du tractus urinaire ^[52]. Dans ce contexte, une nouvelle branche de la biophysique propose, depuis une vingtaine d'année, de nouveaux outils pour l'analyse de la reconnaissance aux interfaces biologiques. Ces outils, comme la microscopie à force atomique (AFM), les pinces optiques, les micropipettes, la cellule à flux laminaire ou le « surface force apparatus » (SFA) permettent d'étudier les caractéristiques des liens ligand-récepteur soumis à une force.

Chapitre 3 : La microscopie à force atomique

Durant ces dernières années, les nanosciences ont pu bénéficier d'un essor considérable et d'une explosion d'avancées qui ont touché un large éventail de disciplines allant des sciences de la vie, à la physique du solide en passant par les sciences des matériaux. À l'origine de cette montée fulgurante des nanosciences au sein de la communauté scientifique, l'invention, dans les années 1980, des microscopes à sondes locales ^[99]. Ces inventions ont permis, via l'exploration de la matière à une échelle nanométrique, de délivrer des découvertes fondamentales et d'apporter des avancées technologiques très prometteuses. L'invention, la mise en place et l'utilisation de ces microscopes ont fait intervenir diverses connaissances interdisciplinaires, notamment, physiques, chimiques, informatiques et biologiques. Dans le domaine de la microscopie à sondes locales, la microscopie à force atomique (AFM) est devenue la technique d'analyse de référence pour l'imagerie et la caractérisation physicochimique et mécanique de surfaces et de matériaux. L'AFM est largement utilisée dans l'imagerie des surfaces à une échelle allant de quelques micromètres à quelques nanomètres ^{[8], [100]}. L'AFM offre un avantage considérable en permettant de procéder sous conditions physiologiques. Ainsi, elle représente la seule technique permettant de donner des images à une résolution sub-nanométrique d'éléments biologiques (protéines, cellules, etc.) sous conditions physiologiques ^[8]. En plus de l'imagerie, l'AFM permet d'explorer les propriétés mécaniques et physicochimiques d'éléments grâce à la spectroscopie de force.

Dans ce chapitre, nous présentons la technique AFM à travers une première section dédiée aux principaux éléments historiques ayant participé dans le développement de la technique. Dans une deuxième section, nous nous intéresserons à l'imagerie AFM où seront présentés le principe de base et les différents modes d'imagerie. Enfin, la dernière section sera consacrée à la spectroscopie de force.

3.1 Histoire de l'AFM

L'invention du microscope à effet tunnel (STM) par Binnig et Rohrer en 1981^[101] a été les prémices du développement de plusieurs microscopes à sondes locales dont le plus connu de nos jours, le microscope à force atomique (AFM). Au regard de la réussite évidente qu'ont connue ces deux microscopes, il est justifié de penser qu'ils ont été, dès leur invention, largement acceptés par la communauté scientifique.

Les avancées de l'AFM étaient rapides, successives et parfois même simultanées si l'on considère les publications scientifiques dans le domaine. Le Tableau 3 résume les faits marquants de l'histoire de l'AFM. Lors de son invention en 1986, l'AFM ne fonctionnait qu'en mode contact. En 1987, Pethica et Oliver introduisirent le mode non-contact, moins détériorant pour les échantillons^[102]. En 1989, Landman et Luedtke développèrent un programme informatique pour l'AFM^[103]. Dans la même année, Burnham et Colton réalisèrent les premières expériences d'étude des propriétés nano-mécaniques de surface par AFM^[104]. Jusqu'ici, l'AFM ne fonctionnait qu'à l'air. Également en 1989, Weisenhorn et *al.* réalisèrent les premières expériences sous liquide^{[105], [106]}. Leurs essais ont permis de conclure qu'opérer en liquide diminuait significativement les interactions matériau-matériau entre pointe et surface, permettait d'améliorer la résolution et surtout représentait une prouesse technologique pour l'étude des éléments biologiques sous conditions physiologiques. En 1991, les premières pointes micro-fabriquées et AFM ont été commercialisés par Veeco, Santa Barbara (actuellement, Bruker). En 1992, l'AFM à haute vitesse a été développée par l'équipe de Häberle et *al.* afin d'imager des cellules vivantes à une résolution d'environ 10 nm et dans un laps de temps d'environ 10 secondes^[107]. En 1993, le mode intermittent a été introduit^[108]. Ce mode, baptisé « Tapping » présente l'avantage majeur de minimiser l'altération de l'échantillon en diminuant le temps de contact et les forces latérales. Ainsi, il a vite été adopté par plusieurs équipes de recherches^{[109], [110], [111]}. En 1994, sont apparus les premiers travaux en spectroscopie de force^{[112], [113]}. En 1995, un nouveau mode d'utilisation de l'AFM, le Cryo-AFM a été introduit^[114]. Ce mode a permis de diminuer les contaminations et de procurer une stabilisation thermique et mécanique des échantillons^[114]. Également en 1995, Giessibl et *al.* ont montré pour la première fois qu'en opérant en mode non-contact, la résolution atomique peut être atteinte avec l'AFM^[115].

Tableau 3. Récapitulatifs des faits marquant le développement de l'AFM.

	Dates	Faits marquants	Références
Avant l'AFM	1972	Invention du « Topografiner »	[116]
	1981	Invention du STM	[101]
	1983	Image de reconstitution 7×7 du silicium.	[117]
L'AFM	1986	Invention de l'AFM	[7]
		Prix Nobel pour l'invention du STM	[118]
Après l'AFM	1987	Introduction du mode non-contact	[102]
	1989	Développement d'outils informatique appliqués à l'AFM.	[103]
		Etude de la nano-mécanique d'échantillons. 1 ^{ère} expérience AFM sous liquide.	[104] [105] et [106]
	1991	1 ^{ère} pointes nano-fabriquées et 1 ^{ers} AFM commercialisés.	-
	1992	AFM à « haute » vitesse, 1 image/10 secondes.	[107]
	1993	Introduction du mode intermittent (Tapping).	[108], [109], [110] et [111]
	1994	Premiers travaux de spectroscopie de force.	[112] et [113]
	1995	Introduction du Cryo-AFM	[114]
		Résolution atomique avec le mode non-contact	[115]
	1996	Détection et cartographie de sites de reconnaissance	[119]
	1997	Dépliage de polymères ; protéines	[120]
	1999	« Dynamic force spectroscopy » pour l'étude cinétique et thermodynamique d'interactions	[121]
	2001	« High speed AFM » 10 images/seconde.	[27]

Les premiers travaux très prometteurs d'Hinterdorfer et *al.* pour la détection et la cartographie de sites de reconnaissance sont apparus en 1996 ^[119]. En 1997, un autre type de mesure en spectroscopie de force a émergé, le dépliement de protéines ^[120]. En 1999, la « dynamic force spectroscopy » a été introduite par Merkel et *al.*, ouvrant le chemin à une nouvelle approche pour étudier la cinétique et la thermodynamique des interactions ^[121]. En 2001, une nouvelle approche dans l'imagerie AFM permettant d'obtenir, en 1 seconde, 10 images AFM à haute résolution a été développé dans l'équipe de Toshio Ando ^[27]. L'approche a été baptisé le « high-speed AFM ». Le développement de l'AFM reste d'actualité et plusieurs équipements aussi sophistiqués les uns que les autres sont entrain d'être mis sur le marché, et la demande n'est pas des moindres.

3.2 Utilisations et principes physiques

Grâce à sa grande sensibilité et sa haute résolution, l'AFM a émergé depuis son invention et est devenu un outil puissant pour l'imagerie des structures de tailles

nanométriques. L'imagerie AFM présente l'avantage d'opérer dans différents modes de fonctionnement ayant chacun ses avantages et ses inconvénients selon les conditions dans lesquelles a lieu l'expérience. Pourvu d'une sensibilité de l'ordre du pico-newton, l'AFM permet d'explorer la nano-mécanique et de mesurer des interactions entre l'extrémité nanométrique d'une pointe et l'échantillon étudié. Cela a été possible en développant l'utilisation de l'AFM en spectroscopie de force.

Le principe général du microscope AFM est présenté dans la Figure 24. Une pointe de dimensions nanométriques située à l'extrémité libre d'un levier est approchée, par un système de vis micrométriques, jusqu'à une distance très proche (environ 500 μm) de la surface. Afin d'éviter le crash de la pointe sur la surface, ce qui peut lui être dommageable, la fin de l'approche est gérée par un moteur qui assure des déplacements verticaux de quelques dizaines de nanomètres. Les céramiques piézo-électriques sont chargées de déplacer l'échantillon dans les trois directions de l'espace par des mouvements nanométriques. Le laser généré par la diode, réfléti sur les dos du levier puis réfléchi, est récupéré dans des photodiodes disposées en quatre quadrants A, B, C et D. Un système d'acquisition convertit la position du laser récupéré dans les photodiodes. La récupération du laser en A+B est traduite en position haute tandis que la récupération en C+D est traduite en position basse. Le laser récupéré en A+C signifie la gauche alors que le laser récupéré en B+D désigne la droite.

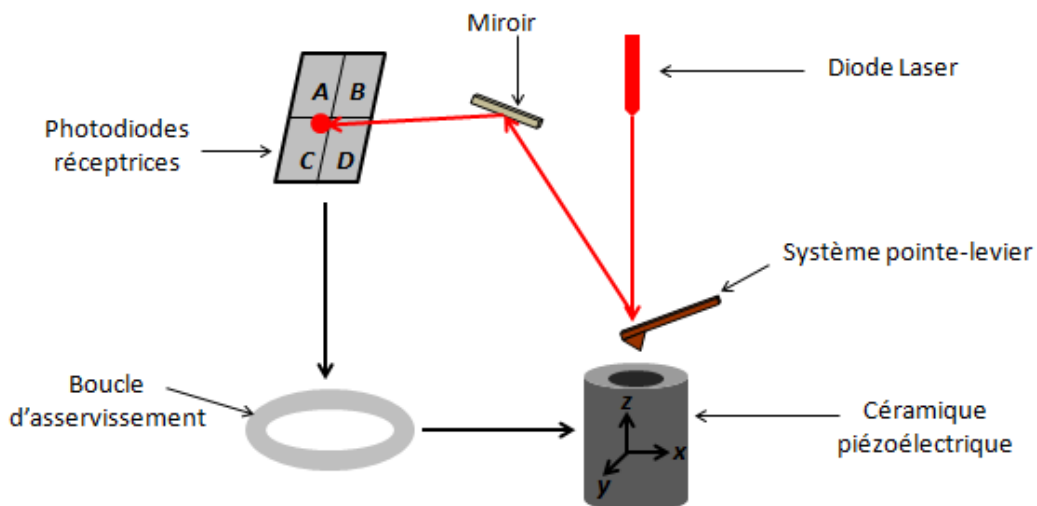


Figure 24. Représentation schématique du principe général du microscope à force atomique

Le terme « force atomique » fait référence au cas idéal de résolution spatiale où on a un seul atome sur la pointe qui interagit avec un seul atome de la surface. Dans un cas plus général, on considère l'interaction comme celle de groupes d'atomes de nombre limité qui interagissent entre eux. Le principe physique de l'AFM est basé sur les interactions dont la nature dépend de la proximité des deux groupes d'atome ^{[122], [123]}. Dans la Figure 25 sont représentées schématiquement les différentes interactions pouvant avoir lieu entre la pointe et la surface. Ces interactions peuvent être classifiées en 4 régions distinctes (Figure 26).

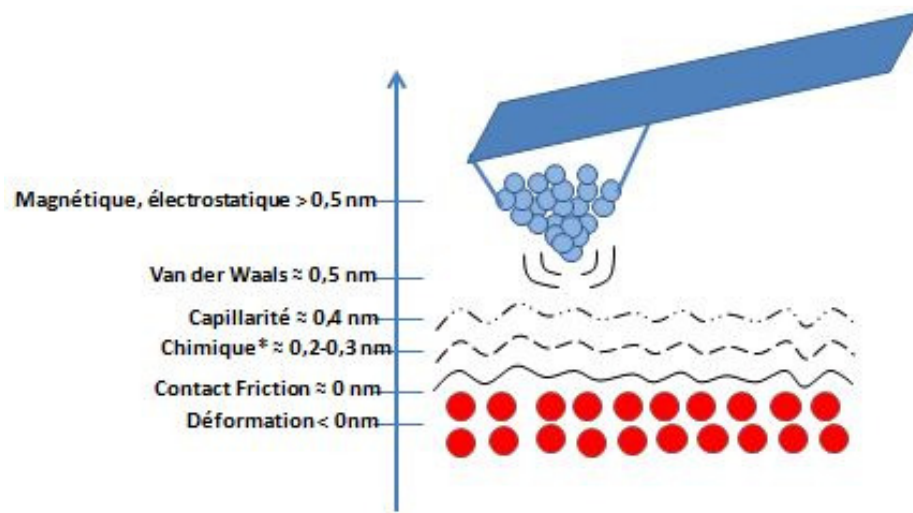


Figure 25. Représentation schématique des interactions pointe-surface en fonction de la distance entre les deux [124]. * = pour les surfaces fonctionnalisées.

Les forces qui s'exercent sur la pointe, au fur et à mesure de son rapprochement de la surface, peuvent être résumées à deux natures : les forces attractives et les forces répulsives (Figure 26). Lors de la phase de rapprochement, la pointe et la surface s'attirent afin de retrouver un état stable qui permet de réduire leur niveau d'énergie. Pendant et après le contact, les partenaires ne pouvant pas s'interpénétrer, se repoussent, d'où la force répulsive.

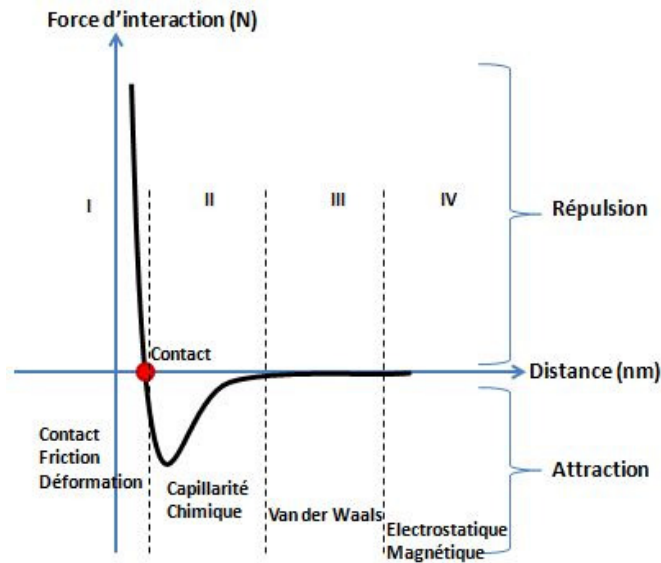


Figure 26. Représentation des forces et interactions entre pointe et surface [124].

3.2.1 Imagerie AFM

L'AFM a révolutionné la visualisation des objets de tailles nanométriques. Néanmoins, le lecteur doit considérer que ce type de microscope est plus proche du toucher que de la vision.

3.2.1.1 Principe

Dans l'imagerie AFM, l'échantillon est balayé par la pointe montée au bout du levier. Lors du balayage, la force entre la pointe et l'échantillon est enregistrée relativement à la déflexion du levier. Une image topographique est obtenue en reproduisant la déflexion du levier en fonction de sa position sur l'échantillon. L'image peut aussi être relative à la hauteur des éléments présents sur l'échantillon [125]. La hauteur est contrôlée par une boucle de rétrocontrôle qui sert à maintenir une force constante de la pointe sur l'échantillon [125].

3.2.1.2 Modes d'imagerie

L'AFM peut opérer en trois modes différents : le mode contact, le mode non-contact et le mode de contact intermittent (« Tapping »). Ces modes exploitent les différentes interactions pointe-surface présentées dans la Figure 26.

➤ Mode contact

Le mode contact est le premier mode à avoir été mis au point lors de l'invention de l'AFM [7]. Dans ce mode, le levier est statique (ne présente aucune oscillation). Il est

rapproché de la surface jusqu'au contact. Lors du balayage, la pointe garde constamment le contact avec l'échantillon et la déflexion du signal récupéré dans les photodiodes est enregistrée en continu (Figure 27 A). Les forces répulsives sont à la base du mode contact. Une boucle de rétroaction régule la hauteur de l'échantillon afin de garder une force d'appui constante. Ainsi, la position verticale de l'échantillon est soumise à un contrôle Proportionnel, Intégral et Différentiel (PID) ce qui permet de suivre la topographie des contours de la surface.

L'avantage du mode contact est sa facilité à la mise en œuvre comparé aux modes non-contact et intermittent que nous exposerons plus tard. Cependant, lors de l'imagerie en mode contact, la force de frottement induite par le balayage continu de la pointe sur la surface peut être assez élevée pour induire, par cisaillement, une déformation plastique de l'échantillon ^{[126], [127]}. Des forces de 100 à 300 pN ont été reportées lors de l'imagerie en mode contact d'éléments biologiques ^{[128], [129]}.

➤ Mode contact intermittent

Un des moyens de préserver l'intégrité de l'échantillon a été de diminuer significativement le temps de contact. Cela a été possible en introduisant le mode contact intermittent ^[110]. Dans ce mode, le levier est dynamique. Il est soumis à une excitation afin de le faire osciller à sa propre fréquence de résonance (environ 100 kHz) et à une certaine amplitude. Pendant le mouvement sinusoïdal du levier, la pointe interagit de façon périodique avec l'échantillon (Figure 27 B). A chaque contact, l'amplitude d'oscillation diminue puisque la fréquence de résonance change. La boucle de rétrocontrôle s'exerce alors sur l'amplitude d'oscillation du levier.

Bien que plus difficile à mettre en œuvre que le mode contact, le nombre élevé d'études AFM menées en mode contact intermittent témoigne des avantages que présente ce mode. Outre la préservation de l'intégrité de l'échantillon en diminuant les forces de cisaillement, l'oscillation du levier en mode intermittent permet d'éviter le saut au contact de la pointe. En effet, quand cette dernière est au plus près de l'échantillon, une force de rappel, proportionnelle à l'amplitude d'oscillation et à la raideur du levier, encontre les forces attractives responsables du saut. Ainsi, la pointe est préservée du crash contre la surface.

➤ Mode non-contact

Dans la course à la résolution de contraste, le mode non-contact a été utilisé dans une étude par AFM visant à la reconstitution atomique 7×7 du silicium ^[115]. Dans le mode non-contact, on exploite principalement les forces attractives entre la pointe et la surface. Le levier est excité de la même façon que dans le mode intermittent, mais la pointe n'entre jamais en contact avec la surface. La pointe oscille alors au voisinage de la surface, à des distances de l'ordre de quelques dizaines d'angströms, sans la toucher (Figure 27 C). Le mode non-contact exploite, de la même manière que le mode contact intermittent, le comportement non linéaire de l'oscillateur au voisinage de la surface. La mesure se fait alors à la fois sur l'évolution de la fréquence de résonance en fonction de la distance pointe-surface ainsi que sur l'intensité de l'excitation nécessaire pour conserver constante cette amplitude. En conséquence, la rétroaction s'opère soit sur la déviation du levier, soit sur l'amplitude des oscillations.

Au regard des nombreux inconvénients qu'il présente, le mode non-contact n'est pas très utilisé. En effet, les forces attractives sont faibles et sont difficilement quantifiables, particulièrement, s'il y a du bruit de fond. Dans le mode non-contact, la résolution ne serait satisfaisante que sous vide. Par ailleurs, la surface est recouverte par une couche nanométrique d'eau piégeant diverses contaminations qui affectent forcément l'expérience.

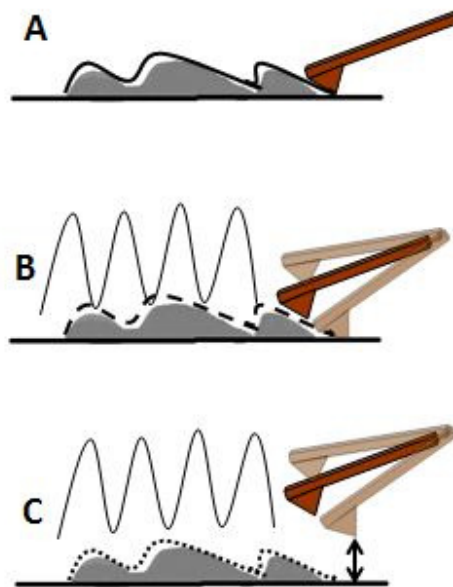


Figure 27. Les modes d'imagerie AFM ; (A) le mode contact, (B) le mode intermittent et (C) le mode non-contact.

3.2.2 Spectroscopie de force

D'autres interactions entre la pointe et l'échantillon peuvent être exploitées dans le but d'étudier certaines propriétés de l'échantillon, de la pointe ou encore du milieu d'interaction. Bien que l'AFM ait été développée, initialement, comme une technique d'imagerie, elle a par la suite été exploitée dans d'autres objectifs. Dans ce cadre, une nouvelle technique de mesure de force, la spectroscopie de force, a été développée.

3.2.2.1 Principe

Dans les expériences de mesures de forces, la pointe au bout du levier est déplacée dans le sens vertical vers la surface et dans des cycles d'approches-retraits. Les positions de la pointe et la déflexion du levier sont enregistrées à chaque approche-retrait et sont exposées sous forme de courbes. En effet, ces courbes présentent le voltage mesuré sur les photodiodes en fonction du déplacement de la plateforme piézoélectrique, portant l'échantillon, dans les directions x et y de l'espace. En utilisant la pente de la courbe de retrait, dans la zone de contact entre la pointe et l'échantillon, le voltage est converti en déflexion du levier (d). En conséquence, à partir de la déflexion déterminée, on déduit la force en se basant sur la loi de Hooke's :

$$F = -k \times d \quad \text{Équation 12}$$

Avec k comme la constante de raideur du levier.

Les courbes de forces-distances ainsi obtenues fournissent des informations quant aux propriétés mécaniques, interactions entre matériaux, énergies d'adhésion et viscoélasticités des échantillons étudiés^[130].

Lorsque la pointe est rapprochée de la surface (Figure 28 A), une déformation négative du levier a lieu. Quand la pointe est à une certaine distance de la surface, pouvant faire intervenir les force de van der Waals, alors un saut au contact est noté (Figure 28 B). Une fois au contact, la pointe continue à appuyer jusqu'à une force fixée par le manipulateur, une déformation positive du levier est alors interceptée par les photodiodes (Figure 28 C). Cette zone de la courbe fournit des informations relatives aux propriétés mécaniques de la surface (Figure 28 F). Lorsque la force fixée par le manipulateur est atteinte, la pointe et la surface sont éloignées l'une de l'autre (Figure 28 D). Généralement, une hystérèse, relative à une force d'adhésion qui maintient le contact entre la pointe et la surface, est enregistrée.

La force dépendra, alors, du temps et de la surface de contact ainsi que de l'énergie entre la pointe et la surface. Lorsque la force exercée par l'éloignement de la pointe devient plus importante que celle qui la retient à la surface, une rupture du contact, dite pic d'adhésion, est constatée (Figure 28 E).

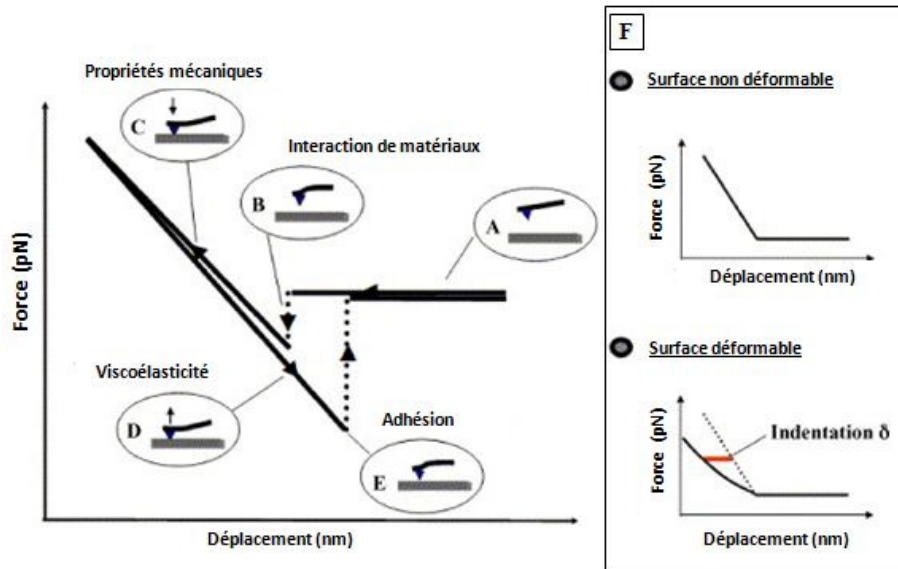


Figure 28. Représentation schématique de courbes d'approche et de retrait type pour une surface non déformable (A) approche pointe-surface, (B) saut au contact sous l'effet des forces de van der Waals, (C) appui de la pointe du la surface jusqu'à une force prédéterminée, (D) retrait pointe-surface, (E) pic d'adhésion et (F) courbes d'approche types pour une surface non déformable (haut) et une surface déformable (bas) [130].

Les courbes de force peuvent être enregistrées à un point unique de l'espace de coordonnées (x, y) ou à plusieurs points de coordonnées (x_n, y_n) pour ainsi obtenir des forces-volumes. L'enregistrement de forces-volumes comportant plus qu'une centaine de courbes de force permet de pallier à l'hétérogénéité des surfaces et d'obtenir, sur la base d'une distribution statistique, des résultats concluants.

3.2.2.2 Techniques de mesure de force

La mesure des forces qui contrôlent les interactions entre des ligands et des récepteurs représente une sous discipline entière de la biophysique. Différentes techniques ont été développées pour l'étude des interactions ligand-récepteur. Ces techniques génèrent des profils force-distance. Ainsi, elles permettent d'analyser les différents états d'adhésion et de définir la nature des forces impliquées. Les techniques de mesure de forces peuvent être divisées, sur la base des moyens par lesquels la séparation des surfaces est contrôlée, en

deux groupes distincts : les techniques de mesures indirectes et les techniques de mesures directes^[131]. Les méthodes directes sont difficiles à pratiquer au regard de la courte portée et la faible ampleur des forces ainsi que l'omniprésence de contaminations qui risquent de fausser les résultats^[131]. Les techniques indirectes, quant à elles, sont entravées par d'autres facteurs, tels que, l'alignement des particules et l'interprétation des résultats qui dépendent largement du système choisi^[131]. Malgré ces difficultés, de nombreuses approches ont été développées pour palier à ces difficultés. L'AFM, entre autres techniques, fait partie des techniques de mesures de forces directes. Ce groupe englobe aussi la technique basée sur les pinces optiques^[132] et magnétiques^[133], la cellule à flux laminaire^{[134], [135]} l'appareil de mesure des forces de surfaces (SFA pour « *surface force apparatus* »)^[136] et les micropipettes.

➤ Les pinces optiques sont basées sur le piégeage d'une particule diélectrique par un faisceau laser focalisé. Ce faisceau permet aussi d'imager la particule et de suivre ses mouvements. L'analyse des interactions entre ligands et récepteurs par la technique des pinces optiques est réalisée en approchant une particule recouverte de ligands à une surface mobile présentant les récepteurs. Ainsi, une liaison spécifique peut avoir lieu entre le ligand et le récepteur. La formation d'un complexe ligand-récepteur est détectée par le déplacement de la particule. En assimilant la particule à un ressort, la force d'interaction peut être déduite à partir du déplacement détecté. Les pinces optiques ont ainsi été utilisées par Salomo et *al.* pour l'étude de l'interaction de la protéine A avec des immunoglobulines dans différentes conditions d'expérimentation^[137]. La méthode des pinces optiques est non invasive et permet d'accéder un des forces entre 0.5 et 200 pN^[138]. Sa limite de détection inférieure est particulièrement intéressante car témoigne de sa résolution élevée. Cependant, contrairement à l'AFM, l'analyse des interactions ligand-récepteur par pinces optiques ne peut pas être couplée à l'imagerie. De ce fait, la localisation des récepteurs sur la surface ne serait pas possible.

➤ La cellule à flux laminaire analyse des particules dans un flux hydrodynamique. Pour l'analyse des interactions ligand-récepteur, des particules recouvertes de ligands sont injectées, dans un flux hydrodynamique laminaire contrôlé, à proximité d'une surface recouverte de récepteur. Les trajectoires des particules sont suivies par acquisition d'images et les arrêts de particules sont comptabilisés. Ainsi, la constante de

dissociation de l'interaction peut être déterminée en reportant le nombre de particules qui restent accrochées après un temps t . De plus, en faisant varier le taux de cisaillement, il est possible d'en déduire une force critique relative à l'intensité du lien entre le ligand et le récepteur. La cellule à flux laminaire est très utilisée pour l'analyse de l'interaction entre des molécules d'ADN et des protéines ^[139]. La méthode de la cellule à flux laminaire est facile à mettre en œuvre. Cependant, elle reste limitée par la résolution temporelle et spatiale. En effet, les liaisons de faibles durées de vie ne peuvent pas être décelées et les récepteurs ne peuvent pas être précisément localisés. De plus, la fréquence de collision entre particule et surface est difficile à évaluer. Par ailleurs, le contact entre la particule et la surface est mal défini en termes d'aire, temps et distance de contact.

➤ L'appareil de mesure des forces de surfaces analyse les interactions entre surfaces en regard en les soumettant à des cycles d'approche-retrait. Pareillement qu'en AFM, le SFA utilise des plateformes piézoélectriques pour déplacer les surfaces. Dans les expériences d'analyse des interactions entre ligands et récepteur, les surfaces présentent les partenaires moléculaires de l'interaction. Le SFA a permis à Wong et *al.* d'étudier la dynamique de l'adhésion spécifique entre membranes biomimétiques ^[140]. Pour étudier l'interaction du couple biotine-streptavidine par SFA, Wong et *al.* ont mis en contact des bicouches lipidiques fonctionnalisées, d'un côté, par la biotine, et de l'autre côté, par la streptavidine. Dans leur principe de fonctionnement, L'AFM et le SFA se ressemblent. Cependant, l'AFM permet d'obtenir une résolution spatiale plus élevée. En effet, en SFA deux surfaces courbées de 1 cm de diamètre et ayant un rayon de courbure de quelques centaines de nanomètres sont rapprochées l'une de l'autre, le contact se fait alors sur une aire de quelques dizaines voire quelques centaines de nanomètres ^[136]. Cependant, en AFM, le rayon de courbure de la pointe est significativement moins important (10 à 50 nm) et permet des contacts sur des aires très faibles, même à l'échelle de la molécule unique.

➤ La technique des micropipettes consiste à rapprocher deux particules fixées sur deux micropipettes montées sur des micromanipulateurs. Les particules, recouvertes de ligands et de récepteurs, sont amenées au contact pour permettre l'interaction spécifique entre les partenaires moléculaires. Une des particules est assimilée à un ressort. Son déplacement indique l'amplitude de la force d'interaction. La technique des micropipettes a été investie par Evans et *al.*, entre autres, pour étudier l'ancrage d'un récepteur dans la

membrane d'une cellule vivante ^[141]. Grâce à un contrôle précis de la tension de la particule, la méthode des micropipettes permet de mesurer des forces dans une gamme de 0,1 pN à 1000 pN. De plus, elle donne accès à une large gamme de taux de chargement allant de 1 à 10^6 pN ^[142].

Chapitre 4 : L'AFM des échantillons biologiques

Depuis son invention en 1986, l'AFM a été largement utilisée dans les recherches en biologie. Une condition essentielle pour la réussite des expériences AFM en biologie est relative à la nature et la technique de préparation des surfaces utilisées. Ce chapitre est consacré à l'AFM des échantillons biologiques où nous soulignerons les méthodes de préparation et nous présenterons les avancées technologiques atteintes par AFM illustrées par plusieurs exemples de la littérature. Enfin, dans une dernière section nous dresserons l'état de l'art de l'investigation des interactions sucre-lectine par AFM.

4.1 Préparation des échantillons biologiques

Le choix des surfaces et des pointes se base à la fois sur l'objectif de l'expérimentation et sur la nature, les charges et les propriétés mécaniques de l'échantillon étudié. Le bon choix du support est indispensable pour obtenir un échantillon propre et relativement plan qui se prête parfaitement à des expériences d'AFM. D'autre part, le choix de la pointe est crucial pour la réussite de l'expérience. Selon l'objectif de l'expérience et la nature de l'échantillon, un large choix de pointes se présente au manipulateur.

4.1.1 Les surfaces

Dans la littérature, trois supports hydrophiles se distinguent comme étant d'excellentes surfaces adaptées aux expériences AFM, le mica muscovite, le verre et l'oxyde de silicium^[143].

4.1.1.1 Le mica muscovite

Le mica muscovite, de formule chimique $KAl_2(OH)_2AlSi_3O_{10}$, se présente sous la forme de multiples feuilles minérales de 1 nm d'épaisseur chacune. Les feuilles sont empilées étroitement pour former une surface de moins de 0,5 mm d'épaisseur. Résistant à la chaleur, le mica se prête à la fixation thermique, via de la colle époxy, sur des supports métalliques (indispensables pour le positionnement sur la plateforme piézoélectrique munie

d'un aimant de fixation). Un autre avantage du mica est sa capacité à générer une surface plane et propre automatiquement suite au clivage par un adhésif (du scotch par exemple).

La charge du mica peut être modulée selon le pH du tampon utilisé (Figure 29 A). La charge négative du mica peut être exploitée afin d'y greffer (par liaisons électrostatiques) des échantillons de charges positives ^[144] (Figure 29 B). La présence de cations divalents dans le tampon peut profiter à la fixation de molécules telles que les acides nucléiques ^[145] (Figure 29 C). Pour des greffages via des liaisons fortes, cas des liaisons covalentes, le mica peut subir une modification chimique par des silanes tels que le 3-aminopropyltriéthoxysilane (APTES) ^[146] ou l'Epoxy-silane (Figure 29 D et E).

Le mica est le support de fixation le plus utilisé pour l'imagerie d'éléments biologiques ^[143].

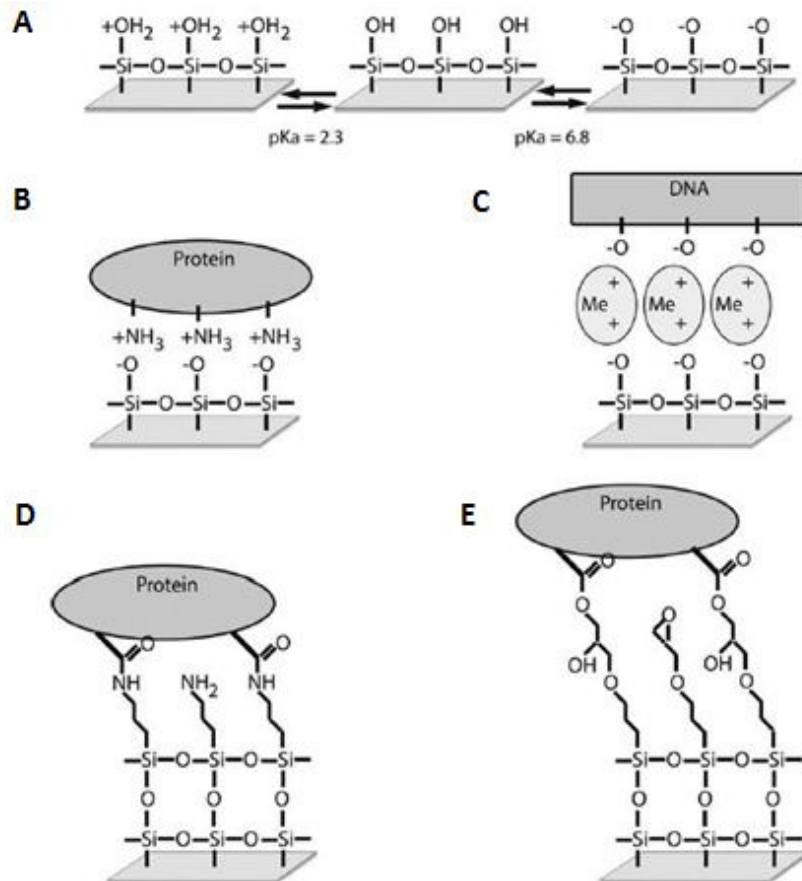


Figure 29. Les différentes options de l'utilisation de mica pour l'immobilisation d'échantillons biologiques pour l'AFM ; (A) changement de charge selon le tampon, (B) adsorption électrostatique de protéines, (C) liaisons électrostatiques de l'ADN via des cations divalents, (D) introduction de groupes amines par traitement du mica à l'APTES et fixation covalente de protéine et (E) introduction de groupes amines par traitement du mica à l'Epoxy-silane et fixation covalente de protéines ^[147].

4.1.1.2 Le verre

Le verre a aussi été utilisé à plusieurs reprises comme support d'échantillon en AFM. Bien qu'assez plan pour être utilisé dans l'imagerie des cellules et autres grandes structures, le verre n'est pas adapté pour imager les petites structures et molécules. Un deuxième inconvénient que présente le verre est relatif à l'omniprésence de contaminations organiques et de particules qui nécessitent d'être éliminées. Cependant cet inconvénient peut être contourné par un lavage préalable dans une solution d'acide concentré suivi d'un rinçage abondant à l'eau ^[143]. Pareillement que pour le mica, le verre peut être modifié par les silanes pour lui apporter des fonctions chimiques rendant possible la fixation covalente des échantillons ^{[148], [149]}.

4.1.1.3 L'oxyde de silicium

Détournées de leur application d'origine, le développement des semi-conducteurs, des fines plaques d'oxyde de silicium ont également été utilisées pour la fixation d'échantillons biologiques en AFM. Bien qu'elles soient plus chères et plus difficiles à manier, elles présentent une surface plus lisse que le verre ^[143].

Certaines expériences nécessitent l'utilisation de surfaces hydrophobes. Cullen et Lowe ont utilisé le graphite dont les liaisons sont fortement orientées par pyrolyse (HOPG ; Highly Oriented Pyrolytic Graphite), et qui génère ainsi une surface plane ^[150]. Des surfaces hydrophobes, de mica recouvert de carbone, ont été utilisées pour la fixation d'ADN ^[151].

Une autre méthode reportée dans la littérature pour créer des surfaces hydrophobes planes est le « spin-coating » de polymères (comme le polystyrène ou le poly(méthylméthacrylate)) ^[152].

Grâce aux nombreux avantages qu'il présente, l'or a largement été utilisé associé à l'une des trois surfaces précédemment présentées. En effet, il est chimiquement inerte en présence d'oxygène, stable en présence de radicaux et enfin peut être modifié facilement par auto-assemblage de monocouches d'alcane thiols (pouvant être utilisées pour l'adsorption ou le greffage de protéines) ^{[153], [154]}. L'obtention de surfaces d'or suffisamment lisses adaptées à des expériences AFM est possible selon deux méthodes différentes. La première consiste à déposer l'or sur une surface plane, tel que le silicium, et d'enduire la surface de l'or exposée à l'air par de la colle époxy. Puis, la face de l'or enduite est mise en

contact avec une surface de verre propre ^[155]. Ainsi la couche d'or est transférée du silicium vers le verre. La deuxième méthode consiste à évaporer sous vide poussé, sur une surface propre (verre, mica ou silicium), une fine couche de chrome de 5 nm d'épaisseur suivie d'une couche d'or de 30 nm ^[156].

Les membranes poreuses en polymère ou encore les gels macromoléculaires représentent un autre système qui peut être utilisé pour la fixation d'objet biologique de taille importante, comme des cellules ^[157].

4.1.2 Les pointes

La pointe constitue la clé de voûte du microscope puisqu'elle est le collecteur de l'information. C'est pour cela que lors des expériences AFM, une grande importance doit être portée au choix de la pointe. Une large gamme de pointes est disponible sur le marché présentant plusieurs différences aux niveaux des formes, natures chimiques et constantes de raideurs.

La pointe se trouve à l'extrémité libre du levier et est obtenue soit par croissance électrochimique, soit par fixation au moment de la préparation du micro-levier ^[158]. La pointe est pourvue d'une hauteur variant de quelques microns à une dizaine de microns et son rayon de courbure, au niveau de l'apex, mesure de quelques nanomètres (pour les pointes les plus fines) à quelques dizaines de nanomètres ^[159].

Les pointes sont en silicium pour les leviers du mode dynamique ou en nitrure de silicium pour ceux du mode statique ^[159]. Selon les modes, d'autres différences sont constatées. Les pointes utilisées en contact présentent généralement des rayons de courbure plus importants et des géométries différentes des pointes du mode dynamique ^[159]. Elles sont pyramidales pour les leviers utilisés en mode contact et coniques pour les leviers utilisés en mode dynamique ^[159].

En raison de leurs dimensions, les pointes sont vendues avec une incertitude sur la taille du rayon de courbure qui peut parfois être importante. Ainsi, leurs tailles et leurs formes ne sont pas connues d'une manière précise et nécessitent des expériences supplémentaires de caractérisation effectuées par le manipulateur.

La taille et la propreté des pointes sont deux éléments cruciaux pour la réussite de l'expérience, tant en termes de sensibilité à l'interaction qu'en termes de résolution. Pour optimiser la taille et la propreté des pointes qu'ils utilisent, certains auteurs leur font subir

un traitement préalable *in situ*, en les bombardant avec des ions d'argon ^{[160], [161]} ou en les passant sous l'UV-ozone puis en les rinçant à l'éthanol avant de les sécher sous un flux d'azote ^[162].

4.2 Imagerie AFM des échantillons biologiques

Dans cette section, nous nous intéresserons aux éléments biologiques ayant été caractérisés par imagerie AFM. Cependant, au regard de la nature du travail dans notre projet, la plus grande partie de ce paragraphe sera consacrée à l'imagerie des bactéries.

On retrouve dans la littérature des travaux de caractérisation par imagerie AFM de, principalement, quatre types d'objets biologiques ; les biomolécules, les films lipidiques, les cristaux 2-D de protéines et les cellules. La préparation des échantillons diffère d'un objet à l'autre ^[143].

4.2.1 Les biomolécules

Des biomolécules, telles que des protéines, des polysaccharides et des acides nucléiques, peuvent être imagées à l'air ou sous liquide. La préparation des échantillons est différente selon les conditions de l'imagerie.

Dans le cas de l'imagerie à l'air, trois protocoles ont été reportés dans la littérature. Le premier consiste à déposer une petite quantité (en microlitres) d'une solution aqueuse de la biomolécule d'intérêt sur le support choisi pour l'expérience. L'eau est par la suite évaporée ou séchée sous un flux d'azote ^[163]. La deuxième méthode consiste à immerger le support d'imagerie dans une solution de biomolécules d'intérêt pendant un certain temps afin de permettre leur adsorption sur le support. Par la suite le support est rincé et séché et les biomolécules adsorbées dessus peuvent être imagées par AFM à l'air ^[143]. La troisième méthode consiste à pulvériser, sur le substrat, la biomolécule mise en solution aqueuse, parfois en présence de glycérol ^[164].

Ainsi, des biomolécules comme l'ADN ^{[163], [165]}, les polysaccharides ^[166] et les protéines ^{[167], [68]} (par exemple la fibronectine ^[164]) ont pu être imagés.

L'imagerie à l'air par AFM a aidé à caractériser de nombreuses biomolécules. Cependant, le séchage peut parfois être dénaturant et certains aspects de la caractérisation ne sont plus possibles. En plus de l'imagerie à l'air et grâce à sa capacité d'opérer en liquide, des images AFM de biomolécules sous liquide ont pu être obtenues. La fixation des

biomolécules sur le support en milieu liquide représente un challenge pour le manipulateur. En général, les méthodes de fixation sont regroupées en deux catégories : l'adsorption physique ou la fixation covalente (Figure 29). Des images d'ADN ^{[145], [151], [165]} et de protéines ^[168] ont ainsi été obtenues.

4.2.2 Les films lipidiques

Les bicouches lipidiques supportées (SLB pour « supported lipid bilayers ») sont des systèmes de modèles membranaires biomimétiques qui sont maintenant largement utilisés pour l'analyse des propriétés biophysiques et biochimiques des membranes biologiques ^[169]. Deux méthodes sont habituellement utilisées pour former les SLBs : le transfert de deux monocouches successives par des techniques de Langmuir-Blodgett ou Langmuir-Schaefer, et la fusion de vésicules lipidiques préformées. Le transfert de films lipidiques sur les supports plans offre la possibilité de les étudier par AFM ^[169]. Ainsi, l'organisation structurale des SLBs a été étudiée par imagerie AFM. Les premières étapes de la formation de SLBs ^[170] ainsi que leur évolution au cours du temps ^[171] ont été étudiées par imagerie AFM. L'AFM a également fourni des éléments de réponses concernant deux phénomènes cruciaux de la formation des domaines lipidiques qui sont la nucléation et la croissance ^{[172], [173]}. L'AFM a largement contribué à la compréhension de l'interaction des membranes avec différents agents externes tels que les peptides (peptides antimicrobiens ^[174], peptides dérivés de virus ^{[175], [176]}, des peptides amyloïdes ^{[177], [178], [179]}) ou des nanoparticules ^{[180], [181], [182]}.

4.2.3 Les cristaux 2-D de protéines

L'AFM a permis l'imagerie de cristaux 2-D de protéines avec une résolution inégalée inférieure à 1 nm. Elle a ainsi fourni des informations complémentaires aux autres techniques de caractérisation des cristaux notamment la diffraction aux rayons X ^[183].

Plusieurs méthodes d'immobilisation des cristaux 2-D de protéines sur des supports ont été mises en place dans la littérature. Une procédure, basée sur l'adsorption de la protéine sur le mica, a été proposée par Müller et *al.* ^[184]. Ainsi, Müller et *al.* ont visualisé, par AFM, des cristaux d'aquaporine-1 (AQP1) extraits d'érythrocytes humains et reconstitués en présence de phospholipides de *E. coli* ^[184]. Des cristaux de trimères de porine OmpF d'*E. coli* ont, également, été reconstitués et imagés par AFM ^[184]. Pareillement, des cristaux de

bactériorhodopsine ont été préparés à partir de la membrane pourpre de *Halobacterium salinarum*, adsorbés sur mica et imagés par AFM^[184].

La modification des propriétés de surface du support représente une autre solution pour palier aux forces électrostatiques répulsives entre l'échantillon et le support. Un revêtement aux poly-cations tels que la poly-L-lysine a été proposé^[185]. Dans le même contexte, une fixation covalente de protéines a été proposée en utilisant un verre fonctionnalisé par un succinimide photoactivable sous une lumière UV^[148]. La fixation covalente, bien qu'efficace pour avoir des images de hautes résolutions, est plus difficile à mettre en œuvre au regard des nombreuses étapes nécessaires à sa réalisation. Elle présente aussi le risque d'altérer la protéine^[143].

4.2.4 Les cellules

Le potentiel de l'AFM dans l'imagerie de cellules a été reconnu rapidement après son invention^[168]. L'imagerie AFM de cellules vivantes, sous conditions physiologiques, permet d'analyser des processus biologiques dynamiques à échelle nanométrique et en temps réel^[157]. L'AFM a été utilisée pour l'imagerie de bactéries, notamment, *Escherichia coli*^{[186], [187]},^[188] *Streptococcus*^[189] *Lactobacillus rhamnosus*^{[190], [191]} et *Pseudomonas*^[192]. Les levures ont également été étudiées par AFM dans plusieurs travaux^{[157], [193], [194]}. L'imagerie AFM a aussi été largement utilisée dans l'étude d'autres cellules eucaryotes^[195] notamment des cellules mésangiales^[196], de chondrocytes^[197], de cellules épithéliales^[198], de cellules cancéreuses^[199] et des lymphocytes^[200].

Bien qu'assez courante aujourd'hui, l'imagerie AFM des cellules demeure un challenge pour les manipulateurs de l'AFM. En effet, plusieurs facteurs interviennent dans la réussite de l'expérimentation, notamment, la constante de raideur du levier utilisé, le mode d'imagerie et surtout la technique d'immobilisation des cellules.

Les techniques d'immobilisation varient en fonction du but de l'expérience et de la nature de la cellule étudiée^[201]. Les méthodes couramment utilisées et qu'on retrouve dans la littérature englobent :

➤ Le séchage qui est la méthode la plus simple^{[202], [203]}. Il ne fait intervenir aucun élément étranger aux cellules et permet d'obtenir une forte fixation. Cependant, le séchage présente de nombreux inconvénients, notamment, la déshydratation, la dénaturation des interfaces et l'aplatissement des cellules^{[204], [205]}. Le séchage,

exclusivement réservé aux expériences d'imagerie à l'air, a été utilisé dans de nombreux travaux ^{[191], [206]}. L'imagerie à l'air permet d'avoir des images plus résolutive et de meilleure qualité. Par exemple, les *pili* des bactéries ne sont visibles qu'en imagerie à l'air car beaucoup trop mobile et fins pour être visualisés sous liquide ^[191].

➤ La fixation chimique au glutaraldéhyde ^[207] ou aux colles commerciales ^[208]. Cette méthode est facile à mettre en œuvre et permet la visualisation de cellules sous liquide. Cependant, elle est agressive et peut dénaturer les interfaces ^[201].

➤ L'adsorption via des interactions électrostatiques sur des supports pré-couverts d'une couche de poly-L-lysine ^{[186], [192], [209], [210]} ou de polyéthylèneimine ^{[188], [211]}. Cette méthode est adaptée pour toutes les bactéries et les levures chargées négativement. Elle ne présente pas de contraintes mécaniques. Cependant, le revêtement de surfaces doit être optimisé (temps de contact, le séchage, le milieu de solubilisation, concentration, etc.) ^[212].

➤ L'immobilisation sur gélatine ^[213] et agar ^[214]. Cette méthode est, largement, la moins dénaturante et le support peut même contenir des éléments nutritifs aux cellules. Cependant, elle est difficile à réaliser et impose aux cellules des contraintes mécaniques.

➤ L'immobilisation physique des cellules dans des membranes poreuses ^{[157], [190], [191], [194] [215]}. Cette méthode ne nécessite pas l'ajout de substances externes et préserve ainsi l'intégrité des cellules, mais elle est limitée par la forme de la cellule et la robustesse de sa membrane ^[157].

Ces méthodes sont parmi celles qui existent mais ne sont pas les seules. Des méthodes plus élaborées, permettant une meilleure localisation des cellules sur le support, sont en cours de développement. Ainsi, Cerf et *al.* ont réussi à aligner les bactéries en lignes et en colonnes grâce à des surfaces micro-structurées qu'ils ont développées ^[216]. Les surfaces micro-structurées sont certes difficiles à réaliser mais représentent une excellente solution pour localiser facilement les bactéries lors des expériences AFM.

Le mode et les conditions d'imagerie dépendent également de la cellule étudiée. Par exemple, le mode contact n'est pas le plus adapté aux bactéries piliées car les *pili*, trop souples et trop mobiles, perturbent la pointe. Enfin, les leviers de faibles constantes de raideurs (0.016 à 0.032 N/m) sont les mieux adaptés.

4.3 Applications de la spectroscopie de force aux échantillons biologiques

Dans cette section, nous parlerons des diverses possibilités qu'offre la spectroscopie de force dans l'étude des éléments biologiques. Cependant, au regard de la nature du travail dans notre projet, la plus grande partie de ce paragraphe sera consacrée à l'étude des interactions ligand-récepteur par spectroscopie de force.

La spectroscopie de force représente aujourd'hui un outil d'excellence dans l'étude des échantillons biologiques ^[104]. Les applications de la spectroscopie de force englobent des domaines d'étude très variés.

4.3.1 L'étude des propriétés mécaniques d'éléments biologiques.

Les bicouches lipidiques (SLB) ont largement été caractérisées par indentation. En effet, en se basant sur le principe physique de la spectroscopie de force, expliqué auparavant, la pointe appuie sur la SLB, ce qui augmente la force verticale qui s'applique dessus. En conséquence, la membrane lipidique est progressivement comprimée entre la pointe et le support jusqu'à ce qu'elle soit transpercée et la pointe saute au contact du support. Avec cette méthode, sont déterminées à la fois, la résistance mécanique correspondant à la force nécessaire pour perforer la membrane et l'épaisseur de cette dernière ^[217]. Les cellules ont aussi fait objet d'étude par spectroscopie de force pour la caractérisation de leurs élasticités ^[218]. La mesure de l'élasticité implique l'enregistrement de courbes de force sur les cellules et de les convertir en courbes de force *versus* indentation avec les modèles appropriés ^[218]. Ainsi, les propriétés nano-mécaniques de bactéries vivantes et mortes ont été déterminées ^{[157], [216]}. Des cellules eucaryotes ont également été caractérisées mécaniquement par AFM notamment les plaquettes ^[219] les fibroblastes ^[220] ainsi que les cellules épithéliales ^[221].

4.3.2 Le dépliement de polymères

L'AFM a permis d'étudier les interactions intramoléculaires des molécules polymériques, tels que, les protéines ^[120] les polysaccharides ^{[222], [223]} et l'ADN ^[224]. Ainsi, il a été possible d'élucider les déterminantes moléculaires de la stabilité mécanique de ces polymères et le rôle joué par les changements de conformation, induits par une force externe, dans la régulation des fonctions biologiques ^{[8] [225]}. Lors de l'étude de dépliement

de polymères par spectroscopie de force, une pointe non fonctionnalisée est appuyée, fortement et suffisamment longtemps, sur une couche de protéines, une membrane cellulaire, ou autres molécules attachées à un support solide^{[8], [226]}. La molécule polymérique est ainsi retenue, par adsorption non spécifique, entre la pointe et la surface^[8]. La pointe et la surface sont par la suite éloignées l'une de l'autre et la courbe de retrait présentera les pics relatifs aux différentes interactions intramoléculaires ressenties par la pointe^[8]. Dans leurs travaux sur la bactériorhodopsine (BR), l'équipe de Daniel J. Müller a étudié son dépliement et son ancrage dans la membrane pourpre de *Halobacterium salinarum*^[227]. Après l'imagerie de la membrane pourpre (Figure 30 A), les auteurs ramènent la pointe au contact d'une BR avec une force d'appui de 1 nN pendant 1s. La pointe est par la suite rétractée et le dépliement de la BR est visualisé sur les courbes de forces enregistrées (Figure 30 B). Une image AFM de la membrane, à la même position, est ensuite réalisée. Les auteurs notent l'extraction de la BR dépliée de son emplacement sur la membrane (Figure 30 C). Bien que simple à mettre en œuvre et permettant l'analyse d'une molécule unique, le protocole utilisé ne permet qu'une faible fréquence d'adhésion et ne permet pas de contrôler la zone d'interaction avec la protéine. Pour pallier à ces inconvénients, les auteurs ont sélectionné les courbes de forces de plus que 60 nm (Figure 30 B) considérant qu'à cette distance l'interaction a lieu avec l'extrémité COOH de la pointe. Sur ces courbes, quatre pics se distinguent témoignant du dépliement en 4 phases de la BR (Figure 30 D).

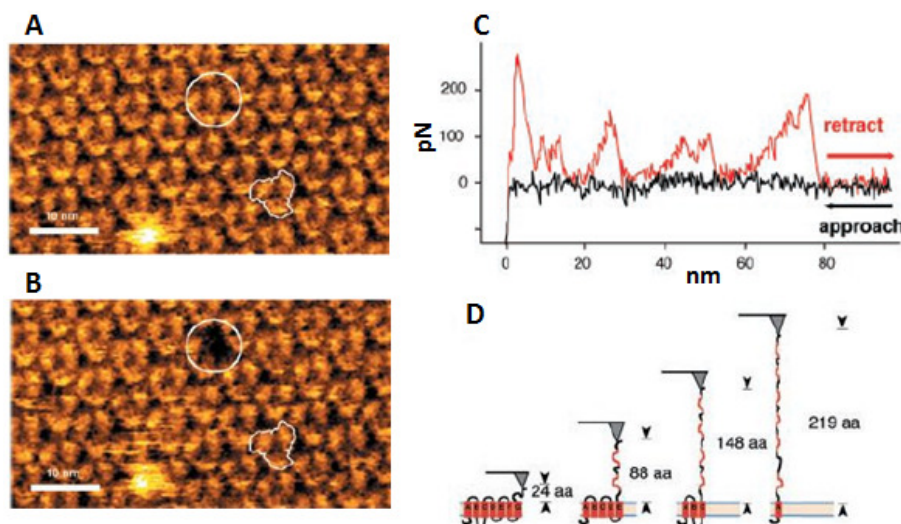


Figure 30. Etude du dépliement de la bactériorhodopsine (BR) par spectroscopie de force. (A) Image AFM de la membrane pourpre de *H. salinarum*. (B) Courbe de force type enregistrée pour l'expérience de dépliement de la BR. (C) Image AFM de la membrane après extraction de la BR de son emplacement. (D) Représentation schématique du dépliement de la BR. [227].

4.3.3 L'analyse de la reconnaissance moléculaire spécifique

Lors de l'analyse de la reconnaissance moléculaire par spectroscopie de force, la pointe AFM est transformée en un nano-capteur qui porte un bio-ligand. Ce dernier peut être une biomolécule (anticorps, hormone, des acides nucléiques simple ou double brins, un polysaccharide, etc.), une molécule synthétique (ligands multivalents) ou n'importe quelle structure pouvant être reconnue spécifiquement par une entité complémentaire (récepteur) sur la surface de l'échantillon étudié. Lors des cycles d'approche-retrait, le bio-ligand au bout de la pointe se lie spécifiquement à la molécule complémentaire sur la surface, et la dissociation du complexe récepteur-ligand est suivie au cours du temps (Figure 31). Ainsi, la spectroscopie de force permet d'étudier les interactions intermoléculaires.

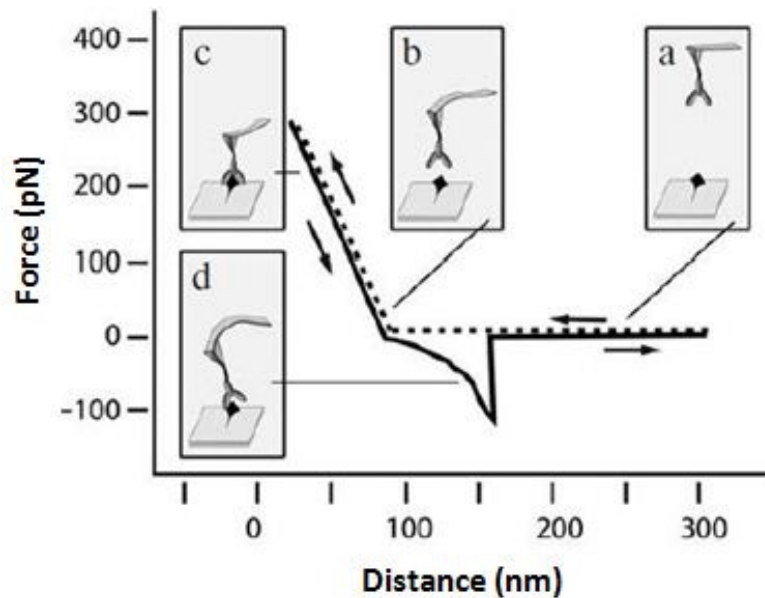


Figure 31. Représentation schématique de la courbe de force typique dans les expériences d'étude des interactions intermoléculaires par spectroscopie de force, (a) approche, (b) saut au contact, (c) appui (d) retrait et pic d'adhésion [147].

La réussite des expériences de spectroscopie de force, particulièrement à l'échelle de la molécule unique, dépend de plusieurs paramètres. La fonctionnalisation des surfaces ainsi que l'acquisition et le traitement des données sont les clés de réussite de l'expérience.

4.3.3.1 Fonctionnalisation de la pointe AFM

La fonctionnalisation de la pointe AFM est d'une importance primordiale dans l'analyse des interactions entre paires moléculaires. Plusieurs méthodes ont été développées et testées. L'appréciation de l'efficacité d'une méthode se base sur plusieurs facteurs ^[228]. Le

premier facteur concerne la force de la fixation. En effet, la fixation de la molécule d'intérêt à la pointe doit être bien plus forte que la force intermoléculaire étudiée. Pour ce faire, les liaisons covalentes sont favorisées car elles sont au moins dix fois plus fortes (1-2 nN) que les interactions intermoléculaires entre ligands et récepteurs ^[228]. Le deuxième facteur est relatif à la densité de surface. Cette dernière doit être suffisamment faible afin de permettre l'étude de l'interaction à l'échelle d'une seule paire moléculaire (SMFS pour « single molecule force spectroscopy »). Le troisième facteur concerne la mobilité du ligand fixé à la pointe. Une certaine mobilité doit être assurée afin de permettre au ligand l'accès à son récepteur spécifique. Le quatrième facteur correspond aux forces non spécifiques, qui doivent être minimisées et distinguées des forces spécifiques. Enfin, la bonne orientation du ligand est indispensable pour interagir avec son récepteur.

Dans les premiers travaux pionniers, l'adsorption physique d'albumine bovine biotinylée (BBSA) à la surface de la pointe a été employée ^{[113], [229]}. La BBSA adsorbée est mise à réagir avec de l'avidine ou de la streptavidine et l'ensemble sert par la suite comme matrice à la fonctionnalisation par des ligands biotinylés (Figure 32 A) ^[230]. En dépit du grand nombre de molécules sur la pointe, la petite fraction de ligands correctement orientés peut être suffisante pour permettre la mesure des interactions intermoléculaires spécifiques ^[228]. Cependant, la rupture parallèle de liaisons multiples est souvent observée avec cette configuration ce qui la rend incompatible avec les expériences de SMFS. Une autre limite du système biotine-avidine est sa force de liaison relativement faible par rapport à celle des liaisons covalentes ^[231]. Ne répondant pas aux exigences détaillées précédemment, cette méthode est très peu utilisée de nos jours.

Essentiellement, deux chimies de surface sont aujourd'hui considérées comme les mieux adaptées pour répondre aux exigences précédemment mentionnées. Elles sont basées soit sur la forte adsorption chimique de thiols sur des pointes d'or ou sur la fixation covalente de silanes ou des alcools sur des pointes d'oxyde de silicium.

Dans la première approche, des pointes micro-fabriquées sont enduites, par thermo-évaporation, d'une première fine couche adhésive de chrome suivie d'une couche de 15 à 100 nm d'or. Ensuite, les protéines, les acides nucléiques ou les hydrates de carbone qui portent les groupes thiol peuvent être fixés directement sur les surfaces d'or (Figure 32 B). Ce type de chimie de surface a permis la détection des forces intermoléculaires entre brins

d'ADN complémentaires ^[112], entre ferritine et anticorps anti-ferritine ^[232], entre concanavoline et oligosaccharides ^[156] et entre la fibronectine et des cellules bactériennes ^[233]. Une deuxième alternative à cette approche serait de fixer les molécules sur la pointe d'or via des monocouches d'alcane-thiols. Ces monocouches sont facilement obtenues par immersion de la pointe d'or dans une solution d'alcane-thiols diluée dans l'éthanol. Les alcane-thiols peuvent ensuite être activés, dans une solution aqueuse de 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDC) et de N-hydroxysuccinimide (NHS), et mis à réagir avec la molécule d'intérêt. Dans certains cas (particulièrement pour les protéines), il serait préférable d'orienter la molécule attachée à la pointe. Une approche basée sur un système de nickel nitrilotriacétate-histidine à site dirigé (Ni-NTA-His) est proposée (Figure 32 B). Ce système nécessite l'introduction de résidus de cystéine dans la protéine d'intérêt.

La deuxième approche développée permet de fonctionnaliser directement les pointes en silicium sans passer par l'évaporation d'or par dessus. Une première étape d'aminofonctionnalisation de la pointe est nécessaire (Figure 32 C). Deux procédures sont privilégiées, l'immersion dans de l'éthanolamine ^{[119], [234]} ou la silanisation ^{[235], [236]}. L'optimisation de l'étape d'aminofonctionnalisation en contrôlant la densité de surface permet d'obtenir une pointe fonctionnalisée bien adaptée aux expériences de SMFS. Un deuxième avantage notable à cette approche est la prédisposition de la pointe aminofonctionnalisée à réagir avec des bras espaceurs homo ou hétéro-bifonctionnels synthétiques. L'équipe de H. Gruber a consacré une grande partie de ses recherches au développement d'une panoplie de bras espaceurs de longueurs et fonctions différentes. Au regard des nombreux avantages qu'ils offrent, les bras espaceurs ont été largement utilisés depuis leur introduction. En effet, à base de poly-éthylène-glycol, les bras espaceurs sont chimiquement et physiquement inertes. De plus, grâce à leur flexibilité, ils permettent une réorientation libre et rapide du ligand ce qui augmente la probabilité d'interaction avec les récepteurs présent sur l'échantillon. D'autre part, le dépliement non-linéaire typique et la longueur du bras espaceur permet de faciliter l'analyse des résultats, notamment, en différenciant les interactions spécifiques de celles non spécifiques. Enfin, le bras espaceur limite les risques d'écrasement du ligand sur la surface et préserve ainsi la fonctionnalisation pour des centaines (jusqu'à 1000) de cycles d'approche-retrait ^{[228], [237]}.

Les avancés rapides, dans le domaine de fonctionnalisation des pointe AFM, ont même abouti à la fixation de cellules entières sur la pointe pour des mesures d'interactions cellule-cellule (Figure 32 D) [228]. Les stratégies développées pour la fixation de cellules sur pointes AFM englobent l'utilisation d'interactions ligand-récepteur spécifiques, des interactions électrostatiques, de la colle commerciale ou la fixation chimique [228]. Pour une meilleure fixation l'utilisation de levier sans pointe est conseillée [228]. L'application de ces protocoles nécessite obligatoirement de s'assurer que la surface native des cellules attachées n'est pas altérée ou dénaturée. À cet égard, une approche particulière consiste à attacher des cellules individuelles à un levier AFM via des lectines. Cette technique a permis la mesure de la force d'adhésion spécifique entre deux cellules adjacentes de *Dictyostelium discoideum* [238].

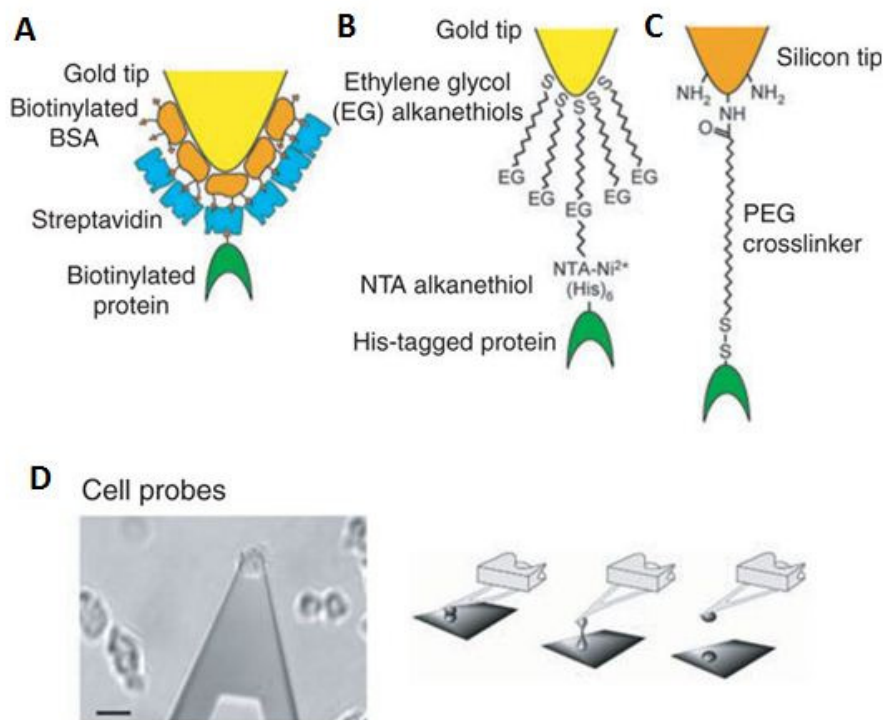


Figure 32. Représentation schématique des chimies de surfaces utilisées dans la fonctionnalisation des pointes AFM pour les expériences de SMFS. (A) Système BBSA sur pointe d'or, (B) Système de monocouche d'alcane-thiols sur pointe d'or, (C) système d'amino-fonctionnalisation des pointes en silicium et (D) système de cellules sur pointes. [228].

4.3.3.2 Analyse des résultats

L'étude des interactions intermoléculaires requiert l'analyse de nombreuses courbes de force. Dans ce type d'expérience, il existe une variation des énergies des molécules qui interagissent. En effet, même lorsque les molécules sont immobilisées sur le support dans les mêmes conditions, elles peuvent avoir différents états énergétiques [147]. Il en résulte

parfois une incohérence dans les courbes de force obtenues. Les informations quantitatives fiables peuvent être obtenues par l'analyse statistique d'un grand nombre de courbes de force. À cet égard, il est important de choisir des courbes de force qui caractérisent les événements spécifiques. Ce choix est fait en fonction des propriétés particulières des courbes de force analysées, tels que, la distance à laquelle a lieu le pic d'adhésion et sa courbure. L'analyse des courbes nécessite l'application d'un des modèles mathématiques développés et que l'on retrouve dans la littérature. Deux modèles sont principalement utilisés. Le premier, dit « freely jointed chain model », suppose que lors du retrait de la pointe, les molécules se comportent comme une chaîne polymère de N segments rigides de longueur b liés par des connexions tournantes librement. Selon le modèle FJC, si les molécules sont soumises à une force appliquée F, l'énergie effective de la chaîne est donnée par l'Equation 13

$$\frac{E}{K_{\beta}T} = \sum_{i=1}^N \frac{fb}{K_{\beta}T} t_i \times z \quad \text{Equation 13}$$

Avec E comme énergie, K_{β} est la constante de Boltzmann, T est la température absolue, f la force et z l'extension de la chaîne.

Le deuxième modèle, plus réaliste, est le « worm like chain model » WLC. Dans ce modèle, les molécules s'étendent de manière continue selon un comportement élastique. La force est dans ce cas déterminée selon l'Equation 14

$$f = \left(\frac{K_{\beta}T}{p} \right) \times \left[\frac{1}{4\left(1-\frac{z}{L}\right)^2} - \frac{1}{4} + \frac{z}{L} \right] \quad \text{Equation 14}$$

Avec K_{β} est la constante de Boltzmann, T est la température absolue, p est la longueur persistante, L est la longueur du contour et z l'extension de la chaîne.

Ces modèles, initialement développés pour l'analyse de dépliement de polymères, ont trouvé un grand intérêt dans l'analyse des interactions ligand-récepteur, particulièrement, lorsque celles-ci font intervenir des bras espaceurs.

Suite à l'analyse des courbes de force, des logiciels spécifiques ou des macros développées par le manipulateur sont utilisés pour tracer la distribution statistique des forces en fonction de la fréquence de leur occurrence.

En règle générale, la spécificité est confirmée par l'évaluation de l'interaction en présence d'un inhibiteur^[113]. L'inhibiteur bloque les sites de reconnaissance du récepteur

immobilisé sur le support, ce qui conduit à une diminution significative de la probabilité de liaison spécifique du ligand au bout de la pointe aux récepteurs (Figure 33).

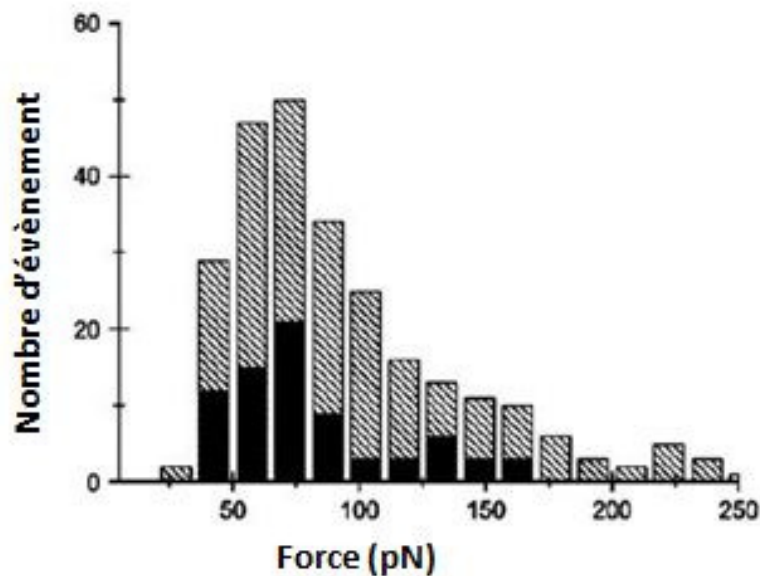


Figure 33. Distribution des forces d'adhésion entre l'azurine (immobilisée sur le support) et le cytochrome c_{551} (immobilisé sur la pointe) en absence (barres striées) et en présence (barres noires) d'azurine libre. [239].

4.3.3.3 Explorer la dynamique de l'interaction ligand récepteur

La force nécessaire pour briser un complexe ligand-récepteur, mesurée à une vitesse constante de retrait, ne représente qu'un seul point d'un spectre continu de forces. La théorie l'a prédit ^[240] et les expériences l'ont confirmé ^{[121], [230], [241]}, la force mesurée dépend du taux de chargement, qui est relatif à la vitesse de retrait de la pointe et à la constante de raideur du levier. Par conséquent, les utilisateurs devraient toujours contrôler et, si possible faire varier, le taux de chargement afin de comparer les forces résultantes des différentes expériences. Cette procédure est d'un grand intérêt dans l'étude de la dynamique de l'interaction ligand-récepteur et permet d'obtenir certains paramètres importants tels que la longueur de la barrière énergétique x_β et la constante cinétique de dissociation k_{off} . En se basant sur ces procédures plusieurs travaux ont déterminé les k_{off} de plusieurs couples ligand-récepteur. A titre indicatif, le Tableau 4 regroupe les résultats de quelques travaux menés sur le sujet.

D'autre part, la variation du temps de contact entre la pointe fonctionnalisée et la surface greffée permet de déduire, à partir des différentes fréquences d'adhésion, la constante cinétique d'association k_{on} .

Les valeurs des constantes cinétiques ainsi déterminées permettent de déduire la constante d'équilibre de dissociation du complexe ligand-récepteur K_d .

Tableau 4. Résultats d'étude d'interactions ligand-récepteur par spectroscopie de force. [147].

Ligand-receptor	Rupture force, pN	Loading rate of cantilever, nN/s	K_{off}, s^{-1}
A β integrin-specific binding peptide	20 \pm 7	10	0.13
Cadherin-cadherin	35 \pm 16	10	\sim 1.8
P53 (protein, tumor suppressor) – mdm2 (ubiquitin-ligase domain interacting with p53)	105 \pm 6	3	\sim 1.5
Lysozyme-Fv fragment of the antibody raised against lysozyme	55 \pm 10	10	0.001
Mucin I-antibody	120	10	\sim 2.6 \times 10 ⁻³
Fluorescein-Fv fragment of the antibody raised fluorescein	160 \pm 10	10	0.062
Azurin-cytochrome c ₅₅₁	95 \pm 1	10	\sim 6-14
Azurin-p53 (protein, tumor suppressor)	75 \pm 15	10	\sim 0.09
Carbonic anhydrase - sulfonamide	65	10	0.8-3.4
Thrombin – thrombin aptamer	4.5	3	No data
PDZ-domain-specific binding peptide	120	10	0.03
Biotin-avidin	130	1	\sim 6.5 \times 10 ⁻⁶
Biotin-streptavidin	150	1	\sim 1.7 \times 10 ⁻⁵

4.3.3.4 Cas particulier des interactions multiples

L'évaluation des forces d'interaction ligand-récepteur entre entités biologiques multivalentes (protéines, ADN, virus, cellules, etc.) est plus compliquée. En effet, les complexes formés peuvent varier en composition et en nombre d'interaction. Une description quantitative des interactions multivalentes a été proposée dans de nombreux travaux [242], [243, 244].

A titre d'exemple, l'interaction mono et divalente entre une nanoparticule de fullerène (C₆₀) et la porphyrine a été étudiée par spectroscopie de force. La porphyrine a été greffée à la surface de manière à permettre une ou deux interactions simultanées (Figure 34 A). La comparaison des résultats obtenus dans le cas d'une interaction monovalente à ceux obtenus pour une interaction divalente montre des différences au niveau de la forme (Figure 34 B) et de la distribution des forces (Figure 34 C).

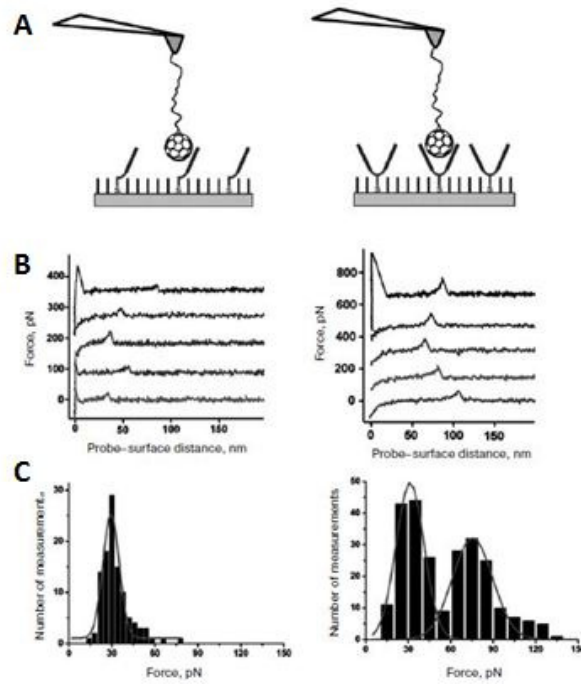


Figure 34. Caractérisation de l'interaction entre le fullerène C60 et la porphyrine mono et divalente par spectroscopie de force. (A) Représentation schématique de l'expérience, (B) courbes de force obtenues dans le cas de l'interaction monovalente (gauche) et divalente (droite) et (C) les histogrammes de distribution des force dans le cas de l'interaction monovalente (gauche) et divalente (droite). [242].

Sulchek *et al.* ont étudié la force ainsi que la dynamique d'interaction mono, di et trivalente entre la mucine et l'anticorps anti-mucine. Ils ont démontré un effet de la valence sur la force et la dynamique de l'interaction (Figure 35).

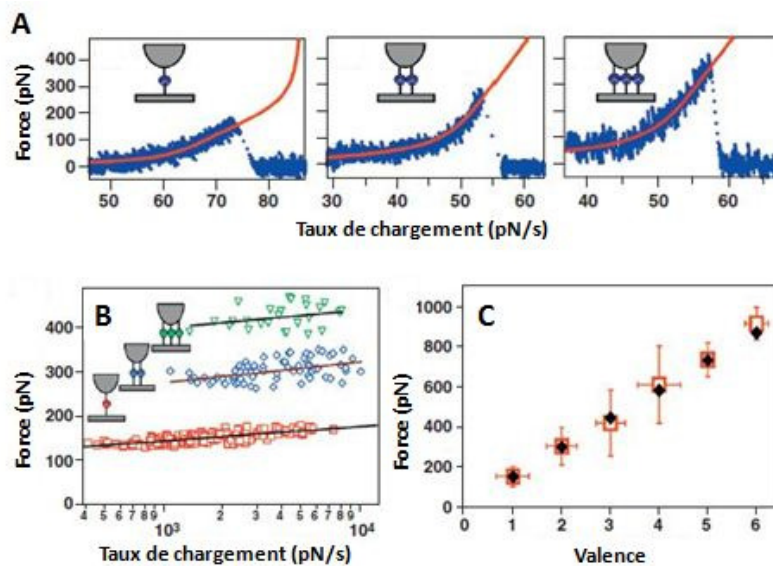


Figure 35. Caractérisation de l'interaction mucine-anticorps anti-mucine. (A) Courbes de forces type obtenues pour les interactions mono, di et trivalentes, (B) variation de la force en fonction des taux de chargement et (C) corrélation entre valence et force. [243].

4.3.4 Cartographie de récepteurs à la surface cellulaire

La combinaison de la spectroscopie de force à l'imagerie AFM offre la possibilité de localiser des sites de reconnaissance sur les membranes cellulaires. En effet, les membranes des cellules eucaryotes présentent une composition hétérogène avec un mélange de stérols, glycolipides, phospholipides et protéines membranaires. Cette hétérogénéité de composition joue un rôle important dans diverses fonctions comme la signalisation et l'adhésion cellulaire. De plus, les membranes cellulaires représentent des structures dynamiques. Ceci souligne l'importance de développer des outils d'imagerie à haute résolution pour localiser les structures membranaires. Dans ce contexte, l'AFM a été utilisée comme outil puissant pour la localisation de sites de reconnaissance et a fourni, ainsi, des informations complémentaires aux résultats de fluorescence et de microscopie électronique.

Deux approches possibles sont utilisées afin de localiser les sites de reconnaissance par AFM ^[228] : La première approche consiste en une cartographie de la surface par détection des pics d'adhésion. Dans cette approche des courbes de force sont enregistrées (16×16 ou 32×32) sur une zone définie. Les forces sont quantifiées et sont pixélisées selon leurs intensités en nuances de gris. Plus la force est intense, plus le pixel est clair et vice et versa (Figure 36). La première preuve du concept de cette approche a été fournie par Ludwig et *al.* qui ont réalisé l'imagerie de la streptavidine par une pointe biotinylée ^[245]. Dans une autre étude, une pointe modifiée par une lectine a été utilisée pour cartographier les polysaccharides sur les parois des levures ^[246]. Depuis lors, cette approche a été exploitée pour la cartographie des sites de reconnaissance sur différents types de cellules vivantes, y compris les globules rouges ^[247], les ostéoclastes ^[248], les cellules endothéliales ^[249] et les mycobactéries ^[153]. Bien que la cartographie des surfaces par détection des forces d'adhésion fournisse une analyse quantitative assez complète, elle demeure limitée par la résolution temporelle. En effet, le temps nécessaire pour enregistrer une carte varie de 2 à 15 minutes ^[228]. Ce temps est beaucoup plus élevé que le temps investi dans les processus biologiques.

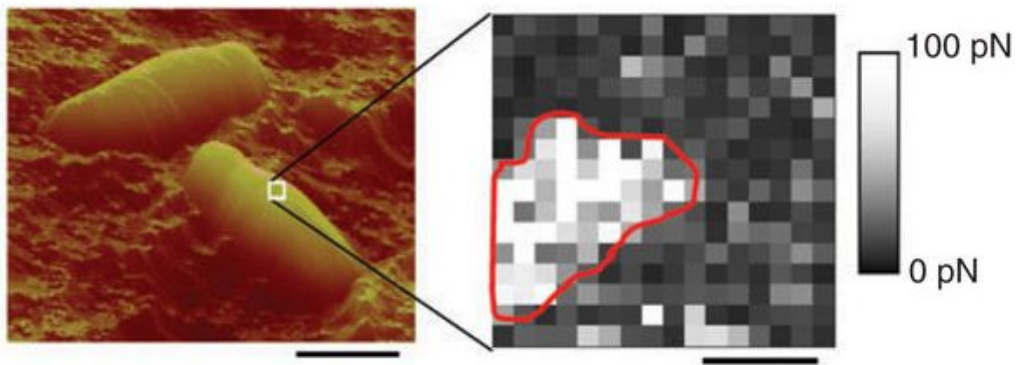


Figure 36. Image topographique (à gauche) montrant deux mycobactéries sur un support. Carte de force d'adhésion (à droite) enregistrée sur une seule cellule avec une pointe modifiée avec l'héparine. Dans les régions localisées, la carte révèle des événements d'adhésion (pixels clairs) en raison de la présence du récepteur spécifique de l'héparine (HBHA). Barres d'échelle, 2 μm (à gauche) et 100 nm (à droite). [153].

La deuxième approche est basée sur une cartographie dynamique des forces ^[228]. Dans cette approche, les forces sont détectées simultanément avec l'imagerie de l'échantillon, en mode dynamique (généralement le mode contact intermittent). En effet, une pointe portant le ligand d'intérêt oscille, à très faible amplitude (5-10 nm), à proximité de la surface de l'échantillon (présentant les récepteurs spécifiques). La topographie et les forces sont enregistrées simultanément (par imagerie topographique et de reconnaissance simultanée, TREC) via un circuit électronique (PicoTrec) ^{[250], [251]}. Pendant l'oscillation du levier, chaque valeur maximale (U_{max}) et minimale (U_{min}) de la sinusoïde est renvoyée vers la boucle de rétrocontrôle. Les données en U_{min} permettent d'accéder à la topographie et celles en U_{max} fournissent les éléments nécessaires à la carte de reconnaissance (Figure 37 A). Grâce à cette approche, des molécules individualisées d'avidine ont été scannées avec une pointe AFM biotinylée ^[252]. Ainsi, la topographie et la reconnaissance ont été obtenues simultanément (Figure 37 B). Les positions latérales des molécules d'avidine enregistrées sur l'image de topographie sont spatialement parfaitement corrélées avec les signaux enregistrés sur l'image de reconnaissance (Figure 37 B).

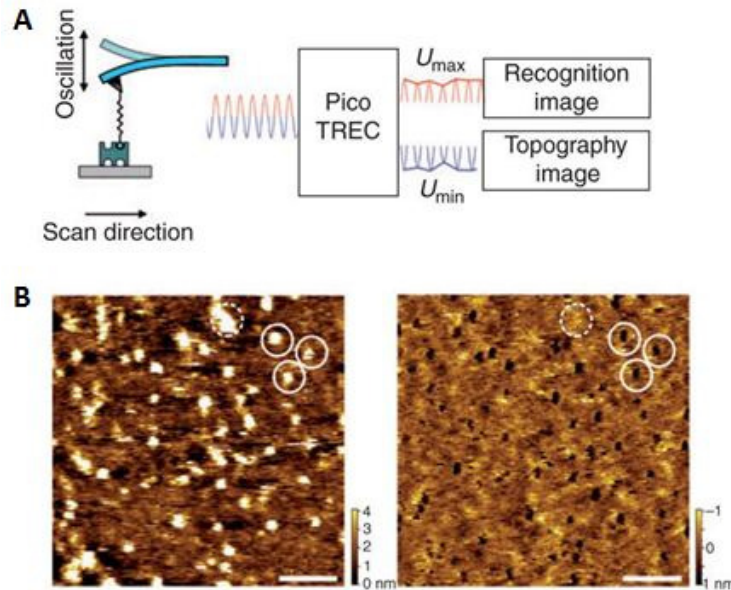


Figure 37. Imagerie simultanée de la topographie et de la reconnaissance. (A) oscillation du levier et conversion du signal en U_{\max} et U_{\min} . (B) molécules d'avidine individualisées détectées par imagerie de la topographie (gauche) et de la reconnaissance (droite). [252].

L'approche de la cartographie dynamique des forces offre une résolution temporelle de 1 à 5 minutes. Pourtant, cela reste encore largement supérieur au temps investi dans la plupart des processus biologiques. Le développement d'instruments AFM avec l'augmentation de la résolution temporelle demeure un défi important.

4.4 Investigation des interactions sucre-lectine par AFM

Nous avons vu dans le chapitre 2 l'intérêt des interactions sucre-lectine dans divers processus biologiques. Les lectines ont fait partie de l'ensemble des protéines qui ont été visualisées et caractérisées par imagerie AFM et par spectroscopie de force. Ceci a fourni des éléments d'information sur leurs structures et leurs modes d'interaction avec les sucres.

Les processus de reconnaissance entre les lectines et les sucres ont été exploités afin de développer de nouvelles approches thérapeutiques. Dans ce contexte, la synthèse chimique de ligands glycosylés multivalents a particulièrement été l'une des approches proposées. Dès lors, plusieurs équipes de recherche se sont penchées sur la caractérisation des interactions entre les lectines et les ligands multivalents synthétiques par AFM.

Gour et Verma se sont distingués avec leurs travaux sur l'étude de l'interaction des ligands multivalents avec la ConA. Ils ont visualisé, par imagerie AFM, la formation de réseaux moléculaires entre la ConA et des ligands mannosylés di et trivalents (Figure 38 A et

B) [167]. Le maillage des réseaux ConA-ligands a été modélisé (Figure 38 C et D). La comparaison entre les deux modèles permet de noter une dépendance du maillage à la valence du ligand.

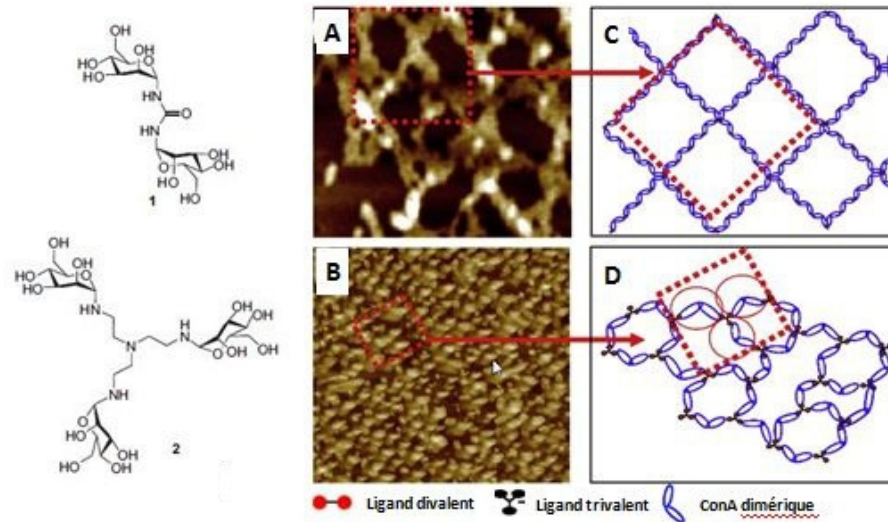


Figure 38. Imagerie AFM à l'air de réseau de ConA en présence de ligands (A) divalents et (B) trivalents. Représentation schématique du maillage du réseau obtenu avec le ligand (C) divalent et (D) trivalent. [167].

Le protocole qu'ont proposé Gour et Verma pour l'imagerie des réseaux sucre-lectine a été repris dans de nombreux travaux, notamment, par Sicard et *al.*. Ces derniers se sont intéressés à l'étude de l'interaction entre une lectine tétramérique et tétravalente de *Pseudomonas aeruginosa* (PA-IL) avec un ligand synthétique tétravalent à base de galactose [68]. La reconnaissance spécifique entre la PA-IL et le galactose a été exploitée par imagerie AFM (Figure 39).

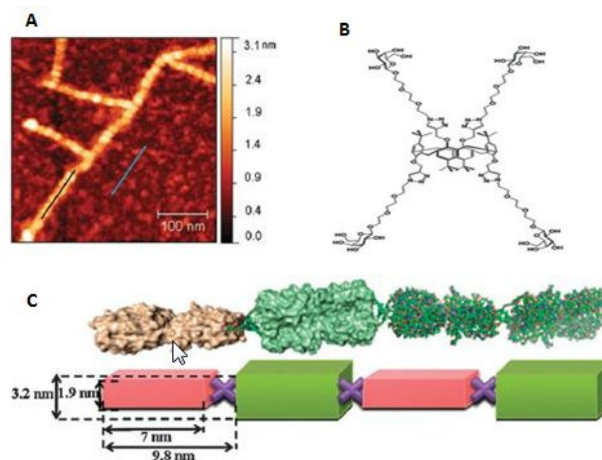


Figure 39. Interaction entre PA-IL et ligand tétravalent à galactose. (A) Image AFM de filament constitué par une succession de PA-IL reliées par les ligands, (B) structure du ligand synthétique et (C) modèle proposé pour l'interaction PA-IL et le ligand. [68].

Les résultats obtenus prouvent que la co-incubation de la PA-IL avec le ligand tétravalent engendre la formation de filament de lectines liées entre elles par les ligands à galactose. Avec des images plus résolutive que celles obtenues par Gour et Verma, Sicard et *al.* ont proposé un modèle plus élaboré en prenant en compte la composante dimensionnelle. Dans un modèle biomimétique, Bondurant et *al.* ont étudié l'interaction protéine-membrane en suivant par imagerie AFM les associations moléculaires, à la surface d'une bicouche lipidique hétérogène, entre la ConA et les têtes mannosamines des glycolipides insérés dans la membrane ^[253]. En effet, L'imagerie AFM a permis de constater que les glycolipides forment des structures dendritiques de 10 nm de large tout au long de la membrane, et que la Con A s'associe spécifiquement à ces motifs nanométriques.

L'investigation des interactions sucre-lectine a également fait intervenir la spectroscopie de force. Les forces d'adhésion et la dynamique des interactions ont été étudiées, par spectroscopie de force, entre des ligands glycosylés et des lectines soit purifiées ou présentées à la surface de bactéries. Dans ce contexte, la ConA a particulièrement intéressé plusieurs équipes. Touhami et *al.* ont déterminé, à un taux de chargement de 4000 pN/s, une force d'adhésion de 96 ± 55 pN entre la ConA, fixée sur une surface d'or via des polymères de carboxy-méthyl-amylose, et des chaînes d'hexa-mannose fixée à la pointe AFM ^[156]. Dans une étude plus récente, Madwar et *al.* ont déterminé, pour l'interaction ConA-mannose, une force de $69,5 \pm 2,7$ pN à un taux de chargement de 8140 pN/s ^[254]. Ils se sont aussi intéressés à la dynamique de cette interaction. Ils ont déterminé, par spectroscopie de force dynamique, les valeurs de la constante cinétique de dissociation (k_{off}) et la distance de la barrière énergétique (x_β) relatives à l'interaction ConA-mannose. Ces valeurs s'élèvent à $0,16 \text{ s}^{-1}$ et 0,53 nm respectivement.

D'autres lectines ont été étudiées par cette approche, notamment, la lectine de *Ricinus communis* (RCA₁₂₀) en interaction avec le galactose (Gal) d'une part et l'asialofetuin (ASF) d'autre part ^[255]. Les forces d'adhésion ainsi que les paramètres cinétiques ont été définis. Une force de 94 ± 3 pN à un taux de chargement de 3100 pN/s a été enregistrée pour l'interaction RCA-Gal contre une force de 69 ± 4 pN à un taux de chargement de 2100 pN/s pour l'interaction RCA-ASF. D'autre part, la spectroscopie de force dynamique a permis de constater une différence au niveau des valeurs de k_{off} et x_β calculées pour les deux interactions avec des x_β de 0,111 nm et de 0,431 nm pour RCA-Gal et RCA-ASF

respectivement et un k_{off} de $5,1 \text{ s}^{-1}$ pour RCA-Gal contre $0,032 \text{ s}^{-1}$ pour RCA-ASF ce qui signifie une stabilité dans le temps supérieure pour le complexe RCA-ASF par rapport à celle de complexe RCA-Gal.

L'interaction sucre-lectine a été exploitée afin de détecter, localiser et analyser la structure d'exo-polysaccharides bactériens par spectroscopie de force. Dans ce contexte, Francius et *al.* ont fonctionnalisé des pointes AFM par deux lectines de spécificités différentes, PA-1 et ConA, pour détecter, à la surface de *Lactobacillus rhamnosus GG (LGG)*, les polysaccharides riches en galactose et en mannose relativement à la spécificité de chaque lectine ^{[190], [162]}. Des forces de $56 \pm 20 \text{ pN}$ et $56 \pm 4 \text{ pN}$ ont été enregistrées, respectivement sur la souche sauvage et sur la souche mutante de *LGG*, pour l'interaction entre la pointe à ConA et les polysaccharides riches en mannose. Bien que les forces soient proches, la fréquence des événements d'adhésion est beaucoup plus importante dans le cas de l'interaction avec la souche sauvage comme indiqué sur les histogrammes et les cartes de distribution des forces obtenus pour les deux souches (Figure 40 A et B). L'interaction, entre la pointe à PA-1 et les souches sauvages et mutées, génère une force de $51 \pm 24 \text{ pN}$ et $55 \pm 7 \text{ pN}$, respectivement. Pareillement que pour la ConA, Les cartes et les histogrammes de distribution obtenus, pour chaque interaction PA-1-*LGG*, révèlent une fréquence d'adhésion beaucoup plus importante au contact de la souche sauvage (Figure 40 C et D).

Dans une autre étude, Quilès et *al.* ont combiné la spectroscopie de force à la spectroscopie infrarouge et à l'immuno-coloration pour mettre en évidence la production de glycogène par les cellules planctoniques de *Pseudomonas fluorescens* ^[206].

Par ailleurs, Le et *al.* ont étudié, par spectroscopie de force, l'interaction entre *Lactococcus lactis* fixée à la pointe AFM et une mucine gastrique fixée sur la surface à analyser ^[241]. L'adhésion entre les lectines (exprimées à la surface des bactéries) et les sucres contenus dans la mucine a été évaluée par spectroscopie de force comme étant de $110 \pm 40 \text{ pN}$ à un taux de chargement de 100 nN/s . De plus, la dynamique de l'interaction a été explorée par spectroscopie de force dynamique afin de déterminer les paramètres cinétiques de l'interaction. Les résultats de l'étude dynamique ont révélé une constante cinétique d'association de $3,3\text{E}^{+02} \text{ M}^{-1}.\text{s}^{-1}$ et une constante de dissociation de $0,46 \text{ s}^{-1}$.

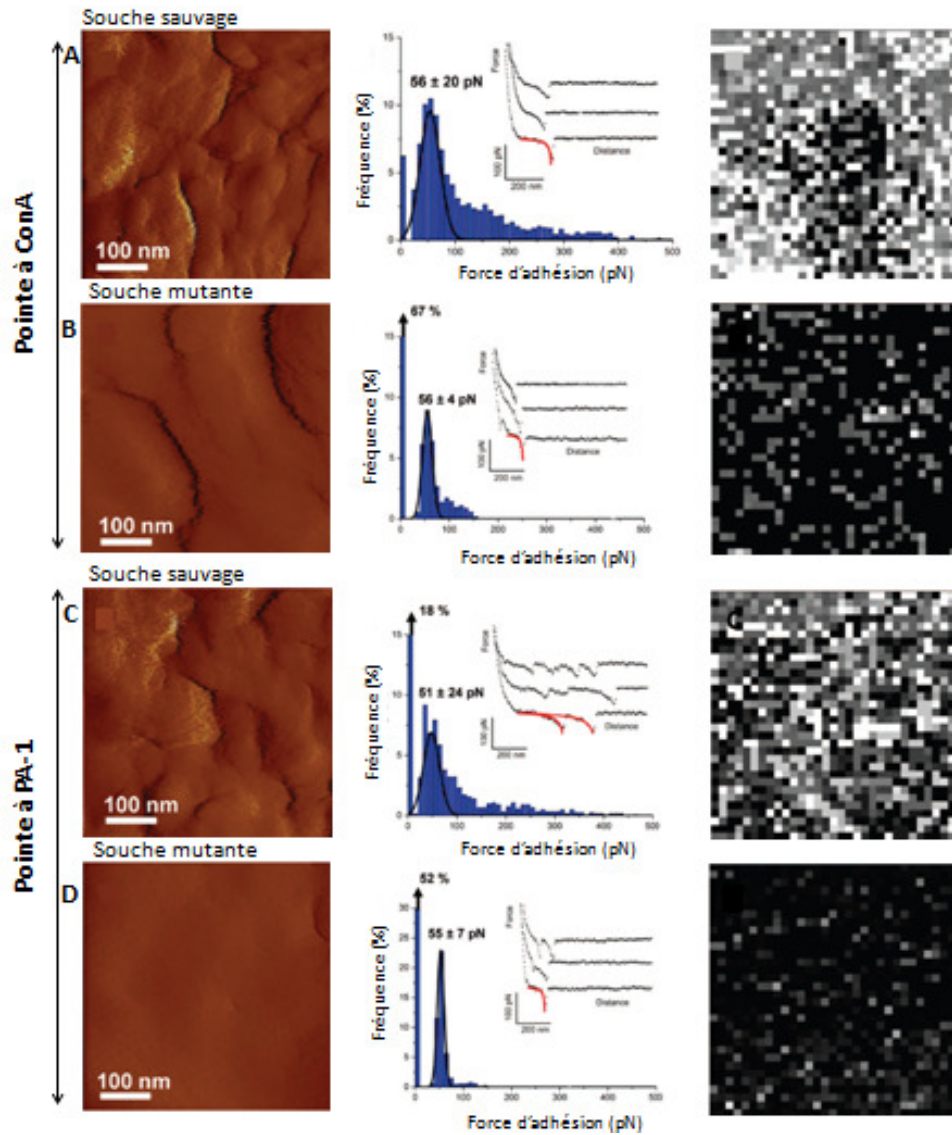


Figure 40. Détection, localisation et analyse de la reconnaissance des polysaccharides à mannoses et à galactoses à la surface de souche sauvage et mutante de LGG. (A) interaction entre Con-A et LGG sauvage, (B) interaction entre Con-A et LGG mutante, (C) interaction entre PA-1 et LGG sauvage et (D) interaction entre PA-1 et LGG mutante. [190].

*PRÉSENTATION DU
PROJET DE
RECHERCHE*

Un grand nombre de processus biologiques sont contrôlés par des interactions entre les sucres, qui tapissent les membranes des cellules, et des protéines appelées lectines^[33]. Ces interactions sont notamment engagées par de nombreux éléments pathogènes, comme les bactéries, les virus, les parasites ou les toxines, pour se fixer aux cellules hôtes^[10]. La conception de petites molécules, capables de se lier aux lectines, permettrait de contrôler ces différents processus. Le développement et la synthèse chimique de ligands, ciblant fortement les lectines, constituent donc un large champ d'investigation en glycochimie qui trouve un intérêt croissant depuis une vingtaine d'année^[6]. Au regard d'une affinité entre sucres et lectines faibles, de l'ordre du micro au milli-molaire, la nature compense la faiblesse par la multivalence^{[3], [4]}. Le gain d'affinité observé est généralement bien supérieur à la simple addition des interactions individuelles. Ce phénomène est généralement désigné par l'effet multivalent ou « effet cluster »^[5]. La multivalence représente, de ce fait, un phénomène biologique extrêmement intéressant à étudier. La synthèse chimique de ligands multivalents offre la possibilité de mener des études de multivalence sur les interactions sucre-lectine.

Notre projet s'inscrit dans ce contexte. Il a été mené au sein de l'unité BMBI UMR-CNRS 7338 dans l'équipe NanoInBio sous la direction de Dr. El Kirat et dans l'unité FRE-3580-CNRS, sous la co-direction de Dr. Morandat. Le projet a été mené en collaboration avec Dr. Sébastien Gouin (laboratoires CEISAM à Nantes, UMR-6230), Dr. Mehdi Almant (laboratoire des glucides à Amiens, UMR-6219) et Dr. Julie Bouckaert (unité de glycobiochimie structurale et fonctionnelle, UMR-8576). Une première partie du projet a consisté en la caractérisation fondamentale de l'interaction multivalente entre des ligands synthétiques et une lectine multivalente modèle. La deuxième partie du projet, d'aspect plus appliqué, s'inscrit dans un projet multidisciplinaire qui porte sur l'investigation de l'effet thérapeutique de nouveaux ligands glycosylés spécifiques aux lectines d'*Escherichia coli* uropathogène.

Ainsi, dans une première partie du projet, nous nous sommes proposés de mener, par AFM, une caractérisation fondamentale des interactions multivalentes sucre-lectine. Des ligands synthétiques, développés par nos collaborateurs chimistes, ont été étudiés en interaction avec une lectine modèle, la lectine d'arachide. Les ligands, à base de galactose, sont portés par une charpente saccharidique via un bras espaceurs en oligoéthylène glycol. Ils diffèrent par la valence et la longueur du bras espaceur. Nous avons disposé de ligand à

bras espaceurs court (0.45 nm) moyen (1,8 nm) et long (4,5 nm), et à 1, 2 ou 3 galactoses. Dans un premier temps, la lectine d'arachide (PNA) a été utilisée comme lectine modèle. Notre choix s'est porté sur la PNA car elle est spécifique au galactose, elle est tétramérique et tétravalente et sa structure cristalline est bien connue. Dans ce travail de thèse, nous avons procédé, par AFM, à la caractérisation de l'influence de la longueur des bras espaceurs et de la valence des ligands sur leur interaction avec la PNA. Nous avons, par ailleurs, évalué la capacité qu'ont ces composés à former des réseaux avec la lectine. L'AFM est une technique relativement complète et dont une maîtrise du savoir faire existe depuis une dizaine d'année dans nos laboratoires. Elle nous a permis de visualiser des structures nanométriques avec une haute résolution. De plus, la reconnaissance moléculaire spécifique a été étudiée par spectroscopie de force sous conditions physiologiques et en temps réel. Également, l'exploration de la dynamique de l'interaction sucre-lectine et la détermination des paramètres cinétiques et thermodynamiques qui la régissent ont été menées. Ainsi, l'AFM nous a permis d'approfondir les études des ligands synthétiques multivalents et compléter celles qui ont été menées précédemment par nos collaborateurs.

Dans une deuxième partie du projet, nous nous sommes intéressés à l'étude de ligands synthétiques multivalents à base de mannoside d'heptyle. Cette partie de la thèse se place dans un cadre plus large de recherche de nouvelles molécules thérapeutiques basées sur une stratégie antiadhésive pour les maladies infectieuses. En effet, l'implication de lectines bactériennes ou virales dans des processus cruciaux de l'infection fait d'elles de potentielles cibles thérapeutiques. Le concept de la stratégie antiadhésive dans la prévention et/ou le traitement des maladies infectieuses permet le blocage de l'infection dans une étape précoce de la maladie. De plus, la thérapie antiadhésive ne tue pas le pathogène. Il est donc admis que cette approche présente peu de risque d'apparition de résistance. En effet, les infections bactériennes ont toujours été traitées aux antibiotiques. Cependant, une résistance envers la plupart des antibiotiques induit une pression de sélection plus faible et conduit parfois à la résurgence de pathologies anciennes, tel que la tuberculose. Dès lors, une rationalisation de la consommation des antibiotiques s'impose. Néanmoins, l'industrie pharmaceutique a connu peu d'innovation dans le développement de nouveaux agents antimicrobiens. Dans ce contexte, la stratégie d'une thérapie antiadhésive a été évoquée depuis 1980. Une première preuve du concept a été démontrée par la co-administration,

dans un modèle murin d'infection urinaire, de α -ManOMe. Les résultats de cette étude ont confirmé que le α -ManOMe peut prévenir la colonisation par *E. coli* [77]. Depuis cette première expérience, l'approche antiadhésive séduit la communauté scientifique.

L'utilisation de glyco-conjugués dans l'inhibition de l'adhésion des bactéries au tractus urinaires prévient la formation des biofilms en occupant les récepteurs bactériens (Figure 41).

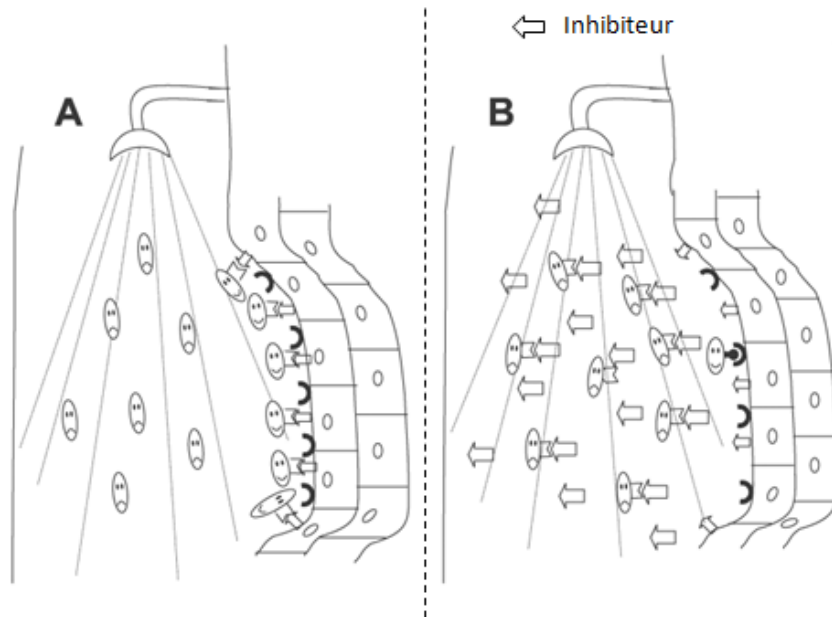


Figure 41. Représentation schématique de la stratégie antiadhésive (A) fixation des bactéries sur les cellules saines (B) En présence d'inhibiteurs, les bactéries ne peuvent plus se fixer. [256].

En collaboration avec nos partenaires chimistes et notre partenaire microbiologiste nous avons envisagé d'évaluer cette approche antiadhésive dans le traitement des infections urinaires chroniques dues à *UPEC*. Les recherches ont été investies depuis une dizaine d'année par Dr. Bouckaert. Elle a mis en évidence une forte affinité du mannoside d'heptyle (HM) vis-à-vis des récepteurs bactériens [69]. Ainsi, des molécules glycosylées multivalentes ont été synthétisées, par Dr. Gouin et Dr. Almant, à bases de HM. Dans ce projet, notre équipe s'est chargée de l'évaluation de l'interaction des nouveaux ligands et les lectines bactériennes impliquées dans l'infection à l'échelle moléculaire par imagerie AFM et par spectroscopie de force.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Chapitre 1 : Matériel

1.1. Les ligands synthétiques

Les ligands étudiés sont des molécules de synthèse multivalentes basées sur une charpente saccharidique. Ils ont été préparés dans l'équipe de Dr. Sébastien Gouin. Les ligands sont greffés par voie covalente sur les positions primaires d'unités monosaccharidiques constituant la charpente. La présence d'une fonction amine libre est indispensable afin de permettre le greffage des ligands aux pointes AFM (comme sera expliqué ultérieurement dans le paragraphe consacré aux protocoles). La multivalence est assurée par l'enchaînement des monosaccharides constituant la charpente, reliés entre eux par des liaisons glycosidiques alpha (1,4), comme expliqué par le schéma ci-dessous (Figure 42).

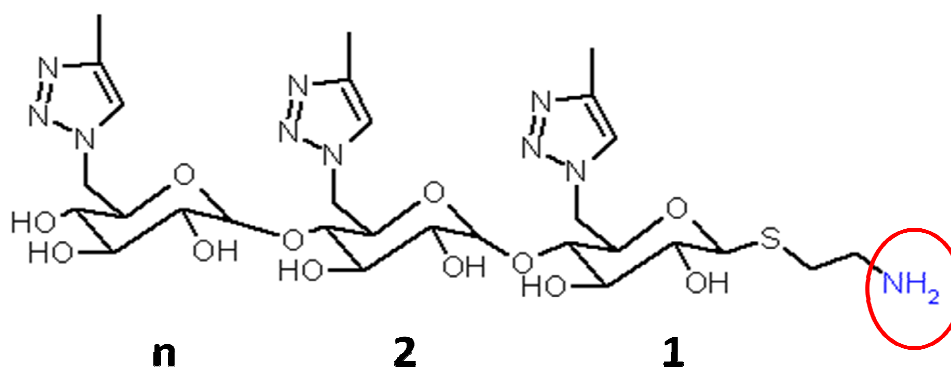


Figure 42. Structure de la charpente saccharidique utilisée dans la conception des ligands glycosylés, n =valence. Charpente dessinée avec ISIS Draw 2.3.

Cette structure particulière de la charpente confère plusieurs avantages au système, notamment, la possibilité de moduler le nombre de sucres qui la composent. En effet, chaque sucre de la charpente porte un épitope, par conséquent, le nombre d'épitopes augmente avec le nombre de sucres composant la charpente. De plus, la liaison glycosidique alpha (1,4) offre à cette structure une certaine rigidité et une possible orientation hélicoïdale des épitopes qui permet aux ligands une distribution régulière dans l'espace et une plus grande accessibilité pour leurs récepteurs.

1.1.1. Ligands à terminaison galactose

Afin d'étudier l'influence de la valence et la longueur de la charpente sur les reconnaissances spécifiques, un premier lot de ligands à base de galactose a été conçu. L'épitope galactose est dans ce cas relié à la charpente saccharidique via des espaceurs de type oligoéthylène glycol. La longueur de ces espaceurs peut être modulée. Ainsi, nous avons disposé de ligands à différentes longueurs d'espaceurs, à savoir, des ligands courts (CC d'environ 0,45 nm), des ligands moyens (CM d'environ 1,8 nm) et enfin des ligands longs (CL d'environ 4,5 nm). Les espaceurs en oligoéthylène glycol offrent aux ligands une flexibilité et une adaptabilité plus importante. Cependant, ils présentent un inconvénient important relatif à leur forte mobilité dans l'espace. Ceci entraîne un coût entropique important lors de la liaison des épitopes avec le récepteur^[6]. Par ailleurs, nous avons disposé de ligands mono (1Gal), di (2Gal) et trivalents (3Gal). L'ensemble de ligands, dessinés moyennant le logiciel ISIS Draw 2.3, est regroupé ci-dessous dans la Figure 43 .

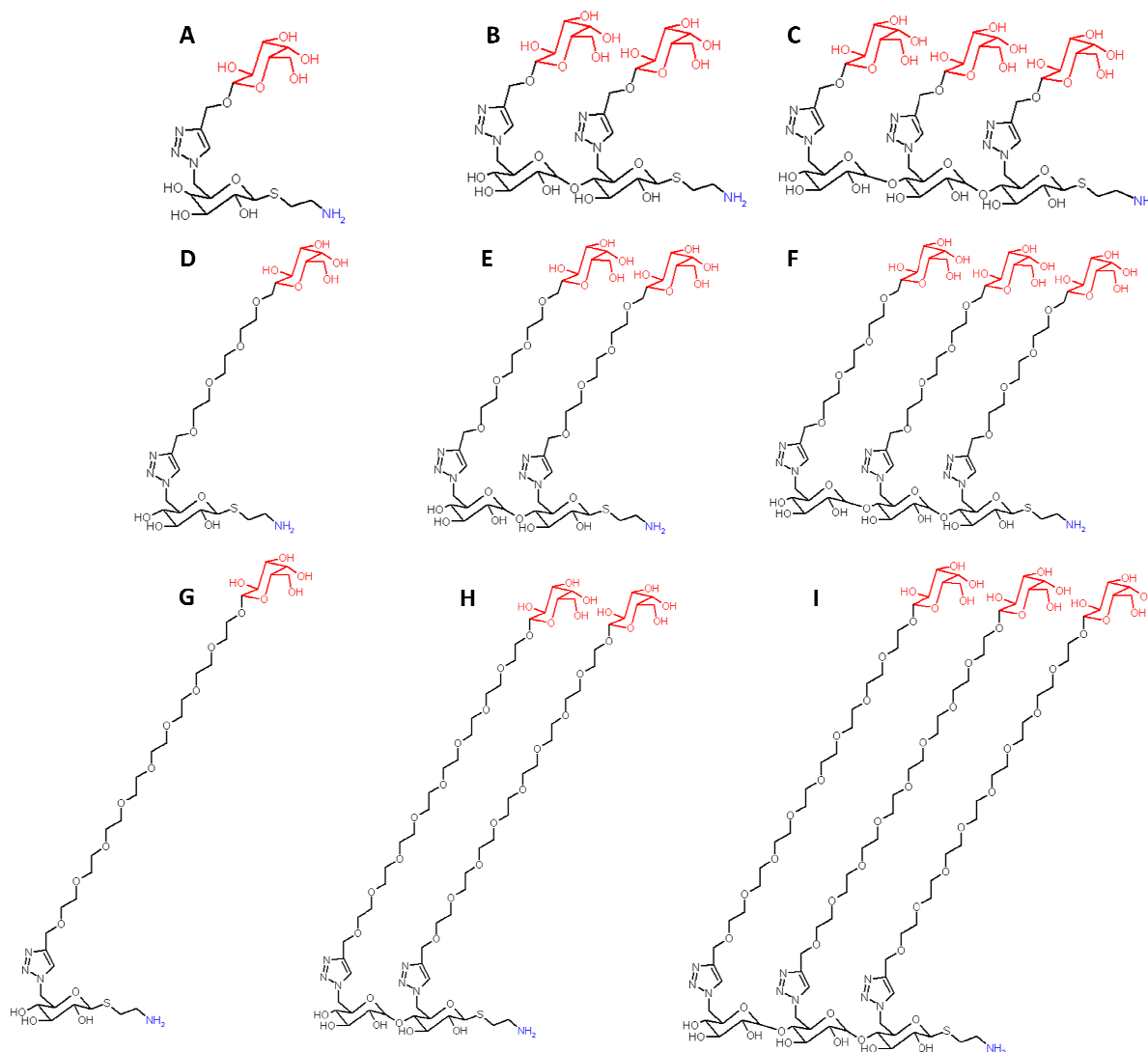


Figure 43. Structure des ligands à galactose. (A) CC1Gal, (B) CC2Gal, (C) CC3Gal, (D) CM1Gal, (E) CM2Gal, (F) CM3Gal, (G) CL1Gal, (H) CL2Gal et (I) CL3Gal. Ligands dessinés avec ISIS Draw 2.3.

1.1.2. Ligands à terminaison α -D-mannoside d'heptyle

Dans le contexte de recherche de molécules thérapeutiques innovantes pour le traitement des infections urinaires chroniques, une gamme de ligands à α -D-mannoside d'heptyle HM (Figure 44) a été conçue. Le HM est une molécule simple capable d'interagir fortement avec les récepteurs FimH responsables de l'adhésion bactérienne aux cellules uroépithéliales.

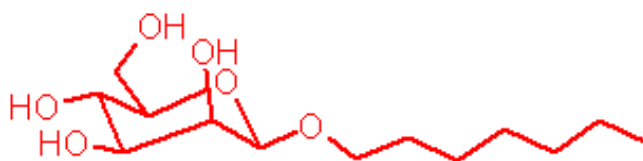


Figure 44. Structure du mannoside d'heptyle.

Des ligands de différentes valences, basés sur le HM, ont été conçus par l'équipe de Dr. Gouin. 1, 2, 3 ou 7 résidus HM ont été greffés sur la charpente saccharidique (présentée dans la Figure 42). Ainsi, dans notre étude, nous avons disposé de ligand mono HM-1, di HM-2, tri HM-3 et heptavalents HM-7 présentés ci après (Figure 45).

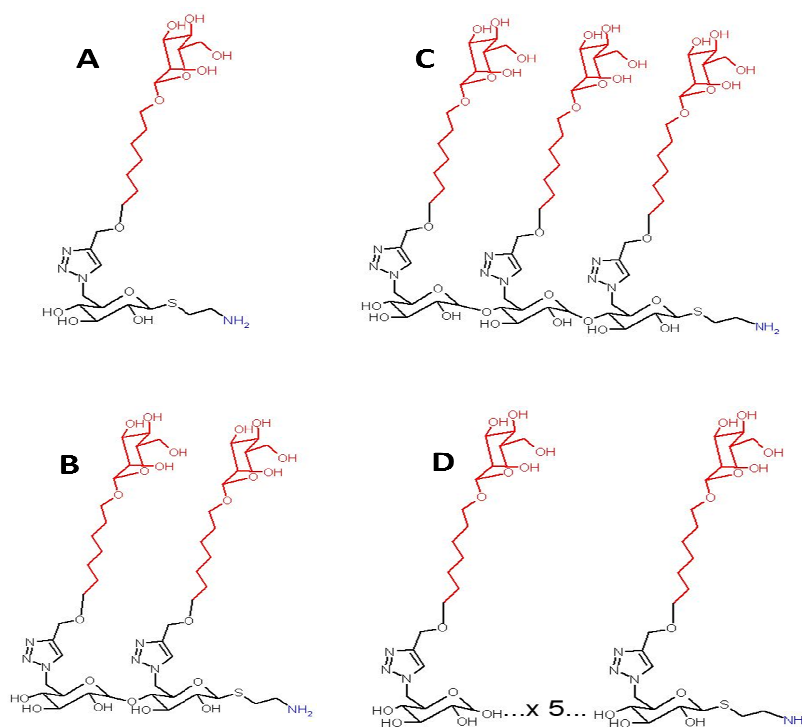


Figure 45. Structure des ligands à mannoside d'heptyle. (A) HM-1, (B) HM-2, (C) HM-3 et (D) HM-7. Ligands dessinés par ISIS Draw 2.3.

1.2. Les récepteurs purifiés

Dans notre étude des interactions moléculaires spécifiques par AFM, nous avons eu recours à des solutions de récepteurs commerciales (PNA, ConA) ou préparés par nos partenaires (FimH).

1.2.1 La lectine d'*Arachis hypogaea* (PNA)

La PNA, lectine extraite à partir de graines d'arachides, est une lectine spécifique au galactose. La lectine PNA, purifiée à 99% portant la référence L0881, a été commandée chez Sigma-Aldrich. Une solution de PNA à 0,5 mg/mL (4,5 μ M) est préparée dans du tampon PBS (2 mM, 150 mM NaCl, ajusté à pH 7,2). Après homogénéisation, la solution est utilisée tout de suite ou stockée à 4°C pour un délai qui ne dépasse pas 5 jours.

1.2.2 La lectine de *Concanavalia ensiformis* (ConA)

La ConA, lectine extraite à partir de graines de *Concanavalia ensiformis*, est une lectine spécifique au mannose. La ConA, pure à 99% portant la référence C7275, a été commandée chez Sigma-Aldrich. Une solution de ConA à 0,5 mg/mL a été préparée dans du tampon PBS (2 mM , 150 mM NaCl, ajusté à pH 7,2). Après homogénéisation, la solution est utilisée tout de suite ou stockée à 4°C pour un délai qui ne dépasse pas 5 jours.

1.2.3 L'adhésine fimbriale FimH

L'adhésine fimbriale FimH, lectine spécifique aux résidus mannosylés, a été utilisée dans une première partie de l'étude sous sa forme purifiée à partir de bactéries. L'expression et la purification du FimH ont été effectuées dans l'équipe de notre collaboratrice Dr. Julie Bouckaert à Lille. Nous avons ainsi disposé d'une solution mère purifiée de FimH à 90 µM qui a été diluée à 10 µM dans de l'eau ultra-pure et aliquotée en aliquotes de 100 µL. Les aliquotes, prévus à une utilisation unique, ont été stockés à -20°C. Avant chaque utilisation, un aliquote de FimH est décongelé à température ambiante.

1.3. Les souches d'*Escherichia coli*

Comme précédemment mentionné dans la partie bibliographique, *Escherichia coli* représente le micro-organisme le plus fréquent dans le diagnostic des infections du tractus urinaires. Les souches utilisées dans notre étude ont été isolées et sélectionnées par l'équipe de Dr. Bouckaert.

1.3.1. *E. coli* uropathogène WT-UTI89

La souche WT-UTI89 nous a été fournie par Dr. Bouckaert sous forme de stocks glycérolés. Cette souche présente la particularité d'exprimer l'adhésine FimH en continue et sans aucun rétrocontrôle. A partir des stocks, une culture liquide de WT-UTI89 à 37°C sous une agitation de 180 tours/min a été effectuée. Elle a été obtenue par ensemencement solide/liquide de 5 mL de milieu LB liquide additionné de 20 µg/mL de chloramphénicol. Après 24h de culture, une sélection sur boîte LB-agar, additionnée de 10 µg/mL de Kanamycine et de 20 µg/mL de chloramphénicol, est effectuée par ensemencement liquide/solide en stries espacées sur la surface de la gélose. Après 24 heures de culture à

37°C, des colonies blanchâtres typiques sont obtenues. Les boîtes de cultures sont stockées à 4°C et sont utilisées dans un délai maximal de 7 jours. Le stock de bactérie est renouvelé chaque semaine.

1.3.2. Mutant d'*E. coli* Q133K

La souche mutante Q133K nous a également été fournie par Dr. Bouckaert sous forme de stocks glycérolés. Ce mutant Q133K est morphologiquement identique à la souche WT-UTI89 et il nécessite exactement les mêmes conditions de culture. Cependant, il présente une altération fonctionnelle due à une mutation du site de reconnaissance du sucre au niveau de l'adhésine FimH. De ce fait, le FimH perd sa fonction adhésive et la pathogénicité du mutant est diminuée. La préparation de stock de bactéries mutantes de la souche Q133K sur boîtes s'est fait de la même manière que pour la souche WT-UTI89 cité précédemment. Le stockage s'est également fait à 4°C pour une durée maximale de 7 jours au bout desquels le stock est renouvelé.

1.4. Les réactifs chimiques

Des réactifs de qualité analytique et commercialement disponibles ont été utilisés. L'acide citrique, le N-Hydroxysuccinimide (NHS), le N-(3-Diméthylaminopropyl)-N'-éthylcarbodiimide hydrochloride (EDC), l'acide 11-mercapto-undécanoïque ($\text{HS}(\text{CH}_2)_{10}\text{CO}_2\text{H}$), la triéthylamine ainsi que la poly-L-lysine ont été commandés chez Sigma-Aldrich (France). Le diméthyle sulfoxyde (DMSO), l'éthanolamine et le sodium cyanoborohydrure (NaCNBH_3) ont été fournis par Fluka (France). Le chloroforme a été procuré chez VWR (France).

Des molécules d'acétal-PEG829-NHS, de 6 nm de longueur, ont été commandées chez Hermann J. Gruber, de l'Institut de biophysique, Université J. Kepler, Linz-Autriche. L'utilisation de ces molécules comme espaceurs est une pratique courante en spectroscopie de force.

Chapitre 2 : Microscopie à force atomique

La microscopie à force atomique a été la principale technique utilisée dans notre étude de la reconnaissance moléculaire spécifique entre ligands synthétiques multivalents et récepteurs. L'imagerie AFM ainsi que la spectroscopie de force ont nécessité une préparation préalable des échantillons. Dans ce chapitre sont présentées les méthodes de fonctionnalisation des surfaces, de l'acquisition et enfin du traitement des données.

2.1 Préparation des échantillons

Pour les expériences d'imagerie AFM et de spectroscopie de force, les éléments analysés (protéines et bactéries) doivent être déposés sur des supports adéquats. Exclusivement pour les expériences de spectroscopie de force, les ligands synthétiques doivent être greffés aux pointes AFM.

2.1.1 Fonctionnalisation des surfaces

Les surfaces utilisées diffèrent selon l'objectif de la manipulation. Généralement, les surfaces de mica sont utilisées pour l'imagerie AFM et les surfaces d'or sont utilisées pour la spectroscopie de force, les ont été privilégiées.

Le mica utilisé est commercialisé sous forme de lame que l'on découpe en carrés de 5 × 5 mm (ou cercles de 5 mm de diamètre) et que l'on colle, avec de la colle Epoxy, sur les disques métalliques. Ces derniers sont indispensables pour le positionnement de l'échantillon sur la plateforme piézoélectrique de l'AFM.

Les surfaces d'or ont été préparées par évaporation thermique en utilisant le système de dépôt Edwards E306A sous un vide de 2×10^{-6} mbar. Pour ce faire, des lames de verre (10 × 33 mm) ont été nettoyées avec de l'eau puis de l'éthanol et enfin avec du chloroforme. Après un séchage à l'azote, les lames de verres sont disposées dans l'évaporateur de métaux. Les boules de chrome (Cr) et d'or (Au) sont disposées dans leurs carrousels respectifs. Sur les lames de verres propres, sont déposées par évaporations deux couches de 5 nm de Cr et 30 nm d'Au respectivement. La couche de chrome représente une couche

d'accroche pour la couche d'or. Les surfaces obtenues sont découpées en carrés de 5 × 5 mm et sont utilisées pour le greffage des protéines.

2.1.1.1 Greffage de la PNA

➤ *Formation de réseau PNA-ligands pour imagerie AFM à l'air*

Les surfaces de mica ont été utilisées dans cette manipulation. Les surfaces sont nettoyées à l'eau et à l'éthanol puis séchées sous un flux d'azote. Un clivage par un ruban adhésif (scotch) permet d'obtenir une surface plane et propre. Cette expérience s'est basée sur le protocole de référence, largement repris dans la littérature, développé en 2008 par Gour et Verma ^[167]. Brièvement, 100 µL de PNA 4,5 µM sont mélangés avec un volume équivalent de ligands 100 µM ou 1000 µM (cela dépend de l'objectif de l'expérience) et avec 200 µL de PBS pH 7,2 (additionnés de CaCl₂ et MnCl₂ 0,5 mM concentration finale). La réaction PNA-ligands se déroule pendant 1 heure à 37°C. Le mélange est par la suite dilué 50 fois par de l'eau ultra-pure. 50 µL de la préparation sont déposés sur la surface de mica fraîchement clivée. Les surfaces ainsi préparées sont ensuite incubées à 30°C pendant 2 heures puis rincées doucement à l'eau et séchées pendant 2 heures à 30°C. Les surfaces sont ainsi prêtes pour l'imagerie AFM à l'air.

➤ *Greffage de la PNA et de la ConA sur surfaces d'or pour la spectroscopie de force*

Cette préparation s'est basée sur le protocole d'El Kirat et al. ^[143]. Les surfaces d'or ont été utilisées pour les expériences de spectroscopie de force. Avant la fonctionnalisation, les surfaces ont été nettoyées à l'eau ultra-pure et à l'éthanol. Ensuite, les surfaces, séchées sous un flux d'azote, sont traitées par UV-ozone pendant 10 minutes. Après un rinçage à l'eau ultra-pure et à l'éthanol, les surfaces sont directement immergées dans une solution de HS(CH₂)₁₀CO₂H 1 mM dans l'éthanol, préalablement soniquée pendant 20 minutes, pour une incubation d'une nuit. Les surfaces sont ensuite rincées comme suit : 3 fois à l'éthanol, 1 fois à l'eau ultra-pure, immergées 1 fois dans un bain de NaOH 1 mM pH 10 et enfin rincées 2 fois à l'eau ultra-pure. Ainsi, des surfaces carboxylées sont obtenues. Afin de permettre leur réaction avec des amines primaires, ces dernières sont activées pendant 30 minutes à température ambiante dans une solution de NHS (170 mM en concentration finale) et EDC (260 mM concentration finale) dans le PBS pH 7,2. Les surfaces activées sont par la suite immergées dans une solution de PNA 4,5 µM dans le PBS pH 7,2 pendant 50 minutes. Après

rinçage, les surfaces sont stockées dans le PBS jusqu'à utilisation, dans un délai qui ne dépasse pas 48 heures.

La même procédure a été appliquée pour la fixation de la ConA sur les surfaces d'or.

2.1.1.2 Greffage du FimH

Comme pour la PNA, le greffage du FimH s'est fait sur des surfaces d'or. Le même protocole cité précédemment dans le paragraphe 2.1.1.1 a été utilisé. Brièvement, des surfaces d'or ont été nettoyées, carboxylées dans une solution de thiols, activées dans une solution de NHS/EDC puis incubées dans une solution de FimH 10 μM et enfin rincées et stockées.

2.1.2 Immobilisation des bactéries sur surfaces de mica

Le mica a été le support utilisé pour l'étude des bactéries aussi bien en imagerie AFM qu'en spectroscopie de force. Cependant, la méthode de fixation des bactéries sur le mica dépendait de l'objectif de la manipulation.

2.1.2.1 Immobilisation à l'air

La fixation des bactéries (des deux souches étudiées, WT-UTI89 et Q133K) sur les surfaces de mica pour l'imagerie AFM à l'air s'est basée sur le protocole de Tripathi et *al.*^[191]. A partir d'une culture de 48 heures à 37°C en mode statique ($\text{DO}_{600\text{nm}}=1.2$), 100 μL sont centrifugés à 5000 g pendant 15 minutes et le culot est repris dans 1000 μL de PBS pH 7,2. Sur un mica propre et fraîchement clivé, 100 μL de la suspension sont déposés et les surfaces sont incubées à 30°C pendant 2 heures. Puis, l'excédent de liquide est enlevé et les surfaces rincées sont séchées à 30°C pendant 2 heures.

Afin de garantir la morphologie des bactéries soumises à la centrifugation, cette étape a fait l'objet d'une optimisation. En effet, il a fallu vérifier que la centrifugation ne détériore pas l'état des *pili*.

2.1.2.2 Immobilisation en liquide

La fixation des bactéries pour l'imagerie AFM en liquide et pour la spectroscopie de force a fait l'objet d'une optimisation particulière. Plusieurs méthodes de fixation ont été reportées dans la littérature, dont l'adsorption électrostatique via la poly-L-lysine (PLL) ou le

poly-éthylène-imine (PEI), bien adapté dans le cas de bactéries chargées négativement. Le protocole que nous avons choisi, utilisant la PLL, est basé sur celui décrit pour la première fois par Schaer-Zammaretti et Ubbink ^[209] et repris par Chen et *al.* ^[186]. Nous avons ainsi adapté le protocole à nos bactéries et à l'objectif de notre expérience. La densité de surface ainsi que la force d'attachement à la surface ont été optimisées. Le paragraphe 2.2.1 de la section résultats présentes les différentes étapes de l'optimisation.

Pour ce faire, 100 μL d'une culture de bactéries (WT-UTI89 et Q133K) de 48 heures en mode statique ($\text{DO}_{600\text{nm}}=1,2$), sont centrifugés pendant 15 minutes à 5000 g. Le culot est repris dans 400 μL de PBS pH 7,2 et la suspension bactérienne est homogénéisée doucement pendant 10 minutes. Cette suspension homogénéisée est directement utilisée pour l'immobilisation de bactéries en liquide. Une surface de mica propre et fraîchement clivé doit être préalablement incubée pendant une nuit dans une solution de PLL à 0.1% dans le PBS pH 7,2. La surface revêtue de PLL, est rincée au PBS juste avant utilisation. 100 μL de la suspension bactérienne sont déposés pendant 10 minutes sur la surface. Ensuite, l'excédent de liquide est prélevé et la surface est exposée à l'air pendant 10 minutes. Enfin, les surfaces sont recouvertes par du tampon PBS froid. Les surfaces sont directement utilisées en AFM dans un délai qui ne dépasse pas 2 heures.

2.1.3 Fonctionnalisation des pointes AFM

Les pointes AFM ont été fonctionnalisées en se basant sur le protocole décrit par Francius et *al.* ^[162]. Les pointes AFM sont lavées avec du chloroforme puis nettoyées pendant 30 minutes sous UV-ozone. Elles sont, par la suite, rincées à l'éthanol et séchées sous un très faible flux d'azote. Les pointes, ainsi nettoyées, sont incubées pendant une nuit dans une solution d'éthanolamine-DMSO (1-2 v / v) afin de les recouvrir par des groupes amines. Les pointes sont ensuite rincées avec du DMSO puis de l'éthanol et sont séchées sous un très faibles flux d'azote. Après cela, les pointes amino-fonctionnalisées sont incubées pendant 2 heures dans une solution d'acétal-PEG829-NHS 1 mg/mL dans le chloroforme additionné de triéthylamine à 20% (v / v). Par la suite, les pointes sont rincées dans des bains successifs de chloroforme et séchées sous un très faibles flux d'azote. Sur un disque d'acier propre, nous préparons un ruban adhésif sur lequel on fixe les mico-leviers. 150 μL d'acide citrique 1% dans l'eau sont déposés sur les pointes. Cette étape dure 15 minutes, pendant lesquelles les

fonctions acétals sont déprotégées et rendues réactives avec les fonctions amines présentes sur les ligands synthétiques. Les pointes sont par la suite abondamment rincées à l'eau (3 x 5 minutes). Pour le couplage du ligand, les pointes sont recouvertes par 116 μL de PBS (pH 7,2) additionnée de 30 μL de la solution de ligand 0,2 mg/mL et 4 μL d'une solution 1 M de NaCNBH_3 dans le NaOH (10 mM, pH 10). Après 50 minutes d'incubation, la solution contenant les ligands est aspirée et les pointes sont rincées au PBS. Ensuite, 5 μL d'une solution d'éthanolamine 1 M dans l'eau sont déposés sur les pointes pendant 10 minutes afin de bloquer les groupements benzaldéhydes n'ayant pas réagi. Enfin, les pointes sont rincées et conservées dans du PBS (pH 7,2) jusqu'à utilisation dans un délai maximal de 48 heures. La Figure 46 résume les 3 principales étapes de fonctionnalisation en phase liquide des pointes AFM.

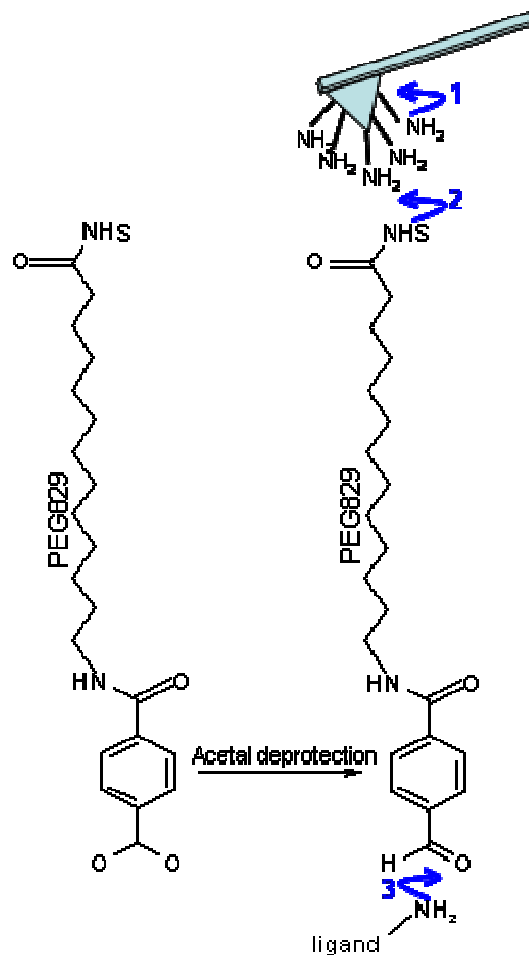


Figure 46. Représentation schématique des principales étapes pour conjuguer les ligands sur les pointes AFM via des bras PEG. (Molécules acétal-PEG829-NHS dessiné sur ISIS Draw 2.3).

2.2 Acquisition des données

Les échantillons préparés, selon les protocoles exposés dans les sections précédentes, ont été analysés par imagerie et spectroscopie de force moyennant un microscope Nanoscope III Multimode AFM (Bruker, Santa Barbara, CA, USA) équipé d'un scanner à céramiques piézoélectriques de $125 \times 125 \times 5 \mu\text{m}$ (J-scanner). L'appareil est fonctionnel aussi bien à l'air qu'en liquide. Une cellule en acier sert de support des pointes pour les expériences à l'air. Sous liquide, la cellule d'acier est remplacée par une cellule en quartz. Les pointes, en Si_3N_4 (Microlevers, Bruker, Santa Barbara, CA, USA), utilisées pour les expériences sont exclusivement celles portées par les leviers 1 et 2 de constantes de raideur (annoncées par le commerçant) de 0,016 et 0,032 N/m. Au regard de leurs faibles constantes de raideur, ces pointes sont bien adaptées aux échantillons biologiques. La pointe est engagée sur la surface à une force entre 100 et 300 pN. Immédiatement après l'engagement, la force est minimisée afin de préserver l'échantillon. Dans le cas de la spectroscopie de force, la minimisation de la force d'appui préserve également le greffage de la pointe.

2.2.1 Imagerie AFM

Selon l'échantillon et l'objectif de l'expérience, nous avons exploité les images de hauteur ou les images de déflexion.

2.2.1.1 Imagerie AFM à l'air

L'imagerie AFM à l'air a été utilisée dans notre étude principalement pour la visualisation de réseaux de molécules de PNA reliées via des ligands multi-galactosides. Elle a aussi servi à l'observation de l'état d'agrégations des bactéries sous l'influence de ligands multi-mannoside d'heptyle.

➤ Paramètres d'imagerie à l'air de réseaux PNA-ligands

Les images de hauteur des réseaux PNA-ligands à l'air ont été acquises à une vitesse de scan de 2 Hz avec une barre d'échelle en z variant de 7 à 10 nm. La majorité des images présentent 512×512 pixels et plus rarement 256×256 pixels. Pour chaque échantillon, nous avons enregistré 5 images (de $15 \mu\text{m}$, $10 \mu\text{m}$, $5 \mu\text{m}$, $2,5 \mu\text{m}$ et $1 \mu\text{m}$ de côté respectivement) sur 3 zones différentes. L'expérience a été reproduite deux fois.

➤ *Paramètres d'imagerie à l'air des bactéries*

Les bactéries ont été imagées à l'air sous une vitesse de scan maximale de 2 Hz. Nous avons exploité dans cette expérience les images de déflexion, plus représentatives de la morphologie des bactéries. Les images présentent 512×512 pixels. Pour chaque échantillon, nous avons enregistré 6 images (de $50 \mu\text{m}$, $25 \mu\text{m}$, $10 \mu\text{m}$, $5 \mu\text{m}$, $2,5 \mu\text{m}$ et $1 \mu\text{m}$ de coté respectivement) sur 3 zones différentes. L'expérience a été reproduite, au minimum, trois fois.

2.2.1.2 Imagerie AFM sous liquide

L'imagerie sous liquide des échantillons a été principalement utilisée dans notre étude pour vérifier la qualité des surfaces et pour localiser des zones particulières dans les expériences de spectroscopie de force.

➤ *Paramètres d'imagerie sous liquide des protéines*

Avant chaque expérience de spectroscopie de force, une zone de la surface d'or, greffée de protéines, est localisée par imagerie AFM sous liquide. Cette opération a pour objectif de vérifier la qualité de la zone analysée. La qualité est déterminée par l'absence de rayure sur l'or et par la présence de peu ou pas d'agrégats de protéines. En effet, ces facteurs sont déterminants de la réussite de l'expérience. Les paramètres d'imagerie ont été fixés, pour toutes les expériences, comme suit : Vitesse de scan = 4 Hz, échelle en z = 10 nm et nombre de pixels = 256×256 .

➤ *Paramètres d'imagerie sous liquide des bactéries*

Avant chaque expérience de spectroscopie de force, les bactéries sur la surface de mica sont repérées par imagerie AFM sous liquide. Par la suite, une zone exploitable est localisée sur une des bactéries repérées. Les paramètres de l'imagerie ont été fixés à une vitesse de 6 Hz et un nombre de pixels 256×256 . La vitesse relativement rapide ainsi que le faible nombre de pixels diminuent, certes, la qualité de l'image mais permettent de conserver l'intégrité de la bactérie et son attachement à la surface.

2.2.2 Spectroscopie de force

Nous avons procédé à des expériences de spectroscopie de force. Ces expériences consistent à exploiter le microscope à force atomique en mode forces-volumes. Ce mode

permet l'acquisition de courbes de force en même temps que des données de topographie. L'analyse des données générées a permis d'explorer les reconnaissances moléculaires spécifiques entre ligands synthétiques et récepteurs. Elle nécessite impérativement la fonctionnalisation préalable des surfaces (pointes et supports) par les partenaires moléculaires de l'interaction.

2.2.2.1 Etude de l'interaction ligands-récepteurs

L'étude de la reconnaissance, entre les récepteurs (PNA, ConA, FimH purifié et sur bactéries) et l'ensemble de ligands synthétiques dont nous avons disposé, s'est opérée à température constante maintenue à 21°C. Les expériences de spectroscopie de force ont été menées sous un tampon particulier. Le tampon doit être à pH adéquat à l'interaction entre la lectine étudiée et les ligands. Il doit également contenir les éléments ioniques indispensables à l'interaction, tel que les ions Ca^{2+} et Mn^{2+} requis pour la reconnaissance des résidus galactoses par la PNA.

Des forces-volumes de 256 courbes (16×16) ont été enregistrés sur des carrés de $500 \times 500 \text{ nm}^2$ pour une vitesse de scan comprise entre 1 et 2 Hz. Les paramètres d'acquisition des forces-volumes sont différents selon le récepteur en question. Dans le cas des récepteurs purifiés (PNA, ConA et FimH purifié) greffés sur les surfaces d'or, le « Ramp size » a été fixé à 100 nm et les vitesses d'approche et de retrait de la pointe ont été maintenues à 400 nm/s. Par ailleurs, les expériences de spectroscopie de force sur l'adhésine FimH bactérienne se sont opérées sur des carrés de $500 \times 500 \text{ nm}^2$ localisés sur la membrane de la bactérie. De part leurs hauteurs largement supérieures à celles des protéines, les paramètres d'acquisition des forces-volumes sur bactéries sont très différents. Le « Ramp size » a été fixé à 3 μm et les vitesses d'approche et de retrait de la pointe ont été maintenues à 3-4 $\mu\text{m/s}$. Le « trigger threshold » a été fixé dans les deux cas de figures (spectroscopie de force sur protéines et sur bactéries) à 0,2 V pour les pointes portées par un levier 1 et à 0,15 V pour celles portées par un levier 2.

2.2.2.2 Etude de la dynamique de l'interaction

La spectroscopie de force dynamique (DFS) offre la possibilité d'explorer, relativement facilement, la dynamique d'une interaction en faisant varier la vitesse de rétraction de la pointe tout en maintenant constants tous les autres paramètres. La DFS est donc basée sur

le changement du taux de chargement appliqué lors de la conduite de l'expérience. Nous avons investi la DFS dans l'étude de la dynamique de l'interaction entre la PNA et les multigalactosides d'une part et entre le FimH purifié et les multimannosides d'autre part. Les paramètres de l'expérience ont été maintenus à un « Ramp size » de 100 nm et à une vitesse d'approche de la pointe de 400 nm/s. La vitesse de retrait imposée a été variée entre 50 et 800 nm/s. Au-delà de 800 nm/s, l'hystérèse entre l'approche et le retrait devient trop important pour permettre d'exploiter les données résultantes. Nous rappelons que pour toutes les expériences, uniquement les pointes portées par les leviers 1 et 2 ont été utilisées, et ce après calibration.

Dans une autre approche, la variation du temps de contact entre la pointe et la surface nous a permis d'accéder à la constante cinétique d'association des complexes ligand-récepteur. Dans notre étude de l'interaction entre la PNA et le galactose, nous avons fait varier le temps de contact (paramètre AFM « Ramp delay ») de 0 à 2000 ms tout en gardant constants tous les autres paramètres.

2.2.3 Calibration des pointes AFM

Pour toutes les expériences de mesure de force, nous avons déterminé la constante de raideur de chaque levier. En effet, pour quantifier les forces, il est nécessaire de connaître la raideur du levier. Nous avons choisi l'approche basée sur l'étude des fluctuations thermiques du ressort au repos ^{[257], [258]}. Une relation de proportionnalité existe entre l'amplitude des fluctuations d'origine thermique et la constante de raideur du levier

$$K \times z^2 = k_B \times T \quad \text{Équation 15}$$

où k_B est la constante de Boltzmann, T la température en Kelvin, z^2 la moyenne des carrés des positions du cantilever par rapport à sa position moyenne prise comme référence ($z = 0$), et K une constante proportionnelle à la constante de raideur k du levier selon la relation $k = c \times K$. La constante de raideur k du levier peut donc s'écrire sous la forme

$$k = c \times \frac{k_B \times T}{z^2} \quad \text{Équation 16}$$

En pratique, la valeur de z^2 est obtenue en mesurant l'aire du pic caractéristique de la vibration thermique du levier. Le coefficient c est une constante géométrique propre à la

forme et au type du levier portant la pointe ^[257]. En étudiant l'influence des conditions de l'expérience (air, liquide), G. Francius a pu conclure que le paramètre c , et par déduction la constante de raideur, sont indépendants de la nature du milieu dans lequel on opère ^[259]. Au regard de ces résultats, nous avons procédé à la calibration à l'air. Bien que les expériences de spectroscopie de force se déroulent sous liquide, la calibration à l'air s'avère plus facile à réaliser.

La calibration s'est déroulée à l'air (Picoforce (PJ-scanner), Bruker, Santa Barbara, CA, USA) sous un « trigger threshold » de 2-5 V et un « Ramp size » fixé à 0,5-1 μm . La calibration se déroule en deux principales étapes. Une première étape consiste à déterminer la sensibilité du levier en V/m. Pour ce faire, la pointe est amenée au contact d'une surface rigide plane et propre. Les courbes d'approche retrait sont enregistrées. La sensibilité est alors déduite à partir de la pente de la portion droite de la courbe d'approche à l'appui. Une fois la sensibilité du levier obtenue, la pointe est mise à vibrer à sa propre fréquence et la constante de raideur est déduite directement à partir du fit du spectre vibrationnel obtenu.

2.3 Traitement des données

2.3.1 Traitement des images

L'ensemble des images acquises à l'AFM a été traité par le logiciel Nanoscope 531R1. Le traitement consiste à aplatir les images en ordre 3. Enfin, les images sont présentées en nuance de brun (table de couleur 2).

La détermination des aires des réseaux PNA, sur les images AFM à l'air, est effectuée moyennant le logiciel « Image J ».

2.3.2 Traitement des Forces-volumes

L'acquisition d'un force-volume génère 256 courbes de force. L'analyse de ces données brutes permet de regrouper les forces sous forme d'histogrammes de distribution. Pour ce faire, les courbes de force sont exportées et analysées une à une par le logiciel *PUNIAS3D* software (Strasbourg, France). Les pics spécifiques sont sélectionnés manuellement, cela permet de diminuer la prise en compte de pics non spécifiques (ce qui fausse les résultats). L'ensemble de valeurs de force généré dans *PUNIAS3D* est transféré dans le logiciel Origin

8.5 et la force la plus probable est déduite en appliquant un « fit gaussien » à l'histogramme de distribution.

Afin de vérifier la reproductibilité des forces enregistrées, pour chaque couple ligand-lectine, un nombre minimum de trois forces-volumes est traité.

Enfin, une application Java a été spécialement conçue pour pouvoir retracer les courbes de force, à partir des données extraites en ASCII, et de moduler leur affichage.

RÉSULTATS

Dans une interaction, de type ligand-récepteur, le terme valence se réfère au nombre de sites de liaison d'un récepteur ou de ligands reconnaissables par le récepteur.

Les interactions multivalentes régissent un grand nombre de phénomènes biologiques. La compréhension des processus impliqués dans les interactions multivalentes constitue une nouvelle approche dans le développement de nouveaux genres de médicaments.

La synthèse de ligands multivalents à carbohydrates constitue un domaine d'investigation très prometteur en glycochimie ^[260]. Dans notre projet, nous nous sommes intéressés à l'étude de l'effet de la multivalence sur les interactions entre des ligands synthétiques et leurs lectines spécifiques, par microscopie à force atomique (AFM).

L'ensemble des résultats de notre étude est regroupé dans la section ci après. Dans un premier chapitre nous présentons l'étude de l'effet de la multivalence sur les interactions entre les ligands synthétiques multivalents (Gal-L et HM-L) et leurs lectines spécifiques purifiées. Nous nous sommes intéressés à un premier lot de ligands, Gal-L, à base de galactose. Les ligands Gal-L diffèrent par la longueur du bras espaceur et le nombre de résidus galactose qu'ils portent. Nous avons étudié leur interaction avec une lectine végétale tétravalente, la lectine d'arachide (PNA). De plus, nous avons travaillé sur un deuxième lot de ligands, HM-L, composés de mannoside d'heptyle. Les ligands HM-L, diffèrent par le nombre de résidus HM qu'ils portent. Nous avons étudié leur interaction avec une lectine bactérienne monovalente, l'adhésine fimbriale (FimH). L'étude de l'influence de la multivalence des ligands HM vis-à-vis du FimH purifié se trouve étroitement liée au deuxième volet de notre travail présenté dans le chapitre suivant. En effet, dans le deuxième chapitre sont présentés les résultats de notre étude de l'influence de la multivalence sur les interactions bactéries-ligands. Dans le cadre de la recherche de nouvelles molécules thérapeutiques non antibiotiques pour les infections urinaires chroniques, notre intérêt s'est porté sur l'étude de la bactérie *Escherichia coli* uropathogène responsable de 90% des cas d'infection urinaire.

Chapitre 1 : Influence de la multivalence sur l'interaction entre une lectine modèle et les ligands multivalents à galactose

Dans cette première partie sont présentés les résultats relatifs à l'analyse de l'influence de la multivalence sur la reconnaissance entre les ligands multivalents synthétiques et la PNA. Les ligands étudiés sont des molécules synthétiques constituées d'une charpente glycosidique portant un, deux ou trois bras espaceurs de longueur variable (court, moyen et long) ^{[4], [261]}. Les bras espaceurs sont de types oligo-éthylène glycol ^[4]. Chaque bras espaceur porte à son extrémité un galactose reconnu par la lectine ^[4]. La lectine choisie pour cette étude est une lectine végétale tétramérique, présentant une structure en quatre sous-unités identiques ^[91]. Elle forme ainsi un dimère de dimère. Elle présente une spécificité, principalement, pour le galactose. Elle peut, également, reconnaître des résidus de lactose, de N-acétylgalactosamine et de N-acétyl-D-lactosamine ^{[3], [29]}.

1.1. Visualisation de l'effet de la multivalence par imagerie AFM

En solution, la mise d'une lectine multivalente en présence d'un ligand multivalent aurait pour conséquence la formation de réseaux ^[21]. À ce niveau de l'étude, notre objectif consistait à analyser le comportement des ligands multivalents Gal-L en présence de la PNA. Au regard de la nature tétravalente de la PNA (à pH neutre), son interaction avec les ligands multivalents engendrerait la formation de réseaux. Afin d'éviter les contraintes stériques, notre choix s'est porté sur les ligands munis des plus longs bras espaceurs et de différentes valences (CL1Gal, CL2Gal et CL3Gal). En effet, la formation d'agrégats sucre-lectine, de taille variable, n'est possible que si la structure multivalente présente une distance, entre les ligands, suffisante pour permettre une interaction multivalente sans contraintes stériques. L'imagerie AFM a été utilisée afin de visualiser les éventuels réseaux de PNA. Elle nous a ainsi permis d'analyser l'effet de la valence et de la concentration en ligands sur la formation de ces réseaux.

Une solution de PNA à 4,5 μM est mise en présence de différentes solutions de multi-galactosides à chaînes longues (CL1Gal, CL2Gal et CL3Gal). Le milieu réactionnel, à pH 7,2, est additionné des ions divalents Ca^{2+} et Mn^{2+} indispensables à la reconnaissance des galactoses par la lectine PNA. Un premier molaire PNA/ligands de 4,5/100 μM a été préparé. Après incubation, le mélange est déposé sur une surface de mica propre. Les surfaces sont par la suite imagées à l'air. Les images AFM sont groupées dans la Figure 47.

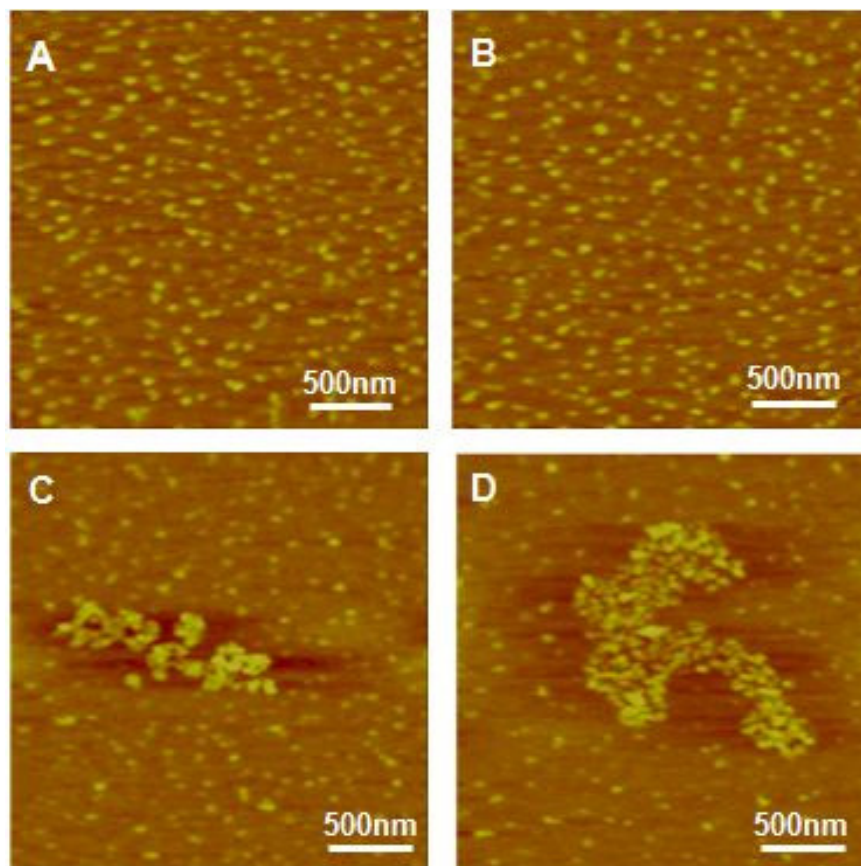


Figure 47. Effet de l'ajout des Gal-L mono, di et trivalent à une solution de PNA. PNA 4,5 μM dans PBS pH 7,2, Ligands 100 μM dans PBS pH 7,2, milieu réactionnel PBS pH 7,2 + CaCl_2 0,5 mM + MnCl_2 0,5 mM. Images AFM à l'air ($z = 10$ nm, vitesse de scan= 2 Hz, nombre de pixels = 512×512); (A) PNA sans ajout de ligand, (B) PNA+ligand CL1Gal, (C) PNA+ligand CL2Gal et (D) PNA+ligand CL3Gal.

La surface de référence, présentée dans la Figure 47 A, a été préparée en déposant de la PNA sans ajout de ligands. Sur cette image AFM, nous pouvons noter que la PNA sans ligands couvre de manière homogène la surface de mica. Elle se présente principalement individualisée en structure de $2,5 \pm 0,1$ nm. Ces hauteurs semblent en accord avec la littérature. En effet la PNA, tétramérique et assimilée à un parallélépipède, présente des dimensions de $a=67,0$ Å, $b=35,2$ Å, $c=65,8$ Å and $\beta=68$ ^[96]. Les hauteurs possibles de la PNA

sur la surface sont donc de 6,7 nm au maximum et de 3,5 nm au minimum. Ces valeurs dépendent à la fois du positionnement et de l'étalement de la PNA. Les différentes dispositions possibles de la PNA sont schématisées dans la Figure 48.

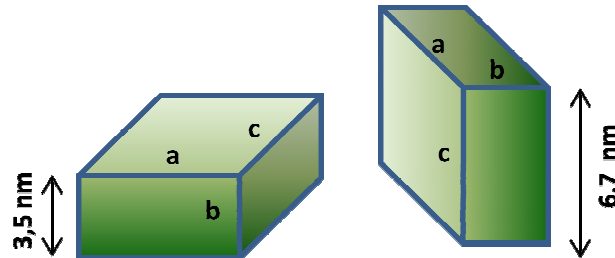


Figure 48. Représentation schématique des différentes dispositions de la PNA.

Une légère différence est néanmoins notée, puisqu'on obtient 2,5 nm au lieu de 3,5 nm. Cette légère différence peut être due à la tendance des lectines, en contact avec le mica, à s'étaler pour garantir une plus grande surface de contact ^[68]. Elles assurent ainsi un faible niveau énergétique et une meilleure adsorption.

Dans la Figure 47 B, est présentée l'image AFM de la PNA après ajout du ligand long monovalent CL1Gal. L'image obtenue, très semblable à celle obtenue pour la PNA seule, présente une distribution homogène de la PNA sur la surface. En présence du ligand CL1Gal, la PNA se présente sous forme de structure de $2,5 \pm 0,2$ nm. La comparaison entre les images, en A et B de la Figure 47, permet de suggérer que l'ajout de CL1Gal ne semble pas avoir d'effet sur la densité et la distribution de la PNA sur la surface.

Le résultat de l'imagerie AFM de la PNA après ajout du ligand divalent CL2Gal est présenté dans la Figure 47 C. L'apparition d'une nouvelle structure, sous forme d'un réseau, est notée. Au sein de cette structure, d'une aire de 300 nm^2 , apparaissent des éléments de $2,8 \pm 0,4$ nm. Il apparaît que, sous l'effet du ligand CL2Gal, les lectines PNA se regroupent en réseaux. En effet, portant 2 résidus galactoses sur deux bras espaceurs longs, le ligand CL2Gal est capable de recruter deux lectines en même temps.

Dans la Figure 47 D, une structure en réseau semblable à celle de la Figure 47 C a été notée. Cette figure présente l'image AFM de la PNA en présence du ligand CL3Gal. La structure en réseau obtenue, d'une aire de 900 nm^2 , présente des éléments de $2,7 \pm 0,3$ nm. En se fixant sur plusieurs lectines PNA simultanément, le ligand CL3Gal a l'aptitude de les organiser en réseaux.

Il est intéressant de noter que le réseau de PNA obtenu sous l'effet du ligand CL3Gal présente une aire trois fois plus importante que celle obtenue sous l'effet du ligand CL2Gal avec 900 nm^2 et 300 nm^2 , respectivement. La taille des réseaux semble donc être proportionnelle à la valence du ligand.

Un deuxième ratio molaire PNA/ligands de $4,5/1000 \text{ } \mu\text{M}$, a été testé. Bien qu'à une concentration dix fois plus importante, les différents ligands Gal-L ont exprimé le même comportement que celui observé précédemment avec le ratio $4,5/100 \text{ } \mu\text{M}$. En effet, le ligand CL1Gal n'agrège pas la lectine PNA et aucune structure en réseau n'est observée (résultat non présenté). Cependant, la mise de la PNA en présence des ligands divalents ou trivalents engendre la formation de réseaux. Dans la Figure 49 B est présentée l'image AFM de la PNA à $4,5 \text{ } \mu\text{M}$ en présence du ligand CL2Gal à $1000 \text{ } \mu\text{M}$. Une structure en réseau est distinguée sur l'image. Le réseau, d'une aire de 2080 nm^2 , présente des éléments de $2,9 \pm 0,2 \text{ nm}$ de hauteur. Par ailleurs, la Figure 49 D expose l'image AFM de la PNA à $4,5 \text{ } \mu\text{M}$ en présence du ligand CL3Gal à $1000 \text{ } \mu\text{M}$. Cette image permet de noter que l'ajout des ligands trivalents à $1000 \text{ } \mu\text{M}$ permet d'agrèger la quasi-totalité de la PNA en réseaux. Sur cette image (Figure 49 D), des éléments de $2,6 \pm 0,4 \text{ nm}$ de hauteur, sont distingués. Les réseaux, d'une aire approximative de $14,6 \text{ } \mu\text{m}^2$, couvrent 58,4% de la zone imagée.

Comparés aux réseaux obtenus pour un ratio $4,5/100$, les réseaux obtenus avec un ratio PNA/ligand à $4,5/1000$ sont plus importants en termes de taille. Les images AFM, présentées dans la Figure 49, permettent de comparer les réseaux obtenus après ajout de $100 \text{ } \mu\text{M}$ (Figure 49 A et C) à ceux obtenus après ajout de $1000 \text{ } \mu\text{M}$ (Figure 49 B et D) des ligands di et trivalents. Les images AFM montrent un réseau, de taille sept fois plus importante, obtenu après l'ajout de $1000 \text{ } \mu\text{M}$ du ligand CL2Gal (Figure 49 B) comparé au réseau obtenu après ajout de $100 \text{ } \mu\text{M}$ du même ligand (Figure 49 A). Pareillement, le réseau obtenu après l'ajout de $1000 \text{ } \mu\text{M}$ du ligand CL3Gal (Figure 49 D) est 16 fois plus étendu que celui obtenu après ajout de $100 \text{ } \mu\text{M}$ du même ligand (Figure 49 C).

Les observations relevées ci-dessus permettent de révéler l'influence de la multivalence des ligands synthétiques sur la formation de réseaux de PNA. Cette formation de réseaux semble être dépendante à la fois de la valence et de la concentration des ligands engagés dans la réaction.

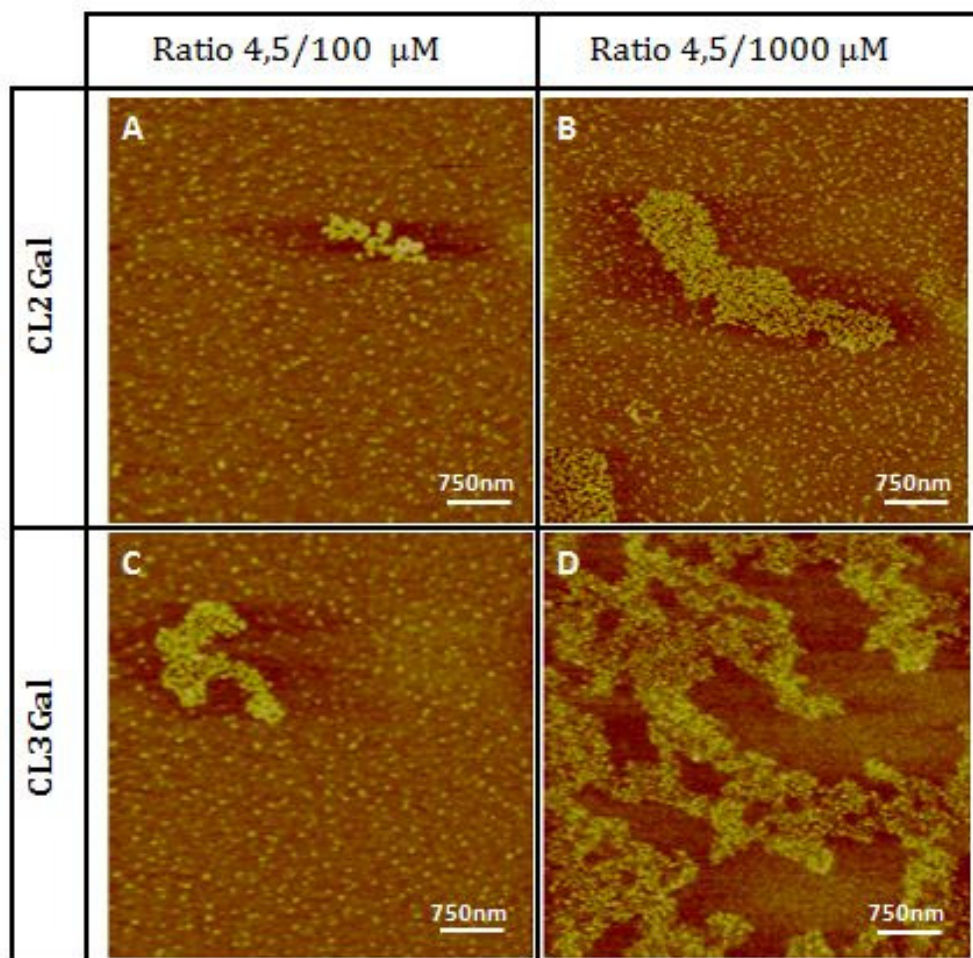


Figure 49. Effet de l'ajout des ligands di et trivalents à deux ratios différents. Image AFM à l'air ($z = 7 \text{ nm}$, vitesse de scan = 3 Hz pour A et C, 2 Hz pour B et D, nombre de pixels = 256×256 pour A et C, 512×512 pour B et D) ; (A) PNA+CL2Gal à 4,5/100 μM , (B) PNA+CL2Gal à 4,5/1000 μM , (C) PNA+CL3Gal à 4,5/100 μM et (D) PNA+CL3Gal à 4,5/1000 μM .

1.2. Etude de l'interaction PNA-Gal-L par spectroscopie de force

Dans une autre approche, l'interaction entre les ligands synthétiques multivalents Gal-L et la PNA a été étudiée par spectroscopie de force. Ces expériences permettent de quantifier l'interaction. Ainsi, elles nous ont permis d'analyser, quantitativement, l'influence de la valence et de la longueur du bras espaceur sur la reconnaissance de la PNA. L'analyse, par spectroscopie de force, a porté sur la force de l'interaction et sur la dynamique de la reconnaissance.

1.2.1 Vérification des surfaces

Pour les expériences de spectroscopie de force, la PNA a été greffée sur des surfaces d'or. Avant utilisation, la qualité des surfaces a été vérifiée par imagerie AFM sous liquide.

L'objectif de cette étape consiste à garantir la rugosité, l'absence de rayure et la continuité de la couche d'or. La Figure 50 présente une image d'une surface de verre sur laquelle sont déposées, par évaporation thermique, une première couche de 5 nm de chrome suivie d'une deuxième couche de 30 nm d'or.

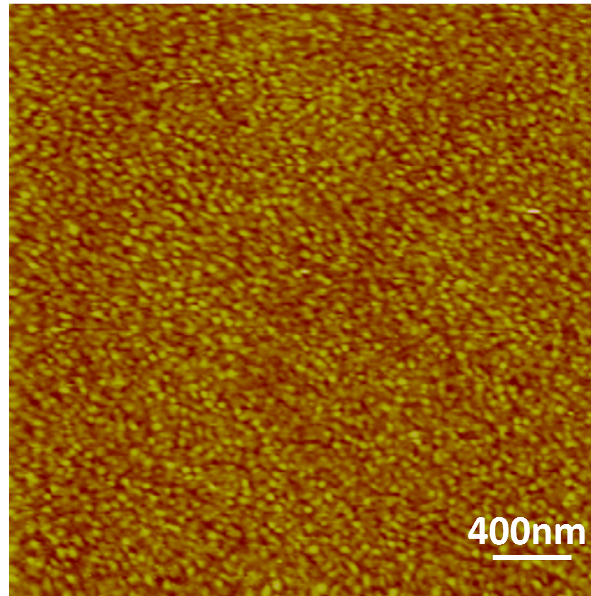


Figure 50. Image AFM d'une surface d'or non fonctionnalisée. Surface imagée sous PBS pH 7,2 ($z=10$ nm, vitesse de scan = 4 Hz, nombre de pixels = 256×256).

Des nano-billes d'or assez régulières sont observées sur cette image. Le recouvrement de la surface est homogène. Nous avons pu mesurer, sur la surface, une hauteur des nano-billes de $2,5 \pm 0,4$ nm et une rugosité évaluée par un RMS (root mean square) de $1 \pm 0,1$ nm. Ceci reflète la réussite de l'étape d'évaporation et confirme la bonne qualité des surfaces d'or utilisées pour le greffage de la PNA. Notre image est parfaitement concordante avec celles obtenues dans la littérature par d'autres équipes ^[156].

Les surfaces d'or ont été carboxylées puis fonctionnalisées par un greffage covalent de la lectine PNA. Les surfaces, ainsi préparées, sont par la suite imagées par imagerie AFM sous liquide. L'objectif de l'imagerie, dans ce cas, consiste à vérifier la qualité de la fonctionnalisation. Cette qualité réside dans la présence de la PNA, l'absence de gros agrégats et de saletés, l'homogénéité du recouvrement et la densité de surface en PNA. L'image AFM de la surface après greffage de la PNA présentée dans Figure 51 A expose des structures en deux nuances reflétant deux hauteurs différentes de la protéine. Les structures les plus hautes apparaissent plus claires et font $7 \pm 1,3$ nm. Les structures les plus basses apparaissent plus foncées et font $3 \pm 0,3$ nm. Afin d'évaluer l'épaisseur de la couche de PNA

greffée, un grattage d'une zone de $2.5 \times 2.5 \mu\text{m}$ a été effectué (Figure 51 B). Le grattage s'opère en scannant la zone à haute vitesse (10 Hz) et en appuyant fortement (jusqu'à 35 nN), ainsi on déplace le matériel dans le sens du scan et on découvre la surface. Une section sur la zone grattée (Figure 51 C) permet de déduire l'épaisseur de la couche. L'épaisseur retrouvée s'élève à $2,5 \pm 0,2 \text{ nm}$. D'après ces résultats, la forme la plus stable et la plus fréquente, de la PNA sur la surface, est représentée par les structures à environ 3 nm de hauteur.

Dans leurs travaux, portant sur la caractérisation de la PNA tétramérique par DLS, Dev et *al.* ont déterminé un rayon hydrodynamique R_h de 3,9 nm^[89]. En solution, la PNA est globulaire. En conséquence, si on assimile la PNA en solution à une sphère, le diamètre hydrodynamique serait d'environ 7,8 nm. Cependant, Roach et *al.* ont reporté un changement de conformation des protéines globulaires induit par le contact d'une surface d'or^[262]. Au regard de leur forte charge, les surfaces d'or induisent l'aplatissement des protéines globulaires. Ces constats permettent de suggérer que la PNA, au contact de la surface d'or, s'aplatit. Ceci explique l'épaisseur de la monocouche de PNA, d'environ 2,5 nm, obtenue lors de notre analyse des surfaces. Les structures claires d'environ 7 nm de hauteur, beaucoup moins fréquentes, correspondraient à des molécules de PNA dont l'aplatissement est moins fort. Il pourrait aussi s'agir du regroupement des PNA en très faibles nombres. Ces derniers ne sont pas préjudiciables aux expérimentations, de spectroscopie de force, prévues pour la suite de l'étude.

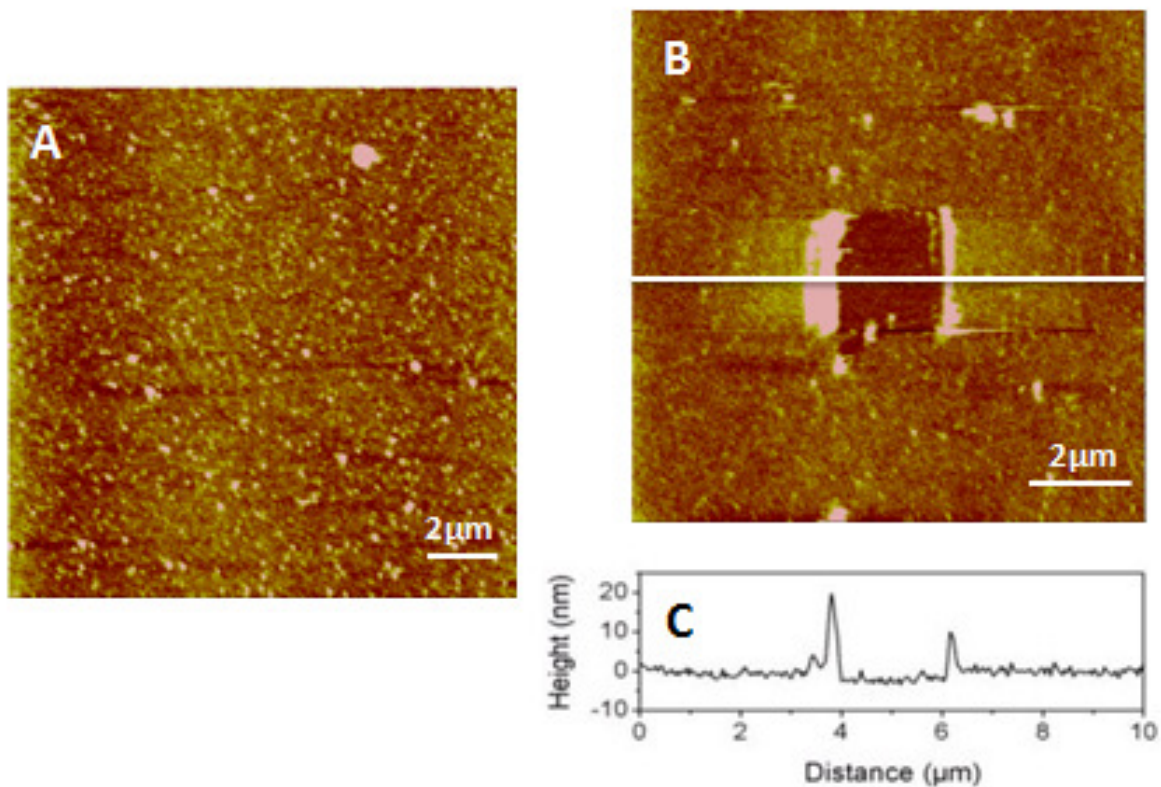


Figure 51. Images AFM de (A) PNA greffée sur surface d'or, imagée sous PBS pH 7,2 ($z = 10$ nm, vitesse de scan = 4 Hz, nombre de pixels = 256×256) et (B) carré de grattage de $2,5 \times 2,5$ μm scanné à 10 Hz à force maximale, surface imagée sous PBS pH 7,2 ($z = 10$ nm, vitesse de scan = 4 Hz, nombre de pixels = 256×256). (C) section du carré de grattage présenté en B.

1.2.2 Quantification de l'interaction PNA-Gal-L par spectroscopie de force

La reconnaissance moléculaire spécifique, entre la PNA et les différents ligands Gal-L, a été explorée par spectroscopie de force. Les courbes forces-distances ont été enregistrées entre la pointe portant un des ligands synthétiques et la PNA greffée sur la surface d'or (Figure 52 A). L'enregistrement des différents forces-volumes s'effectue à des vitesses de retrait de la pointe, et donc à des taux de chargement (« loading rate » LR), proches. Ainsi, on obtient des valeurs de force d'adhésion comparables. Les courbes enregistrées présentent, en majorité, un seul pic d'adhésion et correspondent donc à des événements d'adhésion unique. Sur la courbe type, présentée dans la Figure 52 B, nous pouvons noter que le pic d'adhésion, qui survient à une certaine distance de la surface, présente une courbure caractéristique du dépliement du bras PEG ^{[119], [237], [263], [264]}. La distance et la courbure du pic confirment la spécificité de la force mesurée et révèle la rupture d'un seul complexe PNA-ligand. En effet, l'utilisation d'un excès d'agent de réticulation hétéro-bifonctionnel, acétal-PEG829-NHS, limite le nombre de protéines actives attachées à la

pointe, ce qui augmente la probabilité des événements à l'échelle de la molécule unique ^[264]. De plus, la concentration de PNA a été optimisée afin d'obtenir une densité de surface adaptée aux expériences de mesure de force mono-moléculaire (« Single Molecule Force Spectroscopy » SMFS).

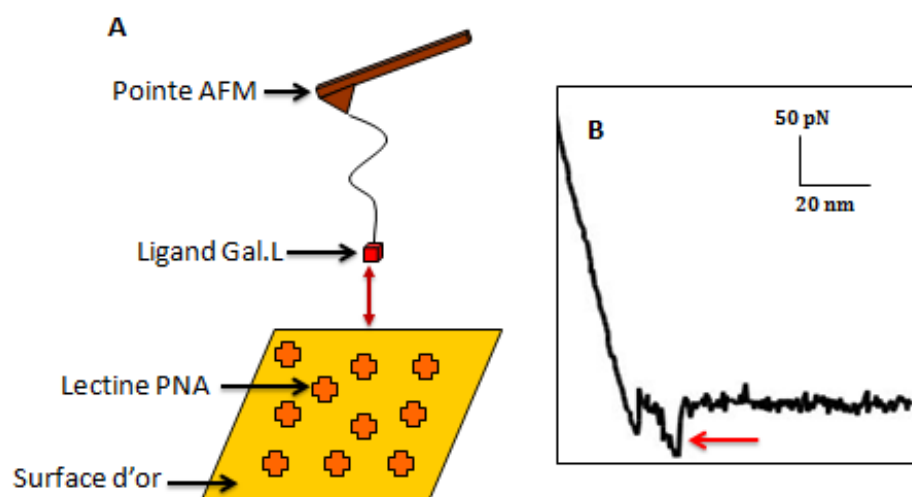


Figure 52. Quantification de l'interaction PNA-Gal-L par spectroscopie de force. (A) Représentation schématisée de l'expérience et (B) courbe de retrait type présentant un pic d'adhésion spécifique (flèche).

L'enregistrement d'un force-volume permet de générer 256 courbes force *versus* distance. Les courbes ont été traitées par le logiciel « *PUNIAS3D* » avec lequel, et après traitement mathématique, un histogramme de distribution de force est obtenu. Les ligands Gal-L ont été testés en interaction avec la PNA. Il en résulte, après traitement mathématique, un histogramme de distribution pour chaque ligand. Sur ces histogrammes (Figure 53) une distribution étroite des forces, qui se concentrent autour d'une force maximale, est observée.

Le logiciel Origin 8.5 a été utilisé afin de déterminer la force la plus probable en appliquant un « fit gaussien » à l'histogramme de distribution. L'ensemble des forces, obtenues dans le cas de l'interaction entre la PNA et les différents multi-galactosides, est regroupé le Tableau 5.

Dans le cadre de notre étude, nous avons fait varier la longueur du bras espaceurs. La force maximale notée, pour les composés monovalents, est d'environ 60 pN. Aucune influence significative de la longueur du bras espaceur n'a été enregistrée pour les ligands monovalents (CC1Gal, CM1Gal et CL1Gal). Par ailleurs, la valeur de force obtenue est

concordante avec ce qui a été décrit dans la littérature pour d'autres interactions sucre-lectine. Ainsi, Madwar et *al.* ont déterminé une force d'adhésion entre la ConA et le mannose de l'ordre de 57 ± 20 pN à un taux de chargement de 6960 pN/s^[254]. Dans un autre contexte, Li et *al.* ont quantifié, par spectroscopie de force, l'interaction entre la lectine de *Ricinus communis* (RCA₁₂₀ ciblé par les unités galactoses et N-acétyle-galactosamines) et l'asialofetaine (ASF une glycoprotéine désialylée qui porte des terminaisons galactose) à une force d'environ 69 ± 4 pN^[255]. Plus récemment, Gunning et *al.* ont déterminé, lors de leur étude du « glycode » de la mucine gastro-intestinale, une force unitaire d'environ 50 pN pour l'interaction entre la PNA et le galactose^[265].

Les forces obtenues pour les ligands divalents augmentent de 49 ± 22 à 56 ± 32 et 64 ± 30 pN pour les ligands CC2Gal, CM2Gal et CL2Gal, respectivement. Cependant, un comportement contradictoire est constaté pour les ligands trivalents. En effet, les forces enregistrées diminuent et passe d'environ 47,5 pN pour les ligands CC3Gal et CM3Gal à 37 ± 13 pN pour le ligand CL3Gal.

D'autre part, un deuxième paramètre a été étudié. Il s'agit de la valence. Les résultats regroupés dans le Tableau 5 montrent qu'à l'exception du ligand CL2Gal, une diminution de la force en fonction de la valence est notée pour l'ensemble des ligands. En effet, les forces enregistrées pour les ligands à bras espaceurs courts passent, respectivement, de 62 ± 21 à 49 ± 22 et 47 ± 26 pN pour les ligands mono, di et trivalents. Cette variation correspond à une diminution de la force de 25% entre le CC1Gal et CC3Gal. Un comportement similaire a été constaté pour les ligands à bras espaceurs moyens. En effet, les forces maximales enregistrées, pour les ligands CM1Gal, CM2Gal et CM3Gal, passent de 61 ± 39 à 56 ± 32 et 48 ± 20 pN, respectivement. Dans ce cas, la diminution de la force est évaluée à 22% entre le ligand monovalent et son homologue trivalent. Pareillement, une diminution de la force est notée dans le cas de l'interaction entre la PNA et les ligands longs de différentes valences. De plus, l'écart entre les forces est plus prononcé dans ce cas. En effet, la force diminue à hauteur de 39% entre un ligand long monovalent et son homologue trivalent.

Dans le cas des ligands courts et moyens, la diminution de la force est accompagnée d'une diminution de la fréquence d'événement d'adhésion. La fréquence d'adhésion est déduite, par soustraction, à partir de la barre de l'histogramme à 0 pN. À titre d'exemple, la

fréquence d'adhésion passe respectivement de 51% à 33% pour les ligands CC1Gal et CC3Gal. Cette variation correspond à une perte de 18% d'évènement d'adhésion.

Plusieurs hypothèses peuvent être émises pour expliquer les fluctuations des forces. Dans notre étude de l'interaction PNA-ligands Gal-L, aucune influence de la longueur des ligands monovalents n'a été constatée. Une explication possible de ce résultat repose sur les études de nos partenaires. En effet, dans leur étude de l'interaction entre une lectine monovalente, la galectine, avec des multilactosides synthétiques, nos partenaires n'ont pas constatée d'influence de la longueur sur la reconnaissance ^[6]. Ils en ont conclu que, lorsque l'interaction se déroule entre une lectine monovalente et des ligands multivalents, la longueur des ligands n'entre pas en compte dans le processus de reconnaissance. Par analogie, la longueur des ligands monovalents n'aurait pas d'influence sur l'interaction avec une lectine multivalente tel que la PNA. Pour les ligands divalents, nous avons pu noter une légère baisse de la force par rapport aux ligands monovalents. Cependant, en comparant les forces obtenues pour les ligands divalents de différentes tailles, nous remarquons une augmentation de la force en fonction de la longueur. On pourrait penser que la diminution de la force enregistrée entre la PNA et le ligand court divalent, en comparaison avec la force obtenue pour son homologue monovalent, serait due à un encombrement stérique autour du site de reconnaissance. En effet la présence d'un second galactose, et sa proximité du premier galactose pourrait créer un encombrement. Le rallongement des bras espaceurs, qui portent les deux galactoses, permet une plus grande liberté. Ainsi, l'encombrement est de plus en plus faible lorsque la liberté de mouvement est de plus en plus importante. Il en résulte une augmentation de la force d'interaction. La diminution de la force est d'autant plus marquée pour les ligands trivalents en comparaison avec les ligands monovalents. Cependant, et contrairement aux ligands divalents, une longueur plus importante de l'espaceur n'améliore pas la force. La force diminue encore plus fortement avec le rallongement de l'espaceur. En effet, les chaînes d'oligoéthylène glycols présentent un inconvénient majeur relatif à leur grande flexibilité ^[266]. La grande flexibilité des chaînes entraîne une forte mobilité des épitopes dans l'espace augmentant ainsi le coût entropique lors de la liaison avec le récepteur. Ce coût entropique élevé pourrait engendrer une diminution de la force. Une deuxième hypothèse, exclusive aux ligands trivalents moyens et longs, réside dans le possible enchevêtrement des bras espaceurs en pelote en confinant les

galactoses à l'intérieur et empêchant leur accès aux sites de reconnaissance de la PNA. Ce qui a pour conséquence d'affaiblir la force d'interaction et de diminuer la fréquence des évènements d'adhésion. Il est possible aussi que les bras espaceurs s'enroulent en hélice. Ainsi, la mobilité des résidus galactoses est réduite, ce qui résulte en une augmentation des contraintes stériques et une diminution de la force d'interaction PNA-ligand. Toutes les hypothèses émises peuvent être soutenues par le résultat obtenu dans le cas de l'interaction du ligand CL3Gal avec la PNA. Disposant des chaînes les plus longues, ce ligand est donc le plus flexible et le plus susceptible de s'enchevêtrer en pelote ou bien d'avoir les épitopes les plus faiblement disponibles. Pour ces raisons, il présente la force d'adhésion la moins importante en comparaison avec les autres ligands.

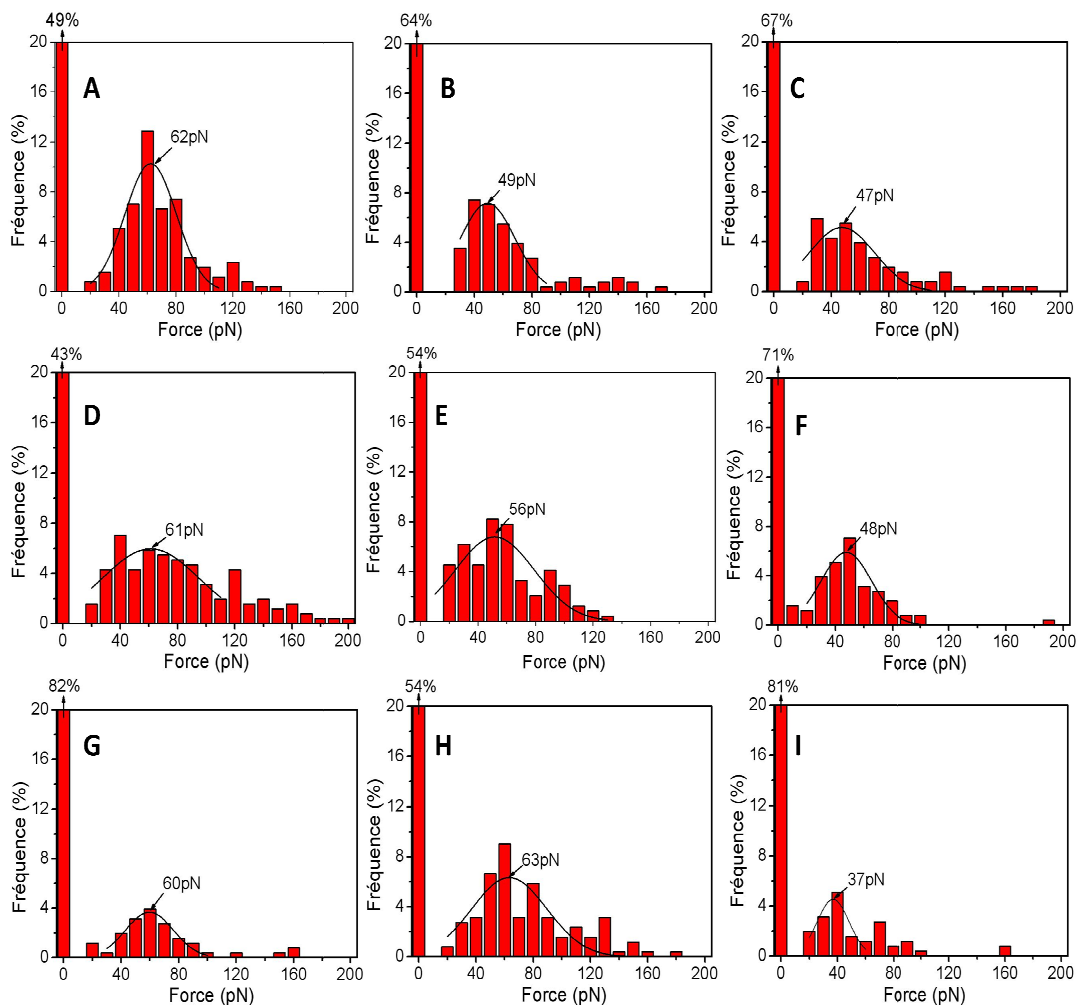
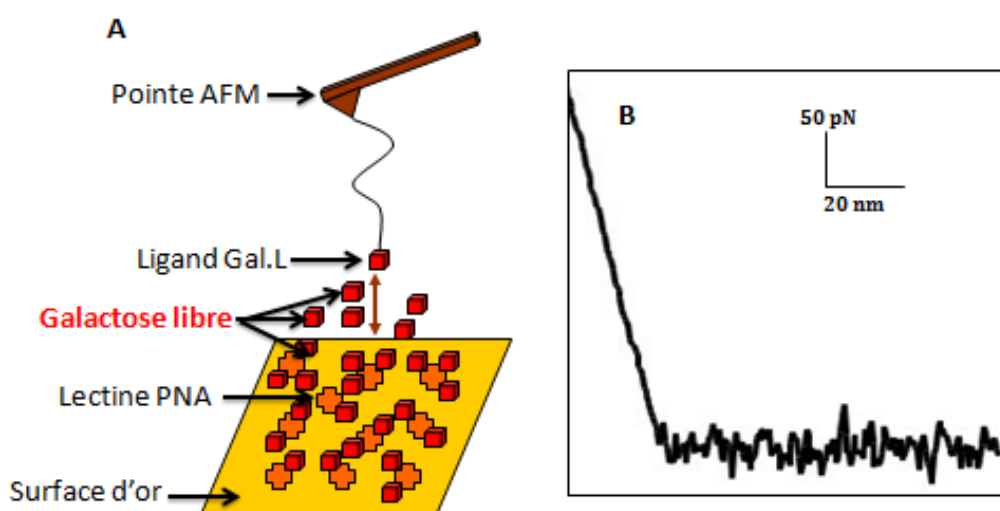


Figure 53. Histogrammes de distribution des forces d'adhésion enregistrées entre la PNA et les ligands (A) CC1Gal, (B) CC2Gal, (C) CC3Gal, (D) CM1Gal, (E) CM2Gal, (F) CM3Gal, (G) CL1Gal, (H) CL2Gal et (I) CL3Gal. Traitement des Forces-volumes $n=256$ courbes par *PUNIAS3D*, traçage des gaussiennes par Origin 8.5.

Tableau 5. Force d'adhésion enregistrée entre la PNA et les ligands de différentes longueurs et valences ($n=256$).

Ligands	1 Galactose		2 Galactoses		3 Galactoses	
	Force (pN)	LR (pN/s)	Force (pN)	LR (pN/s)	Force (pN)	LR (pN/s)
Court	62 ± 21	8670	49 ± 22	13243	47 ± 26	9480
Moyen	61 ± 39	7978	56 ± 32	8480	48 ± 20	9193
Long	60 ± 19	10880	64 ± 30	9720	37 ± 13	8720

Afin de confirmer la spécificité des forces, plusieurs contrôles négatifs ont été effectués. Une première série de contrôle consiste à ajouter le galactose libre à 500 mM après chaque mesure de force (Figure 54 A). Cette expérience a pour objectif d'inhiber la reconnaissance spécifique entre la PNA et le ligand. En effet, Le galactose libre, mis en excès, se positionne sur la PNA au niveau des sites spécifiques de reconnaissance empêchant ainsi l'accès du ligand fixé à l'extrémité de la pointe. Ceci se traduit par l'absence du pic spécifique de reconnaissance sur les courbes de retrait (Figure 54 B).

**Figure 54.** Représentation du contrôle négatif par ajout de galactose libre. (A) Représentation schématique de l'expérience et (B) courbe de retrait type.

Suivant cette méthode, des forces-volumes, entre un ligand à l'extrémité de la pointe AFM et la PNA sur la surface d'or, ont été enregistrés en présence du galactose libre. Les forces-volumes sont ensuite traités par le logiciel *PUNIAS3D*. Les histogrammes de distribution des forces sont ainsi obtenus (Figure 55). La fréquence des événements

d'adhésion enregistrés est très faible et leur distribution est aléatoire. Un pourcentage d'évènement de non adhésion de plus de 90% a été enregistré. Ceci démontre qu'aucune force significative n'est distinguée pour les interactions étudiées précédemment.

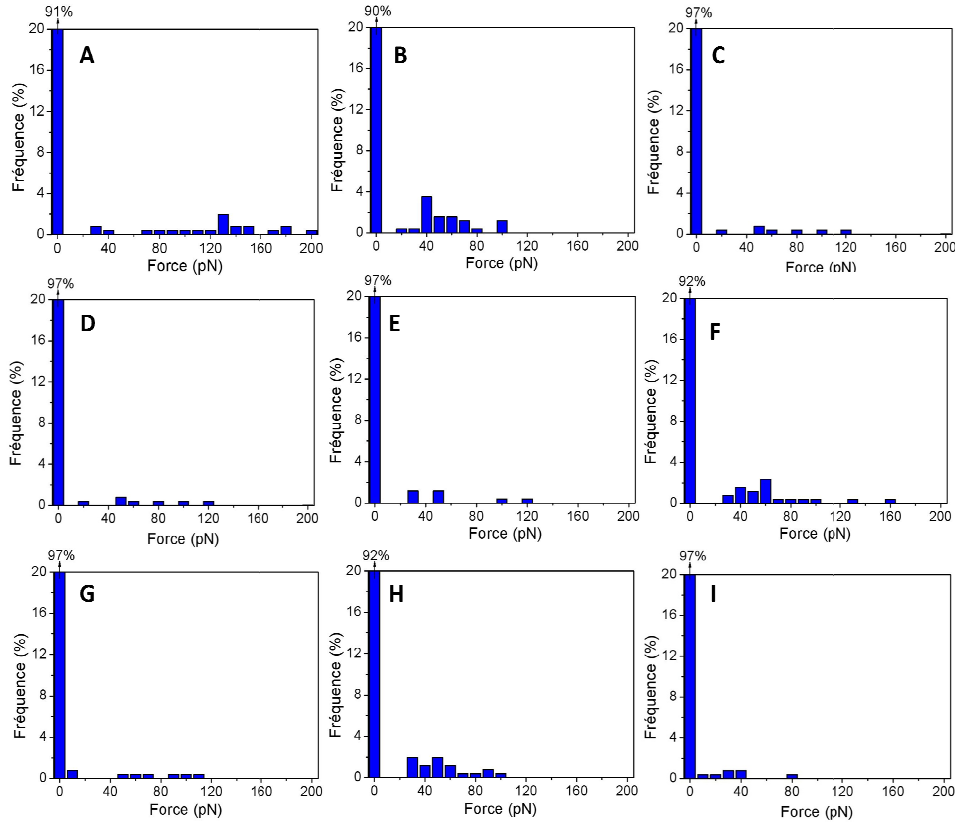


Figure 55. Histogrammes de distribution des forces d'adhésion enregistrées entre la PNA et les ligands (A) CC1Gal, (B) CC2Gal, (C) CC3Gal, (D) CM1Gal, (E) CM2Gal, (F) CM3Gal, (G) CL1Gal, (H) CL2Gal et (I) CL3Gal, en présence de 500mM de galactose. Traitement des Forces-volumes $n=256$ courbes par *PUNIAS3D*.

En plus des contrôles par blocage des sites de reconnaissance de la lectine, un deuxième contrôle négatif a été effectué. Dans ce cas, la pointe AFM a été fonctionnalisée par un ligand synthétique présentant une structure similaire à celle des ligands Gal-L étudiés. Cependant, ce ligand présente un glucose au bout du bras espaceur (Figure 56 A). Le glucose n'étant pas le ligand spécifiquement reconnu par la PNA, aucune force significative n'est notée (Figure 56 B). Ceci confirme la spécificité de la reconnaissance et ne laisse aucun doute quant à la spécificité des forces mesurées pour l'interaction entre les Gal-L et la PNA.

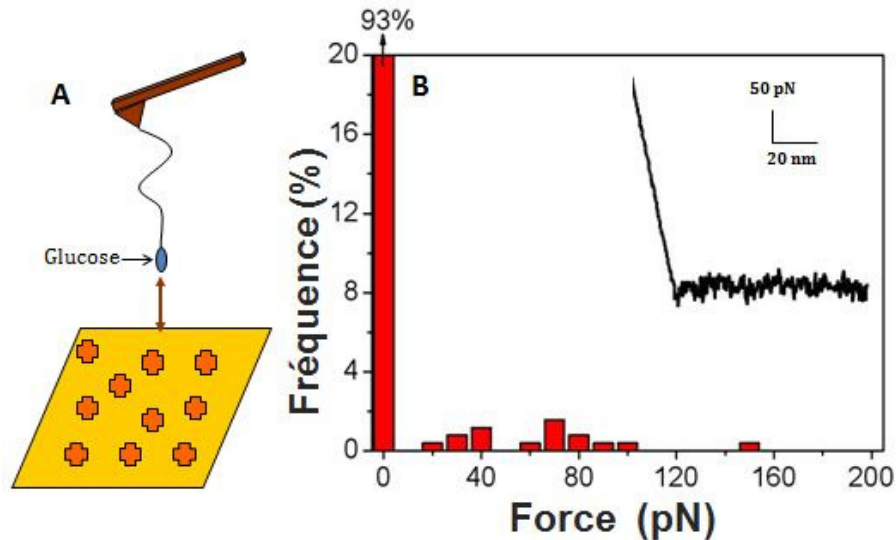


Figure 56. Représentation du contrôle négatif par interaction PNA-glucose. (A) Représentation schématique de l'expérience et (B) courbe de retrait type.

1.3. Exploration de la dynamique de l'interaction PNA-Gal-L par spectroscopie de force

En plus de la détermination de la force d'adhésion, la spectroscopie de force permet d'explorer la dynamique de l'interaction et accéder ainsi à certains des paramètres cinétiques qui la régissent. L'exploration de la dynamique, par spectroscopie de force, passe par la variation des paramètres et des conditions dans lesquelles a eu lieu l'interaction.

1.3.1 Dépendance de la force d'adhésion du complexe PNA-ligand au taux de chargement appliqué

Dans cette partie du projet, nous avons cherché à élucider la dynamique des interactions entre la PNA et les différents Gal-L. Dans ce contexte, nous avons étudié l'influence du taux de chargement appliqué au complexe PNA-ligand. Le taux de chargement (« Loading Rate », LR) est défini comme le produit de la constante de raideur du levier fonctionnalisé et la vitesse à laquelle on sépare le levier de la surface.

$$LR = K \times R\dot{\theta} \quad \text{Équation 17}$$

La constante de raideur K considérée dans le calcul du LR devrait prendre en compte la raideur de la molécule greffée à la pointe (k_{mol}) et la raideur du levier (k_{levier}). La raideur de la molécule est très difficile à calculer. Pour simplifier les calculs, la constante K est considérée égale à la constante de raideur du levier k_{levier} .

Il est bien connu que la force d'adhésion d'un complexe ligand-récepteur dépend non seulement de l'interaction des deux molécules complémentaires mais aussi de la vitesse à laquelle on les sépare ^[121]. En d'autres termes, plus vite la pointe est rétractée, plus grande sera la force d'interaction.

Des expériences de spectroscopie de force entre la pointe fonctionnalisée et la PNA ont été menées en variant le taux de chargement. Les tracés de variation de la force d'adhésion en fonction du taux de chargement appliqué (entre 1000 et 30000 pN/s) sont regroupés dans la Figure 57. Notre choix s'est porté sur l'ensemble des ligands courts et longs (CC1Gal, CC2Gal, CC3Gal, CL1Gal, CL2Gal et CL3Gal). Cependant, seul le ligand monovalent à bras espaceur de taille moyenne (CM1Gal) a fait objet de cette étude. Ainsi, nous avons pu étudier l'effet de la longueur de chaîne sur la dynamique de l'interaction. Ultérieurement, il serait intéressant de compléter par l'étude des ligands moyens di et trivalents.

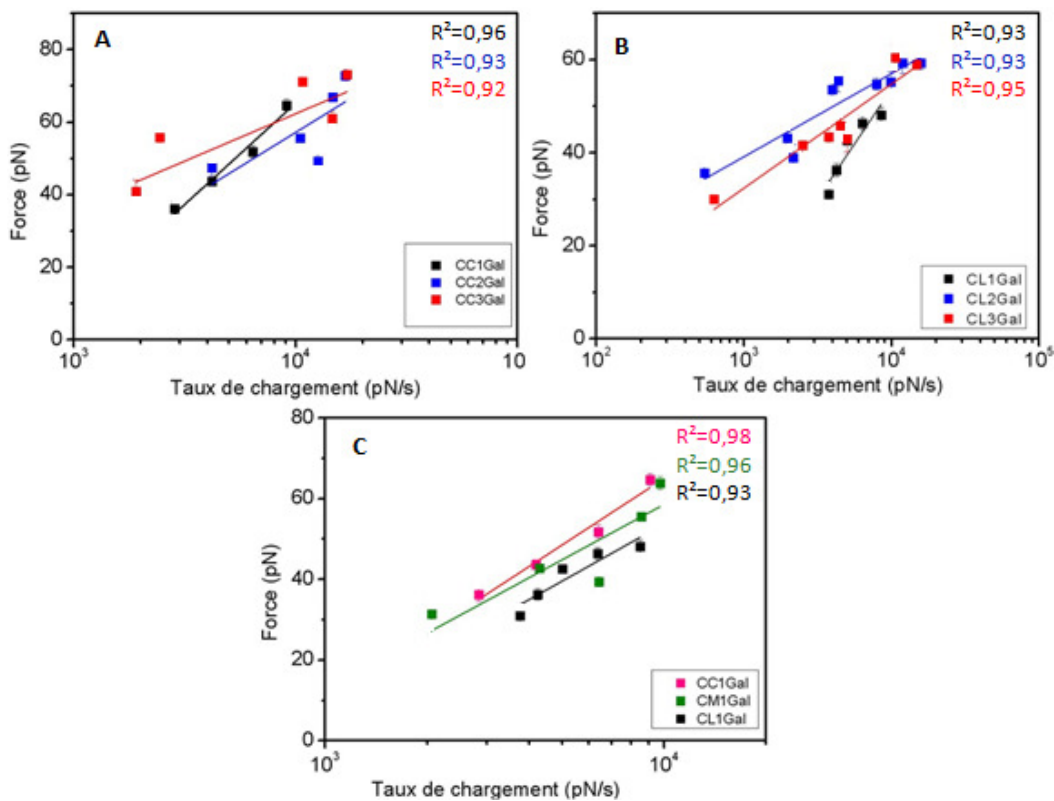


Figure 57. Influence du taux de chargement sur la force d'adhésion. (A) comparaison entre les ligands à chaîne courte et à différentes valences, (B) comparaison entre les ligands à chaîne longue et de différentes valences et (C) comparaison entre les ligands monovalents à différentes longueurs de chaîne. Chaque point expérimental correspond à un Force-volume de $n=256$. Les courbes de force sont traitées avec *PUNIAS3D*. Les forces sont déterminées par un « fit gaussien » tracé sur Origin 8.5.

L'analyse des tracés permet de relever des forces entre 30 et 70 pN ce qui est parfaitement dans l'intervalle de forces décrites dans la littérature pour des interactions similaires [156], [193], [206], [254], [193, 255]. Le comportement dynamique de l'interaction est monomodal. Il présente une seule barrière énergétique.

Une superposition des droites obtenues pour les ligands courts de différentes valences est présentée dans la Figure 57 A. Bien que ces droites exposent la même allure, elles ont des pentes légèrement différentes. Ceci témoigne d'une influence de la valence sur la reconnaissance PNA-ligands Gal-L courts.

Pareillement, une superposition des droites obtenues pour les ligands longs de différentes valences est présentée dans la Figure 57 B. Une différence au niveau des pentes est constatée. Cette différence est plus marquée dans le cas du ligand CL3Gal. Elle reflète ainsi un comportement dynamique dépendant de la valence.

La comparaison entre les tracés obtenus pour les ligands monovalents de différentes longueurs (court, moyen et long) permet de constater une similarité aussi bien au niveau de l'allure que des pentes (Figure 57 C). Cette comparaison permet de suggérer que l'interaction PNA-ligands n'est pas influencée par la longueur du bras espaceurs.

L'enregistrement de forces-volumes, à différents taux de chargement, permet d'explorer la dynamique de l'interaction et de déterminer les constantes cinétiques de dissociation k_{off} ainsi que les distances des barrières énergétiques x_{β} .

La constante cinétique de dissociation, k_{off} , détermine la vitesse de dissociation du complexe ligand-récepteur. En effet, la vitesse de dissociation, correspondant au nombre de phénomène de dissociation par unité de temps, est le produit entre la constante k_{off} et la concentration molaire en complexes ligand-récepteur. En conséquence, pour un même complexe ligand-récepteur, plus la constante k_{off} est élevée, plus la dissociation sera rapide. Ceci témoigne d'une instabilité et d'une faible durée de vie ($\tau_{off} = 1/k_{off}$) du complexe.

Dans une réaction, la transition d'un état A à un état B, nécessite de franchir une barrière énergétique. Dans le cas particulier des interactions sucre-lectine, le passage de l'état lié à l'état libre, sans intervention de force externe, nécessite de franchir une barrière énergétique E. Le franchissement de la barrière énergétique a lieu lorsque les partenaires moléculaires se trouvent à une distance x_{β} . L'application d'une force externe, F, modifie le

potentiel d'interaction, entre sucre et lectine, en ajoutant une contribution énergétique égale à $(-F \times x_\beta)$ [267]. La barrière énergétique, nécessaire pour dissocier le complexe sucre-lectine, est ainsi abaissée (Figure 58 A). De point de vue physique, x_β correspond à la distance, séparant la lectine et le sucre, permettant d'établir ou de rompre les liaisons entre les deux molécules (Figure 58 B).

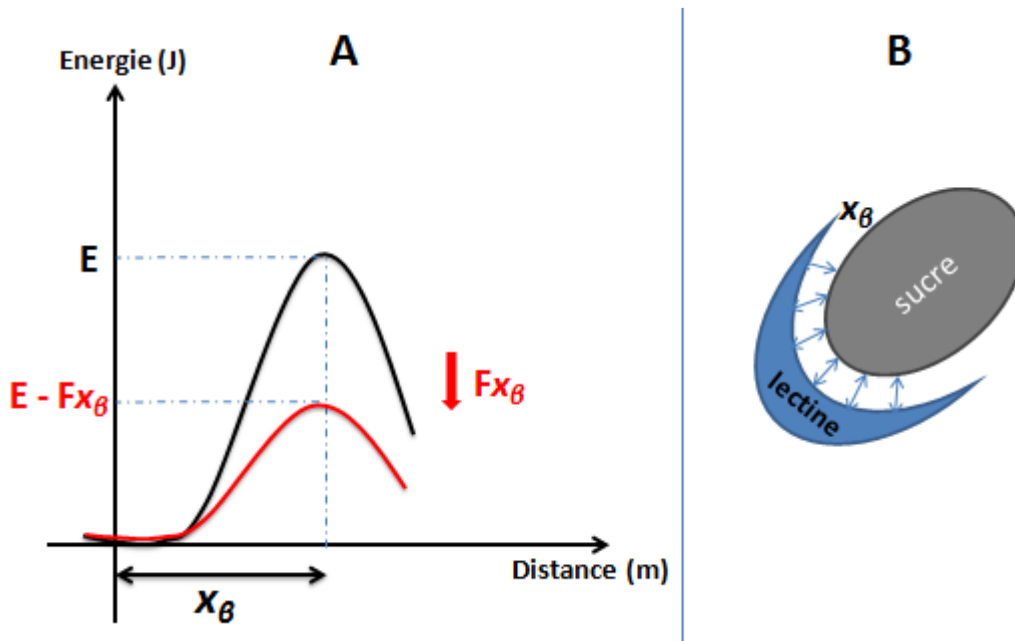


Figure 58. (A) Profil d'énergie de l'état lié en absence et en présence de force. (B) Représentation schématique de x_β .

En se basant sur ces résultats, et d'après l'équation de la droite obtenue, on peut estimer la constante cinétique de dissociation, du complexe PNA-ligand, selon l'équation déterminée par Bell [267] et Evans [240]

$$F = f_\beta \times \ln\left(\frac{r}{f_\beta \times k_{off}}\right) \quad \text{Équation 18}$$

Où F est la force d'adhésion mesurée, f_β est définie comme le ratio entre l'échelle d'énergie thermique ($k_B \times T$, avec k_B constante de Boltzmann et T température en Kelvin) et la distance de la barrière énergétique x_β . Enfin, r correspond au taux de chargement appliqué.

L'équation 18 peut être écrite sous la forme suivante:

$$k_{off} = \frac{r_0}{f_\beta} \quad \text{Équation 19}$$

Avec r_0 défini comme le taux de chargement à force nulle.

Les valeurs de f_{β} (pente) et r_0 le (taux de chargement à force nulle) sont déduites à partir des équations des droites représentées dans la Figure 57.

Le Tableau 6 regroupe les valeurs des paramètres cinétiques obtenus à partir des différentes équations des tracés de la Figure 57.

Tableau 6. Paramètres cinétiques déterminés pour les ligands Gal-L de différentes valences et longueurs de chaînes vis-à-vis de la PNA.

Ligands	Equations	x_{β} (nm)	k_{off} (s^{-1})	τ_{off} (s)
CC-1Gal	23,785 $\ln(x) - 154,05$	0,170	27,30	0,036
CC-2Gal	14,934 $\ln(x) - 80,051$	0,272	14,24	0,070
CC-3Gal	10,812 $\ln(x) - 34,646$	0,375	2,28	0,438
CM-1Gal	18,215 $\ln(x) - 110,034$	0,223	23,05	0,043
CL-1Gal	20,453 $\ln(x) - 134,63$	0,198	35,30	0,028
CL-2Gal	7,772 $\ln(x) - 14,543$	0,523	0,83	1,204
CL-3Gal	9,722 $\ln(x) - 34,772$	0,418	3,67	0,270

Une barrière énergétique à des distances x_{β} variant entre 0,170 et 0,523 nm est identifiée. Globalement, on remarque que la valeur de la barrière énergétique est dépendante de la valence. En effet, la formation et la dissociation du complexe ligand-récepteur, à partir des deux entités séparées, a lieu à des distances plus importantes pour les ligands multivalents par rapport aux ligands monovalents.

D'autre part, nous avons constaté des valeurs élevées des k_{off} allant de 0,83 à 35,3 s^{-1} . Ces valeurs reflètent une faible durée de vie τ_{off} de la liaison entre les partenaires de l'interaction, donc, une faible stabilité du complexe PNA-ligand.

Les valeurs, obtenues pour les ligands monovalents de différentes longueurs de bras espaceur s'élèvent à 0,170, 0,223 et 0,198 nm pour les interactions PNA-CC1Gal, PNA-CM1Gal et PNA-CL1Gal, respectivement. La comparaison des valeurs permet de constater qu'elles sont très proches dans les trois cas d'interaction. En conséquence, la longueur de la chaîne n'aurait pas d'influence significative sur l'interaction PNA-Gal-L. Cette suggestion

conforte l'observation précédente relative à la comparaison des courbes présentées dans la Figure 57 C. Cependant, une dépendance de la durée de vie τ_{off} à la valence du ligand a été identifiée. En effet, les ligands di et trivalents à bras courts et à bras longs ont une durée de vie plus importante que leurs analogues monovalents. L'augmentation de la durée de vie τ_{off} pour les ligands di ou trivalent peut atteindre 12 à 43 fois la durée de vie de la liaison de leurs analogues monovalents au site de reconnaissance du galactose par la PNA.

1.3.2 Dépendance de la probabilité d'adhésion au temps de contact

Afin d'approfondir l'étude de l'interaction PNA-Gal-L, nous avons exploré l'influence du temps de contact sur la dynamique de l'association des partenaires moléculaires. Nous nous sommes intéressés, en particulier, à l'interaction entre la PNA et le ligand CC1Gal. Une pointe AFM, fonctionnalisée au ligand CC1Gal, sert dans ce cas comme pointe modèle pour l'étude de l'interaction PNA-galactose par AFM. Nous avons étudié la variation de la probabilité d'adhésion en fonction du temps de contact entre le ligand CC1Gal et la PNA à un loading rate constant ($\cong 10000\text{pN/s}$). Le « Ramp delay », paramètre définissant le temps de contact entre la pointe et la surface, a été modulé entre 0 et 2500 ms. En pratique, le temps de contact nul n'est pas possible. En effet, il faut prendre en considération la vitesse et l'amplitude du mouvement vertical de la pointe, la vitesse du mouvement horizontal de la surface et la raideur du levier. Pour un « Ramp delay » nul, un temps réel de contact de 55 ± 1 ms, a été déduit expérimentalement à partir des courbes d'approche.

La Figure 59 représente l'évolution de la probabilité de l'adhésion, entre la PNA sur la surface et le ligand CC1Gal à l'extrémité de la pointe, en fonction du temps de contact. Une proportionnalité, entre la probabilité d'adhésion et le temps d'interaction, est relevée à partir de l'observation de la Figure 59. Avec une différence de 1s, la probabilité augmente et passe de 25%, pour un temps approximatif de 0s, à 80% pour un temps de contact de 1s. La dépendance de la probabilité d'adhésion au temps de contact indique que le complexe PNA-CC1Gal est formé par de multiples liaisons intermoléculaires^[241]. En effet, l'augmentation du temps de contact favoriserait la formation de liaisons multiples^[238].

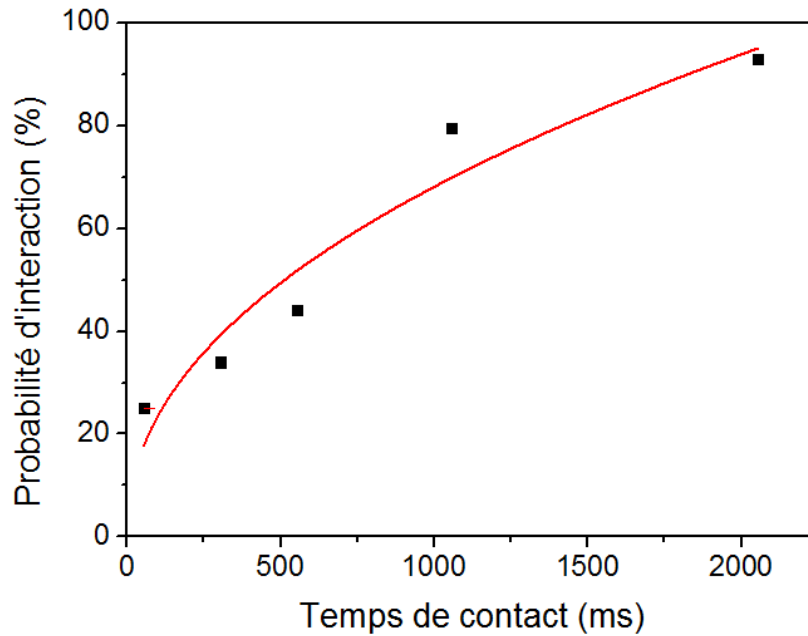


Figure 59. Influence du temps de contact entre le ligand et la PNA sur la probabilité des évènements d'adhésion. Chaque point expérimental correspond à un Force-volume de $n=256$.

En se basant sur le tracé dans la Figure 59, il est possible de déduire le temps de contact nécessaire pour atteindre 50% de probabilité d'adhésion ($t_{0.5}$). Dans notre cas, ce temps s'élève à 0,63 s. Le $t_{0.5}$ permet de déterminer la constante cinétique d'association k_{on} selon l'Equation 20 établie par Baumgartner et al. [144]

$$k_{on} = t_{0.5}^{-1} \times C_{eff}^{-1} \quad \text{Equation 20}$$

Avec $t_{0.5}$ (s) défini comme le temps de contact nécessaire pour atteindre 50% d'évènements d'adhésion et C_{eff} correspondant à la concentration effective (M).

La détermination de C_{eff} se fait suivant l'Equation 21 établie par Baumgartner et al. [268]

$$C_{eff} = n \times N_a^{-1} \times V_{eff}^{-1} \quad \text{Equation 21}$$

Où $n=2$; nombre de partenaires mis en jeu au sein du volume effectif V_{eff} . N_a est le nombre d'Avogadro = $6,022E^{+23}$.

Le calcul du V_{eff} se fait en considérant le volume comme une demi-sphère [119] de rayon 6,45 nm (correspondant à la longueur du bras PEG + la longueur du ligand). Le V_{eff} ainsi calculé est de $5,62E^{+22}$ L et le C_{eff} est de $2,95E^{-02}$ M. Enfin, on obtient avec ces calculs un k_{on} de $5,29E^{+02} \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$.

La constante cinétique d'association de l'interaction PNA-CC1Gal est 100 fois plus élevée que celle déterminée par SPR dans l'équipe d'Adhikari et al. pour l'interaction entre

la PNA et le T-antigène avec un k_{on} de $5,9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ [86]. D'autre part, en étudiant l'interaction entre la PNA et le méthyle galactopyranoside sous les deux formes α et β , Neurohr et *al.* ont déterminé, par RMN, des valeurs de k_{on} qui s'élèvent à $4,6\text{E}^{+04} \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ et $3,6\text{E}^{+04} \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, pour les formes α et β , respectivement [84]. Ces différences des valeurs pourraient être dues à la différence de composition entre les ligands synthétiques et les ligands étudiés dans les autres études. Les différences entre les constantes d'association pourraient être dues à la différence dans les méthodes d'analyse. En effet, il a été admis que, contrairement aux constantes de dissociation très variables, les constantes d'association, des différents couples ligand-récepteur, varieraient peu [269]. La comparaison entre des constantes d'association, obtenues par la même méthode, pourrait confirmer ce constat. En effet, la valeur du k_{on} , que nous avons déterminée dans notre étude, est proche de celles retrouvées dans la littérature et qui sont déterminées par spectroscopie de force dynamique. Ainsi, Le et *al.* ont déterminé un k_{on} de $3,3\text{E}^{+02} \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ pour l'interaction entre des exopolysaccharides de *Lactococcus lactis* et une mucine (la pig gastric mucin, PGM) [241].

La spectroscopie de force nous a permis de déterminer certains paramètres cinétiques qui reflètent la dynamique de l'interaction PNA-CC1Gal. D'après les valeurs des constantes cinétiques nous pouvons déduire la constante d'équilibre K_d qui nous renseigne sur l'affinité du complexe PNA-CC1Gal. Dans notre étude nous avons trouvé un K_d de $5,1\text{E}^{-02} \text{ M}$ soit un K_a de $19,6 \text{ M}^{-1}$. L'affinité retrouvée dans notre étude est 1000 fois plus élevée que celle déterminée dans la littérature par Pratap et *al.* pour l'interaction de la PNA avec le T-antigène évaluée par ITC à $20,6\text{E}^{-03} \text{ M}^{-1}$ [85]. La différence entre les constantes d'équilibre de dissociation pourrait être due à la différence dans les méthodes d'analyse.

1.4 Conclusions

Dans cette première partie du projet, nous nous sommes intéressés à l'exploration de l'interaction entre des ligands glycosylés synthétiques et leurs lectines spécifiques purifiées. L'étude a été menée par microscopie à force atomique en mode imagerie et spectroscopie de force.

Notre étude a porté, d'abord, sur l'interaction entre la lectine d'arachide spécifique au galactose, PNA, et un ensemble de ligands synthétiques à base de galactose, Gal-L. Les ligands Gal-L diffèrent par leurs longueurs et leurs valences. L'effet de la multivalence a été,

d'abord, visualisé par imagerie AFM. En effet, la formation de réseaux, de molécules de PNA reliées par les ligands di et trivalents, a été observée. L'essai de deux ratios molaires PNA/ligands différents, à savoir 4,5/100 et 4,5/1000 μM , a permis de noter que la réticulation ainsi que la taille des réseaux de PNA dépendent à la fois de la valence et de la quantité de ligands additionnée à la solution de PNA. L'interaction entre la PNA et l'ensemble des ligands Gal-L a également été investie par SMFS et DFS. Les forces d'adhésion enregistrées en SMFS, à des taux de chargement proches, ont permis de caractériser une force aux alentours de 60 pN pour l'interaction PNA-ligands monovalents. La longueur des ligands n'aurait pas d'influence significative sur l'intensité de l'interaction entre la PNA et les ligands Gal-L monovalents. Cependant, nous avons noté un effet de la longueur des ligands sur l'interaction pour les ligands di et trivalents. Un effet de la valence a été noté. Il se traduit par une baisse de l'intensité ainsi que de la fréquence de l'adhésion suite à l'augmentation de la valence. Par ailleurs, les résultats de la DFS ont permis d'explorer la dynamique de l'interaction PNA-Gal-L et d'en déduire quelques paramètres clés. L'étude DFS a confirmé l'absence de l'influence de la longueur du ligand sur l'interaction de la PNA avec le galactose. Cependant, les paramètres cinétiques, régissant cette interaction, se sont avérés influencés par la valence des ligands. Une augmentation de la distance de la barrière énergétique x_β en fonction de la valence ainsi qu'une augmentation importante du temps de vie de la liaison τ_{off} ont été constatées. Cette dernière peut atteindre, pour les ligands di ou trivalents, 12 à 43 fois la durée de vie de la liaison obtenue pour leurs homologues monovalents. Enfin, l'étude de l'interaction PNA-Gal-L a été approfondie en étudiant la dépendance de la fréquence des événements de reconnaissance spécifique au temps de contact entre la PNA et le ligand CC1Gal. À partir de cette étude nous avons pu déterminer une constante cinétique d'association k_{on} de $5,29\text{E}^{+02} \text{ M}^{-1}.\text{s}^{-1}$. À partir des valeurs de k_{on} et k_{off} , les constantes d'équilibres, relatives à l'affinité de la PNA au galactose, ont été évaluées par AFM pour la première fois à notre connaissance.

Chapitre 2 : Investigation de l'effet thérapeutique de nouveaux ligands multivalents à α -D-mannoside d'heptyle

Suite à l'explosion des résistances bactériennes, il apparaît urgent de rationaliser et de trouver des alternatives à l'utilisation des antibiotiques. L'approche antiadhésive, basée sur l'inhibition de l'adhésion des bactéries sur les cellules saines, représente une voie alternative de grand intérêt. C'est justement dans ce cadre que s'inscrit la deuxième partie de notre projet. En collaboration avec nos partenaires chimistes des laboratoires CEISAM à Nantes, Dr. Sébastien Gouin et laboratoire des glucides à Amiens, Dr. Mehdi Almant, et notre partenaire microbiologiste de l'unité de glycobiologie structurale et fonctionnelle, Dr. Julie Bouckaert, nous nous sommes intéressés au traitement des infections urinaires (UTIs) dues à *Escherichia coli* uropathogène (UPEC) par une approche antiadhésive. Ainsi, nous avons mené une étude sur de nouveaux ligands synthétiques. La conception rationnelle des ligands s'est largement basée sur le mime du processus biologique des UTIs. En effet, l'infection urinaire se présente en cycle et fait intervenir principalement deux facteurs : (i) Une adhésine fimbriale FimH au niveau de la bactérie uropathogène et (ii) des uroplakines hautement mannosylées qui tapissent la surface des cellules uroépithéliales interviennent au niveau du tractus urinaire [51]. La reconnaissance spécifique, entre l'adhésine fimbriale et les uroplakines mannosylées, a été exploitée afin de concevoir des ligands capables de contrôler les UTIs.

Les études, menées au sein des équipes de nos collaborateurs, ont soutenu la conception rationnelle des ligands HM. Dans un premier temps, ils ont mis en évidence, par SPR, qu'un dérivé du mannose (HM) présente une affinité 460 fois plus élevée que le mannose [69]. Ce composé, breveté, a prouvé un grand potentiel d'inhibition de l'adhésion bactérienne *in vitro* sur des cellules du conduit urinaire. Ce composé a exposé également un potentiel d'inhibition de la formation de biofilms *in vitro* et *in vivo* lors d'une co-injection chez la souris [54]. En se basant sur ces résultats, des ligands multivalents, sur lesquels ont été greffés des résidus de HM, ont été conçus par synthèse chimique. Les ligands HM présentent des valences croissantes (1, 2, 3 et 7 HM). Leur potentiel antiadhésif a été évalué par essais

d'inhibition de l'hémagglutination, inhibition de la fixation au cellules, titration calorimétrique isotherme et microscopie confocale^{[73], [75]}.

Notre étude, par AFM, vient compléter les travaux précédemment entrepris pas nos partenaires. Nous nous sommes chargés d'analyser la reconnaissance entre les ligands synthétiques et l'adhésine fimbriale FimH. L'investigation de l'effet thérapeutique des ligands HM s'est développée en deux temps. En premier lieu, nous avons étudié l'interaction entre les ligands HM et l'adhésine FimH purifiée à partir des bactéries UPEC. En second lieu, l'étude a été menée directement sur les bactéries UPEC en conditions physiologiques. Ainsi, il a été possible de prouver la spécificité et l'efficacité des ligands synthétiques à HM à une échelle moléculaire. De plus, l'influence de la multivalence des ligands HM sur l'interaction avec l'adhésine FimH a été analysée.

2.1 Exploration de l'interaction entre les ligands HM et l'adhésine FimH purifiée

2.1.1 Etude préliminaires par spectroscopie de force sur une lectine analogue : la Concanavaleine A

Dans l'objectif de mettre au point la méthodologie et d'optimiser les conditions de l'expérimentation par spectroscopie de force, des essais préliminaires ont été effectués en utilisant un analogue du FimH. Nous avons opté pour la concanavaleine A (ConA), une lectine végétale tétravalente connue pour sa spécificité pour le mannose. Notre choix s'est basé sur les raisons suivantes : (i) La ConA, première lectine végétale mise en évidence^[1], a largement été étudié dans la littérature, (ii) Plusieurs équipes ont étudié l'interaction entre la ConA et le mannose par diverses techniques et (iii) l'interaction ConA-mannose a particulièrement été étudiée par spectroscopie de force.

Ainsi des essais de spectroscopie de force ont été menés entre une pointe AFM portant un ligand HM et la surface d'or greffée de ConA. Les courbes obtenues ont été, par la suite, traitées par les logiciels *PUNIAS3D* et *Origin 8.5* pour obtenir les histogrammes de distribution de force. Chacun des ligands HM a été testé avec la ConA. Une distribution étroite des forces a, ainsi, été constatée. Le « fit gaussien » effectué dans *Origin 8.5* concentre les valeurs autour d'une force maximale. Les histogrammes de distribution qui découlent des traitements des courbes de forces, enregistrées entre les ligands HM de

différentes valences et la ConA, sont présentés dans la Figure 60. Sur les courbes de retrait typiques, obtenues lors des différentes expériences de spectroscopie de force, un dépliement caractéristique est observé. En effet, le pic relatif à la rupture de la liaison HM-ConA présente une courbure caractéristique du bras PEG utilisé dans les expériences. Un contrôle négatif, par ajout de mannose libre, a également été effectué (un exemple représentatif des résultats est présenté dans l'histogramme en Figure 60 E). Les blocages permettent de confirmer la spécificité des forces enregistrées. Sur la courbe de retrait typique, présentée dans la Figure 60 E, aucun pic spécifique n'est noté.

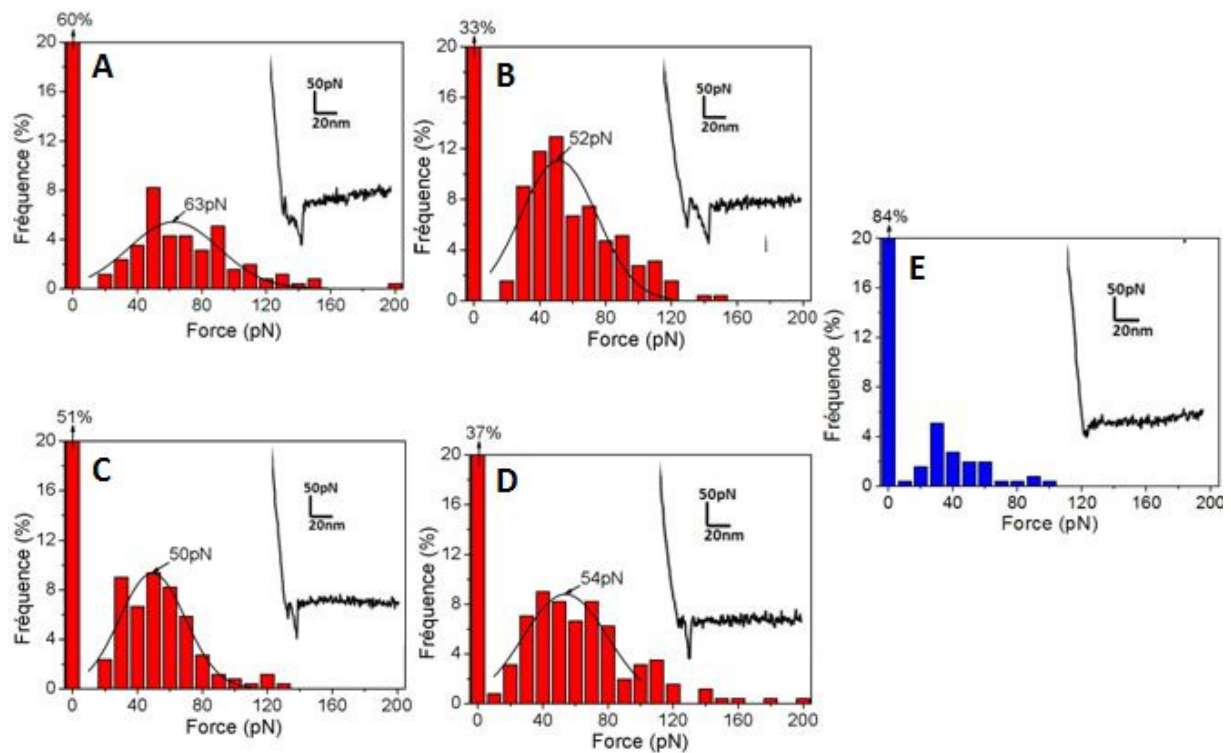


Figure 60. Histogrammes de distribution des forces d'adhésion enregistrées entre la ConA et les ligands HM (A) HM-1, (B) HM-2, (C) HM-3, (D) HM-7 et (E) Exemple d'histogramme de blocage.

Traitement des forces-volumes, $n=256$ courbes, par *PUNIAS3D*. Traçage des gaussiennes par Origin 8.5.

Les valeurs de forces d'adhésion les plus probables, calculées pour l'interaction entre la ConA et les ligands HM de différentes valences, sont regroupées dans le Tableau 7. A des taux de chargement très proches, en moyenne 7610 ± 732 , on constate des forces très proches. D'après le Tableau 7, une force moyenne d'environ 55 pN est enregistrée. Ainsi, la multivalence des ligands HM n'aurait pas d'influence significative sur l'interaction avec la

ConA. Néanmoins, une force légèrement plus élevée est notée pour le ligand monovalent HM-1. En effet, cette force s'élève à 63 ± 33 pN.

Tableau 7. Force d'adhésion enregistrée entre la ConA et les ligands HM de différentes valences ($n=256$).

Ligands	Force (pN)	LR (pN/s)
HM-1	63 ± 33	7880
HM-2	52 ± 26	6540
HM-3	50 ± 23	7820
HM-7	54 ± 30	8200

Les valeurs des forces d'adhésion obtenues pour l'interaction ConA-HM, dans notre étude, sont assez proches de celles obtenues dans la littérature pour l'interaction ConA-mannose. En effet, Madwar et *al.* ont déterminé une force d'adhésion entre la ConA et le mannose de 57 ± 20 pN à un taux de chargement de 6960 pN/s ^[254]. Dans une autre étude de l'interaction ConA-mannose, Ratto et *al.* ont déterminé à un taux de chargement de 10000 pN/s une force de 47 ± 9 pN ^[270]. Cependant et contrairement à nos résultats, le comportement multivalent des ligands mannosylés a été constaté, par Ratto et *al.*. En effet, ces derniers ont noté des forces de 46, 68 et 85 pN, respectivement, pour des ligands mannosylés mono, di et trivalents ^[271].

Cette première partie de l'étude nous a permis de mettre au point la méthodologie de l'étude des ligands HM et d'explorer leur comportement vis-à-vis d'une lectine modèle, la ConA.

2.1.2 Etude de l'interaction entre le FimH purifié et les Ligands à HM par spectroscopie de force

Une fois la méthodologie de l'expérience mise au point, nous nous sommes ensuite intéressés à l'étude de l'interaction entre l'adhésine FimH et les différents ligands HM. L'adhésine FimH a été exprimée et purifiée selon le protocole cité par Bouckaert et *al.* ^[54]. Le gène codant pour le FimH a été inséré dans un vecteur plasmidique. Une transformation bactérienne, par introduction du plasmide modifié, a été effectuée. Les bactéries transformées sont, par la suite, mises en culture et l'expression du gène inséré est induite. Le récepteur FimH, exprimé dans le contenu péri-plasmique des bactéries, est purifié par une dialyse suivie d'une chromatographie échangeuse de cations.

Des essais de spectroscopie de force ont été menés entre le ligand HM, fixé à l'extrémité de la pinte AFM, et le FimH greffé sur la surface d'or. Afin de pouvoir comparer les différents résultats, le taux de chargement a été fixé à environ 10000 pN/s. Les courbes ont été par la suite traitées par le logiciel *PUNIAS3D* qui, par un traitement mathématique, génère un histogramme de distribution des forces. L'ensemble des histogrammes obtenus est regroupé dans la Figure 61. Les histogrammes de distribution des forces ont été lissés par un « fit gaussien » dans Origin 8.5. Les gaussiennes présentent une allure étroite. Ceci témoigne d'une distribution des forces autour d'une valeur maximale. Sur les courbes typiques, le pic d'adhésion présente une courbure caractéristique des bras PEG utilisés dans l'expérience. Cette courbure permet de distinguer entre les forces spécifiques et les forces non spécifiques.

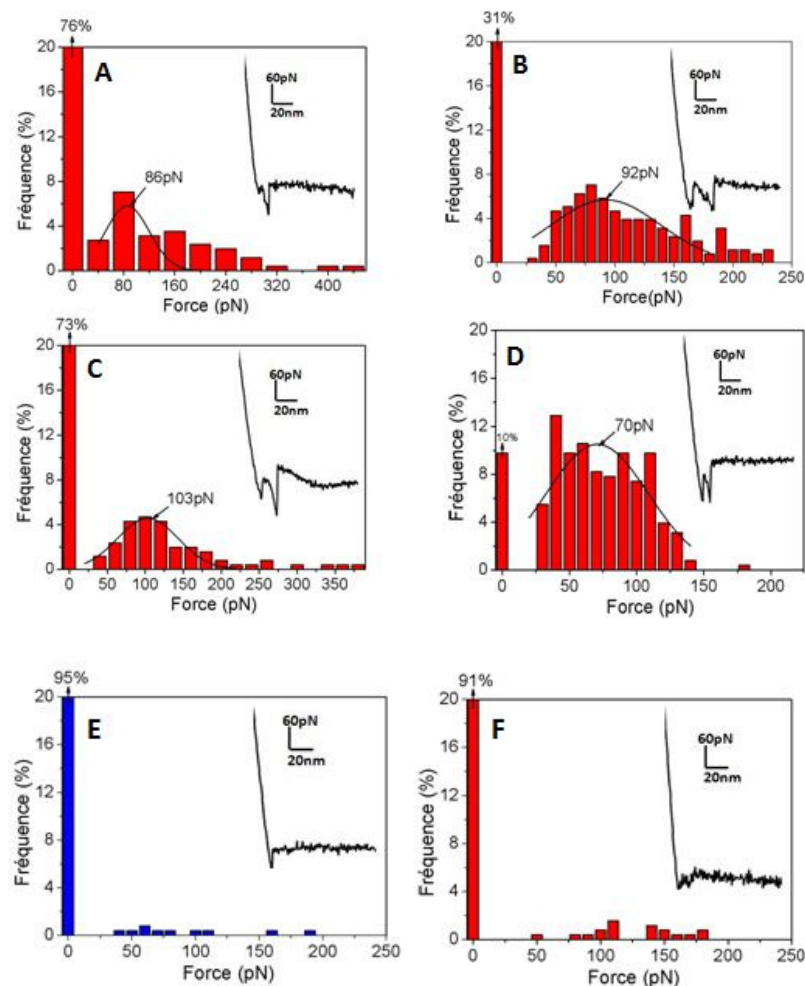


Figure 61. Histogrammes de distribution des forces d'adhésion enregistrées entre l'adhésine FimH et les ligands HM (A) HM-1, (B) HM-2, (C) HM-3, (D) HM-7. Exemple de résultats du contrôle négatif par (E) blocage par ajout de mannose libre et (F) test de pointe non fonctionnalisée. Traitement des Forces-volumes, $n=256$ courbes, par *PUNIAS3D*. Traçage des gaussiennes par Origin 8.5.

Par ailleurs, la vérification de la spécificité de l'interaction s'est opérée par ajout de mannose libre à 500 mM (un exemple représentatif du résultat est présenté dans l'histogramme en Figure 61 E). Un deuxième contrôle négatif, a été effectué. Lors de ce contrôle, la pointe AFM a subi tout le protocole de fonctionnalisation sauf l'étape de fixation du ligand HM (Figure 61 F). Elle est présumée, de ce fait, non réactive avec le FimH. Le traitement mathématique, des courbes de retrait obtenues dans cette expérience contrôle, par *PUNIAS3D* permet de constater qu'aucune force spécifique n'est enregistrée. Ceci permet de confirmer la spécificité de la force notée dans les différentes interactions FimH-Ligands HM.

Les forces obtenues pour l'interaction du FimH avec les ligands HM sont regroupées dans le Tableau 8. Les forces d'adhésion enregistrées varient entre 70 ± 44 et 103 ± 46 pN. Cette variation est légèrement supérieure à la gamme de valeurs d'interactions sucre-lectine déterminées dans la littérature [156], [193], [254], [255], [271], [261]. Il est intéressant de noter, également, que les valeurs des forces d'adhésion dans le cas des interactions FimH-ligands HM sont plus fortes que celles obtenues précédemment pour l'interaction ConA-ligands HM. Ce constat peut être expliqué par la conception rationnelle des ligands HM basée sur la structure tridimensionnelle du récepteur FimH [54].

Tableau 8. Force d'adhésion enregistrée entre le FimH et les ligands HM de différentes valences ($n=256$).

Ligands	Force (pN)	LR (pN/s)
HM-1	86 ± 40	12630
HM-2	92 ± 54	10880
HM-3	103 ± 46	10060
HM-7	70 ± 44	9920

Une légère augmentation de la force d'adhésion est constatée avec l'accroissement de la valence du ligand mis en jeu pour les ligands mono, di et trivalent (HM-1, HM-2 et HM-3). Ainsi, la force d'adhésion la plus importante s'élève à 103 ± 46 pN et est obtenue pour le ligand trivalent HM-3. Contrairement à cette tendance, le ligand heptavalent HM-7 exprime la force d'adhésion la moins importante. Cette force s'élève à 70 ± 44 pN. Au regard de sa nature monomérique et monovalente, l'adhésine FimH ne présente qu'un seul site de reconnaissance du mannose [4]. De plus, la densité de surface en protéine a été optimisée afin qu'elle réponde aux critères des expériences de SMFS. Ainsi, le rapprochement de plusieurs adhésines FimH sur la surface ne serait pas possible. Dans ces conditions, une

influence de la multivalence, par effet cluster, ne serait pas envisageable. Dans le cas particulier des lectines monovalentes, l'augmentation de la force proviendrait essentiellement d'une concentration locale plus élevée en ligand. En effet, la présence des ligands en plusieurs copies autour du site de reconnaissance, augmenterait la probabilité d'interaction FimH-HM. Intuitivement, on pense que la multivalence augmenterait la force d'interaction. Cependant, il demeure difficile de déterminer la valence du ligand optimale pour l'interaction. Une explication possible de la tendance croissante des forces, observée sur le Tableau 8, réside dans une concentration de plus en plus importante des ligands autour du FimH. Quant à la baisse significative de la force, observée avec le ligand HM-7, elle serait due à une trop forte densité de ligands autour du site. Cette dernière pourrait perturber l'interaction entre l'adhésine FimH et les résidus HM par encombrement stérique.

2.1.3 Exploration de la dynamique de l'interaction FimH purifié-Ligands HM par spectroscopie de force

Afin d'approfondir l'investigation de l'interaction entre l'adhésine FimH et les multimannosides HM, nous avons exploré la dynamique de cette interaction. Pour ce faire, nous avons étudié l'influence du taux de chargement appliqué au complexe FimH-ligands HM. Le taux de chargement, définit précédemment (dans le paragraphe 0), influence la valeur de la force d'adhésion du ligand au site de reconnaissance de la protéine ^[121].

Des expériences de spectroscopie de force, entre une pointe portant un des ligands HM et une surface d'or présentant l'adhésine FimH, ont été menées en variant le taux de chargement entre 1000 et 15000 pN/s. Plusieurs forces-volumes ont été générés pour chaque interaction. Ces derniers sont traités par le logiciel *PUNIAS3D* et la distribution des forces d'adhésion est lissée par un « fit gaussien » dans origin 8.5. Les résultats du traitement sont regroupés dans la Figure 62.

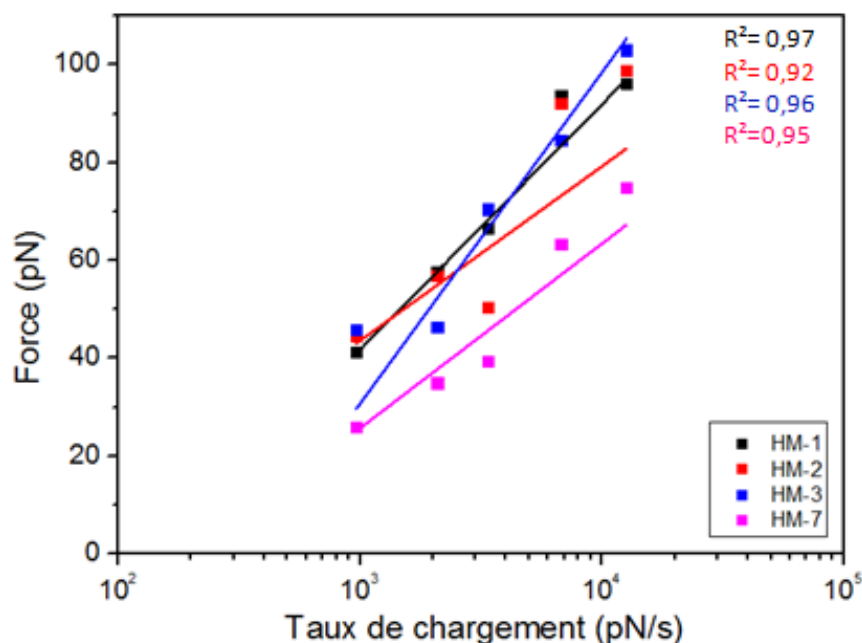


Figure 62. Influence du taux de chargement sur la force d'adhésion. Comparaison entre les interactions entre le FimH et les différents HM. Chaque point expérimental correspond à un force-volume de $n=256$. Les courbes de force sont traitées avec *PUNIAS3D*. Les forces sont déterminées par un « fit gaussien » tracé sur Origin 8.5.

L'analyse des tracés, de la variation de la force en fonction du taux de chargement appliqué, permet de constater des forces entre 20 et 100 pN. Ceci est parfaitement dans l'intervalle de forces décrites dans la littérature pour des interactions sucre-lectine [9], [156], [193], [254], [255], [271]. La comparaison entre les tracés obtenus pour les ligands HM de différentes valences (HM-1, HM-2, HM-3, HM-7) permet de constater une allure linéaire. Ceci témoigne d'un comportement dynamique monomodal de la reconnaissance avec une seule barrière énergétique à franchir pour passer de l'état lié à l'état libre et vice et versa.

L'enregistrement de forces-volumes à différents taux de chargement permet d'explorer la dynamique de l'interaction et de déterminer les constantes cinétiques de dissociation k_{off} ainsi que les distances x_{β} (en nm) des barrières énergétiques. En se basant sur les résultats, présentés dans la Figure 62, et d'après les équations des tracés obtenus pour chaque interaction FimH-HM, on peut estimer la constante cinétique de dissociation de la liaison FimH-ligand HM selon l'Equation 18 et l'Equation 19 (présentées précédemment dans le paragraphe 0). Les différents paramètres cinétiques, déduits à partir des équations des courbes exposées dans la Figure 62, sont reportés dans le Tableau 9.

Tableau 9. Paramètres cinétiques déterminés pour les ligands HM de différentes valences vis-à-vis du FimH.

Ligands	Equations	x_{θ} (nm)	k_{off} (s^{-1})	τ_{off} (s)
HM-1	26,321 $\ln(x) - 160,89$	0,154	17,15	0,058
HM-2	27,062 $\ln(x) - 162,63$	0,150	15,05	0,067
HM-3	34,271 $\ln(x) - 221,56$	0,118	18,74	0,055
HM-7	20,004 $\ln(x) - 115,84$	0,203	16,36	0,063

Les valeurs de x_{θ} , calculées pour l'interaction du FimH avec les ligands HM-1 et HM-2, sont très proches. La barrière énergétique, dans ces deux cas d'interaction, se situent aux alentours de $0,152 \pm 0,002$ nm. L'interaction du FimH avec le ligand HM-3 expose une distance de barrière énergétique plus petite, avec 0,118 nm. Cependant, la distance de la barrière énergétique, lors de l'interaction du FimH avec le ligand HM-7, est plus importante et s'élève à 0,203 nm. Il est intéressant de remarquer que la distance de la barrière énergétique varie en suivant la même tendance que les forces (présentées précédemment dans le paragraphe 1.2.2). Néanmoins, la variation des x_{θ} demeure faible pour pouvoir conclure quant à un effet significatif de la valence sur l'apport énergétique ($-F \times x_{\theta}$) nécessaire pour rompre le complexe FimH-HM.

Par ailleurs, des valeurs très proches de k_{off} , variant entre 15,05 et 18,74 s^{-1} , ont été enregistrées. Aucune influence significative de la valence sur les constantes cinétiques de dissociation n'est notée. A partir de ces valeurs, nous avons déduit de faibles τ_{off} , de l'ordre de quelques millisecondes. Les faibles valeurs de τ_{off} dévoilent une faible durée de vie de la liaison du résidu HM à l'adhésine FimH. Elles reflètent, également, une instabilité du complexe formé par les partenaires de l'interaction.

Une différence importante entre les valeurs de k_{off} , que nous avons obtenues, et celles obtenues en SPR, par nos collaborateurs, est discernée ^[4]. Cette large différence pourrait être due à la différence entre les principes des deux techniques. En effet, les mesures des constantes de dissociation en surface donnent des valeurs plus élevées, comprises entre 0,01 et 10 s^{-1} , que celles obtenues en solution qui peuvent être de l'ordre de 10^{-4} à 10^{-5} s^{-1} . Afin d'expliquer cette différence, Evans suggère que l'application d'une faible force (même

inférieure à 1 pN) élimine certains chemins énergétiques, par ailleurs accessibles en solution [272]. En effet, lorsque les partenaires moléculaires sont en solution, de faibles interactions attractives peuvent ralentir leur dissociation. De plus, en solution, la dissociation est spontanée alors qu'entre surfaces, la dissociation est provoquée par la force externe.

Bien que très différentes, les valeurs des k_{off} obtenues dans les deux études sont assez proches lorsqu'elles sont comparées entre elles. En d'autres termes, l'effet de la valence sur les constantes cinétiques de dissociation, obtenues pour l'interaction entre l'adhésine FimH et les différents ligands HM, n'est pas significative.

Ces constats confirment les résultats, de mesures de forces, obtenus précédemment. En effet, la différence entre les forces enregistrées, pour les différents ligands HM, ne permettaient pas d'énoncer une influence significative de la valence sur l'interaction. Nos résultats rejoignent, également, les résultats obtenus par nos collaborateurs, en SPR. L'absence d'influence de la multivalence sur la dynamique de l'interaction, entre le FimH purifié et les multimannosides étudiés, serait due à la nature monomérique et monovalente du FimH.

2.2 Exploration de l'interaction entre les ligands HM et les bactéries

Dans la section précédente, une étude de ligands multivalents synthétiques, à base de résidus de mannosides d'heptyle (ligands HM), a été présentée. Dans cette partie, nous avons exploré l'interaction entre les ligands HM et l'adhésine FimH purifiée. Le FimH est le principal facteur mis en œuvre par la bactérie UPEC lors d'un processus d'infection du tractus urinaire. Cependant, analyser l'adhésine FimH hors de son cadre d'origine ne permet pas de tirer les conclusions pertinentes à propos du potentiel thérapeutique des ligands HM.

Chez la bactérie, le FimH est exprimé dans une structure complexe dite *pilus* de type I. Les *pili* de type I sont constitués par l'association d'environ 1000 sous unités structurales FimA, suivie par un enchainement de sous unités FimF, FimG et FimH. Les FimH se trouvent donc à l'extrémité des *pili*. Ceci confère à ces derniers leur propriété adhésive responsable de l'adhésion bactérienne aux cellules saines. Récemment, il a été démontré que la structure des *pili* joue un rôle dans la résistance des bactéries aux flux urinaires en permettant une meilleure adhésion des bactéries soumises à une tension externe [61], [63], [64], [65].

Il apparaît donc important de considérer la complexité du système impliqué dans l'adhésion bactérienne afin de pouvoir apprécier le potentiel thérapeutique des ligands HM étudiés. Nous avons, ainsi, ciblé nos travaux à l'étude de l'influence de la multivalence des ligands HM vis-à-vis des bactéries UPEC par microscopie à force atomique.

2.2.1 Effet de la multivalence des ligands sur l'agrégation des bactéries

Dans une première section, l'effet de la multivalence a été évalué par imagerie AFM des bactéries incubées en absence et en présence des ligands HM. La souche étudiée, WT-UTI89, a été génétiquement manipulée pour enlever le contrôle sur l'expression du gène *fim*. L'expression des sous-unités Fim s'opère ainsi en continue. Une souche mutante, Q133K, présentant une mutation au niveau du site de reconnaissance du mannose a été utilisée comme contrôle négatif.

2.2.1.1 Evaluation de l'influence des ligands multivalents sur la souche WT-UTI89 par imagerie AFM

Après une sélection sur boîtes de LB-agar, les bactéries ont été mises en pré-culture, à 37°C, pendant 8h et sous une agitation de 180 tr/min, dans un milieu liquide LB additionné des antibiotiques adéquats. Une culture est lancée à partir de la pré-culture, par ensemencement liquide-liquide, à 37°C, pendant 48h et sans agitation. Les bactéries sont ensuite récoltées ($DO_{600nm} \approx 1,2$) et fixées sur les surfaces de mica selon le protocole établie par Tripathi et *al.* ^[191]. La culture est centrifugée à 5000 g pendant 15 minutes. Ensuite, le culot est repris dans du tampon PBS pH 7,2. La suspension est déposée sur les micas, propres et clivés, en absence ou en présence des différents ligands HM (à 10 μ M). Puis, les surfaces sont incubées à 30°C pendant 2 heures. Enfin, l'excédent de liquide est enlevé et les surfaces rincées sont mises à sécher à 30°C pendant 2 heures. Les bactéries peuvent dès lors être imagées à l'air par AFM.

L'imagerie AFM à l'air permet de visualiser l'éventuel effet agrégatif que peuvent avoir les ligands sur les bactéries. La Figure 63 regroupe des images AFM (de 25 \times 25 μ m) de bactéries incubées sans et avec les différents ligands HM. L'image de bactérie en absence de ligands (Figure 63 A) a servi comme image de référence. La densité initiale des bactéries sur la surface a été optimisée afin d'établir un compromis entre présence de bactérie sur toutes

les zones scannées et absence d'agrégats. En effet, pour les densités trop faibles, plusieurs zones de la surface se trouvent dépourvues de bactéries. Ainsi, la recherche d'une zone exploitable sur la surface peut prendre beaucoup de temps. Au contraire, une densité trop élevée pourrait être à l'origine de la présence d'agrégats spontanés entre les bactéries (sans présence de multimannosides). Ceci rencontre l'évaluation de l'effet agrégatif des ligands sous l'effet de la multivalence.

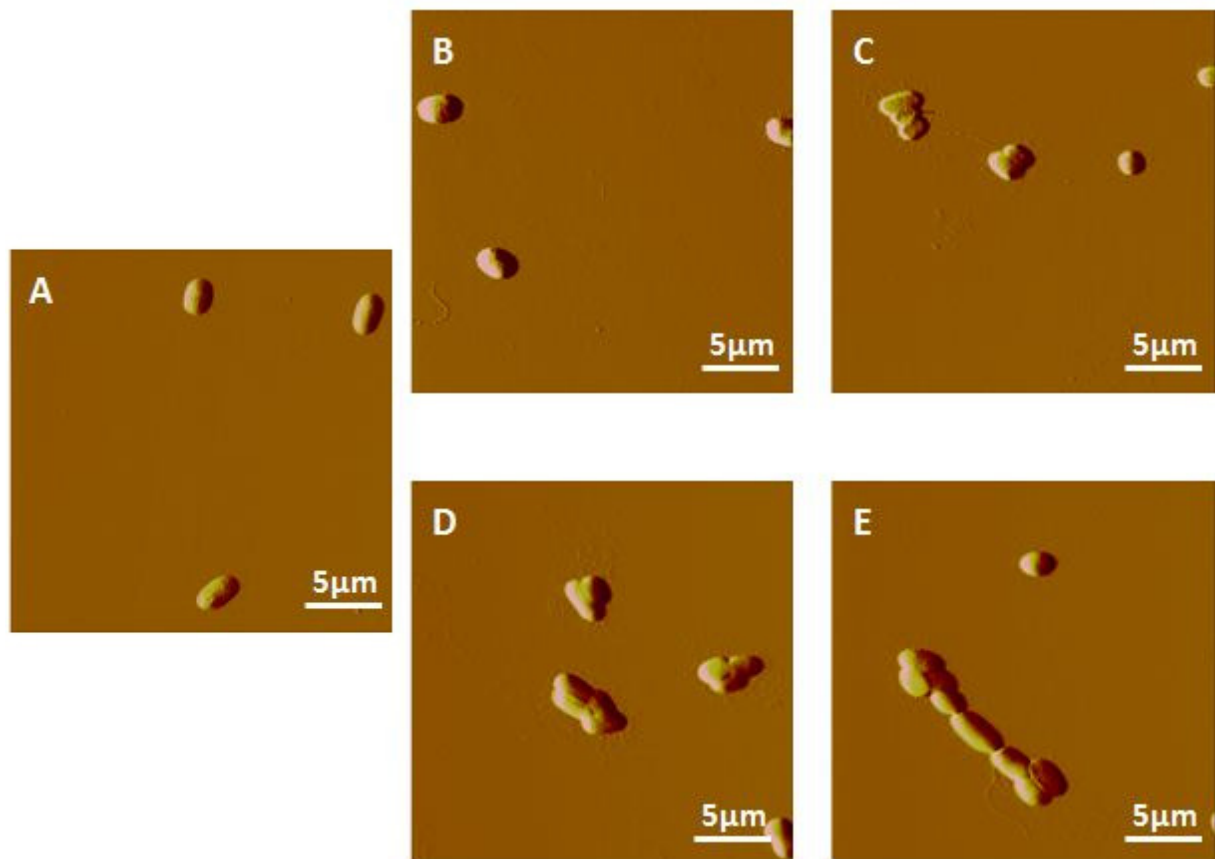


Figure 63. Imagerie AFM à l'air. Images en déflexion de bactéries WT-UTI89 (A) en absence de ligands, (B) incubées avec HM-1, (C) incubées avec HM-2, (D) incubées avec HM-3 et (E) incubées avec HM-7 (Vitesse de scan=2 Hz, Nombre de pixels=512×512).

Les images de déflexions des bactéries, présentées dans la Figure 63, révèlent qu'en l'absence de ligands HM, les bactéries se dispersent de façon individualisée sur la surface (Figure 63 A). L'ajout du ligand monovalent HM-1 ne présente pas d'effet notable sur la dispersion des bactéries (Figure 63 B). Cependant, suite à l'ajout des ligands di, tri et heptavalents (HM-2, HM-3 et HM-7) nous observons la formation d'agrégats de bactéries (Figure 63 C, D et E). Ces images de déflexion révèlent que la taille des agrégats dépend de la valence. En effet, la taille des agrégats de bactéries augmente en fonction de la valence. Ainsi, pour des valences plus fortes, le nombre de bactéries recrutées dans un agrégat sera

plus important. Ce postulat a été vérifié par une étude statistique, qui sera présentée dans la section 2.1.3.

Les agrandissements des images de déflexion (en $5 \times 5 \mu\text{m}$), présentés dans la Figure 64, permettent de visualiser les détails sur les bactéries.

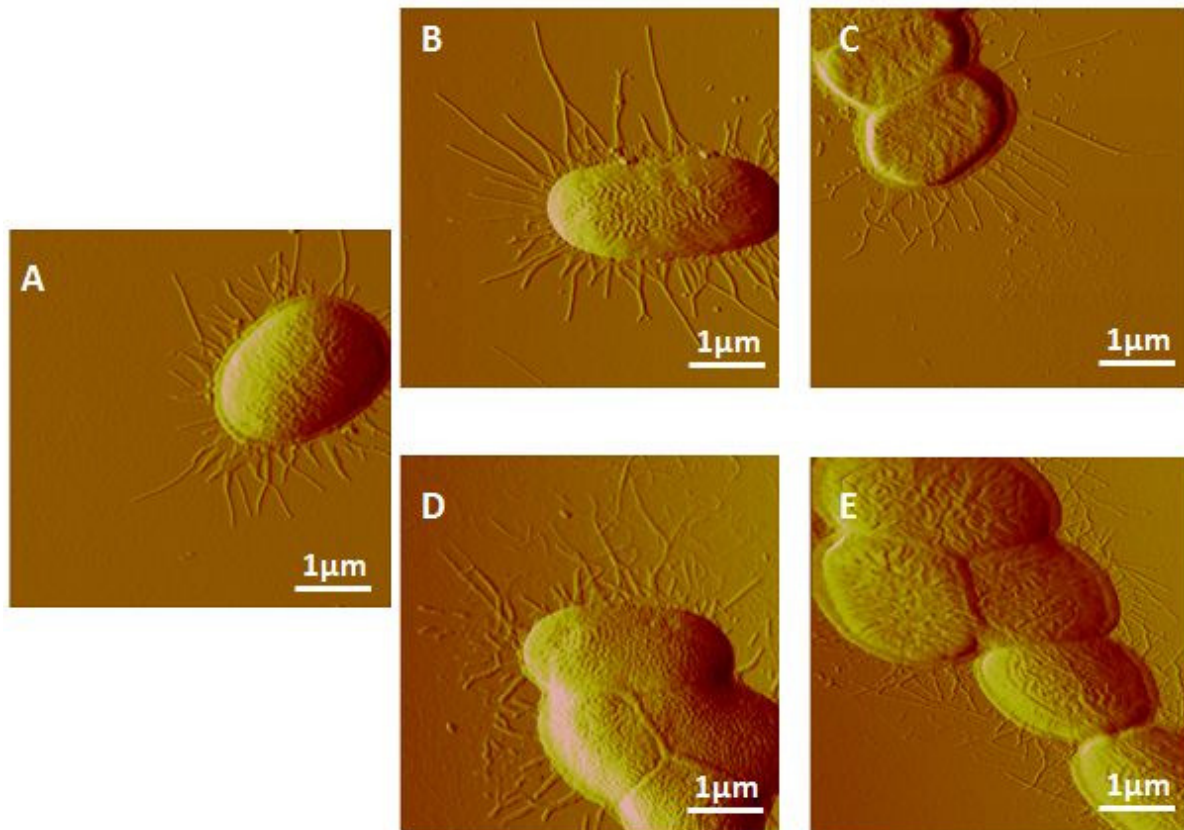


Figure 64. Imagerie AFM à l'air. Images en déflexion de bactéries WT-UTI89 (A) en absence de ligands, (B) incubées avec HM-1, (C) incubées avec HM-2, (D) incubées avec HM-3 et (E) incubées avec HM-7 (Vitesse de scan=2 Hz, Nombre de pixels=512×512).

Sur les images C, D et E de la Figure 64, correspondant aux bactéries incubées avec HM-2, HM-3 et HM-7, respectivement, nous distinguons l'apparition de boursoufflures dans les zones de contacts entre les bactéries. Les lignes boursoufflées aux alentours des bactéries témoignent de l'empilement des *pili* dans les zones de jonction. Une observation intéressante est à noter, particulièrement sur les images D et E de la Figure 64, où peuvent être observées des interconnexions des *pili* de la même bactérie et entre *pili* de bactéries voisines en présence des ligands multivalents.

Les *pili* sont les principaux acteurs de la fixation des ligands HM. Des images d'agrandissement, focalisées sur les *pili*, permettent d'en distinguer la structure. Nous présentons, dans la Figure 65, une comparaison entre l'état des *pili* en absence de ligand et

en présence du ligand HM-7. Une interconnexion est constatée entre les *pili* sous l'effet de la multivalence.

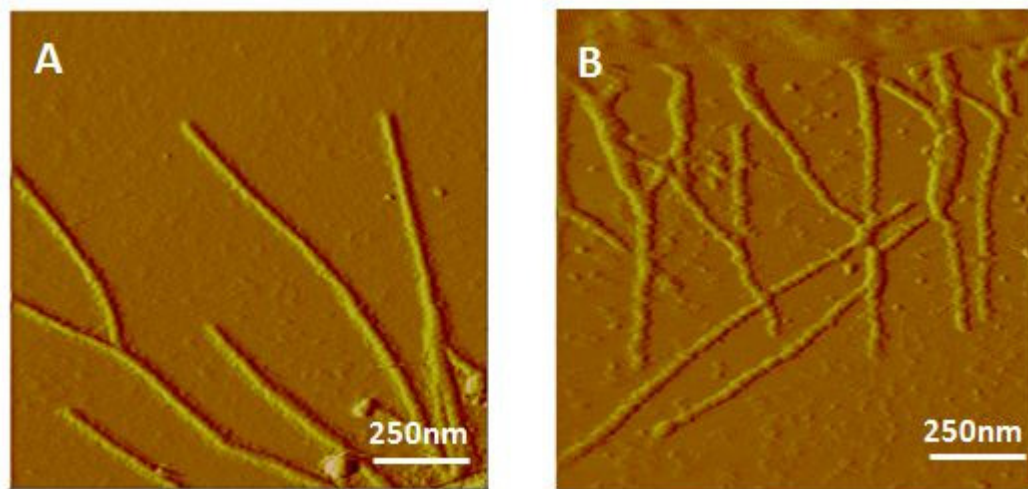


Figure 65. Imagerie AFM à l'air. Images en déflexion de bactéries WT-UTI89 (A) en absence de ligands, (B) incubées avec HM-7 (Vitesse de scan=2 Hz, Nombre de pixels=512×512).

A petite échelle, une structure des *pili* en chapelet peut être visualisée. Cette structure découle de l'enchaînement des sous-unités Fim en une hélice. La structure hélicoïdale des *pili* de type I a été reporté dans la littérature ^{[49], [55], [56], [273],[49, 274]}. La visualisation de *pili* CFA/I chez *E. coli enteropathogène*, par imagerie AFM à l'air, a été récemment reporté ^[187]. Cependant, à notre connaissance, la visualisation de la structure hélicoïdale des *pili* de type I chez *E. coli uropathogène* n'a pas été reportée.

Ainsi nous avons visualisé par imagerie AFM, à une haute résolution, l'effet de la valence sur l'interaction des ligands HM avec les bactéries. Nos résultats rejoignent ceux trouvés par nos collaborateurs, pour l'étude de l'effet des ligands sur les bactéries, par microscopie confocale. En effet, suite à l'ajout du ligand trivalent, marqué à la fluorescéine isothiocyanate, ils ont observé la localisation de la fluorescence verte du ligand dans un agrégat de bactéries ^[75].

2.2.1.2 Contrôle négatif : influence de l'ajout des ligands multivalents au mutant Q133K

Bien que le protocole de fixation des bactéries sur les surfaces de mica ait été optimisé, afin de garantir l'exploitabilité des résultats, il demeure indispensable de procéder à un contrôle négatif. Nous avons donc étudié l'influence de la multivalence des ligands HM en contact avec la souche mutante Q133K. Le mutant Q133K présente une délétion du site

de reconnaissance des mannoses. De ce fait, il serait incapable de se lier aux ligands HM. La préparation des surfaces a été effectuée selon le même protocole cité dans le paragraphe 2.1.1 pour la souche pathogène WT-UTI89.

Dans la Figure 66 nous avons mis en comparaison les images AFM des mutants, obtenues par imagerie AFM à l'air, en absence et en présence des ligands HM de différentes valences. Les bactéries imagées apparaissent individualisées et aucun agrégat n'est observé. Les ligands n'auraient donc pas interagis avec les récepteurs FimH mutés à l'extrémité des *pili*. En conséquence, aucun effet de la multivalence n'est constaté.

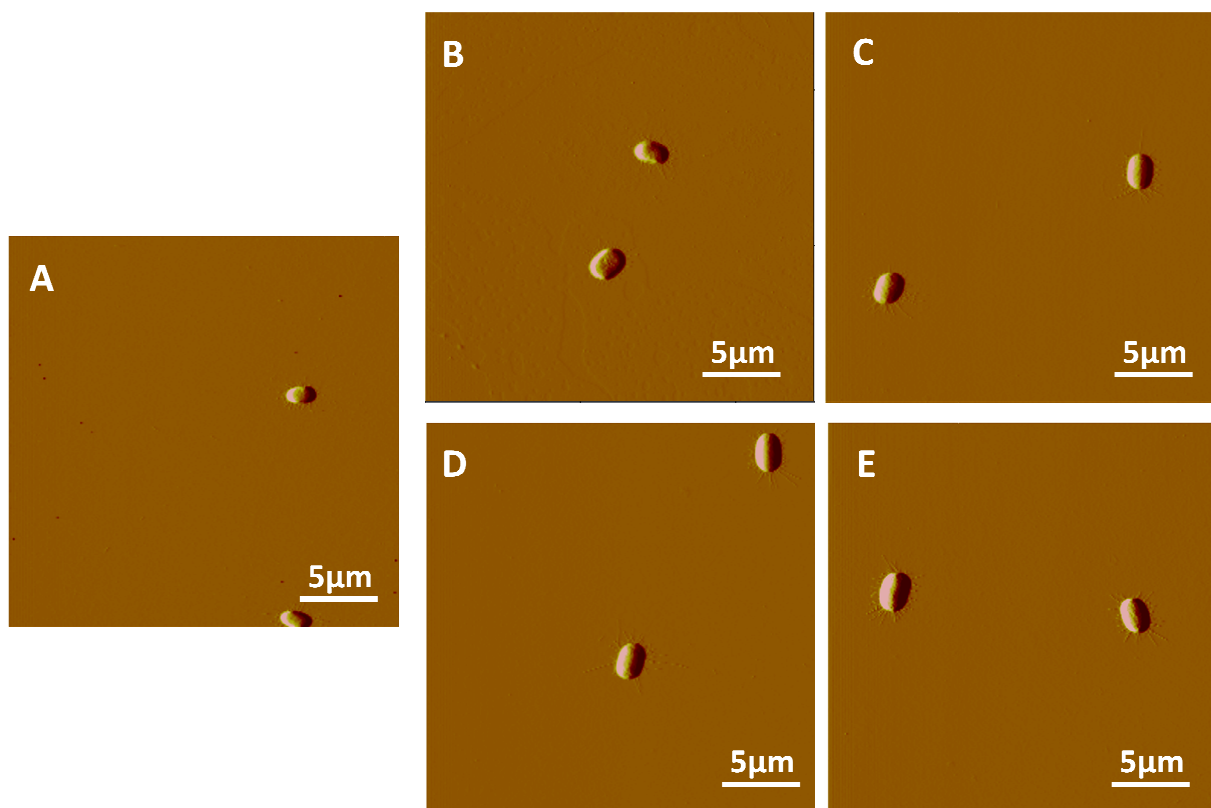


Figure 66. Imagerie AFM à l'air. Images en déflexion des mutants Q133K (A) en absence de ligands, (B) incubés avec HM-1, (C) incubés avec HM-2, (D) incubés avec HM-3 et (E) incubés avec HM-7 (Vitesse de scan=2 Hz, Nombre de pixels=512×512).

Des agrandissements, présentés dans la Figure 67, permettent de visualiser en détail l'état des *pili*. En comparaison avec les images présentées dans la Figure 64 et la Figure 65, nous n'avons pas constaté d'interconnexion notable des *pili* de la souche mutante en présence des multimannosides.

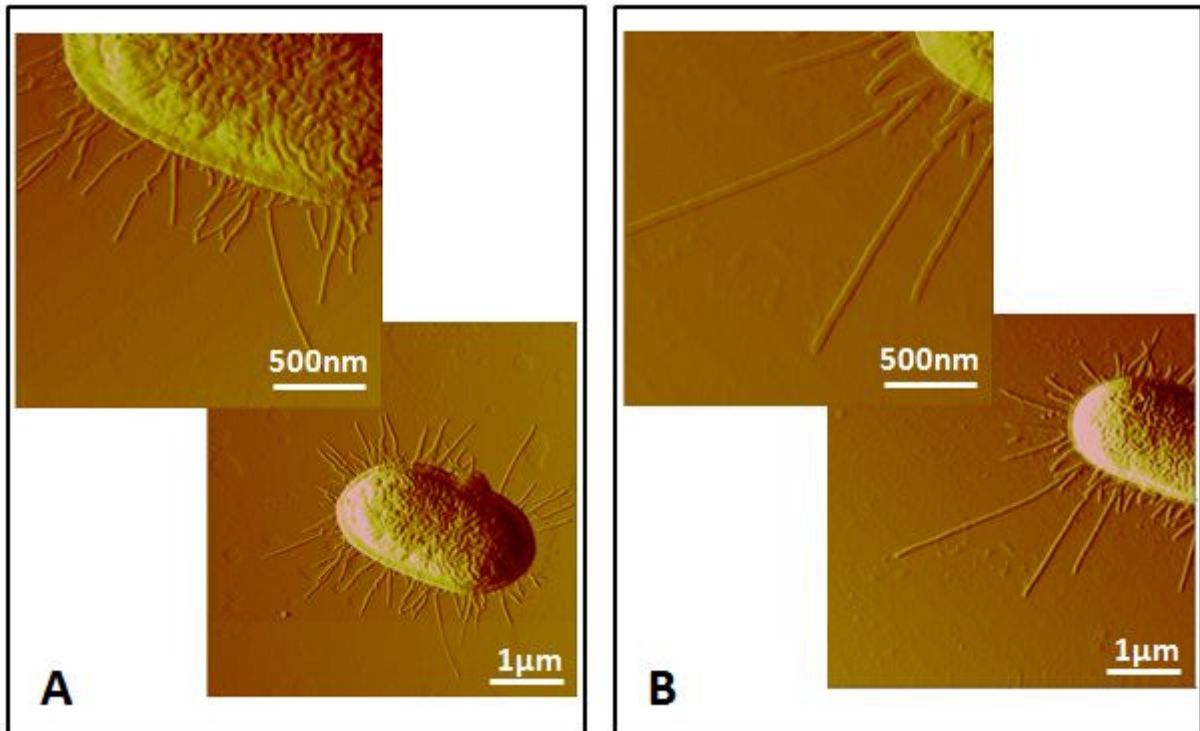


Figure 67. Imagerie AFM à l'air. Images en déflexion du mutant Q133K (A) en absence de ligands, (B) incubées avec HM-7 (Vitesse de scan=2 Hz, Nombre de pixels=512×512).

En conclusion, l'étude de la souche mutante nous a permis de vérifier la spécificité de la reconnaissance entre les bactéries WT-UTI89 et les ligands HM et de confirmer l'influence de la multivalence sur l'agrégation.

2.2.1.3 Etude statistique de l'agrégation

Nous avons pu noter, sur les images de déflexion des bactéries WT-UTI89 en présence des différents ligands HM, une influence de la multivalence sur l'agrégation des bactéries. En effet, nous avons constaté une proportionnalité entre la valence et la taille des agrégats. Afin de confirmer ce constat, une étude statistique a été menée sur les images. Pour ce faire, pour chacune des surfaces et sur un échantillon de 5 images AFM de 50 μ m de côté, nous avons calculé la moyenne et l'écart type du nombre de bactéries présentes sur la surface. Les bactéries sont ensuite classées en bactéries individualisées, bactéries agrégées 2 à 2, bactéries en agrégats de 3 unités et enfin en agrégats de plus que 3 unités. Un histogramme de distribution des bactéries sur les surfaces (Figure 68) est obtenu. Il permet de quantifier l'influence de la multivalence sur l'agrégation. Cette analyse statistique indique la présence de bactéries individualisées sur toutes les surfaces. Nous pouvons aussi noter que l'ajout du ligand monovalent n'a aucune influence sur l'état des bactéries présentes sur les surfaces.

L'apparition des agrégats est constatée suite à l'ajout des ligands di, tri et heptavalents. Les agrégats les plus importants (en taille et en nombre) sont exclusivement obtenus avec le ligand trivalent et, à un degré six fois plus important, avec le ligand heptavalent.

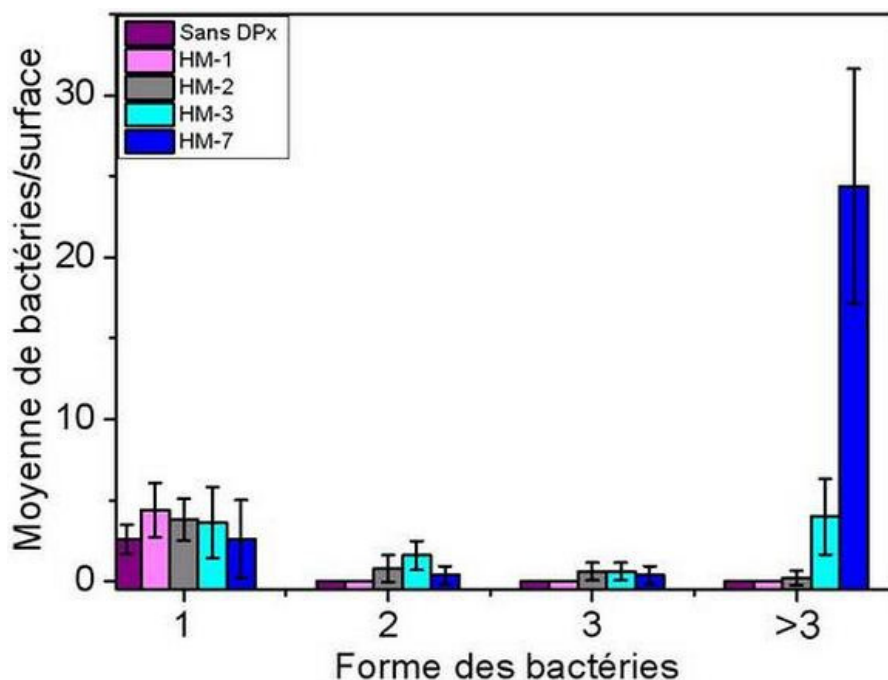


Figure 68. Histogramme de distribution des bactéries sur les surfaces ($n=5$) imagées par AFM.

En se basant sur ces résultats, il apparaît évident que l'incubation des bactéries en présence des ligands HM multivalents provoque la formation d'agrégats. La taille est le nombre des agrégats dépendent de la valence. L'expérience a montré également qu'en présence des ligands multivalents, et suite à l'agrégation, certaines zones sur le mica deviennent dépourvues de bactéries (résultats non présentés). En effet, cette constatation est à envisager vu le nombre quasi-constant des bactéries déposées sur la surface. En absence de ligands multivalents les bactéries couvrent de manière assez homogène la surface. Cependant, en présence des multimannosides, les bactéries s'agrègent et se regroupent dans certaines zones de la surfaces ce qui a pour conséquence de dépourvoir les autres zones.

Dans la littérature, la capacité qu'ont des ligands à fortes valences à agréger les bactéries en suspension a déjà été reportée. En effet, Disney et *al.* ont constaté la formation d'agrégats fluorescents de *E. coli* suite à l'ajout de polymères mannosylés synthétiques [67]. Dans une autre étude, Pasparakis et *al.* ont démontré le potentiel dont disposent des glycopolymères thermoréactifs à contrôler l'agrégation des bactéries [275]. Plus récemment

l'équipe de Lindhorst s'est intéressée à l'étude de ligands de faibles valences. En effet, ils ont montré un effet de la multivalence de glycopeptides à mannopyranosides di et trivalents sur l'inhibition de l'adhésion de *E.coli* fluorescentes à une surface de mannans^[70]. Cependant, à notre connaissance, l'étude de l'effet de la multivalence de ligands synthétiques en interaction avec les bactéries par imagerie AFM n'a pas été reportée.

2.2.2 Etude de l'interaction bactérie-ligands à HM par spectroscopie de force

En plus de l'imagerie AFM, la spectroscopie de force permet d'approfondir davantage l'étude de la multivalence des ligands HM. Bien que l'imagerie AFM confirme un effet de la multivalence des ligands, nous n'avons pas pu le constater lors de l'étude de l'interaction entre les ligands HM et l'adhésine FimH purifiée. Comme nous l'avons déjà avancé, cela est certainement dû à la nature monomérique et monovalente du FimH. Cependant, considéré dans son environnement d'origine, le FimH est exprimé en multiples copies à l'extrémité de *pili* flexibles et mobiles. Un effet de la multivalence serait donc à envisager lors de l'étude, par spectroscopie de force, de l'interaction des ligands HM avec les bactéries.

Au regard de ces constatations, nous nous sommes intéressés à l'étude de l'influence de la multivalence sur l'interaction entre les ligands HM et les bactéries WT-UTI89 par spectroscopie de force.

Des essais de spectroscopie de force, en conditions physiologiques, ont été menés entre une pointe portant un des ligands HM et les bactéries WT-UTI89 adsorbées sur une surface de mica. En plus du contrôle par blocage en ajoutant de mannose libre, le mutant Q133K a été exploité dans des essais de spectroscopie de force comme contrôle négatif.

2.2.2.1 Adsorption des bactéries sur les surfaces

Le problème de l'immobilisation des cellules a été longtemps reconnu comme un obstacle majeur à l'application de l'AFM en microbiologie^[157]. Le grand nombre de publications sur le sujet indique la persistance du problème. Les techniques d'immobilisation varient selon l'objectif de l'expérience et dépendent de la forme, la taille, la rigidité et les propriétés chimiques des cellules. L'étude de l'interaction, entre les ligands HM et les bactéries, nécessite de garder ces dernières en conditions physiologiques. La technique

d'immobilisation ne doit pas dénaturer les composants externes des bactéries (notamment les Fim constituant les *pili*). Lors de notre choix de la technique d'immobilisation, nous avons exploité la charge négative d'*E. coli* pour une immobilisation non dénaturante, par interaction électrostatique, via la poly-L-lysine (PLL) chargée positivement.

Bien que la PLL soit largement utilisée ^{[209], [276], [277]}, les protocoles changent selon les objectifs des travaux. Nous avons donc adapté le protocole de fixation des bactéries sur la surface de mica via la PLL à notre étude. Nous nous sommes particulièrement intéressés à la densité des surfaces en bactéries et à leur force de fixation.

Dans un premier temps, nous présentons dans la Figure 69 les résultats relatifs à l'optimisation de l'adhésion en modulant la concentration de la solution de PLL.

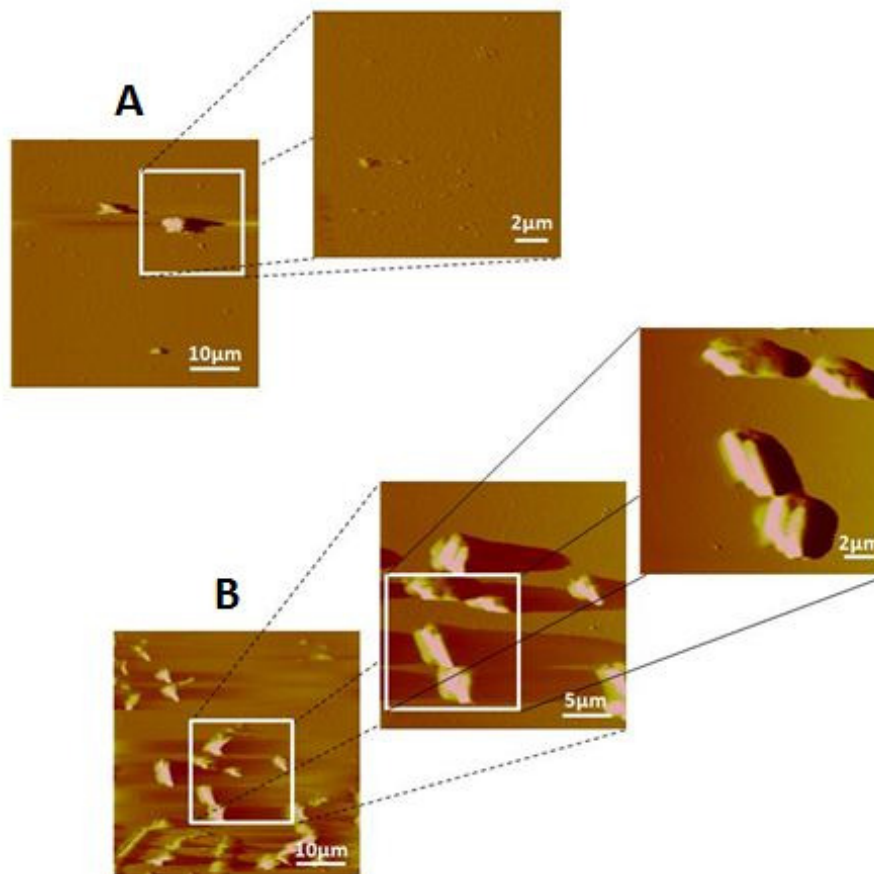


Figure 69. Imagerie AFM des WT-UTI89 sous PBS pH 7,2. (A) Images de déflexion de bactéries sur surfaces cotées à 0,01% (m/v) PLL dans l'eau, (B) images de déflexion de bactéries sur surfaces cotées à 0,1% (m/v) de PLL dans PBS pH 7,2. (vitesse de scan=6 Hz, nombre de pixels = 256×256).

Nous avons choisi d'adapter le protocole décrit par Chen et *al.* ^[186]. En résumé, une surface de mica propre et clivée est incubée dans une solution de PLL pendant une nuit à température ambiante. La surface est par la suite rincée et utilisée pour y adsorber les

bactéries. La suspension bactérienne est déposée pendant 10 minutes sur la surface. Ensuite, l'excédent de liquide est prélevé et la surface est exposée à l'air pendant 10 minutes. Selon Bolshakova et *al.*, l'exposition des bactéries à un bref séchage de 10 minutes n'engendre pas l'endommagement de ces dernières^[277]. Enfin, la surface est recouverte par du tampon PBS froid et est ainsi prête à l'imagerie AFM sous liquide

Dans un premier lot d'expérience, nous avons testé deux solutions de PLL. Une première solution de PLL à 0,01% (m/v) dans de l'eau ultra-pure a été testée (Figure 69 A). Dans ce cas, nous avons constaté que les bactéries sont entraînées avec la pointe lors de l'imagerie AFM sous liquide. Un agrandissement sur l'image montre que les bactéries sont complètement délocalisées. Au regard de ces résultats, une deuxième solution de PLL a été testée. Nous avons utilisé une solution de PLL à 0,1% (m/v) dans du tampon PBS à pH 7,2. Les images des bactéries sous PBS, présentées dans la Figure 69 B, révèlent une bien meilleure fixation. Au fur et à mesure des agrandissements successifs effectués sur une même zone, les bactéries ne sont pas entraînées par la pointe.

La densité des bactéries sur la surface représente un des paramètres clés de la réussite des expérimentations de spectroscopie de force sur bactéries. En effet, une densité trop élevée génère des agrégats, de tailles et hauteurs variables. Ceci encontre l'exploitabilité de la surface en spectroscopie de force. Au contraire, pour une densité trop faible, la recherche d'une zone exploitable sur la surface nécessite un temps plus ou moins long. Le temps de recherche des zones exploitables par imagerie AFM, au dépend des expériences de spectroscopie de force, est préjudiciable à la réalisabilité de l'expérience. En effet, le temps d'une bonne adhésion des bactéries à la surface est limité à environ 2h^[186].

Afin d'optimiser la densité de surface, nous avons testé plusieurs dilutions d'une suspension de bactéries ($DO_{600nm} \approx 1,2$). 200 μ L de chaque dilution sont déposés sur une surface de mica recouverte de PLL à 0,1% dans du tampon PBS pH 7,2. La Figure 70 présente les images de déflexion des bactéries, imagées sous PBS pH 7,2, obtenues pour des dilutions de 1, 2 et 4 fois.

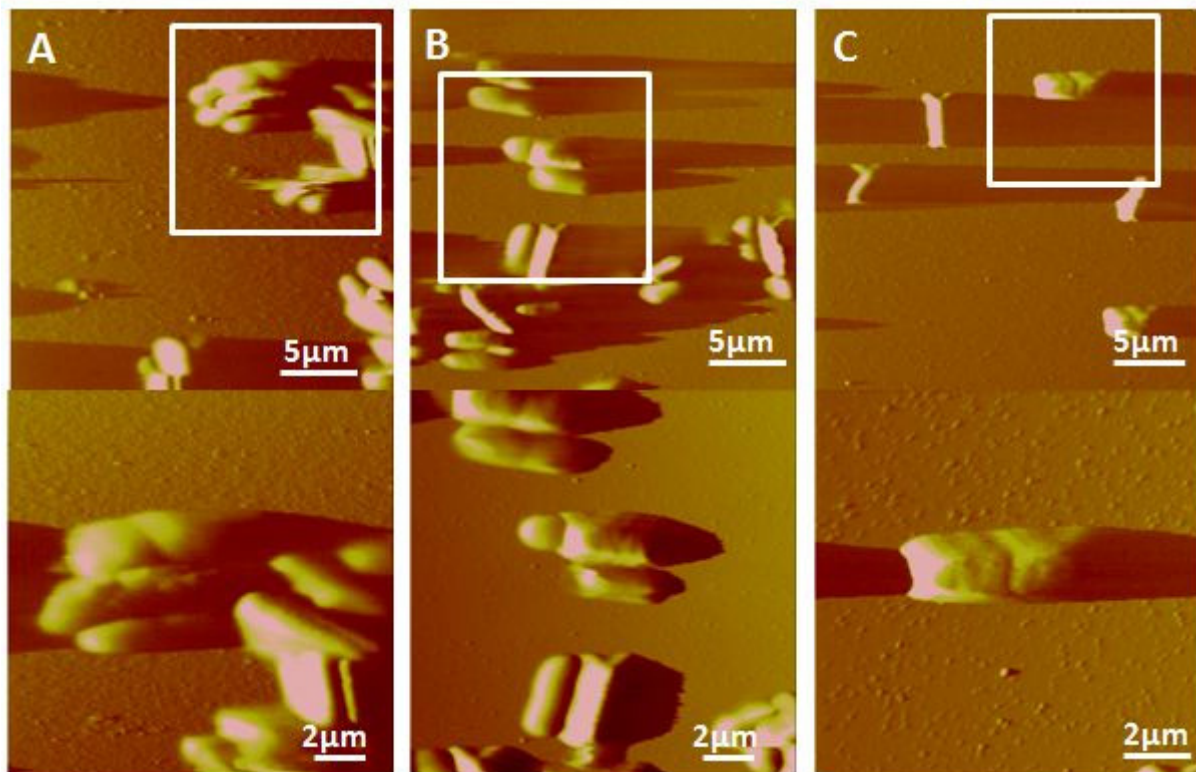


Figure 70. Imagerie AFM des WT-UTI89 dans PBS pH 7,2. Etude de l'influence de la dilution sur la densité de surface en bactérie ; (A) Images de déflexion de la suspension bactérienne non diluée, (B) Images de déflexion de la suspension bactérienne diluée deux fois et (c) Images de déflexion de la suspension bactérienne diluée quatre fois. (vitesse de scan=6 Hz, nombre de pixels = 256×256).

L'observation de la surface sans dilution (Figure 70 A) montre que les bactéries se regroupent en amas. Une dilution de deux fois permet de diminuer la densité sur la surface et d'obtenir des bactéries individuelles et regroupées deux à deux (Figure 70 B). Enfin, une dilution de quatre fois, appliquée à une suspension bactérienne de $DO_{600nm} \approx 1,2$, permet d'obtenir des bactéries individualisées et à des distances suffisantes pour permettre de les exploiter lors des expérimentations de spectroscopie de force sur une seule bactérie (Figure 70 C).

2.2.2.2 Interaction entre les bactéries WT-UTI89 et les ligands HM

Une fois la préparation des surfaces mise au point, nous nous sommes ensuite intéressés à l'étude de l'interaction entre les bactéries *E. coli* uropathogène WT-UTI89 et les différents ligands HM. Dans cette étude, des expériences de spectroscopie de force ont été menées entre les bactéries adsorbées à la surface de mica, et maintenues en conditions physiologiques, et la pointe AFM portant un des ligands HM (Figure 71).

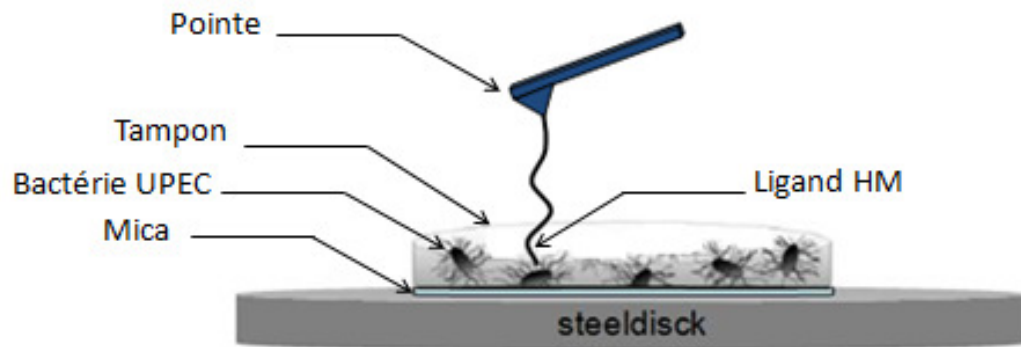


Figure 71. Représentation schématique de l'expérience de spectroscopie de force sur bactéries.

Nombreuses contraintes s'opposent à la réalisation des expérimentations de spectroscopie de force sur bactéries. En effet, ces dernières sont connues au sein de la communauté scientifique comme étant très délicates et critiques. Nous nous sommes basés sur le protocole, développé par Francius et *al.*, pour la réalisation des expériences de spectroscopie de force sur bactéries^[162]. Il est, évidemment, non envisageable de scanner la surface avec une pointe fonctionnalisée. Cette dernière, perdrait le greffage. Afin de localiser une bactérie exploitable et régler les paramètres de la conduite de l'expérience, une pointe non fonctionnalisée est engagée et la force d'appui est minimisée. Une image de la bactérie est enregistrée, à une résolution satisfaisante (Figure 72 A), avant l'enregistrement des forces-volumes. Ainsi, nous localisons la bactérie et la zone d'intérêt. Ensuite, tout en marquant la position de la zone d'intérêt, la pointe est désengagée et est remplacée par une pointe portant le ligand. Dix courbes de force *versus* distance sont enregistrées à une position fixe. Pendant cette étape, nous vérifions les paramètres et l'allure des courbes d'approche et de retrait (Figure 72 B). Des forces-volumes, consistant en une matrice de 16×16 courbes de forces-distances sur une surface de 500 nm de côté, sont enregistrés. Enfin, dans l'objectif de contrôler la spécificité des forces enregistrées, la pointe est désengagée, du mannose libre est injecté et l'expérience est renouvelée (un exemple représentatif du résultat est présenté dans l'histogramme en Figure 73 E).

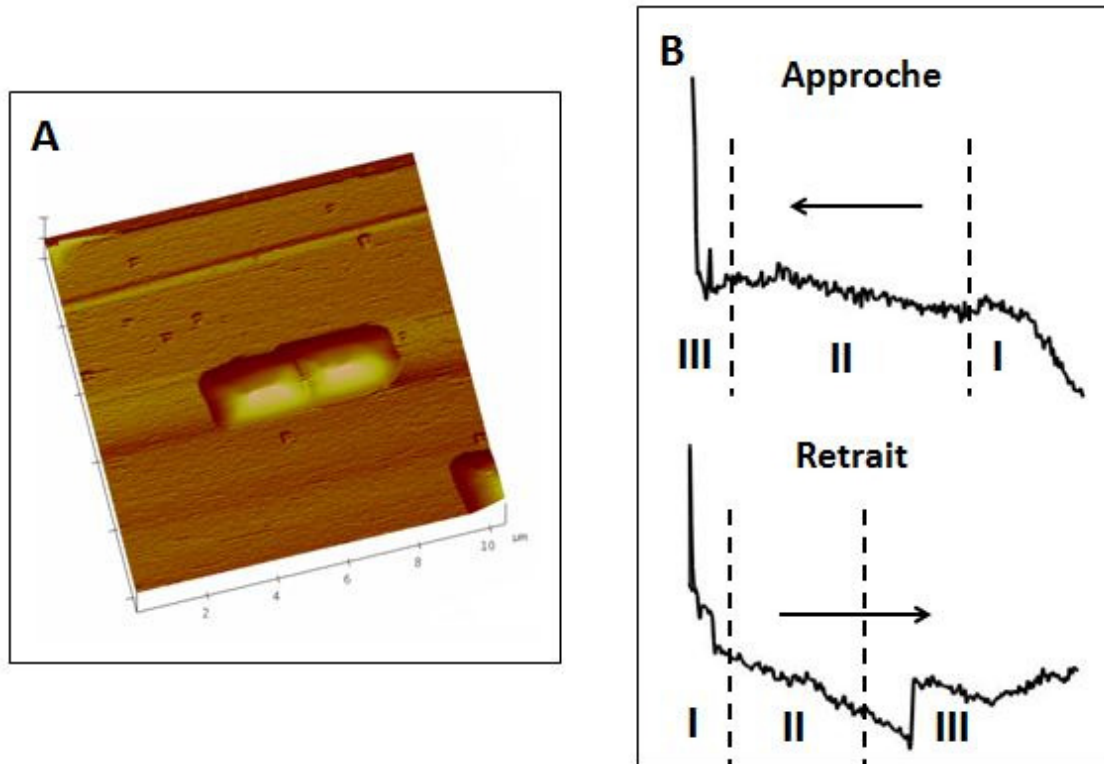


Figure 72. (A) Image de bactérie en 3D imagée sous PBS à pH 7,2. (B) Courbes d'approche-retrait enregistrées en spectroscopie de force sur bactérie.

Les courbes d'approche-retrait, exposées dans la Figure 72 B, présentent une allure caractéristique qui a été reportée dans la littérature. La courbe d'approche présente, au contact de la surface, une courbure spécifique. Cette dernière résulte de l'élasticité de la bactérie et de la présence d'un revêtement de *pili* qui perturbe la stabilité de la pointe à l'approche de la surface ^{[278], [279]}. Dans une étude des propriétés biomécaniques des *pili* de type I chez *E. coli* par pinces optiques, Andersson et *al.* ont reporté une courbe d'approche en trois régions et dont l'allure est en parfaite concordance avec les courbes d'approche obtenues dans notre étude. La région I correspond à une évolution élastique au contact des *pili*. La région II montre un repliement à force constante des *pili*. Enfin, la région III est la région de contact entre la pointe et la surface de la bactérie.

La courbe de retrait présente, également, trois régions distinctes ^[273]. Une première région (région I) relative aux interactions non spécifiques. La région II présente un plateau de force et correspond au déroulement, à force constante, de l'hélice formant le *pilus*. La troisième région présente le pic de rupture d'adhésion du complexe ligand-lectine FimH, ayant lieu à l'extrémité du *pilus*.

Des essais de spectroscopie de force ont ainsi été menés entre les ligands HM au bout de la pointe et les bactéries adsorbées, par interactions électrostatiques, sur la surface de mica. Afin d'avoir des résultats comparables, le taux de chargement a été fixé à environ 85000 pN/s. Les courbes de retrait ont été, par la suite, traitées par le logiciel *PUNIAS3D*. Le traitement mathématique nous permet d'obtenir un histogramme de distribution des forces. L'ensemble des histogrammes obtenus est regroupé dans la Figure 73.

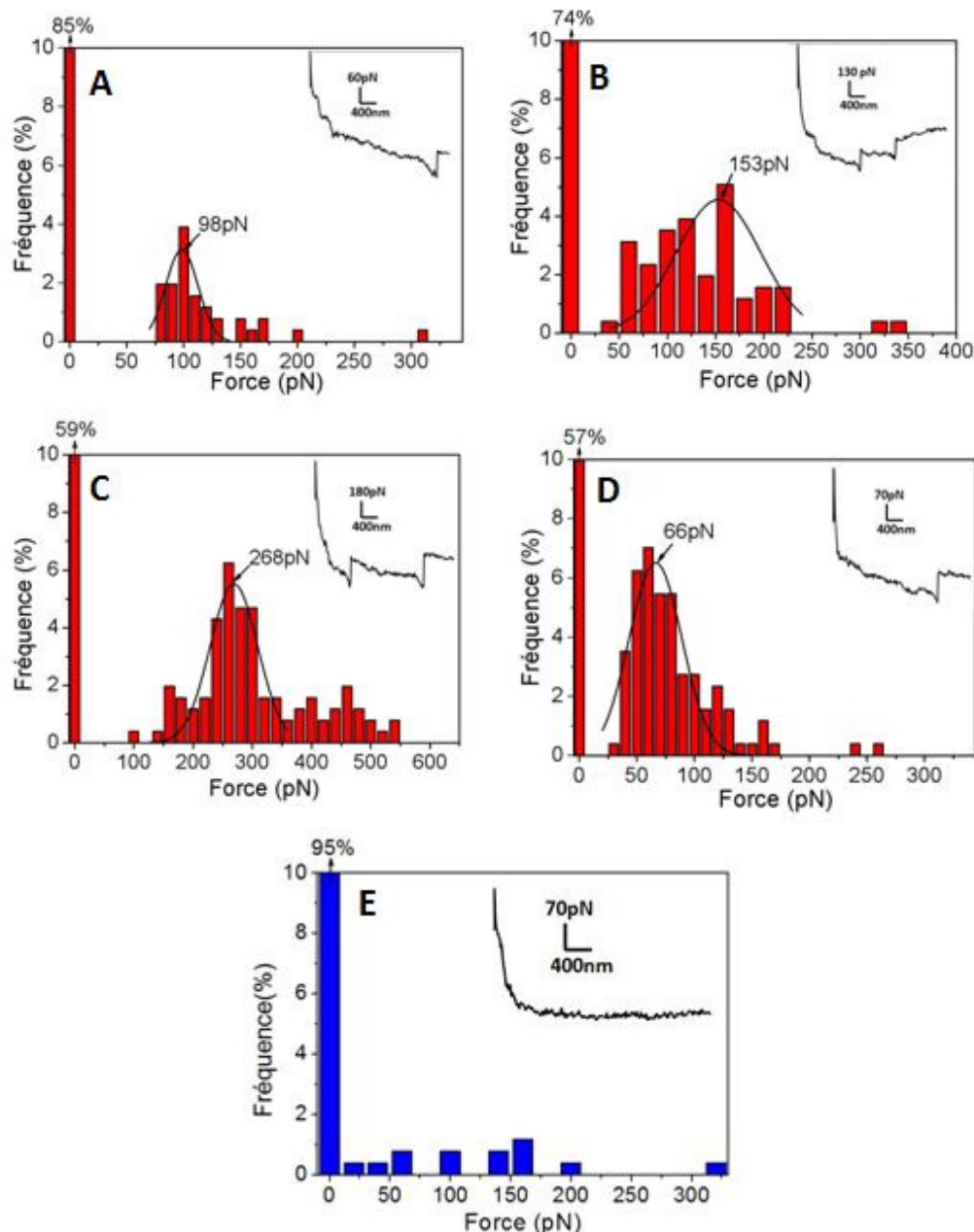


Figure 73. Histogrammes de distribution des forces d'adhésion enregistrées entre les bactéries WT-UTI89 et les ligands HM ; (A) HM-1, (B) HM-2, (C) HM-3, (D) HM-7 et (E) Exemple d'histogramme de blocage. Traitement des Forces-volumes, $n=256$ courbes, par *PUNIAS3D*. Traçage des gaussiennes par Origin 8.5.

L'allure des courbes typiques, présentées dans le Figure 73 A, B, C et D, est en accord avec ce qui a été décrit dans la littérature. En effet, les courbes présentent les trois régions précédemment détaillées. Le pic relatif à la rupture de l'adhésion est obtenu dans la troisième région de la courbe. Certaines courbes présentent des pics multiples. Cela peut être dû à des interactions simultanées entre plusieurs résidus HM et plusieurs FimH à l'extrémité des *pili*.

Les histogrammes de distribution des forces ont été lissés par un « fit gaussien » moyennant le logiciel Origin 8.5. Les gaussiennes présentent une allure étroite. Les forces se concentrent autour d'une valeur maximale. Le Tableau 10 regroupe les forces et les fréquences obtenues pour l'interaction entre les bactéries WT-UTI89 avec les ligands HM de différentes valences.

Tableau 10. Forces et fréquences d'adhésion enregistrées entre WT-UTI89 et les ligands HM de différentes valences ($n=256$).

Ligands	Force (pN)	LR (nN/s)	Fréquence (%)
HM-1	98 ± 16	61	15
HM-2	153 ± 34	80	26
HM-3	268 ± 47	86	41
HM-7	66 ± 26	74	43

Les forces d'adhésion enregistrées varient entre 66 ± 26 et 268 ± 47 pN. Les forces enregistrées dans ce cas sont supérieures à celles obtenues lors de l'étude de l'interaction entre le FimH purifié et les ligands HM. En effet, considérée dans sa structure originelle (le *pilus*), l'adhésine FimH expose des forces d'adhésion, aux surfaces mannosylées, plus fortes que lorsqu'elle est purifiée. Soumise à une traction mécanique, l'adhésine FimH à l'extrémité du *pilus* s'attache fortement aux surfaces mannosylées. Cependant, lorsque l'adhésine FimH est séparée du *pilus*, la force d'adhésion notée, suite à l'exercice d'une force externe, est significativement moins importante. Ce constat confirme ce qui a été reporté dans la littérature concernant l'influence de la structure originelle et le rôle que joue le *pili* dans la reconnaissance des ligands mannosylés ^[65]. Ce mécanisme expliquerait la résistance des bactéries uro-pathogènes au flux urinaire.

Nous constatons une augmentation initiale des forces sous l'influence de la valence. Les forces passent de 98 ± 16 pN à 153 ± 34 pN et enfin à 268 ± 47 pN pour les ligands HM-1, HM-2 et HM-3, respectivement. Un facteur d'augmentation de la force, sous l'influence de la

valence, d'environ 1,5 est calculé. La force obtenue pour le ligand heptavalent inverse la tendance. En effet, une force de 66 ± 26 pN a été obtenue pour l'interaction du ligand HM-7 avec la bactérie. Ce résultat est en contradiction avec le pouvoir agrégeant révélé par l'HM-7 lors de l'imagerie AFM. Néanmoins, il est intéressant de noter que nos résultats rejoignent ceux trouvés par ITC chez nos collaborateurs. En effet, ils ont noté une amélioration initiale de l'affinité en allant du ligand monovalent au divalent et enfin au trivalent avec des K_d de 14,4, 2,6 et 2,4 nM, respectivement. Cependant, ils ont enregistré la plus faible affinité pour le ligand HM-7 avec un K_d de 36,2 nM.

L'augmentation initiale de la force d'adhésion sous l'influence de la valence serait due à des interactions multiples entre les FimH à l'extrémité des *pili* et les résidus HM. La faible force d'adhésion, constatée pour le ligand HM-7, serait due à un encombrement de plusieurs complexes FimH-HM.

Par ailleurs, un effet de la multivalence sur la fréquence d'adhésion est manifesté par les ligands HM. En effet, nous avons enregistré une fréquence de plus en plus élevée pour des ligands de valences croissantes. La fréquence la plus faible est enregistrée pour le ligand monovalent avec seulement 15% d'évènements de reconnaissance spécifique entre la bactérie et le HM-1. La fréquence augmente à 26% pour le ligand divalent et atteint 41% et 43% pour les ligands tri et heptavalents, respectivement. La présence de l'adhésine FimH, présentée en plusieurs copies, à la surface de la bactérie permet d'augmenter la fréquence des évènements de reconnaissance des ligands multivalents.

Sur l'histogramme présenté dans la Figure 73 E, relatif au contrôle négatif par ajout de mannose libre, aucune force significative n'est constatée. La persistance de quelques évènements d'adhésion pourrait être due à l'affinité plus importante qu'exprime le FimH vis-à-vis du mannoside d'heptyle en comparaison avec le mannose.

2.2.2.3 Contrôle de la spécificité de l'interaction

En plus des contrôles par blocage des sites de reconnaissance au mannose libre, nous avons vérifié la spécificité des forces enregistrées en analysant la distance à laquelle a lieu le pic d'adhésion (région III sur la courbe de retrait). D'autre part, nous avons exploité, dans des expériences de spectroscopie de force, la mutation imposée à la souche Q133K.

L'analyse de la reconnaissance sur la souche mutante Q133K permet de vérifier la spécificité de l'interaction entre les ligands HM et la souche pathogène WT-UTI89.

➤ Analyse de la distance de rupture de l'adhésion

Au regard du positionnement de l'adhésine FimH à l'extrémité des *pili* de type I, il est à envisager d'obtenir les pics d'adhésion, sur la courbe de retrait, à une certaine distance de la surface. Dans le cas où la force d'adhésion du ligand au FimH est supérieure à 60 pN (force nécessaire au dépliement du *pili* selon Miller et *al.*) la distance devrait correspondre à $1,9 \pm 0,7 \mu\text{m}$ [273]. Cette distance correspondrait à la longueur du *pili* déroulé.

En se basant sur ces données, nous avons analysé la distance à laquelle sont obtenus les pics d'adhésion. L'analyse s'est effectuée en analysant les courbes de retrait, une par une, moyennant PUNIAS3D. Des gaussiennes sont appliquées, aux histogrammes obtenus, moyennant le logiciel Origin 8.5 (Figure 74).

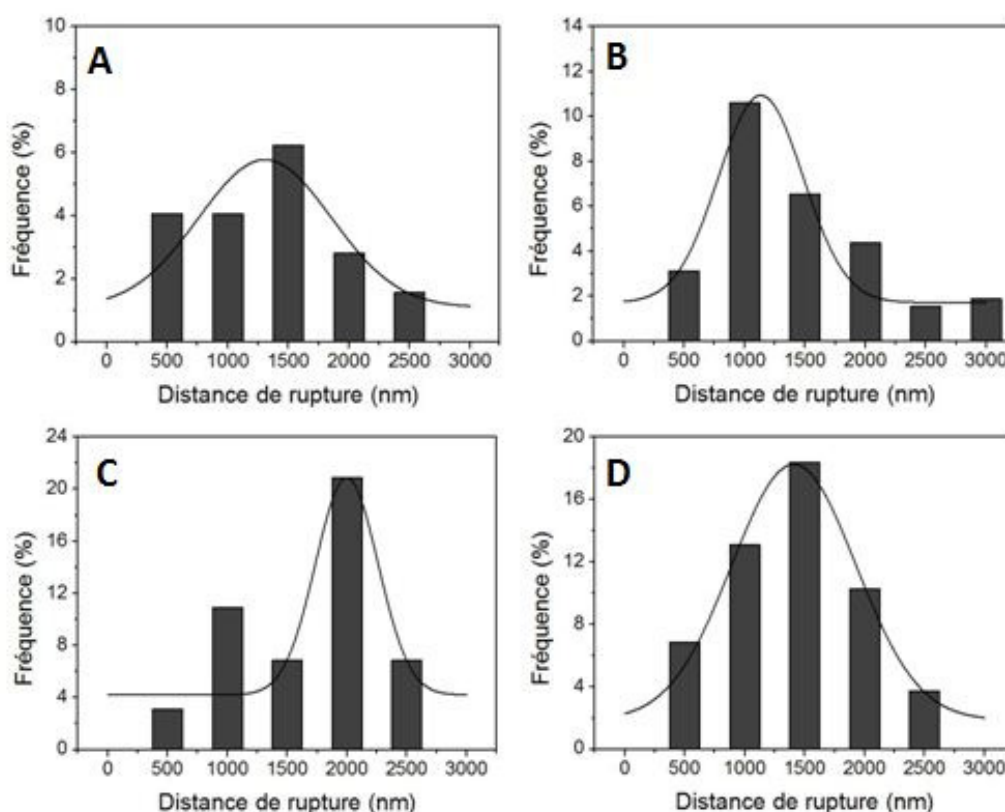


Figure 74. Histogrammes de distribution des distances de rupture enregistrées sur les courbes de retrait dans les expériences de spectroscopie de force entre la bactérie WT-UTI89 et (A) HM-1, (B) HM-2, (C) HM-3 et (D) HM-7.

Sur toutes les courbes, la distance de rupture a lieu à une distance de 0,5 et 3 μm . Suite au lissage des histogrammes, par un « fit gaussien » dans Origin 8.5, nous avons constaté que les distances de rupture de l'adhésion se concentrent autour d'une valeur maximale. Les valeurs ont été regroupées dans le Tableau 11.

Tableau 11. Distance de rupture de l'adhésion entre l'adhésine FimH à l'extrémité des *pili* de WT-UTI89 et les ligands HM de différentes valences.

Ligands	Distance de rupture (μm)
HM-1	1,31 \pm 0.50
HM-2	1,20 \pm 0.35
HM-3	1,99 \pm 0.25
HM-7	1,41 \pm 0.50

Les pics d'adhésion ont lieu à une distance variant de 1,2 à 2 μm ce qui correspond exactement à la longueur des *pili*. Ainsi, nous avons pu vérifier que les événements d'adhésion ont lieu à l'extrémité des *pili*, principale structure de la reconnaissance des résidus mannosides d'heptyle.

➤ Interaction entre le mutant Q133K et les ligands HM

En plus des expériences de blocage et l'analyse de la distance des pics d'adhésion, nous avons exploité la mutation, imposée à la souche Q133K, pour le contrôle de la spécificité de la reconnaissance entre les ligands HM et la bactérie WT-UTI89. De la même manière décrite dans le paragraphe 2.2.2, nous avons réalisé des expériences de spectroscopie de force entre les ligands HM de différentes valences et le mutant Q133K. L'ensemble des forces-volumes enregistrés a été traité par *PUNIAS3D* et des histogrammes de distribution de force sont obtenus (Figure 75).

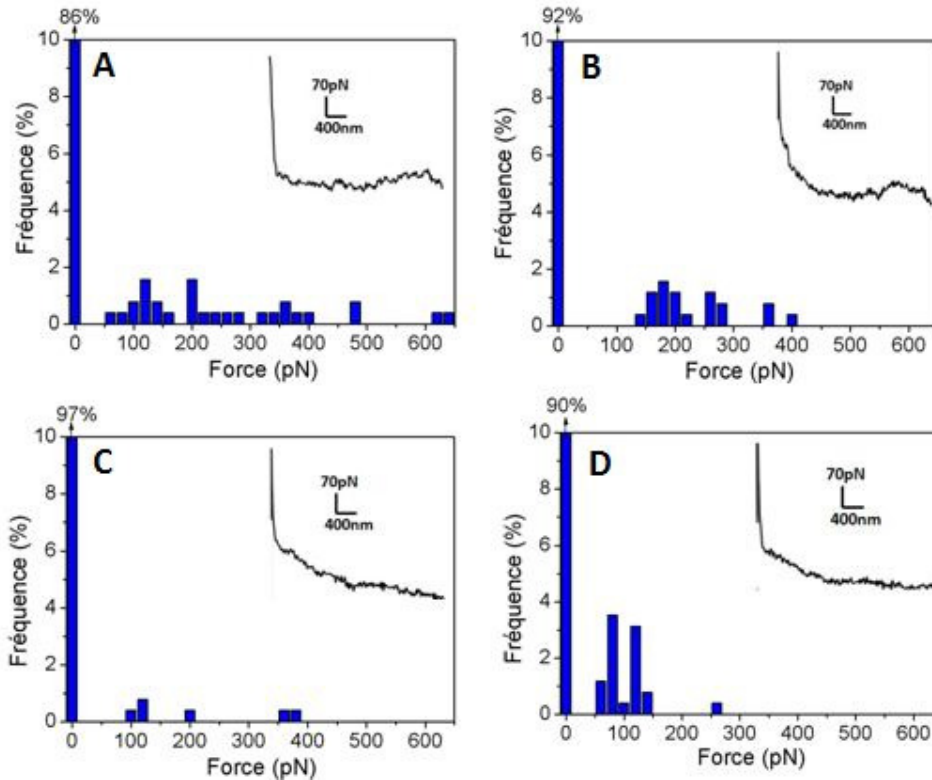


Figure 75. Histogrammes de distribution des forces d'adhésion enregistrées entre le mutant Q133K et les ligands HM ; (A) HM-1, (B) HM-2, (C) HM-3, (D) HM-7. Traitement des Forces-volumes, $n=256$ courbes, par *PUNIAS3D*.

Les histogrammes présentent une distribution aléatoire des forces. De plus, des fréquences de non adhésion élevées ont été constatées. Les courbes de retrait typiques, présentées dans la Figure 75, n'exposent pas de pics d'adhésion spécifique. La comparaison des résultats obtenus avec le mutant Q133K à ceux obtenus avec la souche WT-UTI89, présentés dans la Figure 73, atteste qu'aucune reconnaissance spécifique des ligands HM par le mutant n'est constatée. Ainsi, les résultats de la spectroscopie de force entre les ligands HM et le mutant Q133K permettent de confirmer la spécificité de la reconnaissance des ligands par l'adhésine FimH reportée dans le paragraphe 2.2.2.

2.3 Conclusions

Dans le deuxième axe du projet, nous nous sommes intéressés, en partenariat avec nos collaborateurs chimistes et microbiologistes, à l'étude d'une nouvelle classe de ligands multivalents synthétiques. Ces ligands proposent une éventuelle utilisation comme molécules thérapeutiques pour les UTIs.

Un ensemble de ligands, à base de mannosides d'heptyle (HM), a été étudié en interaction avec l'adhésine bactérienne purifiée (l'adhésine FimH). Afin de mettre au point l'expérience et de valider la reconnaissance des mannoses, nous avons eu recours à une lectine modèle commerciale. La lectine spécifique au mannose extraite de *Concanavalia ensiformis*, ConA, a été utilisée comme lectine modèle. L'étude par SMFS, menée sur la ConA, a permis de valider la reconnaissance des ligands et de mettre au point les conditions de l'expérience. Par la suite, la spectroscopie de force en mode SMFS et DFS, ont été investies dans l'étude de l'interaction de l'adhésine FimH purifiée avec les ligands HM. Les résultats de la SMFS ont révélé des forces variant entre 70 et 103 pN. Bien que dans la marge des forces reportées dans la littérature pour des interactions sucre-lectine, elles restent dans la plus forte gamme d'interaction. De plus, nous avons constaté que les forces enregistrées pour l'interaction FimH-ligands HM est beaucoup plus importante que celles enregistrées pour l'interaction ConA-HM. La conception rationnelle des ligands HM par nos collaborateurs, basée sur la structure tridimensionnelle du FimH et plus particulièrement sur la nature de la poche de reconnaissance, pourrait être à l'origine de la forte interaction des ligands HM à l'adhésine purifiée. La différence entre les forces enregistrées n'est pas significativement importante pour permettre de conclure quant à un effet de la valence sur l'interaction. L'étude par SMFS a été complétée par une étude en DFS. Cette dernière a permis, en explorant la dynamique de l'interaction, d'accéder à certains paramètres cinétiques et énergétiques. Bien qu'une légère dépendance des valeurs de x_{β} à la valence soit constatée, les valeurs de k_{off} enregistrées ne soulignent pas d'influence significative de la valence sur la reconnaissance FimH-HM. Ceci est en accord avec l'observation précédente relative à l'absence d'influence de la valence sur la force d'interaction. Nos conclusions sont également en concordance avec les résultats des expériences SPR menées par nos collaborateurs sur les ligands HM. La nature monomérique et monovalente du FimH, mise en cause pour expliquer les résultats, ne permettrait pas d'évaluer l'effet de la multivalence des ligands.

Dans une seconde étape, l'interaction des ligands synthétiques à HM avec des bactéries UPEC a été étudiée. L'AFM a été exploitée, dans cette partie du projet, de deux manières. Dans un premier temps, les bactéries ont été incubées avec les différents ligands

puis imagées à l'air par AFM. Dans une seconde étape, l'interaction, entre les bactéries et les ligands de différentes valences, a été investie par spectroscopie de force.

L'imagerie AFM à l'air a permis la visualisation directe de l'effet de la multivalence des ligands sur l'agrégation des bactéries de la souche WT-UTI89. En effet, nous avons observé qu'en présence des ligands HM, di, tri et heptavalent, les bactéries se regroupaient en agrégats. Contrairement, l'ajout du ligand monovalent ne semble pas avoir d'influence sur l'état des bactéries. L'incubation des ligands HM avec la souche mutante Q133K a confirmé l'effet de la valence. Une étude statistique menée sur ces images a mis en évidence une dépendance entre la taille des agrégats et la valence du ligand. En effet, nous avons constaté que les agrégats les plus importants, en taille et en nombre, sont exclusivement obtenus avec le ligand trivalent et, à un degré six fois plus important, avec le ligand heptavalent. Par ailleurs, l'imagerie AFM à petite échelle a permis de constater un entassement des *pili* dans les zones de jonction entre bactéries. De plus, une interconnexion des *pili*, d'une même bactérie et parfois de bactéries voisines, a été constatée. Enfin, la structure hélicoïdale des *pili* de type I a pu être visualisée.

La spectroscopie de force a également été investie dans cette partie du projet afin d'évaluer et de quantifier l'interaction entre les bactéries WT-UTI89 et les ligands HM de différentes valences. Des forces d'adhésion, entre le FimH à l'extrémité des *pili* et les ligands HM, comprises entre 66 et 268 pN ont été enregistrées. Ces forces sont supérieures à celles obtenues pour l'interaction des mêmes ligands HM avec l'adhésine FimH purifiée. Ce constat confirme le rôle de la structure complexe du *pilus* dans l'adhésion aux surfaces mannosylées. Par ailleurs, un effet de la valence a été constaté. En effet, les forces d'adhésion du FimH, à l'extrémité des *pili*, aux ligands HM mono, di et trivalent augmentent d'un facteur de 1,5. Ainsi, nous avons enregistré des forces de 98 ± 16 , 153 ± 34 et 268 ± 47 pN pour les ligands HM mono, di et trivalent, respectivement. Cependant, une force de 66 ± 26 pN a été obtenue pour l'interaction entre le ligand HM-7 et le FimH. Nos résultats sont en parfaite concordance avec ceux retrouvés par nos collaborateurs qui ont remarqué les mêmes variations d'affinité en étudiant l'interaction entre le FimH et les ligands HM par ITC. Dans l'étude de l'interaction par spectroscopie de force nous avons vérifié la distance à laquelle sont obtenus les pics d'adhésion. Cela nous a permis de confirmer la présence des FimH à l'extrémité des *pili* et de contrôler leur état. Les résultats ont montré que la majorité des pics

d'adhésion est obtenue à une distance de 1,2 à 2 μm . La distance est parfaitement en accord avec la présence du FimH à l'extrémité des *pili* (structures protéiques de 1 à 2 μm). Enfin, les expériences de blocages, par ajout de mannose libre, ainsi que la spectroscopie de force sur le mutant Q133K ont permis de confirmer la spécificité de la reconnaissance entre les ligands HM et l'adhésine FimH étudiée.

DISCUSSION

Les reconnaissances moléculaires spécifiques, particulièrement les interactions sucre-lectine, se trouvent à la base de nombreux processus biologiques. L'ubiquité des lectines et l'abondance des sucres dans la quasi-totalité des organismes vivants ^{[1], [2]} renseignent sur l'importance des rôles, que peuvent jouer ces molécules, dans les phénomènes biologiques ayant lieu dans un organisme.

Dans les organismes vivants, l'interaction entre une lectine et son sucre spécifique se caractérise par une faible intensité ^[3]. Cette affinité est représentée par des constantes d'affinité de l'ordre du micro au millimolaire ^[4]. La faiblesse de l'interaction unique sucre-lectine, ne permettant pas de générer un signal, est compensée par la multivalence ^[5]. La multivalence permet non seulement d'intensifier mais aussi de moduler la réponse du signal généré ^[10].

Dès lors, le mime de la multivalence naturelle, par la synthèse chimique de ligands multivalents, semble représenter une approche prometteuse pour la compréhension de certains processus biologiques. Cette approche présente, également, un grand intérêt dans le développement de stratégies de diagnostic et/ou de lutte contre les maladies impliquant des interactions sucre-lectine ^[6]. Dans ce contexte, notre projet porte sur l'étude de l'effet de la multivalence de ligands synthétiques multivalents à base de résidus saccharidiques en interaction avec leurs lectines spécifiques. Deux lots de ligands synthétiques ont été étudiés. Un premier lot de ligands à base de galactose (Gal-L), différent par la longueur et la valence, a été étudié en interaction avec une lectine modèle. La lectine utilisée dans cette étude est la lectine d'arachide, PNA, qui est tétravalente et spécifique au galactose. Le deuxième lot de ligands synthétiques, dont la structure de la charpente est similaire à celle des ligands du premier lot, porte des résidus de mannosides d'heptyle (HM). Les ligands HM, de différentes valences, font l'objet d'une étude appliquée à la recherche de nouvelles molécules thérapeutiques aux infections du tractus urinaire (UTIs).

Le microscope à force atomique (AFM), devenu depuis quelques années l'outil de référence pour l'imagerie et la caractérisation de matériaux à très petite échelle ^[8], a été exploité, dans notre étude des reconnaissances spécifiques sucre-lectine, en imagerie et en spectroscopie de force.

Chapitre 1 : Exploration de l'interaction entre la PNA et les ligands à galactose

Les résultats obtenus par imagerie AFM et spectroscopie de force nous ont permis d'analyser le comportement multivalent des ligands Gal-L en interaction avec la PNA. La reconnaissance moléculaire spécifique PNA-Gal-L, l'influence de la multivalence sur cette reconnaissance ainsi que son mécanisme fondamental ont été mis en évidence.

1.1 Reconnaissance moléculaire spécifique entre la PNA et le galactose

L'effet de la multivalence sur l'interaction entre les ligands Gal-L de différentes valences et la PNA a, d'abord, été visualisé par imagerie AFM à l'air. Pour ce faire, des surfaces de mica ont été préparées selon le protocole établi par Gour et Verma ^[167]. Des réseaux de molécules de PNA, interconnectées via les ligands longs di et trivalents, ont été observés sur les images AFM à l'air. Dans leur étude, Gour et Verma ont étudié par imagerie AFM l'effet de la multivalence de ligands mannosylés sur l'interaction avec la lectine ConA spécifique au mannose. Dans la Figure 38 (*cf.* chapitre 4, contexte bibliographique), sont présentées des images AFM ainsi que des modèles proposés par Gour et Verma pour illustrer les réseaux de ConA obtenus. La PNA et la ConA étant deux lectines très proches de point de vue structurel, il n'est point surprenant d'obtenir des réseaux similaires dans les deux études. En effet, les images AFM présentées dans la Figure 38 et la Figure 47 montrent respectivement des réseaux de ConA et de PNA similaires de points de vue réticulation et maillage. Des agrandissements, sur nos images (Figure 76 A et B), permettent de visualiser des réseaux de molécules de PNA entre elles via les ligands multivalents. Des représentations schématiques (Figure 76 C et D) accompagnent les images AFM pour illustrer les réseaux entre molécules de PNA formés via les ligands. La formation de tels réseaux a été reportée par Brewer et *al.* ^[21]. Elle est relative à un mode d'association agrégatif. Ce mode relève des mécanismes intermoléculaires pouvant avoir lieu entre lectines multivalentes et ligands multivalents. À une valence plus importante du ligand, les réseaux gagnent en complexité. Ainsi, le maillage devient plus petit et la réticulation plus

importante. Ceci pourrait expliquer la différence entre les réseaux de PNA réticulés aux ligands divalents par rapport à ceux obtenus sous l'effet des ligands trivalents. Cependant, dans les deux cas de figures, la réticulation n'est pas linéaire (de type I) mais complexe (réseau de type II à deux ou trois dimensions). À *contrario* des réseaux linéaires (généralement solubles), les réseaux complexes de type II sont généralement insolubles et conduisent à une précipitation irréversible.

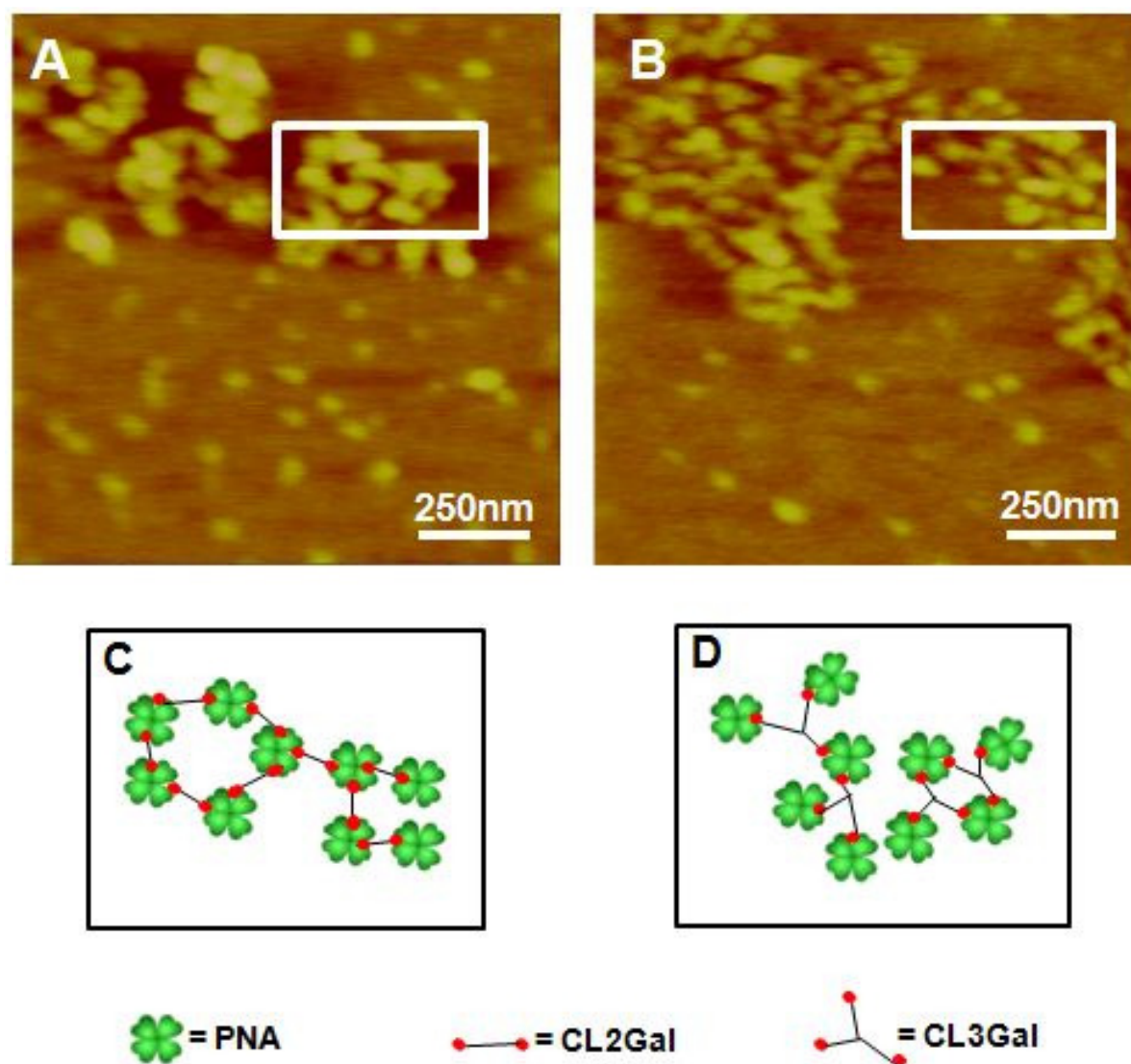


Figure 76. Effet de l'ajout des Gal-L di et trivalent à une solution de PNA. PNA 4,5 μM dans PBS pH 7,2, Ligands 100 μM dans PBS pH 7,2, milieu réactionnel PBS pH 7,2 + CaCl_2 0,5 mM + MnCl_2 0,5 mM. Images AFM à l'air ($z = 7$ nm, vitesse de scan = 2 Hz, nombre de pixels = 512×512); (A) PNA+ligand CL2Gal, (B) PNA+ligand CL3Gal, (C) représentation schématique du réseau PNA+CL2Gal et (D) représentation schématique du réseau PNA+CL3Gal.

La visualisation de l'effet de la multivalence, par imagerie AFM, a fourni des informations de grand intérêt pour la compréhension du mode d'association des lectines et

ligands multivalents en solution. Cependant, elle ne peut pas fournir les informations, relatives à la reconnaissance intramoléculaire, en matière de force et d'affinité. La spectroscopie de force permet d'accéder à ces informations. Ainsi, elle permet d'analyser l'influence de la multivalence sur la reconnaissance moléculaire spécifique sur ses bases physiques.

Dans notre étude deux paramètres ont fait objet d'une analyse. Le premier paramètre analysé est la valence des épitopes galactoses présents sur chaque ligand. Nos partenaires ont synthétisé des ligands, de différentes valences allant de 1 à 3 galactoses par ligand. Un renforcement de l'interaction serait à envisager en augmentant la valence. Contrairement à ce qui a été envisagé dans notre étude de l'influence de la multivalence, une diminution de la force d'interaction a été notée. À titre d'exemple, l'interaction de la PNA avec les ligands trivalents expose une diminution de la force, allant de 22 à 39%, par rapport à son interaction avec les ligands monovalents. Le deuxième paramètre, investi dans notre étude, est la longueur du ligand. Lors de la conception du ligand, nos partenaires ont fait varier la longueur du bras espaceur reliant le galactose à la charpente saccharidique. Ainsi, ils nous ont fourni des ligands courts, moyens et longs. Intuitivement, on pense que l'interaction, entre une lectine multivalente et son ligand spécifique multivalent, est maximale lorsque la longueur de l'espaceur permet une liaison simultanée sur plusieurs sites de reconnaissance, particulièrement, dans une association intramoléculaire selon le mode chélate ^[4]. Cependant, la longueur, l'espacement et la mobilité, des épitopes d'un ligand multivalent, peuvent représenter, à la fois, un avantage et un inconvénient. En effet, la longueur optimale est très difficile à trouver. En deçà de cette longueur, la multivalence ne permet pas un effet chélate, engendre une contrainte stérique et défavorise l'interaction sucre-lectine. Au-delà de cette longueur, la multivalence peut être bénéfique à l'interaction en permettant la fixation des épitopes sur plusieurs sites de la lectine. Cependant, en raison de facteurs entropiques, générés par la forte mobilité des ligands longs, la force d'interaction est susceptible de diminuer ^[6]. Dans notre étude de l'interaction PNA-ligands Gal-L, aucune influence de la longueur des ligands monovalents n'a été constatée. Une explication possible de ce résultat repose sur les études de nos partenaires. En effet, dans leur étude de l'interaction entre une lectine monovalente, la galectine, avec des multilactosides synthétiques à différentes longueurs, nos partenaires ont reporté que l'influence de la

longueur, sur la reconnaissance, n'est pas notable ^[6]. Ils ont, ainsi, démontré que, lorsque l'interaction se déroule sur une lectine monovalente, la longueur des ligands multivalents n'entre pas en compte dans le processus de reconnaissance ^{[4],[6]}. Par analogie, la longueur des ligands monovalents n'aurait pas d'influence sur l'interaction avec une lectine multivalente. Cependant, nous avons noté, dans le cas des ligands multivalents, un effet de la longueur des ligands sur l'intensité reconnaissance. Dans le cas particulier de l'interaction de la PNA avec les ligands divalents de différentes longueurs, la force augmente. Les forces obtenues dans ce cas sont, respectivement, de 49 ± 22 , 56 ± 32 et 64 ± 30 pN pour les ligands divalents courts, moyens et longs. La diminution de la force enregistrée entre la PNA et le ligand court divalent, en comparaison avec la force obtenue pour son homologue monovalent, serait due à un encombrement stérique autour du site de reconnaissance. En effet la présence d'un second galactose, et sa proximité du premier galactose pourrait créer un encombrement. Le rallongement des bras espaceurs, qui portent les deux galactoses, permet une plus grande liberté. Ainsi, l'encombrement est de plus en plus faible lorsque la liberté de mouvement est accentuée. Il en résulte une augmentation de la force d'interaction. Par ailleurs, une tendance contradictoire est obtenue avec les ligands trivalents. En effet, dans le cas particulier de l'interaction de la PNA avec les ligands trivalents, une baisse de l'intensité de l'interaction est constatée sous l'effet de la longueur. La diminution de la force enregistrée entre la PNA et le ligand court trivalent (47 ± 26 pN), en comparaison avec son homologue monovalent (62 ± 21 pN), serait, également, due à une contrainte stérique. Contrairement aux ligands divalents, une longueur plus importante de l'espaceur n'améliore pas la force. En effet, la force diminue encore plus fortement avec le rallongement de l'espaceur. Une explication possible de ce comportement serait reliée à la forte mobilité des ligands longs et à l'augmentation du coût entropique. Ceci aurait pour conséquence de diminuer la force d'interaction. Une deuxième hypothèse, exclusive aux ligands trivalents moyens et longs, est rapportée au possible enchevêtrement des bras espaceurs en pelote en confinant les galactoses à l'intérieur et empêchant leur accès aux sites de reconnaissance de la PNA. Ce qui a pour conséquence d'affaiblir la force d'interaction et de diminuer la fréquence des événements d'adhésion. Au regard du choix de bras espaceurs en oligoéthylène glycol ne réagissant pas entre eux, cette hypothèse est néanmoins peu probable. Bien qu'ils ne réagissent pas entre eux, il demeure possible que les

bras espaceurs s'enroulent en hélice. Ainsi, la mobilité des résidus galactoses est réduite, ce qui résulte en une augmentation des contraintes stériques et une diminution de la force d'interaction PNA-ligand. Une proposition pour éviter l'enroulement des bras espaceurs serait de choisir des bras qui n'interagissent pas entre eux mais aussi qui se repoussent lorsqu'ils sont très proches.

L'étude par spectroscopie de force à un taux de chargement fixe nous a, ainsi, fourni des informations à propos de l'intensité de l'interaction et de l'effet de la valence et la longueur des ligands sur cette interaction. Cependant, elle ne permet pas d'accéder à la dynamique et au mode de la reconnaissance. Ces derniers ont été analysés, dans notre étude, par DFS (Dynamic Force Spectroscopy).

1.2 Mécanisme de reconnaissance des ligands multivalents par la PNA

La dynamique de l'interaction, PNA-ligands Gal-L, a été analysée en DFS. Cette étude nous a fourni des informations sur la variation de la cinétique de l'interaction sous l'effet de la structure des ligands. L'influence de la longueur et la valence du ligand sur la distance de barrière énergétique x_β et la constante cinétique de dissociation k_{off} a particulièrement été évaluée.

Une augmentation de la distance de la barrière énergétique en fonction de la valence a été notée. Une augmentation de la valeur de x_β reflète une dissociation, du complexe PNA-galactose, ayant lieu à une distance plus élevée. Ceci implique une contribution énergétique ($-F \times x_\beta$) plus importante, investie lors de la rupture du complexe PNA-galactose, pour les ligands multivalents. En effet, la présence d'un nombre plus élevée de résidus galactoses autour de la PNA renforcerait l'installation du galactose dans le site de reconnaissance.

Ce constat est soutenu par la diminution, notée pour les ligands multivalents, de la constante k_{off} . La durée de vie de la liaison PNA-galactose est déduite de la valeur de k_{off} ($\tau_{off} = 1/k_{off}$). La durée de vie déduite est significativement affectée par la multivalence des ligands Gal-L. En effet, une augmentation de τ_{off} , d'environ 12 à 43 fois, est constatée pour l'interaction PNA-ligands multivalents par rapport à l'interaction PNA-ligands monovalents. L'augmentation de la durée de vie du complexe, soumis à une force, témoigne d'une plus grande stabilité. Un changement dans la durée de vie d'une liaison sous l'effet de la

multivalence a déjà été reporté dans la littérature ^[243]. En effet, Sulchek et *al.* ont pu affirmer que, lors d'une interaction entre paires moléculaires, l'accroissement du nombre de liaisons de nature similaire, sous l'effet d'une multivalence, engendre inéluctablement une augmentation de la durée de vie de l'interaction ^[243].

Des travaux antérieurs menés chez nos collaborateurs par ELLA et DLS ont, également, démontré un effet positif de la valence sur l'affinité PNA-ligands Gal-L ^[261]. L'amélioration de l'affinité dans leur étude a été expliquée par un effet agrégatif. Cependant, l'obtention d'agrégats demeure exclusive aux interactions ayant lieu en solution. En spectroscopie de force, le système est fixe. La formation d'agrégats n'est, donc, pas possible. De ce fait, l'explication de l'augmentation de la durée de vie et de la distance de la barrière énergétique ne peut se baser sur un effet agrégatif. En conséquence, l'hypothèse d'un mécanisme d'association multivalente intermoléculaire n'est pas envisageable.

La longueur des bras espaceurs courts ne permet pas la reconnaissance de deux galactoses du même ligand par deux sites de reconnaissance de la même protéine PNA. En conséquence, la formation simultanée de liaisons reste très peu probable et une association intramoléculaire par effet chélate n'est pas à envisager. Ce postulat est appuyé par l'étroite distribution des forces sur l'ensemble des histogrammes de la Figure 53 où on note une force correspondant à la formation d'un unique complexe PNA-galactose. Au regard de la chimie de fonctionnalisation des surfaces d'or par la PNA, un regroupement de récepteur suite à une diffusion bidimensionnelle sur la surface n'est pas, non plus, envisageable. En effet, maintenues sur la surface par des liaisons covalentes fortes, les molécules de PNA ne peuvent pas diffuser. Par ailleurs, de par la chimie de synthèse des ligands multivalents, la possibilité de stabilisation du complexe PNA-ligands, par une interaction secondaire non spécifique, a été éliminée. En se basant sur ces constats, l'augmentation de la durée de vie de la liaison sous l'effet de la multivalence résulte d'une concentration locale élevée de galactose autour du site de reconnaissance de la PNA. Cette proposition supporte un mode d'association intramoléculaire par fixation et recapture (un mode courant pour les ligands à faible valence) présenté dans la Figure 77.



Figure 77. Mécanisme de fixation et recapture proposé par Almant et *al.* [261].

Chapitre 2 : Exploration de l'interaction entre le FimH et les ligands à α -D-mannoside d'heptyle (HM)

Dans le cadre d'un projet portant sur la recherche de nouvelles molécules thérapeutiques basée sur une approche antiadhésive, nous avons étudié par AFM, de nouveaux ligands glycosylés, spécifiques aux lectines d'*Escherichia coli* uropathogène (UPEC). L'adhésine FimH (lectine d'UPEC) est engagée lors de l'interaction des bactéries avec les cellules saines. En effet, les adhésines FimH se fixent aux résidus mannosylés des uroplakines. Ainsi, elles représentent le premier facteur mis en œuvre par la bactérie dans l'infection. La reconnaissance spécifique, entre l'adhésine FimH et les résidus mannosylés, a été exploitée afin de développer de nouvelles molécules qui inhibent l'adhésion des bactéries aux cellules saines. Nos partenaires ont synthétisé un lot de ligands, à base de mannoside d'heptyle (HM), de valences différentes (1, 2, 3 et 7 HM). Nous avons analysé, par AFM, l'interaction entre les ligands HM de différentes valences et l'adhésine FimH (purifiée et sur bactéries). Les résultats obtenus nous ont permis d'analyser le comportement multivalent des ligands HM en interaction avec les deux types de FimH (purifiés et sur bactéries). Ils nous ont aussi permis de mettre en évidence l'importance de la structure protéique complexe sur laquelle se trouve le FimH, le *pilus* de type I. Enfin, la vérification, à une échelle moléculaire, de l'efficacité de l'approche antiadhésive, utilisant les ligands HM multivalents, a pu être mise en évidence.

1.1 Reconnaissance moléculaire spécifique entre HM et FimH

La reconnaissance spécifique, entre les ligands HM et l'adhésine FimH, a été investie par spectroscopie de force. Dans un premier temps, l'étude a été menée sur l'adhésine FimH purifiée que nous avons greffée, par liaison covalente, sur une surface d'or. Les résultats ont attribué des forces d'interaction, entre les FimH purifiées et les ligands HM, variant de 70 ± 44 à 103 ± 46 pN. Bien qu'une légère augmentation de la force pour les ligands di et trivalents soit constatée, elle demeure faible pour permettre d'annoncer un effet significatif de la multivalence sur l'interaction. Les forces d'interaction enregistrées, entre le FimH

purifié et les différents ligands HM, sont plus élevées que celles obtenues pour les autres interactions que nous avons étudiées (PNA-Gal-L et ConA-HM). Elles sont, également, supérieures à celles retrouvées dans la littérature, par exemple, l'interaction ConA-mannose [156], [193], [254], [271] et l'interaction RCA₁₂₀-ASF(Gal) [255]. Compte tenu de la conception rationnelle des ligands, la force d'interaction élevée, entre les résidus HM à l'adhésine FimH, serait à envisager. En effet, la conception des ligands s'est basée sur des études antérieures menées par nos partenaires. Dans une étude de l'interaction de différents monosaccharides et alkyl-mannosides (de différentes longueurs de chaînes aliphatiques), Bouckaert *et al.* ont reporté une énergie de liaison inversement proportionnelle à la longueur de la chaîne alkyle [69]. Le résidu α -D-mannoside d'heptyle (HM), composé breveté, a exposé une grande affinité vis-à-vis du FimH [69]. La reconnaissance des mannoses par le FimH a lieu dans une poche tyrosine. Au vu de sa nature aromatique, la tyrosine est un acide aminé hydrophobe. D'autre part, grâce à son hydrophobicité, l'aglycone alkyle s'intègre bien dans la poche tyrosine. Bien que son intégration soit non spécifique, elle permet d'augmenter, de 100 à 1000 fois plus, l'affinité du FimH envers le mannose [69]. L'augmentation de l'affinité résulte de l'augmentation de la surface de contact hydrophobe entre la poche tyrosine et l'aglycone alkyle. Ces constatations permettent d'expliquer les intensités d'interaction, relativement fortes, enregistrées dans notre étude entre FimH et ligands HM.

L'influence de la multivalence sur la dynamique de l'interaction FimH-HM a également été investie par DFS. Dans cette étude, nous avons enregistré des valeurs de distances de la barrière énergétique x_β entre 0,118 et 0,203 nm. Nous n'avons pas noté d'influence significative de la valence sur les valeurs de x_β . En conséquence, pour les ligands HM de différentes valences, les apports énergétiques, nécessaires pour rompre la liaison entre le FimH et le HM sous l'effet d'une force externe F , sont proches. Également, nous n'avons pas noté d'influence de la valence sur les valeurs des constantes cinétiques de dissociation k_{off} . De très faibles temps de vie (τ_{off}) des liaisons FimH-HM ont été déduits des valeurs de k_{off} . Bien qu'en se liant fortement à l'FimH, le ligand est vite relâché de la poche tyrosine. L'absence d'influence de la multivalence sur l'interaction FimH-ligands HM a également été reportée par nos collaborateurs suite à l'étude, par SPR, de l'interaction entre le FimH fixé sur une surface en or et les ligands HM de différentes valences en solution [4]. Cette absence d'influence de la multivalence sur l'interaction avec le FimH résulte de la nature

monomérique de l'adhésine étudiée. En effet, l'adhésine FimH étant monomérique, elle ne peut fixer qu'un seul résidu HM à la fois. Ainsi, un mode d'association intramoléculaire, par effet chélate, n'est pas envisageable. De plus, en SMFS (le ligand fixé à la pointe et l'adhésine FimH fixée à la surface d'or) ainsi qu'en SPR (le ligand en flux de solution et l'adhésine FimH fixée à la surface d'or), un mode d'association intermoléculaire (effet agrégatif) n'est pas non plus à envisager.

Dans une deuxième partie de l'étude des ligands HM, nous nous sommes intéressés à l'interaction de ces ligands avec l'adhésine FimH dans son environnement d'origine. Nous avons donc étudié, par spectroscopie de force, l'adhésine FimH sur les bactéries UPEC. L'adhésine FimH est exprimée, par les bactéries, à l'extrémité d'une structure protéique complexe, le *pilus* de type I. Les *pili* de type I sont des structures fibrillaires de 1 à 2 μm de longueur. Ils sont présents en très grand nombre à la surface des bactéries ^[55]. Grâce à l'adhésine FimH exprimée à leurs extrémités, les *pili* de type I sont responsables de l'adhésion des bactéries aux cellules saines et de l'infection de ces dernières ^[58]. Dans les expériences de spectroscopie de force, le ligand fixé sur la pointe AFM se lie à une adhésine FimH à l'extrémité d'un *pilus* de type I d'UPEC fixée sur la surface de mica. Au retrait de la pointe, le pic de rupture de l'adhésion a lieu à une distance correspondant à la longueur du *pilus* de type I. Dans notre étude, la distance moyenne de rupture de l'adhésion a lieu entre 1,2 et 1,99 μm , ce qui correspond à la longueur des *pili* de type I de la bactérie étudiée ^[55], ^[273].

Les forces d'adhésion, enregistrées entre les différents ligands HM et les adhésines FimH à l'extrémité des *pili* de type I, varient entre 66 ± 26 et 268 ± 47 pN. À l'exception du ligand HM-7, les forces obtenues sont supérieures à celles obtenues pour l'interaction des ligands HM avec le FimH purifié. Ce résultat met en avant l'importance d'étudier l'interaction des ligands avec le FimH considéré dans son environnement originel. Il souligne également le rôle des *pili* de type I dans la résistance à la traction mécanique ^[65]. En effet, outre son rôle structural, la composition des *pili* de type I joue un rôle fonctionnel, en augmentant la force d'attachement du FimH aux résidus mannosylés de l'uro-épithélium, lors de l'exercice d'une force externe. Sous une traction mécanique, la piline et l'adhésine FimH se séparent l'une de l'autre. Ceci engendre un changement conformationnel de

l'adhésine qui s'enferme plus fortement sur le ligand (Figure 18)^{[64], [65]}. Cette augmentation, de la force d'attachement, a été rapportée à la formation entre le FimH et le ligand de « catch bonds »^{[63] [64]}. Ainsi, lors d'une infection à UPEC, les *pili* de type I garantissent, dans le tractus urinaire, une résistance au flux d'urine en s'accrochant plus fortement aux uroplakines hautement mannosylées de l'uro-épithélium. En conséquence, les forces enregistrées entre les ligands HM et le FimH à l'extrémité des *pili*, sont naturellement plus importantes que celles mesurées sur FimH purifié et exclu de sa structure originelle.

D'autre part, un effet de la valence sur la force d'adhésion, des ligands HM mono, di et trivalent à l'adhésine FimH à l'extrémité des *pili* de type I, a été constaté. La force augmente, d'un facteur de 1,5, entre les ligands mono, di et trivalent. Cependant, la force enregistrée avec le ligand HM-7, s'est avérée être la plus faible. Cette même évolution en cloche, de la force en fonction de la valence, a été publiée par nos partenaires pour l'étude de l'affinité entre les ligands HM et le FimH par ITC^[75]. Dans leur étude, nos partenaires ont évoqué une amélioration de l'affinité avec l'augmentation de la valence, en passant du ligand HM-1 au ligand HM-3. Une baisse importante de l'affinité a été enregistrée pour l'HM-7. De par la nature monovalente de l'FimH, la multivalence est assurée, dans ce cas, par un effet de densité de surface. En effet, la présence du FimH en nombreuses copies à la surface de la bactérie provoque un phénomène de multivalence via des associations intramoléculaires selon le mode chélate. Ainsi, plusieurs résidus HM, sur la pointe, peuvent se fixer, simultanément, à plusieurs FimH sur la bactérie. Ceci est confirmé par la fréquence des pics multiples observés sur les courbes de retraits, enregistrées entre les ligands HM et la bactérie. Dans ce cas d'étude, la spectroscopie de force offre un grand avantage par rapport à l'ITC. En effet, en spectroscopie de force la formation de liaisons simultanées entre plusieurs HM et plusieurs FimH ne peut pas générer d'agrégats insolubles. Alors qu'en ITC, la formation d'agrégats pourrait générer des cristaux irréversibles qui précipitent dans la cellule de mesure et faussent les résultats.

Par ailleurs, une hypothèse possible pour expliquer la faible force enregistrée pour le ligand HM-7 tient compte du nombre de résidus HM présent dans le volume effectif de l'interaction. En effet, la présence de sept résidus reconnaissables par les FimH au bout des

pili pourrait engendrer un encombrement de plusieurs complexes FimH-HM et perturber la fixation de l'HM dans la poche de reconnaissance.

1.2 Potentiel thérapeutique des ligands multivalents à HM

Dans une autre approche, plus visuelle, l'effet de la multivalence des ligands HM a été investi par imagerie AFM. La nature monovalente du FimH rend inutile l'investigation, par imagerie AFM, de l'effet de la multivalence AFM sur l'adhésine purifiée. Car dans ce cas aucun effet visible n'est à envisager. Cependant, il apparaît très intéressant de voir l'effet agrégeant des ligands HM sur les bactéries.

La présence d'un nombre très important de *pili* de type I munis d'autant d'adhésine FimH, à la surface des bactéries UPEC, renforce leur adhésion aux cellules saines et facilite la formation de biofilms^[51]. L'approche antiadhésive représente une stratégie intéressante pour bloquer l'adhésion aux cellules et la formation de biofilms qui s'ensuit^{[44], [51], [66], [77]}^[256]. Basée sur la fixation de ligands exogènes sur l'adhésine FimH à l'extrémité des *pili* de type I, l'approche antiadhésive bloque l'accès des bactéries aux résidus mannosylés à la surface des cellules uroépithéliales^{[51], [77]}. Un prérequis pour la réussite de la stratégie antiadhésive serait une affinité plus élevée du FimH vis-à-vis des ligands exogènes par rapport à son affinité pour les résidus mannosylés de l'uroépithélium^[69]. Dans ce contexte, nos partenaires ont mis en évidence une affinité, vis-à-vis du FimH, 460 fois plus élevée d'un alkyle mannoside à sept carbonés, le mannoside d'heptyle (HM)^[69]. Pour ces raisons, le HM représente un excellent candidat dans la recherche de molécules thérapeutiques innovantes pour le traitement des infections urinaires dues à *E. coli*. D'autre part, la multivalence représente une alternative pour intensifier le potentiel thérapeutique de ces ligands. La multivalence, mimant les interactions ayant lieu dans l'organisme, est généralement obtenue par synthèse chimique^[74]. La conception de ligands, de différentes valences, à bases de résidus HM a donc été effectuée par nos partenaires chimistes^{[73], [75]}. 1, 2, 3 ou 7 résidus HM ont été fixés sur une charpente saccharidique. Au regard de cette conception prometteuse, nous nous sommes proposés d'évaluer l'aptitude de ces molécules synthétiques multivalentes à agréger les bactéries. Ceci aurait pour conséquence d'inhiber leur adhésion et la formation de biofilms dans le tractus urinaire.

L'évaluation de l'effet agrégeant des nouveaux ligands HM peut s'opérer de plusieurs manières. Nos partenaires ont opté pour une évaluation indirecte, par inhibition de l'hémagglutination (HIA), ou une visualisation directe de l'effet agrégeant du ligand HM-3, marqué à la fluorescéine, en microscopie confocale ^[75]. Notre approche, plus directe et plus résolutive, consiste en une visualisation de l'effet de la multivalence sur l'agrégation des bactéries par imagerie AFM à l'air. Les échantillons analysés par AFM sont plus faciles à préparer et ne nécessitent pas de marquage préalable des ligands.

Les images AFM des bactéries, incubées sans et avec les différents ligands HM, ont révélé une agrégation des bactéries en présence des multimannosides. En effet, contrairement au ligand HM-1, la présence des ligands multivalents provoque le regroupement des bactéries en amas. Afin d'éliminer toute agrégation spontanée, la densité de surface en bactéries a été optimisée. De plus, un contrôle négatif, utilisant la souche mutante de la bactérie (souche Q133K), a été réalisé. Les résidus HM des ligands multivalents se fixent, simultanément, sur les FimH à l'extrémité des *pili* des bactéries WT-UTI89. Cela provoque l'association des bactéries et l'apparition de boursouffures visualisées dans les zones de jonction. De plus, l'interaction multivalente pourrait s'opérer sur les FimH à l'extrémité des *pili* d'une même bactérie. Dans ce cas, une interconnexion entre *pili* d'une même bactérie serait observée. L'étude statistique que nous avons menée sur ces images confirme une efficacité accrue à l'agrégation des bactéries pour les ligands tri et heptavalents. Nos résultats confortent les résultats obtenus en test HIA par nos partenaires ^{[4], [75]}. Dans leur étude, ils ont remarqué que le ligand HM-1 possède une affinité similaire à celle du mannoside d'heptyle de référence. Le ligand divalent HM-2 est 8 fois (4 fois par mannoside), le ligand trivalent HM-3 est 16 fois (5,3 fois par mannoside) et le ligand HM-7 est 64 fois (9,1 par mannoside), meilleur inhibiteur que le composé monovalent de référence. La possibilité de former des agrégats sous l'effet d'un ligand multivalent a également été reportée par nos partenaires qui ont observé, en microscopie confocale, le comportement des bactéries en absence et en présence du ligand trivalent marqué à la fluorescéine ^[75]. Ils ont reporté qu'en absence de ligands, les bactéries se dispersent de façon homogène dans la solution tampon. L'ajout du ligand trivalent marqué provoque le regroupement des bactéries et une luminescence verte est localisée au sein de l'agrégat bactérien. Ainsi, un mode d'association intermoléculaire agrégatif s'opère lors de

l'interaction, simultanée, des résidus HM d'un ligand multivalent avec les nombreuses copies de FimH à la surface de la bactérie.

Les multimannosides peuvent constituer des outils efficaces pour la capture, l'agrégation et l'inhibition de l'adhésion des bactéries aux cellules saines lors d'une infection urinaire. Les résultats de l'imagerie AFM sont cohérents avec ceux obtenus en spectroscopie de force sur bactéries pour les ligands HM-1, HM-2 et HM-3. Cependant, le ligand HM-7 pose une contradiction. En fait, en spectroscopie de force il présente la force la plus faible alors qu'en imagerie AFM il présente le pouvoir agrégeant le plus important. Dès lors, l'appréciation du potentiel thérapeutique, des multimannosides étudiés, résulte d'un compromis entre la force d'adhésion et le potentiel agrégeant. Dans ce sens, le ligand HM-3, doté d'un pouvoir agrégeant raisonnable et présentant la plus forte force d'adhésion aux bactéries avec 268 ± 47 pN, pourrait être le mieux adapté pour une éventuelle utilisation comme molécule thérapeutique dans une stratégie antiadhésive.

*CONCLUSIONS ET
PERSPECTIVES*

Durant ces trois années de thèse, nous avons investi la microscopie à force atomique dans l'étude des phénomènes de reconnaissance spécifique, et plus particulièrement, les interactions sucre-lectine. Au regard de leur abondance et de l'importance des rôles qu'elles jouent dans la plupart des organismes vivants ^{[1], [2]}, les interactions sucre-lectine représentent un objet d'étude captivant. Dans la nature, l'affinité d'une lectine pour un sucre est faible ^{[3], [4]}. Cette faiblesse est compensée par la multivalence ^[5]. Ainsi, la compréhension des interactions sucre-lectine nécessite une analyse des phénomènes de multivalence. Nous nous sommes, donc, intéressés à l'étude de l'effet de la multivalence sur ces interactions. Dans ce cadre, la synthèse chimique nous a offert la possibilité de concevoir des ligands multivalents qui répondent au besoin de l'étude. Nos partenaires chimistes, Dr. Gouin et Dr. Almant, de l'unité CEISAM UMR-CNRS 6230 ont synthétisé des lots de ligands de différentes spécificités. Nous avons comme objectif d'étudier, par AFM en imagerie et spectroscopie de force, l'interaction des nouveaux ligands avec leurs lectines spécifiques respectives.

Dans une première démarche, nous avons envisagé une étude, d'aspect fondamental, de ligands Gal-L, de différentes valences et longueurs, portant des épitopes galactoses. Nous avons testé ces nouveaux ligands en interaction avec une lectine commerciale modèle : la lectine d'arachide PNA (« *Peanuts agglutinine* »). La PNA est une lectine tétramérique et tétravalente spécifique au galactose qui a été, largement, caractérisée dans la littérature. Dans notre étude, nous avons évalué l'influence de la longueur des bras espaceurs et de la valence sur la reconnaissance spécifique. L'interaction PNA-Gal-L a été, d'abord, analysée par imagerie AFM. Afin d'éviter les éventuelles contraintes stériques pouvant avoir lieu, nous avons opté pour les ligands les plus longs (CL1Gal, CL2Gal et CL3Gal). L'effet de la valence sur l'association des molécules de PNA a été observé par imagerie AFM à l'air. Contrairement au ligand monovalent CL1Gal, la mise de la PNA en présence des ligands di et trivalents (CL2Gal et CL3Gal) provoque la formation de réseaux liants les molécules de PNA entre elles. Cette expérience révèle un mode d'association intermoléculaire agrégatif (« effet cluster »). Un effet de la valence, sur la taille et la complexité des réseaux obtenus, a été noté.

En plus de l'imagerie, l'interaction, entre la PNA et l'ensemble des ligands synthétisés, a été examinée par spectroscopie de force en mode SMFS et DFS. Une influence de la

valence et de la longueur du ligand, a été constatée sur la force et sur la fréquence de l'interaction PNA-Gal-L. Contrairement à ce qui peut être envisagé, la force et la fréquence de l'interaction diminuent avec la valence. Cependant, les résultats de la DFS révèlent une compensation de la diminution de la force par une augmentation du temps de vie de la liaison. En effet des τ_{off} plus importants sont obtenus pour l'interaction de la PNA avec les ligands di et trivalents par rapport aux monovalents. De plus, une compensation énergétique est constatée. En effet, l'apport énergétique nécessaire pour rompre le complexe PNA-galactose est plus important dans le cas des ligands multivalents. L'analyse de ces résultats et leur comparaison avec les données bibliographiques nous ont permis de mettre en évidence le mode de reconnaissance intramoléculaire entre la PNA et les ligands multivalents. La reconnaissance entre la PNA et les ligands multivalents s'opère selon un mode d'association intramoléculaire par fixation et recapture.

L'exploration de la dynamique de l'interaction entre la PNA et les ligands Gal-L, par DFS, n'avait pris en compte que les ligands courts et longs de différentes valences (CC1Gal, CC2Gal, CC3Gal, CL1Gal, CL2Gal, CC3Gal) et le ligand monovalent à bras espaceur moyen (CM1Gal). Cependant, suite à l'analyse par SMFS, une influence de la longueur du bras espaceur sur l'interaction a été notée exclusivement pour les ligands di et trivalents. De ce fait, il serait avantageux de compléter l'étude des ligands moyens di et trivalents (CM2Gal et CM3Gal) en DFS. Ainsi, un effet de la longueur des ligands, sur les paramètres cinétiques et énergétiques de l'interaction, serait à prévoir pour les ligands di et trivalents.

D'autre part, dans le cadre de l'étude de l'interaction PNA-galactose, le ligand le plus simple, CC1Gal, a servi de modèle. La constante d'affinité K_d de l'interaction PNA-CC1Gal a été définie. Il serait à envisager de déterminer l'affinité pour l'ensemble des ligands synthétisés. Ainsi, nous pourrions compléter l'étude de l'influence de la multivalence sur l'affinité vis-à-vis de la lectine modèle utilisée. D'après les résultats obtenus en DFS, le temps de la liaison, τ_{off} , augmente avec la valence. En se basant sur ces résultats, un effet positif de la valence sur l'affinité serait à envisager.

Théoriquement, une affinité maximale est à prévoir lorsque la longueur des bras espaceurs permet aux épitopes une fixation simultanée sur les sites de reconnaissance, suivant un mode d'association chélate. Afin de vérifier ce postulat, il serait intéressant de tester d'autres longueurs de bras espaceurs.

De plus, il serait intéressant de faire varier la nature des bras espaceurs. Ainsi, outre son rôle d'espaceur, le bras pourrait jouer un rôle dans la modulation de l'intensité de l'interaction.

Dans le cadre de l'étude de l'influence de la valence sur les interactions PNA-Gal-L, il serait intéressant d'augmenter davantage la valence des ligands testés. Ainsi, des ligands à fortes valences pourraient être synthétisés. Leur comportement vis-à-vis de la lectine PNA pourrait être étudié par AFM.

Nos recherches, menées dans le cadre de l'étude de l'interaction PNA-ligands à galactose, pourraient être élargies. La PNA a été utilisée, dans notre étude, comme une lectine modèle. Il serait intéressant d'élargir l'étude sur d'autres lectines, d'intérêt biologique, spécifiques au galactose, telle que la galectine. Ainsi, les ligands Gal-L peuvent être utilisés dans de nouvelles approches thérapeutiques et stratégies de diagnostic de maladies reliées à l'activité de ces lectines. Par exemple, la vectorisation de molécules thérapeutiques, en les greffant sur les ligands synthétiques, permettrait de cibler les cellules présentant à leur surface les lectines spécifiques aux ligands. Ainsi, la thérapie pourrait devenir plus sélective. Ceci pourrait diminuer les effets secondaires et les quantités à incorporer au corps pendant la thérapie, et éventuellement, diminuer le coût de la thérapie.

La deuxième partie de notre projet, d'aspect plus appliqué, s'inscrit dans le cadre de la recherche de molécules thérapeutiques innovantes pour les infections du tractus urinaires (UTIs) dues à *E. coli* uropathogène. Cette approche s'est basée sur la stratégie antiadhésive dans le traitement de l'infection. La conception des inhibiteurs de la fixation bactérienne sur les cellules du conduit urinaire a été réalisée par nos partenaires chimistes. Lors de la conception des ligands, ils se sont basés sur les travaux précédents de Dr. Julie Bouckaert de l'UMR-CNRS 8576. Le mannoside d'heptyle (HM) a été identifié, par l'équipe de Dr. Bouckaert, comme ayant une forte affinité envers l'adhésine FimH (responsable de l'adhésion bactérienne aux cellules uroépithéliales saines) ^[69]. Des ligands à base d'HM de différentes valences (1, 2, 3 et 7) ont été synthétisés au sein de l'équipe de Dr Gouin ^{[73], [75]}. Dans cette étude, nous nous sommes intéressés à l'étude, par AFM, de l'interaction des différents ligands HM avec l'adhésine FimH. Dans un premier temps, nous avons étudié l'interaction, entre les ligands HM et l'adhésine FimH purifiée, par spectroscopie de force en SMFS et DFS. Les forces ainsi enregistrées sont plus intenses que celles retrouvées pour les

autres interactions sucre-lectine. Cela réconforte la conception rationnelle des ligands qui s'est basée sur le HM, un fort ligand du FimH. Les résultats obtenus, suite à cette première étude, ne révèlent pas d'effet significatif de la valence sur l'interaction entre les ligands HM et l'adhésine FimH purifiée. En effet, des forces d'interaction proches ont été enregistrées en SMFS. De plus, aucune variation significative des constantes cinétiques (k_{off} et τ_{off}) ni de la distance de la barrière énergétique x_β n'a été enregistrée. Ces résultats, concordent avec ceux obtenus, par SPR, chez nos partenaires^[75]. La nature monovalente de l'adhésine FimH explique l'absence d'influence de la multivalence sur l'interaction. En effet, le FimH ne présentant qu'un seul site de fixation du sucre, un mode d'association intermoléculaire par effet chélate n'est pas envisageable. Également, un mode d'association intermoléculaire par effet agrégatif ne peut être envisagé pour une lectine monovalente. Bien qu'aucune influence de la multivalence, sur l'interaction entre le FimH purifié et les ligands HM, ne soit notée, les résultats de la spectroscopie de force menée sur la bactérie révèlent une augmentation de la force d'adhésion avec la valence. Cette augmentation de la force, sous l'effet de la valence, a été expliquée par une association intramoléculaire par effet chélate. De plus, les forces enregistrées sur les FimH à l'extrémité des *pili* bactériens sont plus intenses que celles enregistrées sur l'adhésine FimH purifiée. Ces résultats soulignent l'importance de considérer le FimH dans sa structure originelle et mettent en avant le rôle joué par les *pili* dans la résistance à la traction mécanique précédemment reporté dans la littérature^{[62], [63], [64] [65]}. D'autre part, l'influence de la multivalence sur la reconnaissance des ligands HM par la bactérie a été visualisée par imagerie AFM. Nous avons ainsi mis en évidence l'effet agrégatif (« effet cluster »), des ligands multivalents, sur les bactéries. En effet, la mise en coprésence des multimannosides avec les bactéries engendre le regroupement de ces dernières en agrégats. La taille des agrégats obtenus dépend de la valence du ligand en question. De la sorte, malgré qu'il ait présenté la force d'adhésion la plus faible, le ligand heptavalent HM-7 engendre l'agrégation la plus favorisée. Même si l'effet « cluster » observé n'est pas très intense, nos résultats montrent néanmoins un fort potentiel thérapeutique de ces ligands. Ce potentiel serait à valoriser dans une approche antiadhésive pour le traitement des UTIs. De plus, la solubilité des ligands synthétisés leur permet de pénétrer dans les cellules infectées, où les bactéries sont quiescentes. Ainsi, ces ligands diminueraient fortement le caractère chronique de l'infection. Le potentiel

thérapeutique résulterait d'un compromis entre force et pouvoir agrégeant de chaque ligand. Dans l'état actuel de l'étude, le ligand trivalent HM-3 semble être un bon candidat pour le traitement antiadhésif des UTIs.

Ainsi, nous avons analysé, par AFM, la reconnaissance entre des ligands synthétiques à mannosides d'heptyle (HM) et l'adhésine FimH (principal facteur impliqué dans l'infection des cellules saines). En raison de la nature monomérique et monovalente de l'adhésine FimH, les études menées, en SMFS et DFS, n'ont révélé aucun effet de la valence sur l'interaction entre le FimH purifiée et les ligands HM multivalents. Cependant, une influence significative de la valence sur l'interaction des ligands HM avec les FimH sur bactéries a été mise en évidence par SMFS. Il serait intéressant de procéder à une étude, en DFS, de la reconnaissance entre les ligands HM synthétiques et les FimH sur bactéries. En appliquant différentes vitesses de retrait, nous pourrions prévoir une résistance plus forte pour les vitesses les plus rapides et les valences les plus importantes. La résistance de la liaison entre le FimH et les mannosides sous l'effet d'une traction mécanique, reportée dans la littérature, soutient cette hypothèse.

Au regard de la complexité des systèmes biologiques, il peut être envisagé de procéder à l'expérimentation sur cellules modèles. Des cellules dont le glycocalyx est hautement mannosylé (tels que les cellules HT-29, HTB-4 et HTB-9) peuvent être utilisées. Dans ce cas, les bactéries pathogènes seront fixées sur la pointe AFM et les cellules modèles sur la surface. Des mesures de forces peuvent être, par la suite, menées entre les bactéries et les cellules en absence et en présence des différents ligands synthétisés (Figure 78). Cette expérience permettrait d'apprécier le potentiel thérapeutique des ligands synthétiques dans des conditions plus proches de celles d'une infection.

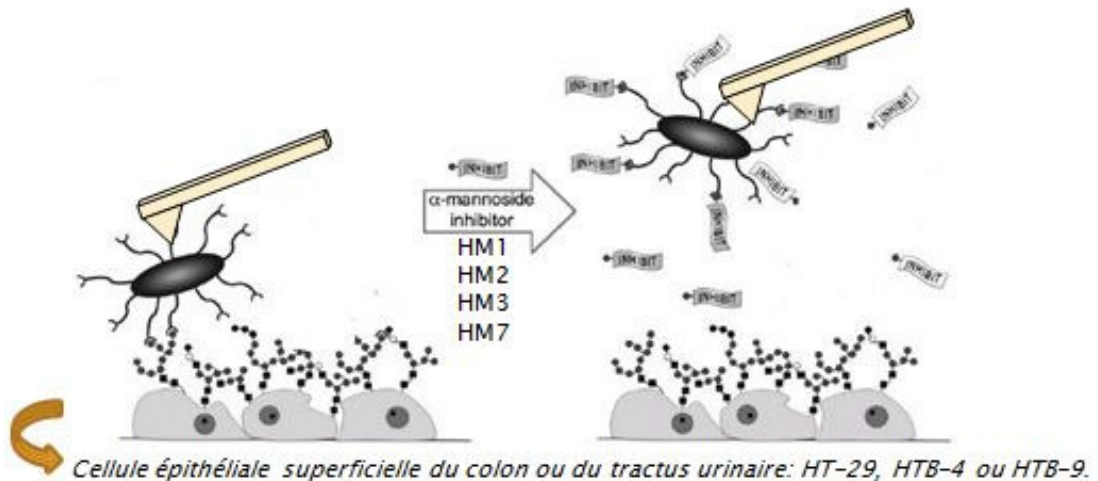


Figure 78. Analyse de l'effet des ligands synthétiques à HM sur l'inhibition de l'adhésion des bactéries pathogènes aux cellules mannosylées. Adapté de [72].

Bien qu'à notre connaissance, elle n'est pas encore appliquée cliniquement, l'approche antiadhésive s'annonce très prometteuse comme nouvelle stratégie thérapeutique. Cette approche n'est pas restreinte aux infections urinaires étudiées dans notre projet. Elle peut s'appliquer à plusieurs autres maladies impliquant l'adhésion bactérienne, via des interactions sucre-lectine, aux cellules saines. À titre d'exemple, l'infection des voies respiratoires à *Pseudomonas aeruginosa*, généralement fatale chez les patients atteints de mucoviscidose, peut-être traitée par une approche antiadhésive. L'équipe de Dr. Anne Imberty, de l'université Joseph Fourier de Grenoble, s'intéresse, depuis quelques années, au sujet [68].

Enfin, la synthèse chimique des ligands multivalents offre une voie encourageante pour le développement de nouveaux outils de diagnostic et de nouvelles stratégies de thérapie. La conception rationnelle et la flexibilité de la synthèse en matière de longueur, valence, hydrophobicité ainsi que la possibilité de greffer des molécules d'intérêt sur les ligands, élargissent considérablement les champs d'application des ligands synthétiques. À titre d'exemple, ils peuvent être utilisés dans la vectorisation de médicaments et d'agents d'imagerie médicale, dans les thérapies anticancéreuses et dans les infections diverses.

*RÉFÉRENCES
BIBLIOGRAPHIQUES*

1. Sharon, N. and H. Lis, *History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules*. Glycobiology, 2004. **14**(11): p. 53R-62R.
2. Varki, A., *Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct*. Glycobiology, 1993. **3**(2): p. 97-130.
3. Sharon, N., *Lectins: carbohydrate-specific reagents and biological recognition molecules*. Journal of Biological Chemistry, 2007. **282**(5): p. 2753-2764.
4. Almant, M., *Conception de ligands à charpente saccharidique pour le ciblage multivalent et la vectorisation*, thèse de doctorat en chimie organique. 2010, Picardie, Jules Verne: Amiens.
5. Lee, Y.C. and R.T. Lee, *Carbohydrate-protein interactions: basis of glycobiology*. Accounts of chemical research, 1995. **28**(8): p. 321-327.
6. Gouin, S.G., et al., *Multimeric Lactoside "Click Clusters" as Tools to Investigate the Effect of Linker Length in Specific Interactions with Peanut Lectin, Galectin-1, and-3*. ChemBioChem, 2010. **11**(10): p. 1430-1442.
7. Binnig, G., C.F. Quate, and C. Gerber, *Atomic force microscope*. Physical review letters, 1986. **56**(9): p. 930-933.
8. Kada, G., F. Kienberger, and P. Hinterdorfer, *Atomic force microscopy in bionanotechnology*. Nano Today, 2008. **3**(1): p. 12-19.
9. Almant M., Mastouri A., et al., *Probing the nature of the cluster effect observed with synthetic multivalent galactosides and peanut agglutinin lectin*. Chemistry-A European Journal, 2013. **19**(2): p. 729-738.
10. Mammen, M., S.-K. Choi, and G.M. Whitesides, *Polyvalent interactions in biological systems: implications for design and use of multivalent ligands and inhibitors*. Angewandte Chemie International Edition, 1998. **37**(20): p. 2754-2794.
11. Pritchett, T. and J. Paulson, *Basis for the potent inhibition of influenza virus infection by equine and guinea pig alpha 2-macroglobulin*. Journal of Biological Chemistry, 1989. **264**(17): p. 9850-9858.
12. Lee, R.T., et al., *Ligand-binding characteristics of rat serum-type mannose-binding protein (MBP-A). Homology of binding site architecture with mammalian and chicken hepatic lectins*. Journal of Biological Chemistry, 1991. **266**(8): p. 4810-4815.
13. Lundquist, J.J., *The cluster glycoside effect*. Chem Rev, 2002. **102**: p. 555-578.
14. Jencks, W.P., *On the attribution and additivity of binding energies*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1981. **78**(7): p. 4046-4050.
15. Fan, E., et al., *High-affinity pentavalent ligands of Escherichia coli heat-labile enterotoxin by modular structure-based design*. Journal of the American Chemical Society, 2000. **122**(11): p. 2663-2664.
16. Heldin, C.-H., *Dimerization of cell surface receptors in signal transduction*. Cell, 1995. **80**: p. 213-223.

17. Banerjee, A.L., et al., *Spacer-based selectivity in the binding of "two-prong" ligands to recombinant human carbonic anhydrase I*. *Biochemistry*, 2005. **44**(9): p. 3211-3224.
18. Gómez-García, M., et al., *Probing secondary carbohydrate-protein interactions with highly dense cyclodextrin-centered heteroglycoclusters: the heterocluster effect*. *Journal of the American Chemical Society*, 2005. **127**(22): p. 7970-7971.
19. Dam, T.K., et al., *Binding studies of α -GalNAc-specific lectins to the α -GalNAc (Tn-antigen) form of porcine submaxillary mucin and its smaller fragments*. *Journal of Biological Chemistry*, 2007. **282**(38): p. 28256-28263.
20. Cecioni, S., *Approche multivalente des interactions saccharides-lectines: synthèse de glycoclusters et analyse de la reconnaissance biomoléculaire*. Thèse de doctorat en chimie. 2010, Université Claude Bernard-Lyon I.
21. Brewer, C.F., M.C. Miceli, and L.G. Baum, *Clusters, bundles, arrays and lattices: novel mechanisms for lectin-saccharide-mediated cellular interactions*. *Current opinion in structural biology*, 2002. **12**(5): p. 616-623.
22. Stillman, B.N., et al., *Galectin-3 and galectin-1 bind distinct cell surface glycoprotein receptors to induce T cell death*. *The Journal of Immunology*, 2006. **176**(2): p. 778-789.
23. Ercolani, G., *Assessment of cooperativity in self-assembly*. *Journal of the American Chemical Society*, 2003. **125**(51): p. 16097-16103.
24. Dam, T.K. and C.F. Brewer, *Thermodynamic studies of lectin-carbohydrate interactions by isothermal titration calorimetry*. *Chemical reviews*, 2002. **102**(2): p. 387-430.
25. Dam, T.K., T.A. Gerken, and C.F. Brewer, *Thermodynamics of Multivalent Carbohydrate-Lectin Cross-Linking Interactions: Importance of Entropy in the Bind and Jump Mechanism*. *Biochemistry*, 2009. **48**(18): p. 3822-3827.
26. Sanders, C.R., *Biomolecular Ligand-Receptor Binding Studies: Theory, Practice, and Analysis*. 2010, Departement of biochemistry of the Vanderbilt university: Tennessee.
27. Ando, T., et al., *A high-speed atomic force microscope for studying biological macromolecules*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2001. **98**(22): p. 12468-12472.
28. Donnelly, E. and I. Goldstein, *Glutaraldehyde-insolubilized concanavalin A: an adsorbent for the specific isolation of polysaccharides and glycoproteins*. *Biochemical Journal*, 1970. **118**(4): p. 679-680.
29. Sharon, N., & Lis, H. (2003). *Lectins*. Kluwer Academic Pub.
30. Merritt, E.A., et al., *Crystal structure of cholera toxin B-pentamer bound to receptor GM1 pentasaccharide*. *Protein Science*, 1994. **3**(2): p. 166-175.
31. Goldstein, I.J. and R. Poretz, *Isolation, physicochemical characterization, and carbohydrate-binding specificity of lectins*. *The lectins: properties, functions and applications in biology and medicine*, 1986: p. 33-248.
32. Imberty, A., et al., *Structures of the lectins from *Pseudomonas aeruginosa*: insights into the molecular basis for host glycan recognition*. *Microbes and Infection*, 2004. **6**(2): p. 221-228.

33. Bertozzi, C.R. and L.L. Kiessling, *Chemical glycobiology*. Science, 2001. **291**(5512): p. 2357-2364.
34. Barkai-Golan, R., D. Mirelman, and N. Sharon, *Studies on growth inhibition by lectins of Penicillia and Aspergilli*. Archives of microbiology, 1978. **116**(2): p. 119-124.
35. Peumans, W.J. and E. Van Damme, *Lectins as plant defense proteins*. Plant physiology, 1995. **109**(2): p. 347-352.
36. Kijne, J.W., M.A. Bauchrowitz, and C.L. Diaz, *Root lectins and rhizobia*. Plant physiology, 1997. **115**(3): p. 869.
37. Bevilacqua, M., et al., *Selectins: a family of adhesion receptors*. Cell, 1991. **67**(2): p. 233-233.
38. Töpfer-Petersen, E., et al., *Spermadhesins: a new protein family. Facts, hypotheses and perspectives*. Andrologia, 1998. **30**(4-5): p. 217-224.
39. Inbar, M. and L. Sachs, *Interaction of the carbohydrate-binding protein concanavalin A with normal and transformed cells*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1969. **63**(4): p. 1418-1425.
40. Nicolson, G.L., *The interactions of lectins with animal cell surfaces*. Int. Rev. Cytol, 1974. **39**(89): p. 90-190.
41. Mier, J. and R. Gallo, *The purification and properties of human T cell growth factor*. The Journal of Immunology, 1982. **128**(3): p. 1122-1127.
42. Sears, P. and C.H. Wong, *Carbohydrate mimetics: a new strategy for tackling the problem of carbohydrate-mediated biological recognition*. Angewandte Chemie International Edition, 1999. **38**(16): p. 2300-2324.
43. Feinberg, H., et al., *Multiple modes of binding enhance the affinity of DC-SIGN for high mannose N-linked glycans found on viral glycoproteins*. Journal of Biological Chemistry, 2007. **282**(6): p. 4202-4209.
44. Sharon, N., *Carbohydrate—Lectin Interactions in Infectious Disease*, in *Toward Anti-Adhesion Therapy for Microbial Diseases*. 1996, Springer. p. 1-8.
45. Imberty, A., E.P. Mitchell, and M. Wimmerová, *Structural basis of high-affinity glycan recognition by bacterial and fungal lectins*. Current opinion in structural biology, 2005. **15**(5): p. 525-534.
46. Merritt, E.A. and W. Hol, *AB5 toxins*. Current opinion in structural biology, 1995. **5**(2): p. 165-171.
47. Soto, G.E. and S.J. Hultgren, *Bacterial adhesins: common themes and variations in architecture and assembly*. Journal of bacteriology, 1999. **181**(4): p. 1059-1071.
48. Nishiyama, M., et al., *Structural basis of chaperone—subunit complex recognition by the type 1 pilus assembly platform FimD*. The EMBO journal, 2005. **24**(12): p. 2075-2086.
49. Kline, K.A., et al., *A tale of two pili: assembly and function of pili in bacteria*. Trends in microbiology, 2010. **18**(5): p. 224-232.

50. Hooton, T.M., et al., *A prospective study of risk factors for symptomatic urinary tract infection in young women*. New England journal of medicine, 1996. **335**(7): p. 468-474.
51. Cegelski, L., et al., *The biology and future prospects of antivirulence therapies*. Nature Reviews Microbiology, 2008. **6**(1): p. 17-27.
52. Zhou, G., et al., *Uroplakin Ia is the urothelial receptor for uropathogenic Escherichia coli: evidence from in vitro FimH binding*. Journal of cell science, 2001. **114**(22): p. 4095-4103.
53. Mysorekar, I.U. and S.J. Hultgren, *Mechanisms of uropathogenic Escherichia coli persistence and eradication from the urinary tract*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2006. **103**(38): p. 14170-14175.
54. Wellens, A., et al., *Intervening with urinary tract infections using anti-adhesives based on the crystal structure of the FimH–oligomannose-3 complex*. PLoS One, 2008. **3**(4): p. e2040.
55. Jones, C.H., et al., *FimH adhesin of type 1 pili is assembled into a fibrillar tip structure in the Enterobacteriaceae*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1995. **92**(6): p. 2081-2085.
56. Hung, C.S., et al., *Structural basis of tropism of Escherichia coli to the bladder during urinary tract infection*. Molecular Microbiology, 2002. **44**(4): p. 903-915.
57. Chen, S.L., et al., *Positive selection identifies an in vivo role for FimH during urinary tract infection in addition to mannose binding*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2009. **106**(52): p. 22439-22444.
58. Schilling, J.D., M.A. Mulvey, and S.J. Hultgren, *Structure and function of Escherichia coli type 1 pili: new insight into the pathogenesis of urinary tract infections*. Journal of Infectious Diseases, 2001. **183**(Supplement 1): p. S36-S40.
59. Sharon, N., *Bacterial lectins, cell-cell recognition and infectious disease*. FEBS Letters, 1987. **217**(2): p. 145-157.
60. Bouckaert, J., et al., *The affinity of the FimH fimbrial adhesin is receptor-driven and quasi-independent of Escherichia coli pathotypes*. Molecular microbiology, 2006. **61**(6): p. 1556-1568.
61. Duncan, M.J., et al., *The distinct binding specificities exhibited by enterobacterial type 1 fimbriae are determined by their fimbrial shafts*. Journal of Biological Chemistry, 2005. **280**(45): p. 37707-37716.
62. Thomas, W.E., et al., *Bacterial adhesion to target cells enhanced by shear force*. Cell, 2002. **109**(7): p. 913-923.
63. Thomas, W.E., V. Vogel, and E. Sokurenko, *Biophysics of catch bonds*. Biophysics, 2008. **37**: p. 399-416.
64. Yakovenko, O., et al., *FimH forms catch bonds that are enhanced by mechanical force due to allosteric regulation*. Journal of Biological Chemistry, 2008. **283**(17): p. 11596-11605.
65. Aprikian, P., et al., *The bacterial fimbrial tip acts as a mechanical force sensor*. PLoS biology, 2011. **9**(5): p. e1000617.

66. Sharon, N., *Carbohydrates as future anti-adhesion drugs for infectious diseases*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects, 2006. **1760**(4): p. 527-537.
67. Disney, M.D., et al., *Detection of bacteria with carbohydrate-functionalized fluorescent polymers*. Journal of the American Chemical Society, 2004. **126**(41): p. 13343-13346.
68. Sicard, D., et al., *AFM investigation of Pseudomonas aeruginosa lectin LecA (PA-IL) filaments induced by multivalent glycoclusters*. Chemical Communications, 2011. **47**(33): p. 9483-9485.
69. Bouckaert, J., et al., *Receptor binding studies disclose a novel class of high-affinity inhibitors of the Escherichia coli FimH adhesin*. Molecular Microbiology, 2005. **55**(2): p. 441-455.
70. Schierholt, A., M. Hartmann, and T.K. Lindhorst, *Bi- and trivalent glycopeptide mannopyranosides as inhibitors of type 1 fimbriae-mediated bacterial adhesion: variation of valency, aglycon and scaffolding*. Carbohydrate Research, 2011. **346**(12): p. 1519-1526.
71. Schwardt, O., et al., *Design, synthesis and biological evaluation of mannosyl triazoles as FimH antagonists*. Bioorganic & medicinal chemistry, 2011. **19**(21): p. 6454-6473.
72. Hartmann, M., et al., *Inhibition of bacterial adhesion to live human cells: Activity and cytotoxicity of synthetic mannosides*. FEBS letters, 2012. **586**: p. 1459-1465.
73. Gouin, S.G., et al., *Synthetic multimeric heptyl mannosides as potent antiadhesives of uropathogenic Escherichia coli*. ChemMedChem, 2009. **4**(5): p. 749-755.
74. Deniaud, D., K. Julienne, and S.G. Gouin, *Insights in the rational design of synthetic multivalent glycoconjugates as lectin ligands*. Organic & biomolecular chemistry, 2011. **9**(4): p. 966-979.
75. Almant, M., et al., *Clustering of Escherichia coli Type-1 Fimbrial Adhesins by Using Multimeric Heptyl α -D-Mannoside Probes with a Carbohydrate Core*. Chemistry-A European Journal, 2011. **17**(36): p. 10029-10038.
76. Firon, N., et al., *Aromatic alpha-glycosides of mannose are powerful inhibitors of the adherence of type 1 fimbriated Escherichia coli to yeast and intestinal epithelial cells*. Infection and immunity, 1987. **55**(2): p. 472-476.
77. Aronson, M., et al., *Prevention of colonization of the urinary tract of mice with Escherichia coli by blocking of bacterial adherence with methyl α -D-mannopyranoside*. Journal of Infectious Diseases, 1979. **139**(3): p. 329-332.
78. Mouricout, M., et al., *Glycoprotein glycans that inhibit adhesion of Escherichia coli mediated by K99 fimbriae: treatment of experimental colibacillosis*. Infection and immunity, 1990. **58**(1): p. 98-106.
79. Idänpään-Heikkilä, I., et al., *Oligosaccharides interfere with the establishment and progression of experimental pneumococcal pneumonia*. Journal of Infectious Diseases, 1997. **176**(3): p. 704-712.
80. Mysore, J.V., et al., *Treatment of *Helicobacter pylori* infection in rhesus monkeys using a novel antiadhesion compound*. Gastroenterology, 1999. **117**(6): p. 1316-1325.
81. Ambrosi, M., N.R. Cameron, and B.G. Davis, *Lectins: tools for the molecular understanding of the glycode*. Organic & biomolecular chemistry, 2005. **3**(9): p. 1593-1608.

82. Lotan, R., et al., *The purification, composition, and specificity of the anti-T lectin from peanut (*Arachis hypogaea*)*. Journal of Biological Chemistry, 1975. **250**(21): p. 8518-8523.
83. Pereira, M., et al., *Immunochemical studies on the specificity of the peanut (*Arachis hypogaea*) agglutinin*. Carbohydrate research, 1976. **51**(1): p. 107-118.
84. Neurohr, K.J., et al., *Kinetics of binding of methyl. alpha.-and. beta.-D-galactopyranoside to peanut agglutinin: a carbon-13 nuclear magnetic resonance study*. Biochemistry, 1981. **20**(12): p. 3499-3504.
85. Pratap, J., et al., *The combination of molecular dynamics with crystallography for elucidating protein-ligand interactions: a case study involving peanut lectin complexes with T-antigen and lactose*. Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography, 2001. **57**(11): p. 1584-1594.
86. Adhikari, P., et al., *Mutational Analysis at Asn-41 in Peanut Agglutinin A RESIDUE CRITICAL FOR THE BINDING OF THE TUMOR-ASSOCIATED THOMSEN-FRIEDENREICH ANTIGEN*. Journal of Biological Chemistry, 2001. **276**(44): p. 40734-40739.
87. Fish, W.W., L.M. Hamlin, and R.L. Miller, *The macromolecular properties of peanut agglutinin*. Archives of biochemistry and biophysics, 1978. **190**(2): p. 693-698.
88. Decastel, M., et al., *Effect of pH on oligomeric equilibrium and saccharide-binding properties of peanut agglutinin*. Archives of biochemistry and biophysics, 1985. **240**(2): p. 811-819.
89. Dev, S. and A. Surolia, *Dynamic light scattering study of peanut agglutinin: Size, shape and urea denaturation*. Journal of biosciences, 2006. **31**(5): p. 551-556.
90. Neurohr, K., N.M. Young, and H.H. Mantsch, *Determination of the carbohydrate-binding properties of peanut agglutinin by ultraviolet difference spectroscopy*. Journal of Biological Chemistry, 1980. **255**(19): p. 9205-9209.
91. Banerjee, R., et al., *Conformation, protein-carbohydrate interactions and a novel subunit association in the refined structure of peanut lectin-lactose complex*. Journal of molecular biology, 1996. **259**: p. 281-296.
92. Srinivas, V., et al., *Legume lectin family, the 'natural mutants of the quaternary state', provide insights into the relationship between protein stability and oligomerization*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects, 2001. **1527**(3): p. 102-111.
93. Rougé, P., et al., *La lectine de l'arachide*. Revue Francaise d'Allergologie, 2010. **50**(3): p. 281-284.
94. Olsen, K.W. and R.L. Miller, *Crystallization and preliminary X-ray data for peanut agglutinin*. FEBS letters, 1982. **145**(2): p. 303-307.
95. Salunke, D., et al., *Crystallization and preliminary X-ray studies of the anti-T lectin from peanut (*Arachis hypogaea*)*. Journal of molecular biology, 1982. **154**(1): p. 177-178.
96. Zaluzec E.J., Zaluzec M.Z., et al., *Crystallization and preliminary X-ray analysis of peanut agglutinin-N6-benzylaminopurine complex*. Journal of Molecular Biology, 1991. **219**: p. 151-153.

97. Kundhavai Natchiar, S., et al., *Multivalency in lectins—a crystallographic, modelling and light-scattering study involving peanut lectin and a bivalent ligand*. *Current science*, 2006. **90**(9): p. 1230-1237.
98. Reisner, Y., M. Linker-Israeli, and N. Sharon, *Separation of mouse thymocytes into two subpopulations by the use of peanut agglutinin*. *Cellular immunology*, 1976. **25**(1): p. 129-134.
99. Toumey, C., *Probing the history of nanotechnology*. *Nature Nanotechnology*, 2012. **7**(4): p. 205-206.
100. Dufrêne, Y.F., *Recent progress in the application of atomic force microscopy imaging and force spectroscopy to microbiology*. *Current Opinion in Microbiology*, 2003. **6**(3): p. 317-323.
101. Binnig, G., et al., *Surface studies by scanning tunneling microscopy*. *Physical review letters*, 1982. **49**(1): p. 57-61.
102. Pethica, J. and W. Oliver, *Tip surface interactions in STM and AFM*. *Physica Scripta*, 1987. **1987**(T19A): p. 61-71.
103. Landman, U., W. Luedtke, and A. Nitzan, *Dynamics of tip-substrate interactions in atomic force microscopy*. *Surface Science Letters*, 1989. **210**(3): p. L177-L184.
104. Burnham, N.A. and R.J. Colton, *Measuring the nanomechanical properties and surface forces of materials using an atomic force microscope*. *Journal of Vacuum Science & Technology A: Vacuum, Surfaces, and Films*, 1989. **7**(4): p. 2906-2913.
105. Weisenhorn, A., et al., *Forces in atomic force microscopy in air and water*. *Applied Physics Letters*, 1989. **54**(26): p. 2651-2653.
106. Drake, B., et al., *Imaging crystals, polymers, and processes in water with the atomic force microscope*. *Science*, 1989. **243**(4898): p. 1586-1589.
107. Häberle, W., et al., *In situ investigations of single living cells infected by viruses*. *Ultramicroscopy*, 1992. **42**: p. 1161-1167.
108. Tortonese, M., R. Barrett, and C. Quate, *Atomic resolution with an atomic force microscope using piezoresistive detection*. *Applied Physics Letters*, 1993. **62**: p. 834.
109. Zhong, Q., et al., *Fractured polymer/silica fiber surface studied by tapping mode atomic force microscopy*. *Surface Science Letters*, 1993. **290**(1): p. L688-L692.
110. Putman, C., et al., *Viscoelasticity of living cells allows high resolution imaging by tapping mode atomic force microscopy*. *Biophysical journal*, 1994. **67**(4): p. 1749-1753.
111. Hansma, P., et al., *Tapping mode atomic force microscopy in liquids*. *Applied Physics Letters*, 1994. **64**(13): p. 1738-1740.
112. Lee, G.U., L.A. Chrisey, and R.J. Colton, *Direct measurement of the forces between complementary strands of DNA*. *Science*, 1994. **266**(5186): p. 771-773.
113. Florin, E.-L., V.T. Moy, and H.E. Gaub, *Adhesion forces between individual ligand-receptor pairs*. *Science*, 1994. **264**(5157): p. 415-417.

114. Han, W., et al., *Cryo atomic force microscopy: a new approach for biological imaging at high resolution*. *Biochemistry*, 1995. **34**(26): p. 8215-8220.
115. Giessibl, F.J., *Atomic resolution of the silicon (111)-(7x7) surface by atomic force microscopy*. *Science*, 1995. **267**(5194): p. 68-71.
116. Young, R., J. Ward, and F. Scire, *The topografiner: an instrument for measuring surface microtopography*. *Review of Scientific Instruments*, 1972. **43**(7): p. 999-1011.
117. Binnig, G., et al., *7x7 reconstruction on Si (111) resolved in real space*. *Physical review letters*, 1983. **50**(2): p. 120-123.
118. Toumey, C., *35 atoms that changed the nanoworld*. *Nature Nanotechnology*, 2010. **5**(4): p. 239-241.
119. Hinterdorfer, P., et al., *Detection and localization of individual antibody-antigen recognition events by atomic force microscopy*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1996. **93**(8): p. 3477-3481.
120. Rief, M., et al., *Reversible unfolding of individual titin immunoglobulin domains by AFM*. *Science*, 1997. **276**(5315): p. 1109-1112.
121. Merkel, R., et al., *Energy landscapes of receptor–ligand bonds explored with dynamic force spectroscopy*. *Nature*, 1999. **397**(6714): p. 50-53.
122. Israelachvil, *Intermolecular and Surface Forces*, ed. A. Press. 1992, London.
123. Kaplan, I.G., *Intermolecular interactions: physical picture, computational methods and model potentials*. 2006: Wiley.
124. Reifengerger, R., *From STM to AFM*, P.U. Brick Nanotechnology center, Editor. 2010: Indiana.
125. Butt, H.-J., B. Cappella, and M. Kappl, *Force measurements with the atomic force microscope: Technique, interpretation and applications*. *Surface science reports*, 2005. **59**(1): p. 1-152.
126. Mazeran, P.-E., *Microscopie À Force Atomique et Imagerie Mécanique*. Thèse de doctorat en physique. 1998, Ecole centrale de Lyon: Lyon.
127. Basire, C. and C. Fretigny. *Experimental study of the friction regimes on viscoelastic materials*. in *ACS Symposium Series ACS Publications*, 2000. **741**(14): p. 239-257.
128. Müller, D.J., G. Büldt, and A. Engel, *Force-induced conformational change of bacteriorhodopsin*. *Journal of molecular biology*, 1995. **249**(2): p. 239-243.
129. Müller, D.J., et al., *Electrostatically balanced subnanometer imaging of biological specimens by atomic force microscope*. *Biophysical journal*, 1999. **76**(2): p. 1101-1111.
130. Gaboriaud, F. and Y.F. Dufrêne, *Atomic force microscopy of microbial cells: application to nanomechanical properties, surface forces and molecular recognition forces*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2007. **54**(1): p. 10-19.
131. Craig, V.S., *An historical review of surface force measurement techniques*. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 1997. **129**: p. 75-93.

132. Evans, E., K. Ritchie, and R. Merkel, *Sensitive force technique to probe molecular adhesion and structural linkages at biological interfaces*. Biophysical journal, 1995. **68**(6): p. 2580-2587.
133. Miyata, H., R. Yasuda, and K. Kinoshita Jr, *Strength and lifetime of the bond between actin and skeletal muscle α -actinin studied with an optical trapping technique*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects, 1996. **1290**(1): p. 83-88.
134. Kaplanski, G., et al., *Granulocyte-endothelium initial adhesion. Analysis of transient binding events mediated by E-selectin in a laminar shear flow*. Biophysical journal, 1993. **64**(6): p. 1922-1933.
135. Alón, R., D.A. Hammer, and T.A. Springer, *Lifetime of the P-selectin-carbohydrate bond and its response to tensile force in hydrodynamic flow*. Nature, 1995. **374**(6522): p. 539-542.
136. Israelachvili, J.N. and P.M. McGuiggan, *Adhesion and short-range forces between surfaces. Part I: New apparatus for surface force measurements*. J. Mater. Res, 1990. **5**(10): p. 2223-2231.
137. Salomo, M., et al., *Optical tweezers to study single protein A/immunoglobulin G interactions at varying conditions*. European Biophysics Journal, 2008. **37**(6): p. 927-934.
138. Williams, M.C., *Optical tweezers: measuring piconewton forces*. Biophysics Textbook Online: <http://www.biophysics.org/btol>, 2002.
139. Brewer, L.R. and P.R. Bianco, *Laminar flow cells for single-molecule studies of DNA-protein interactions*. Nature methods, 2008. **5**(6): p. 517-525.
140. Wong, J.Y. and T.L. Kuhl, *Dynamics of membrane adhesion: the role of polyethylene glycol spacers, ligand-receptor bond strength, and rupture pathway*. Langmuir, 2008. **24**(4): p. 1225-1231.
141. Evans, E. and K. Kinoshita, *Using Force to Probe Single-Molecule Receptor-Cytoskeletal Anchoring Beneath the Surface of a Living Cell*. Methods in Cell Biology, 2007. **83**: p. 373-396.
142. Gourier, C., et al., *A nanospring named erythrocyte. The biomembrane force probe*. Cellular and Molecular Bioengineering, 2008. **1**(4): p. 263-275.
143. El Kirat, K., et al., *Sample preparation procedures for biological atomic force microscopy*. Journal of microscopy, 2005. **218**(3): p. 199-207.
144. Baumgartner, W., et al., *Cadherin interaction probed by atomic force microscopy*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2000. **97**(8): p. 4005-4010.
145. Hansma, H.G. and D.E. Laney, *DNA binding to mica correlates with cationic radius: assay by atomic force microscopy*. Biophysical journal, 1996. **70**(4): p. 1933-1939.
146. Tätte, T., et al., *Preparation of smooth siloxane surfaces for AFM visualization of immobilized biomolecules*. Surface science, 2003. **532**: p. 1085-1091.
147. Safenkova, I., A. Zherdev, and B. Dzantiev, *Application of atomic force microscopy for characteristics of single intermolecular interactions*. Biochemistry (Moscow), 2012. **77**(13): p. 1536-1552.

148. Karrasch, S., et al., *Covalent binding of biological samples to solid supports for scanning probe microscopy in buffer solution*. Biophysical journal, 1993. **65**(6): p. 2437-2446.
149. Kollár, V., et al., *Dynamic strength of titin's Z-disk end*. Journal of biomedicine and biotechnology, 2010. Article ID 838530, 8 pages.
150. Cullen, D.C. and C.R. Lowe, *AFM studies of protein adsorption: 1. Time-resolved protein adsorption to highly oriented pyrolytic graphite*. Journal of colloid and interface science, 1994. **166**(1): p. 102-108.
151. Yang, J., K. Takeyasu, and Z. Shao, *Atomic force microscopy of DNA molecules*. FEBS letters, 1992. **301**(2): p. 173-176.
152. Dupont-Gillain, C.C., B. Nysten, and P.G. Rouxhet, *Collagen adsorption on poly (methyl methacrylate): net-like structure formation upon drying*. Polymer international, 1999. **48**(4): p. 271-276.
153. Dupres, V., et al., *Nanoscale mapping and functional analysis of individual adhesins on living bacteria*. Nature methods, 2005. **2**(7): p. 515-520.
154. Berquand, A., et al., *Antigen binding forces of single antilysozyme Fv fragments explored by atomic force microscopy*. Langmuir, 2005. **21**(12): p. 5517-5523.
155. Wagner, P., et al., *Formation and in situ modification of monolayers chemisorbed on ultraflat template-stripped gold surfaces*. Langmuir, 1995. **11**(10): p. 3867-3875.
156. Touhami, A., et al., *Probing specific lectin-carbohydrate interactions using atomic force microscopy imaging and force measurements*. Langmuir, 2003. **19**(5): p. 1745-1751.
157. Dufrière, Y., *Life at the Nanoscale: Atomic Force Microscopy of Live Cells*. 2011: Pan Stanford Pub.
158. Albrecht, T., et al., *Microfabrication of cantilever styli for the atomic force microscope*. Journal of Vacuum Science & Technology A: Vacuum, Surfaces, and Films, 1990. **8**(4): p. 3386-3396.
159. NONY, L., *Analyse de la microscopie de force dynamique : application à l'étude de l'A.D.N.* Thèse de doctorat en lasers et matiere dense. 2000, l'université bordeaux I: Bordeaux.
160. Sugawara, Y., et al., *Defect motion on an InP (110) surface observed with noncontact atomic force microscopy*. Science, 1995. **270**(5242): p. 1646-1648.
161. Tomitori, M. and T. Arai, *Tip cleaning and sharpening processes for noncontact atomic force microscope in ultrahigh vacuum*. Applied surface science, 1999. **140**(3): p. 432-438.
162. Francius, G., et al., *Stretching polysaccharides on live cells using single molecule force spectroscopy*. Nature protocols, 2009. **4**(6): p. 939-946.
163. Vesenska, J., et al., *Substrate preparation for reliable imaging of DNA molecules with the scanning force microscope*. Ultramicroscopy, 1992. **42**: p. 1243-1249.
164. Emch, R., et al., *Morphological difference between fibronectin sprayed on mica and on PMMA*. Ultramicroscopy, 1992. **42**: p. 1155-1160.

165. Lyubchenko, Y., et al., *Atomic force microscopy of long DNA: imaging in air and under water*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1993. **90**(6): p. 2137-2140.
166. Kirby, A.R., A.P. Gunning, and V.J. Morris, *Imaging polysaccharides by atomic force microscopy*. Biopolymers, 1996. **38**(3): p. 355-366.
167. Gour, N. and S. Verma, *Synthesis and AFM studies of lectin-carbohydrate self-assemblies*. Tetrahedron, 2008. **64**(30): p. 7331-7337.
168. Butt, H.-J., K.H. Downing, and P.K. Hansma, *Imaging the membrane protein bacteriorhodopsin with the atomic force microscope*. Biophysical journal, 1990. **58**(6): p. 1473-1480.
169. Morandat, S., et al., *Atomic force microscopy of model lipid membranes*. Analytical and bioanalytical chemistry, 2013. **405**(5): p. 1445-1461.
170. Reviakine, I. and A. Brisson, *Formation of supported phospholipid bilayers from unilamellar vesicles investigated by atomic force microscopy*. Langmuir, 2000. **16**(4): p. 1806-1815.
171. Jass, J., T. Tjärnhage, and G. Puu, *From liposomes to supported, planar bilayer structures on hydrophilic and hydrophobic surfaces: an atomic force microscopy study*. Biophysical journal, 2000. **79**(6): p. 3153-3163.
172. Blanchette, C.D., et al., *Domain nucleation rates and interfacial line tensions in supported bilayers of ternary mixtures containing galactosylceramide*. Biophysical journal, 2008. **94**(7): p. 2691-2697.
173. Blanchette, C.D., et al., *Galactosylceramide domain microstructure: impact of cholesterol and nucleation/growth conditions*. Biophysical journal, 2006. **90**(12): p. 4466-4478.
174. Mou, J., D.M. Czajkowsky, and Z. Shao, *Gramicidin A aggregation in supported gel state phosphatidylcholine bilayers*. Biochemistry, 1996. **35**(10): p. 3222-3226.
175. Epan, R.F., et al., *Self-assembly of influenza hemagglutinin: studies of ectodomain aggregation by in situ atomic force microscopy*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes, 2001. **1513**(2): p. 167-175.
176. El Kirat, K., et al., *The SIV tilted peptide induces cylindrical reverse micelles in supported lipid bilayers*. Biochemistry, 2006. **45**(30): p. 9336-9341.
177. Sipe, J.D. and A.S. Cohen, *Review: history of the amyloid fibril*. Journal of structural biology, 2000. **130**(2): p. 88-98.
178. Yip, C.M. and J. McLaurin, *Amyloid-[beta] Peptide Assembly: A Critical Step in Fibrillogenesis and Membrane Disruption*. Biophysical journal, 2001. **80**(3): p. 1359-1371.
179. Yip, C.M., A.A. Darabie, and J. McLaurin, *A β 42-peptide assembly on lipid bilayers*. Journal of molecular biology, 2002. **318**(1): p. 97-107.
180. Leroueil, P.R., et al., *Wide varieties of cationic nanoparticles induce defects in supported lipid bilayers*. Nano letters, 2008. **8**(2): p. 420-424.
181. Mecke, A., et al., *Direct observation of lipid bilayer disruption by poly (amidoamine) dendrimers*. Chemistry and physics of lipids, 2004. **132**(1): p. 3-14.

182. Parimi, S., T.J. Barnes, and C.A. Prestidge, *PAMAM dendrimer interactions with supported lipid bilayers: a kinetic and mechanistic investigation*. *Langmuir*, 2008. **24**(23): p. 13532-13539.
183. Müller, D.J. and A. Engel, *Conformations, flexibility, and interactions observed on individual membrane proteins by atomic force microscopy*. *Methods in Cell Biology*, 2002. **68**: p. 257-299.
184. Müller, D.J., M. Amrein, and A. Engel, *Adsorption of biological molecules to a solid support for scanning probe microscopy*. *Journal of structural biology*, 1997. **119**(2): p. 172-188.
185. Muller, D.J., A. Engel, and M. Amrein, *Preparation techniques for the observation of native biological systems with the atomic force microscope*. *Biosensors and Bioelectronics*, 1997. **12**(8): p. 867-877.
186. Chen, Y.-Y., et al., *Surface rigidity change of Escherichia coli after filamentous bacteriophage infection*. *Langmuir*, 2009. **25**(8): p. 4607-4614.
187. Andersson, M., et al., *A structural basis for sustained bacterial adhesion: biomechanical properties of CFA/I pili*. *Journal of molecular biology*, 2012. **415**(5): p. 918-928.
188. Francius, G., et al., *Bacterial surface appendages strongly impact nanomechanical and electrokinetic properties of Escherichia coli cells subjected to osmotic stress*. *PLoS One*, 2011. **6**(5): p. e20066.
189. Francius, G., et al., *Thermo-regulated adhesion of the Streptococcus thermophilus Δrgg0182 strain*. *Langmuir*, 2013. **29**(15): p. 4847-4856.
190. Francius, G., et al., *Detection, localization, and conformational analysis of single polysaccharide molecules on live bacteria*. *Acs Nano*, 2008. **2**(9): p. 1921-1929.
191. Tripathi, P., et al., *Deciphering the Nanometer-Scale Organization and Assembly of Lactobacillus rhamnosus GG pili using atomic force microscopy*. *Langmuir*, 2011. **28**(4): p. 2211-2216.
192. Touhami, A., et al., *Nanoscale characterization and determination of adhesion forces of Pseudomonas aeruginosa pili by using atomic force microscopy*. *Journal of bacteriology*, 2006. **188**(2): p. 370-377.
193. Touhami, A., et al., *Aggregation of yeast cells: direct measurement of discrete lectin-carbohydrate interactions*. *Microbiology*, 2003. **149**(10): p. 2873-2878.
194. Dupres, V., et al., *The yeast Wsc1 cell surface sensor behaves like a nanospring in vivo*. *Nature chemical biology*, 2009. **5**(11): p. 857-862.
195. Webb, H.K., et al., *Physico-mechanical characterisation of cells using atomic force microscopy—current research and methodologies*. *Journal of microbiological methods*, 2011. **86**(2): p. 131-139.
196. Lee, G.-J., et al., *Observation of angiotensin II-induced changes in fixed and live mesangial cells by atomic force microscopy*. *Micron*, 2010. **41**(3): p. 220-226.
197. Wozniak, M.J., et al., *Monitoring of mechanical properties of serially passaged bovine articular chondrocytes by atomic force microscopy*. *Micron*, 2009. **40**(8): p. 870-875.

198. Francis, L.W., et al., *Progesterone induces nano-scale molecular modifications on endometrial epithelial cell surfaces*. *Biology of the Cell*, 2009. **101**(8): p. 481-493.
199. Kaul-Ghanekar, R., et al., *Tumor suppressor protein SMAR1 modulates the roughness of cell surface: combined AFM and SEM study*. *BMC cancer*, 2009. **9**(1): p. 350.
200. Hu, M., et al., *Nanostructure and nanomechanics analysis of lymphocyte using AFM: from resting, activated to apoptosis*. *Journal of biomechanics*, 2009. **42**(10): p. 1513-1519.
201. Dragnevska, Z., *Development, optimisation and application of novel thermal probe techniques for the study of biological systems*. 2011, University of East Anglia.
202. Canetta, E., A.K. Adya, and G.M. Walker, *Atomic force microscopic study of the effects of ethanol on yeast cell surface morphology*. *FEMS microbiology letters*, 2006. **255**(2): p. 308-315.
203. Fernandes, J.C., et al., *Study of the antibacterial effects of chitosans on *Bacillus cereus* (and its spores) by atomic force microscopy imaging and nanoindentation*. *Ultramicroscopy*, 2009. **109**(8): p. 854-860.
204. Plomp, M., et al., *Spore coat architecture of Clostridium novyi NT spores*. *Journal of bacteriology*, 2007. **189**(17): p. 6457-6468.
205. Sahu, K., et al., *Atomic force microscopic study on morphological alterations induced by photodynamic action of Toluidine Blue O in *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli**. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 2009. **96**(1): p. 9-16.
206. Quilès, F., et al., *Production of Extracellular Glycogen by Pseudomonas fluorescens: Spectroscopic Evidence and Conformational Analysis by Biomolecular Recognition*. *Biomacromolecules*, 2012. **13**(7): p. 2118-2127.
207. Vadillo-Rodríguez, V., T.J. Beveridge, and J.R. Dutcher, *Surface viscoelasticity of individual gram-negative bacterial cells measured using atomic force microscopy*. *Journal of bacteriology*, 2008. **190**(12): p. 4225-4232.
208. Chung, C.-J., et al., *Inactivation of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* under various light sources on photocatalytic titanium dioxide thin film*. *Surface and Coatings Technology*, 2009. **203**(8): p. 1081-1085.
209. Schaer-Zammaretti, P. and J. Ubbink, *Imaging of lactic acid bacteria with AFM-elasticity and adhesion maps and their relationship to biological and structural data*. *Ultramicroscopy*, 2003. **97**(1): p. 199-208.
210. Vadillo-Rodríguez, V. and J.R. Dutcher, *Viscoelasticity of the bacterial cell envelope*. *Soft Matter*, 2011. **7**(9): p. 4101-4110.
211. Chandraprabha, M., P. Somasundaran, and K. Natarajan, *Modeling and analysis of nanoscale interaction forces between *Acidithiobacillus ferrooxidans* and AFM tip*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2010. **75**(1): p. 310-318.
212. Colville, K., et al., *Effects of poly (L-lysine) substrates on attached Escherichia coli bacteria*. *Langmuir*, 2009. **26**(4): p. 2639-2644.

213. Doktycz, M., et al., *AFM imaging of bacteria in liquid media immobilized on gelatin coated mica surfaces*. Ultramicroscopy, 2003. **97**(1): p. 209-216.
214. Park, B.-J., T. Haines, and N.I. Abu-Lail, *A correlation between the virulence and the adhesion of *Listeria monocytogenes* to silicon nitride: An atomic force microscopy study*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2009. **73**(2): p. 237-243.
215. Busscher, H.J., W. Norde, and H.C. van der Mei, *Specific molecular recognition and nonspecific contributions to bacterial interaction forces*. Applied and environmental microbiology, 2008. **74**(9): p. 2559-2564.
216. Cerf, A., et al., *Nanomechanical properties of dead or alive single-patterned bacteria*. Langmuir, 2009. **25**(10): p. 5731-5736.
217. Butt, H.-J. and V. Franz, *Rupture of molecular thin films observed in atomic force microscopy. I. Theory*. Physical Review E, 2002. **66**(3): p. 031601-031610.
218. Carl, P. and H. Schillers, *Elasticity measurement of living cells with an atomic force microscope: data acquisition and processing*. Pflügers Archiv-European Journal of Physiology, 2008. **457**(2): p. 551-559.
219. Radmacher, M., et al., *Measuring the viscoelastic properties of human platelets with the atomic force microscope*. Biophysical journal, 1996. **70**(1): p. 556-567.
220. Rotsch, C., K. Jacobson, and M. Radmacher, *Dimensional and mechanical dynamics of active and stable edges in motile fibroblasts investigated by using atomic force microscopy*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1999. **96**(3): p. 921-926.
221. Rico, F., et al., *Probing mechanical properties of living cells by atomic force microscopy with blunted pyramidal cantilever tips*. Physical Review E, 2005. **72**(2): p. 021914-021925.
222. Marszalek, P.E., et al., *Atomic levers control pyranose ring conformations*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1999. **96**(14): p. 7894-7898.
223. Li, H., et al., *Single-molecule force spectroscopy on xanthan by AFM*. Advanced Materials, 1998. **10**(4): p. 316-319.
224. Rief, M., H. Clausen-Schaumann, and H.E. Gaub, *Sequence-dependent mechanics of single DNA molecules*. Nature Structural & Molecular Biology, 1999. **6**(4): p. 346-349.
225. Parot, P., et al., *Past, present and future of atomic force microscopy in life sciences and medicine*. Journal of Molecular Recognition, 2007. **20**(6): p. 418-431.
226. Rabbi, M. and P.E. Marszalek, *Measuring protein mechanics by atomic force microscopy*. Cold Spring Harbor Protocols, 2007. **2007**(12): p. pdb. prot4901.
227. Oesterhelt, F., et al., *Unfolding pathways of individual bacteriorhodopsins*. Science, 2000. **288**(5463): p. 143-146.
228. Hinterdorfer, P. and Y.F. Dufrêne, *Detection and localization of single molecular recognition events using atomic force microscopy*. Nature methods, 2006. **3**(5): p. 347-355.
229. Lee, G.U., D.A. Kidwell, and R.J. Colton, *Sensing discrete streptavidin-biotin interactions with atomic force microscopy*. Langmuir, 1994. **10**(2): p. 354-357.

230. Fritz, J., et al., *Force-mediated kinetics of single P-selectin/ligand complexes observed by atomic force microscopy*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1998. **95**(21): p. 12283-12288.
231. Grandbois, M., et al., *How strong is a covalent bond?* Science, 1999. **283**(5408): p. 1727-1730.
232. Harada, Y., M. Kuroda, and A. Ishida, *Specific and quantized antigen-antibody interaction measured by atomic force microscopy*. Langmuir, 2000. **16**(2): p. 708-715.
233. Bustanji, Y., et al., *Dynamics of the interaction between a fibronectin molecule and a living bacterium under mechanical force*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2003. **100**(23): p. 13292-13297.
234. Hinterdorfer, P., et al., *A mechanistic study of the dissociation of individual antibody-antigen pairs by atomic force microscopy*. NANOBIOLOGY-ABINGDON-, 1998. **4**: p. 177-188.
235. Strunz, T., et al., *Dynamic force spectroscopy of single DNA molecules*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1999. **96**(20): p. 11277-11282.
236. Yersin, A., et al., *Interactions between synaptic vesicle fusion proteins explored by atomic force microscopy*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2003. **100**(15): p. 8736-8741.
237. Kamruzzahan, A., et al., *Antibody linking to atomic force microscope tips via disulfide bond formation*. Bioconjugate chemistry, 2006. **17**(6): p. 1473-1481.
238. Benoit, M., et al., *Discrete interactions in cell adhesion measured by single-molecule force spectroscopy*. Nature cell biology, 2000. **2**(6): p. 313-317.
239. Bonanni, B., et al., *Single molecule recognition between cytochrome C 551 and gold-immobilized azurin by force spectroscopy*. Biophysical journal, 2005. **89**(4): p. 2783-2791.
240. Evans, E. and K. Ritchie, *Dynamic strength of molecular adhesion bonds*. Biophysical journal, 1997. **72**(4): p. 1541-1555.
241. Le, D.T.L., et al., *Measuring Kinetic Dissociation/Association Constants Between *Lactococcus lactis* Bacteria and Mucins Using Living Cell Probes*. Biophysical journal, 2011. **101**(11): p. 2843-2853.
242. Zhang, Y., et al., *Single-molecule study on intermolecular interaction between C60 and porphyrin derivatives: toward understanding the strength of the multivalency*. Langmuir, 2009. **25**(12): p. 6627-6632.
243. Sulchek, T.A., et al., *Dynamic force spectroscopy of parallel individual Mucin1-antibody bonds*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005. **102**(46): p. 16638-16643.
244. Sulchek, T., R.W. Friddle, and A. Noy, *Strength of multiple parallel biological bonds*. Biophysical journal, 2006. **90**(12): p. 4686-4691.
245. Ludwig, M., W. Dettmann, and H. Gaub, *Atomic force microscope imaging contrast based on molecular recognition*. Biophysical journal, 1997. **72**(1): p. 445-448.
246. Gad, M., A. ITOH, and A. IKAI, *Mapping cell wall polysaccharides of living microbial cells using atomic force microscopy*. Cell biology international, 1997. **21**(11): p. 697-706.

247. Grandbois, M., et al., *Affinity imaging of red blood cells using an atomic force microscope*. Journal of Histochemistry & Cytochemistry, 2000. **48**(5): p. 719-724.
248. Lehenkari, P., et al., *Adapting atomic force microscopy for cell biology*. Ultramicroscopy, 2000. **82**(1): p. 289-295.
249. Almqvist, N., et al., *Elasticity and adhesion force mapping reveals real-time clustering of growth factor receptors and associated changes in local cellular rheological properties*. Biophysical journal, 2004. **86**(3): p. 1753-1762.
250. Stroh, C.M., et al., *Simultaneous topography and recognition imaging using force microscopy*. Biophysical journal, 2004. **87**(3): p. 1981-1990.
251. Stroh, C., et al., *Single-molecule recognition imaging microscopy*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2004. **101**(34): p. 12503-12507.
252. Ebner, A., et al., *Localization of single avidin–biotin interactions using simultaneous topography and molecular recognition imaging*. ChemPhysChem, 2005. **6**(5): p. 897-900.
253. Bondurant, B., et al., *Optical and scanning probe analysis of glycolipid reorganization upon concanavalin A binding to mannose-coated lipid bilayers*. Langmuir, 2003. **19**(5): p. 1829-1837.
254. Madwar, C., et al., *Perfluorophenyl Azide Immobilization Chemistry for Single Molecule Force Spectroscopy of the Concanavalin A/Mannose Interaction*. Langmuir, 2010. **26**(22): p. 16677-16680.
255. Li, Y., et al., *Molecular recognition force spectroscopy of a specific lectin–carbohydrate interaction at single-molecule level*. Journal of structural biology, 2011. **176**(1): p. 46-51.
256. Ofek, I., D.L. Hasty, and N. Sharon, *Anti-adhesion therapy of bacterial diseases: prospects and problems*. FEMS Immunology & Medical Microbiology, 2003. **38**(3): p. 181-191.
257. Levy, R. and M. Maaloum, *Measuring the spring constant of atomic force microscope cantilevers: thermal fluctuations and other methods*. Nanotechnology, 2002. **13**(1): p. 33.
258. Stark, R.W., T. Drobek, and W.M. Heckl, *Thermomechanical noise of a free v-shaped cantilever for atomic-force microscopy*. Ultramicroscopy, 2001. **86**(1): p. 207-215.
259. Francius, G., *Détermination des propriétés viscoélastiques de films multicouches de polyélectrolytes par sonde colloïdale au microscope de force atomique*. Thèse de doctorat en chimie physique. 2006, Université Louis Pasteur: strasbourg.
260. Turnbull, W.B. and J.F. Stoddart, *Design and synthesis of glycodendrimers*. Reviews in Molecular Biotechnology, 2002. **90**(3): p. 231-255.
261. Almant, M., et al., *Probing the Nature of the Cluster Effect Observed with Synthetic Multivalent Galactosides and Peanut Agglutinin Lectin*. Chemistry-A European Journal, 2013. **19**(2): p. 729-738.
262. Roach, P., D. Farrar, and C.C. Perry, *Interpretation of protein adsorption: surface-induced conformational changes*. Journal of the American Chemical Society, 2005. **127**(22): p. 8168-8173.

263. Ebner, A., et al., *A new, simple method for linking of antibodies to atomic force microscopy tips*. *Bioconjugate chemistry*, 2007. **18**(4): p. 1176-1184.
264. Riener, C.K., et al., *Simple test system for single molecule recognition force microscopy*. *Analytica Chimica Acta*, 2003. **479**(1): p. 59-75.
265. Gunning, A.P., et al., *Mining the "glycocode"—exploring the spatial distribution of glycans in gastrointestinal mucin using force spectroscopy*. *The FASEB Journal*, 2013. **27**(6): p. 2342-2354.
266. Patel, A. and T.K. Lindhorst, *Multivalent glycomimetics: synthesis of nonavalent mannoside clusters with variation of spacer properties*. *Carbohydrate research*, 2006. **341**(10): p. 1657-1668.
267. Bell, *Models for the specific adhesion of cells to cells*. *Science*, 1978. **200**(4342): p. 618-627.
268. Baumgartner, W., et al., *Affinity of Trans-interacting VE-cadherin Determined by Atomic Force Microscopy*. *Single Molecules*, 2000. **1**(2): p. 119-122.
269. Bongrand, P., *Ligand-receptor interactions*. *Reports on Progress in Physics*, 1999. **62**(6): p. 921.
270. Ratto, T.V., et al., *Force spectroscopy of the double-tethered concanavalin-A mannose bond*. *Biophysical journal*, 2004. **86**(4): p. 2430-2437.
271. Ratto, T.V., et al., *Nonlinearly additive forces in multivalent ligand binding to a single protein revealed with force spectroscopy*. *Langmuir*, 2006. **22**(4): p. 1749-1757.
272. Evans, E., *Probing the relation between force-lifetime-and chemistry in single molecular bonds*. *Annual review of biophysics and biomolecular structure*, 2001. **30**(1): p. 105-128.
273. Miller, E., et al., *The Mechanical Properties of *E. coli* Type 1 Pili Measured by Atomic Force Microscopy Techniques*. *Biophysical journal*, 2006. **91**(10): p. 3848-3856.
274. Hahn, E., et al., *Exploring the 3D Molecular Architecture of *Escherichia coli* Type 1 Pili*. *Journal of molecular biology*, 2002. **323**(5): p. 845-857.
275. Pasparakis, G., A. Cockayne, and C. Alexander, *Control of bacterial aggregation by thermoresponsive glycopolymers*. *Journal of the American Chemical Society*, 2007. **129**(36): p. 11014-11015.
276. Razatos, A., et al., *Molecular determinants of bacterial adhesion monitored by atomic force microscopy*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1998. **95**(19): p. 11059-11064.
277. Bolshakova, A., et al., *Comparative studies of bacteria with an atomic force microscopy operating in different modes*. *Ultramicroscopy*, 2001. **86**(1): p. 121-128.
278. Andersson, M., B.E. Uhlin, and E. Fällman, *The Biomechanical Properties of *E. coli* Pili for Urinary Tract Attachment Reflect the Host Environment*. *Biophysical journal*, 2007. **93**(9): p. 3008-3014.
279. Volle, C., et al., *Spring constants and adhesive properties of native bacterial biofilm cells measured by atomic force microscopy*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2008. **67**(1): p. 32-40.

VALORISATION SCIENTIFIQUE

Publications scientifiques

Almant M, Mastouri A., Gallego-Yerga L, García Fernandez JM, Ortiz Mellet C, Kovensky J, Morandat S, El Kirat K, Gouin SG., *Probing the nature of the cluster effect observed with synthetic multivalent galactosides and peanut agglutinin lectin*. Chemistry-A European Journal, 2013. 19(2): p. 729-738.

Morandat S, Azouzi S, Beauvais E, Mastouri A, El Kirat K, *Atomic force microscopy of model lipid membranes*. Analytical and bioanalytical chemistry, 2013. **405**(5): p. 1445-1461.

Mastouri A, Almant M, Morandat S, Kovensky J, Gouin SG El Kirat K, *Molecular recognition force spectroscopy of a synthetic carbohydrate terminated ligand and peanuts agglutinin interaction at single-molecule level*. **En cours**.

Poster

Amira MASTOURI, Sandrine MORANDAT, Mehdi ALMANT, Sébastien GOUIN, Karim EL KIRAT. *Study of specific molecular recognition phenomena at biological interfaces by atomic force microscopy: probing the multivalency effect of new glycosylated ligands specific for lectins with force spectroscopy*, AFM BioMed 4th Conference, Août 2011, Paris France.