

N° d'ordre 2012-49

ECOLE CENTRALE DE LYON

THESE

Pour obtenir le grade de
DOCTEUR DE L'ECOLE CENTRALE DE LYON

Ecole Doctorale : Matériaux

Par **Delphine SICARD**

**Caractérisation par microscopie à force atomique
des arrangements protéine/sucre impliquant la
lectine PA-IL de la bactérie *Pseudomonas aeruginosa***

Thèse préparée à l'Institut des Nanotechnologies de Lyon – Ecole Centrale de Lyon

Sous la direction de Magali PHANER-GOUTORBE

Soutenue le 26 Novembre 2012

Commission d'examen composée de :

Pr Touria COHEN-BOUHACINA	Rapportrice
Dr Jean-Luc PELLEQUER	Rapporteur
Pr Karine MASENELLI-VARLOT	Présidente
Dr Sébastien VIDAL	Examineur
Dr Yann CHEVOLOT	Examineur
Pr Magali PHANER-GOUTORBE	Directrice de thèse

NOM	Prénom	Laboratoire	Spécialité	Date de soutenance
SIMONET	Pascal	AMPERE	microbiologie	1990
MOREL	Hervé	AMPERE	électrotechnique	10 février 1994
NICOLAS	Laurent	AMPERE	électrotechnique	12 juillet 1994
REDARCE	Hervé Tanneguy	AMPERE	automatique	20 juillet 1995
KRÄHENBÜHL	Laurent	AMPERE	par nomination DR au CNRS	1 octobre 1996
CLERC	Guy	AMPERE	PR LYON 1	6 mars 1998
BURAI	Noël	AMPERE	PR LYON 1	7 décembre 2004
VOLLAIRE	Christian	AMPERE	génie électrique	25 mars 2005
SCORLETTI	Gérard	AMPERE	automatique	6 octobre 2006
BURET	François	AMPERE	électrotechnique	17 novembre 2006
VENET	Pascal	AMPERE	génie électrique	24 octobre 2007
BEROUAL	Abderrahmane	AMPERE	Doctorat d'Etat es Sc Physiques	1 janvier 1987

TOTAL AMPERE : 4

LAFON	Philippe	Extérieur	Acoustique	26 janvier 2011
GOURDAIN	Nicolas	Extérieur	Mécanique des fluides	3 novembre 2011

TOTAL EXTERIEUR :

MAITRE	Jean-François	ICJ	PR émérite	30 novembre 1974
MOUSSAOUI	Mohand	ICJ	retraite au 1/10/11	20 juin 1977
MUSY	François	ICJ	Doctorat d'Etat	7 juin 1985
MARION	Martine	ICJ	Doctorat d'Etat en Mathématiques	15 décembre 1988
MIRONESCU	Elisabeth	ICJ	Doctorat d'Etat	15 décembre 1999
LOHEAC	Jean-Pierre	ICJ	Mathématiques	15 novembre 2002
ZINE	Abdel-Malek	ICJ	Mathématiques	9 novembre 2005

TOTAL ICJ : 5

VIKTOROVITCH	Pierre	INL	Doctorat d'Etat es Sc Physiques	1975
SOUTEYRAND	Eliane	INL	Doctorat d'Etat en Matériaux	1985
GRENET	Geneviève	INL	Doctorat d'Etat es Sciences	6 novembre 1981
GENDRY	Michel	INL	Doctorat d'Etat es Sciences	12 octobre 1986
ROBACH	Yves	INL	Doctorat d'Etat en Matériaux	31 janvier 1989
JACQUEMOD	Gilles	INL	électronique	13 janvier 2000
GAFFIOT	Frédéric	INL	électronique	18 janvier 2000
PHANER-GOUTORBE	Magali	INL	Physique	19 décembre 2003
CLOAREC	Jean-Pierre	INL	chimie des matériaux	20 décembre 2004
DANESCU	Alexandre	INL	mécanique	20 juin 2005
O'CONNOR	Ian	INL	électronique	11 octobre 2005
SEASSAL	Christian	INL	Photonique	9 mars 2007
CALLARD	Anne-Ségolène	INL	Physique, Nanophotonique	6 décembre 2007
LETARTRE	Xavier	INL	Photonique	3 juin 2008

SAINT-GIRONS	Guillaume	INL	milieux denses et matériaux	5 juin 2009
GARRIGUES	Michel	INL		
JOSEPH	Jacques	INL	PR émérite	
TARDY	Jacques	INL	électronique	
MIEYEVILLE	Fabien	INL	Dispositif de l'électronique intégrée	29 mai 2012
CHEVOLOT	Yann	INL	Chimie théorique, physique, analytique	28 septembre 2012

TOTAL INL : 8

DAVID	Bertrand	LIESP	doctorat d'Etat en Informatique	1981
SEFFAH	Ahmed	LIESP	informatique	15 septembre 2006

TOTAL LIEPS : 2

CHEN	Liming	LIRIS		1 janvier 1998
------	--------	-------	--	----------------

TOTAL LIRIS : 1

SCOTT	Julian	LMFA	PhD	1978
HAMADICHE	Mahmoud	LMFA	Doctorat d'Etat es Sciences	7 juin 1905
JUVE	Daniel	LMFA	Doctorat d'Etat es Sciences	1985
BLANC-BENON	Philippe	LMFA	Doctorat d'Etat es Sciences	9 juin 1905
ROGER	Michel	LMFA	Doctorat d'Etat en Acoustique	1989
JEANDEL	Denis	LMFA	Doctorat d'Etat es Sc Physiques	9 juillet 1976
GOROKHOVSKI	Mickael	LMFA		28 avril 1982
LEBOEUF	Francis	LMFA	Doctorat d'Etat en Mécanique	26 juin 1984
FERRAND	Pascal	LMFA	Doctorat d'Etat	17 mars 1986
HENRY	Daniel	LMFA	Docteur es Sciences Physiques	19 juin 1986
GALLAND	Marie-Annick	LMFA	Acoustique	12 juillet 1993
PERKINS	Richard	LMFA	mécanique	20 février 1998
BAILLY	Christophe	LMFA	Acoustique	29 mars 1999
CARRIERE	Philippe	LMFA	Mécanique des Fluides	27 septembre 2000
SIMOENS	Serge	LMFA	Mécanique des Fluides	1 avril 2002
TREBINJAC	Isabelle	LMFA	mécanique	7 mai 2003
LE RIBAUT	Catherine	LMFA	Mécanique des Fluides	11 juillet 2003
LAKEHAL	Djamel	LMFA	mécanique, génie mécanique et civil	26 novembre 2004
GODEFERD	Fabien	LMFA	énergétique et thermique	13 décembre 2004
UHLMANN	Markus	LMFA	Thermique et Energétique	27 juin 2006
BOGEY	Christophe	LMFA	Acoustique	25 mai 2007
SHAO	Liang	LMFA	Mécanique	15 septembre 2007
NICOLLEAU	Franck	LMFA	mécanique, génie mécanique et civil	8 décembre 2009
BERTOGLIO	Jean-Pierre	LMFA	Doctorat d'Etat es Sciences	1 juin 1986
BIESHEUVEL	Arie	LMFA		
CAMBON	Claude	LMFA		
CHAMPOUSSIN	J-Claude	LMFA		
COMTE-BELLOT	Geneviève	LMFA	PR émérite	
BOS	Wouter	LMFA	Mécanique des Fluides	29 juin 2012

TOTAL LMFA : 9

JUVE	Denyse	LTDS	Doctorat d'Etat en Chimie	1983
JEZEQUEL	Louis	LTDS	Doctorat d'Etat	1985
LOUBET	Jean-Luc	LTDS	Doctorat d'Etat	1 décembre 1986
STREMSDOERFER	Guy	LTDS	chimie des matériaux	3 avril 1992
DONNET	Christophe	LTDS	PR ENISE	27 avril 1995
MAZUYER	Denis	LTDS	mécanique	27 avril 1995
SALVIA	Michelle	LTDS	matériaux	4 décembre 1997
CHOVELON	J.Marc	LTDS	matériaux	3 avril 1998
BOMBA	Cécile	LTDS	génie des matériaux	29 mai 1998
PONSONNET	Laurence	LTDS	matériaux	29 mai 1998
CHATEAUMINOIS	Antoine	LTDS	matériaux	22 janvier 1999
PERRET-LIAUDET	Joël	LTDS	mécanique	16 avril 1999
DUBUJET	Philippe	LTDS	PR ENISE	31 mars 2000
JEANDIN	Michel	LTDS	Matériaux Mécanique	20 mars 2001
THOUVEREZ	Fabrice	LTDS	mécanique	5 juillet 2001
WONG	Henry	LTDS	génie civil	8 janvier 2002
FOUVRY	Siegfrid	LTDS	Matériaux Mécanique	12 septembre 2002
LE BOT	Alain	LTDS	Acoustique	19 décembre 2002
BENAYOUN	Stéphane	LTDS	matériaux	9 décembre 2003
HERTZ	Dominique	LTDS	génie des matériaux	18 juin 2004
ICHCHOU	Mohamed	LTDS	mécanique	6 décembre 2004
GUERRET	Chrystelle	LTDS	milieux denses et matériaux	7 mars 2005
HOC	Thierry	LTDS	chimie des matériaux	19 novembre 2007
SINOUC	Jean-Jacques	LTDS	Mécanique	21 novembre 2007
VINCENS	Eric	LTDS	génie civil	17 novembre 2010
CAMBOU	Bernard	LTDS	PR émérite	
KAPSA	Philippe	LTDS		
MARTIN	Jean-Michel	LTDS	PR émérite	
SIDOROFF	François	LTDS	PR émérite	
VINCENT	Léo	LTDS	PR émérite	
CAYER-BARRIOZ	Juliette	LTDS	Mécanique	14 octobre 2012
DASSENOY	Fabrice	LTDS	Chimie théorique, physique, analytique	2 décembre 2011
DE BARROS BOUCHET	Maria Isabel	LTDS	Chimie des matériaux	12 décembre 2011
VALETTE	Stéphane	LTDS	milieux denses et matériaux	4 décembre 2012
TREHEUX	Daniel		PR émérite	

TOTAL LTDS : 15

Personnels ECL

Personnels CNRS

Personnels extérieurs

« Dans la vie, rien n'est à craindre, tout est à comprendre »

Marie Curie

« La connaissance s'acquiert par l'expérience,
tout le reste n'est que de l'information »

Albert Einstein

« When you understand the laws of physics, anything is possible.
And may I add Mwah, ha, ha »

Sheldon Cooper, The Big Bang Theory

A tous ceux qui veillent sur moi depuis le ciel

A tous ceux qui sont à mes côtés sur terre

Remerciements

Durant ces trois années de thèse, j'ai été accueillie au sein de l'Ecole Centrale de Lyon, dans l'Institut des Nanotechnologies de Lyon. Je tiens donc tout d'abord à remercier Mr Frank Debouck, directeur de l'Ecole Centrale de Lyon ainsi que Mme Catherine Bru-Chevallier et Mr Christian Seassal, directrice et directeur-adjoint de l'INL pour m'avoir ouvert les portes de leur établissement. Etant inscrite à l'Ecole Doctorale Matériaux, je remercie aussi Mr Jean-Yves Buffière, responsable de cette entité.

Je souhaite exprimer mes sincères remerciements à tous les membres de mon jury de thèse : Mme Karine Masenelli-Varlot, présidente du jury ainsi qu'à Mme Touria Cohen-Bouhacina et Mr Jean-Luc Pellequer qui ont eu la difficile tâche de rapporter mon manuscrit. Cela a été un grand honneur pour moi de présenter mes travaux de thèse devant vous. Je remercie aussi vivement Mr Sébastien Vidal et Mr Yann Chevolut, examinateurs de cette thèse. En plus d'être à l'origine de ce projet, vous avez, l'un comme l'autre, donné de votre temps pour répondre à mes nombreuses questions ou pour discuter des résultats expérimentaux. Merci pour votre présence, votre gentillesse, votre bonne humeur et votre implication à tous les deux.

Je tiens à remercier très chaleureusement Mme Magali Phaner-Goutorbe, ma directrice de thèse. Ce fut un réel plaisir de travailler avec vous pendant ces trois ans. Vous avez su me donner la liberté nécessaire pour que je fasse évoluer ce projet de thèse de mes propres initiatives, tout en étant là dans les moments difficiles. Peu de directeurs de thèse restent avec leur doctorant le vendredi soir pour suivre les manip. Merci donc pour votre présence, votre confiance et votre disponibilité toujours dans la bonne humeur. En dehors des salles de manip, vous m'avez aussi permis de participer à de nombreuses conférences nationales et internationales. Merci aussi pour cela.

Ce projet a été mené à bien grâce à plusieurs collaborations. Je remercie donc Mme Anne Imberty au Cermav (Grenoble), Mr François Morvan et Mr Jean-Jacques Vasseur de l'Institut des Biomolécules Max Mousseron (Montpellier) ainsi que Mr Sébastien Vidal et Mr Samy Cecioni à l'Institut de Chimie et Biochimie Moléculaire et Supramoléculaire (Lyon). Rien n'aurait possible sans le travail de vos équipes.

Je remercie infiniment Mme Eliane Souteyrand et toute l'équipe Chimie et Nanobiotechnologies : Virginie Monnier, Yann Chevolut, Magali Phaner-Goutorbe, Emmanuelle Laurenceau, Thomas Gehin, Isabel Nabeth, Jean-Pierre Cloarec, Liu Shi, Alice Goudot, Francisco Palazon, Amandine Cornillon, Richard Villey, Marie-Virginie Salvia, Rémy Beland et Maryline Diserio. Je n'oublie pas non plus les doctorants qui ont soutenu leur thèse et les post-doc : Jing Zhang, Zhugen Yang, Ning Sui, Marie Trévisan, Maksym Iazykov et Dimitri Charrier. J'ai eu la chance pendant trois ans de faire partie de cette équipe

du « 3^{ème} ». Se lever tous les matins en se disant qu'on va travailler dans la bonne humeur avec des personnes sympathiques et enthousiastes, ce n'est pas donné à tout le monde, je vous en remercie. Je vous mentirez si je disais que la pause-café de 10h et le repas de Noël avec le fameux « punch » ne me manqueront pas ! Je vous souhaite à tous une bonne continuation et une réussite dans vos projets professionnels et personnels. Je souhaite aussi bon courage aux doctorants pour la suite de leur thèse.

J'ai une pensée particulière pour Virginie et Isabel. Virginie, merci pour ta gentillesse et ta présence. Tu as été disponible pour répondre à mes questions en particulier pour l'enseignement, je t'en suis très reconnaissante. Isabel, mais qu'est-ce-que j'aurai fait sans toi ?! Dès que j'avais une question pratique je me dirigeais vers toi : « Isabel doit sûrement savoir où je peux trouver ce que je cherche ou quelle est la procédure à suivre ! » Un grand merci pour ton aide, ta gentillesse, ta présence et pour toutes nos discussions pas toujours professionnelles.

En plus de mon travail de recherche, j'ai participé, pour mon plus grand plaisir, à l'enseignement à l'Ecole Centrale de Lyon en tant que monitrice. Je remercie tout d'abord Mr Yves Robach pour m'avoir accueilli au sein du département Sciences et Technologies des Matériaux et des Surfaces (STMS). J'ai aussi eu l'occasion de partager de nombreuses discussions avec les membres de l'équipe d'enseignement Physique-Chimie : Guy Stremsdoerfer, Naoufel Haddour, Vanessa Belaud, Bertrand Vilquin, José Penuelas, Emmanuel Drouard, Ségolène Callard, Christelle Monat,... Cela a été un plaisir de travailler avec vous tous. Je pense aussi à tous les élèves de Centrale à qui j'ai eu la chance d'enseigner. J'espère qu'ils auront appris autant que moi j'ai appris de cette fabuleuse expérience.

Je voudrais exprimer toute ma gratitude aux personnels administratifs, plus particulièrement à Mme Françoise Minjard-Leynard, responsable de la scolarité 3^{ème} cycle à l'Ecole Centrale, Mme Meriem Dahmani à l'Ecole Doctorale Matériaux et à Mme Nicole Durand, Mme Patricia Dufour et Mme Thérèse Martin à l'INL. Je souhaite aussi remercier Mr Raphaël Lopez pour avoir fait preuve de patience envers moi lors de mes appels affolés pour cause de problème informatique.

Un merci tout particulier à Mme Sylvie Goncalves. Sylvie, je t'ai surnommé affectueusement, comme tu le sais, « maman-cougar ». Tu as toujours été présente pour moi avec une oreille attentive que ce soit pour mes « anecdotes du jour » ou pour mes moments de doute. Je me rappelle nos discussions passionnantes et nos « séances de bizutage » des petits nouveaux. Je dois dire que j'ai rencontré un jour dans un couloir une nouvelle personne de l'administration de l'INL et que je repars aujourd'hui de ce laboratoire avec une amie !

Je remercie aussi tous les autres membres de l'Ecole Centrale de Lyon et de l'Institut des Nanotechnologies de Lyon, permanents et non-permanents.

Durant ces trois années, de nombreux stagiaires ont pris part à mon travail : Camille Girard-Bock, Aude Couturier, Aude Daniel, Amandine Jaillon, Clément Neri, Vincent Barellon, Barbara Lynch et Hélène Tarissi. Je vous remercie pour votre implication et votre sérieux à tous dans vos projets respectifs. J'espère pour ma part vous avoir montré et transmis mon enthousiasme pour la recherche académique.

Je voudrais également remercier Mr Aziz Benamrouche pour m'avoir souvent aidé avec les AFM.

Au cours de ma première année de thèse, deux stagiaires sont arrivées dans notre équipe et je n'aurai jamais imaginé qu'elles deviendraient un jour deux proches amies. Alice et Mélanie, « Bichette » et « Bibiche », sans vous deux, ces années n'auraient jamais été les mêmes. Merci pour toutes ces discussions, ces massages de la tête et ces week-ends mémorables°!!

Ces trois années ont été marquées par de nombreuses expériences mais pas uniquement à la paillasse. Avec Alice Goudot, Florian Bremond et Samuel Mambingo-Doumbe, nous nous sommes lancés dans l'aventure ECLAT. J'ai ainsi eu l'honneur et le privilège d'être la présidente de l'association des doctorants de l'Ecole Centrale de Lyon. Notre objectif principal a été de créer et de renforcer les liens amicaux entre les 220 doctorants de l'Ecole Centrale. Cela a donné lieu à de nombreuses rencontres. Je pense notamment à Imen, Felipe, Jean-Baptiste, Lamis, Sophia, Benoît, Alexis, Patricio, Gaylord, Olivier, Jérémie, Flavien, Fabien, Sophie, Osman, Fida, Nicolas, Benjamin, Nabil, Cyrielle, Laura, Hervé, Mihai, Keny, Fipi,... Je vous souhaite à tous une bonne continuation dans votre thèse et vos vies respectives.

Je ne pouvais pas évoquer ECLAT sans remercier personnellement Romain et Florian, « Ex-Prez » et « Co-Prez » de l'association. Je me rappelle notre séance de tournage pour la vidéo de passation du bureau... Un grand moment !! Sans oublier pour autant les barbec, les réunions du bureau, les vendredi midi,...

J'ai aussi pu découvrir les joies du foot en salle du vendredi midi. Je dois avouer que même après plus de deux ans de foot hebdomadaire, je ne suis toujours pas capable de courir avec un ballon entre les pieds mais j'ai passé des moments formidables ! Merci donc à tous mes co-équipiers : Romain, Florian, Patricio, Gaylord, Olivier, Alice, Jérémie, Flavien, Michaël, Miguel, André, Fabien, Samuel, Keny, Sophie, Laura,...

Je voudrais remercier ici particulièrement Patricio. Nos discussions sur le retour de Centrale, nos sorties ciné ou encore nos balades nocturnes dans les rues de Lyon vont vraiment me manquer. Ma période de rédaction n'a pas toujours été facile et tu as toujours su m'écouter et te rendre disponible quand je voulais aller me changer les idées. Merci infiniment !

L'étape de rédaction est un moment particulier dans la vie d'un doctorant. Pour ne pas rentrer dans les détails, je dirais que c'est une période intense... Je voudrais remercier trois de mes collègues qui ont vécu cette période en même temps que moi : Imen, Felipe et Benoît. J'espère vous avoir encouragé et aidé autant que vous l'avez fait pour moi. Je n'ajouterais que cela : « On a gagné !! ».

Bien sûr, rien de tout cela n'aurait été possible sans mes parents que je remercie de tout mon cœur. Ils ont su m'apporter le meilleur pour que je puisse aller le plus long possible. C'est par leur amour et leur soutien de tous les jours que j'en suis là aujourd'hui. Merci encore infiniment à tous les deux. Je ne le dis sûrement pas assez mais je vous aime fort. Je joins aussi à ces remerciements mes grand-mères et l'ensemble de ma famille qui m'ont témoigné leur soutien jusqu'au bout.

Un grand merci à mes amis de longue date : Estelle, Loïc, Audrey, Clément, Sébastien, Antoine, Zalpha, Yasmine,... Même éloigné et pris par nos vies respectives, vous avez pris le temps de prendre de mes nouvelles et pour certains même venir me voir dans cette belle ville qu'est Lyon.

A cela, s'ajoute mes rencontres « lyonnaises » : Julien qui m'a ouvert les portes de Gerland, Mickaël et cet univers si étrange qu'est Science Po, l'équipe du « Gang des Quenelles », vous

avez égayé mes mardi soir par nos improvisations théâtrales, une aventure que je n'oublierai pas, et enfin Nicolas qui m'a fait découvrir Centrale sous un autre angle.

Je voudrais aussi remercier particulièrement Mathieu. Si tu lis ces quelques lignes, je suis sûre que tu vas te demander pourquoi tu as droit à un paragraphe à toi tout seul ! Il y a des personnes qui m'ont accompagné tout au long de cette thèse mais il y a aussi des personnes qui m'ont amené jusqu'à cette thèse. Tu fais partie de cette deuxième catégorie. Sans tes encouragements et ton soutien pour postuler à cette thèse, je n'en serai pas là aujourd'hui. Tu avais raison, Lyon est une ville où on se plait d'y vivre !

En écrivant mes remerciements, je me remémore les paroles qu'une personne actuellement professeur d'université qui m'a dit un jour que je n'avais pas les qualités nécessaires pour faire une thèse. Je crois bien que ce manuscrit démontre qu'elle avait tort...

Tout comme Bernard Werber l'indique dans ses livres, j'ai écrit une grande partie de ma thèse en écoutant les albums d'Adèle, d'Emeli Sandé, de Jean-Jacques Goldman et d'un grand nombre de musique de film et de série. Merci donc au site youtube.com.

J'ai toujours dit aussi que je remercie dans ma thèse l'inventeur d'un outil fantastique qu'est le scotch. Cela surprend toujours les gens puisque c'est un objet du quotidien mais je suis sûre qu'il a sauvé bien des manip. Voilà chose faite !

Quand je lis une thèse, mon premier réflexe est de regarder les remerciements. Je crois qu'on apprend beaucoup de chose sur la personne qui les a écrits. Du coup, quand je vois que j'ai écrit plus de trois pages, je me demande ce qu'on va dire de moi. Sûrement que je suis une grande bavarde avec un brin d'humour ! Et bien si c'est le cas, je crois qu'on ne sera pas loin de la vérité !

Encore un grand merci à vous tous !

Nomenclature

A	Amplitude d'oscillation du levier (nm)
A_H	Constante d'Hamaker (J)
A_{libre}	Amplitude libre, amplitude d'oscillation loin de la surface (nm)
A_{sp}	Valeur d'amplitude déterminée par la boucle d'asservissement (setpoint) (nm)
A_0	Amplitude d'oscillation du levier à la résonance (nm)
AFM	Microscope à force atomique (Atomic Force Microscope)
a	Rapport d'amplitude A/A_{libre}
C	Constante spécifique aux matériaux
CU	Unité de contrôle
c_0	Concentration en sel (mol/L)
D	Distance entre la pointe et la surface (m)
d	Distance entre deux objets (m)
d_{hkl}	Plan réticulaire d'indice (hkl)
E	Module de Young (Pa)
E_{vdw}	Energie de Van der Waals (J)
$ELISA$	Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay
$ELLA$	Enzyme-Linked Lectin Assay
e_c	Concentration de l'électrolyte (mol/L)
F	Force (N)
F_{cap}	Force capillaire (N)
F_{DLVO}	Force DLVO (N)
F_{el}	Force électrostatique (N)
F_{vdw}	Force de Van der Waals (N)
F_{ts}	Force d'interaction pointe-surface (N)
F_0	Force excitatrice du levier (N)
FI_{max}	Valeur de la fluorescence maximale
HIA	Hemagglutination Inhibition Assay (inhibition de l'hémagglutination)
h	Constante de Planck ($6,626 \cdot 10^{-34}$ J s) ; hauteur du rectangle, trou ou rainure (m)
h'	Hauteur apparente du rectangle, trou ou rainure (m)
I_{PSD}	Courant de la photodiode (A)
IC_{50}	Half Maximal Inhibitory Concentration (concentration inhibitrice médiane)
ITC	Isothermal Titration Calorimetry (microcalorimétrie de titration isotherme)
J_T	Courant tunnel (A)
K_a	Constante d'association (L/mol)
K_d	Constante de dissociation (mol/L)
k_B	Constante de Boltzmann ($1,381 \cdot 10^{-23}$ J/K)
k_C	Constante de raideur du levier (N/m)
k_e	Constante de raideur effective du levier (N/m)
L	Longueur du levier (m) ; longueur de la pointe (m)

<i>MIC</i>	Minimum Inhibitory Concentration (concentration minimale d'inhibition du sucre)
<i>m_c</i>	Masse du levier (g)
<i>m_t</i>	Masse de la pointe (g)
<i>m[*]</i>	Masse effective du système levier-pointe (g)
<i>N_a</i>	Nombre d'Avogadro ($6,0221 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1}$)
<i>n</i>	Nombre entier
<i>OPD</i>	<i>Ortho</i> -phenylènediamine
<i>P_d</i>	Pression de disjonction
<i>P_X</i>	Système piézoélectrique assurant le mouvement dans la direction <i>x</i>
<i>P_Y</i>	Système piézoélectrique assurant le mouvement dans la direction <i>y</i>
<i>P_Z</i>	Système piézoélectrique assurant le mouvement dans la direction <i>z</i>
<i>Q</i>	Facteur de qualité du levier
<i>q</i>	Paramètre du mouvement
<i>R</i>	Constante des gaz parfaits ($8,314 \text{ J/mol.K}$) ; rayon de courbure de la pointe (m) ; rayon de sphère (m)
<i>RMS</i>	Rugosité de la surface (Root Mean Square) (m)
<i>RU</i>	Unité de résonance
<i>r</i>	Distance moyenne entre deux molécules 1 et 2 (m)
<i>SPR</i>	Surface Plasmon Resonance (résonance plasmonique de surface)
<i>T</i>	Température (K)
<i>t</i>	Temps (s)
<i>t_C</i>	Epaisseur du levier (m)
<i>V_{LJ}</i>	Energie potentielle de Lennard-Jones (J)
<i>V_p</i>	Tension appliquée par le système piézoélectrique (V)
<i>V_T</i>	Tension tunnel (V)
<i>V₀</i>	Différence de potentiel (V)
<i>W_{//}</i>	Energie d'interaction par unité de surface (J/m)
<i>w</i>	Largeur du levier (m) ; largeur du rectangle, trou ou rainure (m)
<i>w'</i>	Largeur apparente du rectangle (m)
<i>X</i>	Coordonné horizontale qui prend son origine à la base du levier (m)
<i>Z_C</i>	Déflexion à l'extrémité du levier (m)
<i>Z_P</i>	Position verticale du système piézoélectrique (m)
<i>Z(X)</i>	Déflexion du levier à la position <i>X</i> (m)
<i>α_{e1}, α_{e2}</i>	Polarisabilité électronique de molécules ($\text{C}^2 \cdot \text{m}^2/\text{J}$)
<i>α₀</i>	Angle d'ouverture du levier triangulaire (°)
<i>Γ</i>	Coefficient d'amortissement effectif
<i>γ_L</i>	Energie de surface de l'eau (J/m^2)
<i>ΔH</i>	Enthalpie (J)
<i>Δh</i>	Hauteur relative entre les deux objets (m)
<i>ΔG</i>	Enthalpie libre (J/mol)
<i>ΔS</i>	Entropie (J/mol.K)
<i>Δz</i>	Distance verticale entre le haut des objets et l'intersection des deux traits en pointillé (m)
<i>δ</i>	Indentation (m)
<i>ε</i>	Constante diélectrique du milieu ; profondeur du puits de potentiel (eV)
<i>ε₀</i>	Constante diélectrique du vide ($8,854 \cdot 10^{-12} \text{ F/m}$)
<i>θ</i>	Angle de demi-ouverture du cône pour une pointe conique (°), Angle d'incidence (°)
<i>κ</i>	Courbure du ménisque
<i>λ</i>	Longueur d'onde (m)
<i>λ_D</i>	Longueur de Debye (m)

λ_0	Densité de charge (C/m)
μ	Moment dipolaire (J/mol)
ν	Ratio de Poisson
ν_e	Fréquence électronique d'absorption (Hz)
ν_0	Fréquence de résonance du levier (Hz)
ρ	Densité du matériau du levier (kg/m^3) ; Nombre d'atomes par unité de volume ($1/\text{m}^3$)
σ	Distance à laquelle la force est égale à zéro (m)
σ_s, σ_t	Densité de charge de surface de l'échantillon et de la pointe (C/m^2)
ϕ	Différence de phase entre la force motrice et le mouvement du levier
ϕ_i	Angle intérieur formé entre la pointe et le ménisque ($^\circ$)
ϕ_{libre}	Valeur de la phase du déplacement de l'oscillateur loin de la surface ($^\circ$)
ω	Fréquence du levier (Hz)
ω_e	Fréquence effective du levier (Hz)
ω_r	Fréquence de résonance angulaire du levier influencée par l'effet d'amortissement (Hz)
ω_0	Fréquence de résonance angulaire du levier avec $\omega_0 = 2\pi\nu_0$ (Hz)
[FI]	Valeur de la fluorescence
[L], [R], [LR], [Lectine]	Concentration du ligand, du récepteur, du complexe ligand/récepteur et des lectines respectivement (mol/L)

Table des matières

Introduction générale.....	3
I. Chapitre 1 – Introduction aux interactions lectine/sucre.....	5
I.1 Les sucres.....	5
I.1.1 Les glucides.....	5
I.1.2 Les glycoconjugués.....	8
I.2 Les lectines.....	9
I.2.1 Généralité.....	10
I.2.2 Classification, rôles et applications.....	11
I.3 L'interaction lectine-sucre.....	13
I.3.1 Les notions de base.....	13
I.3.2 Les liaisons fondamentales dans l'interaction.....	14
I.3.3 Effet de la multivalence.....	15
I.4 Les méthodes de caractérisation.....	16
I.4.1 Mesures d'affinité avec le sucre.....	16
I.4.2 Données thermodynamiques de l'interaction.....	23
I.4.3 Arrangement structural du complexe lectine-sucre.....	25
I.5 Le cas étudié : la lectine PA-IL de la bactérie Pseudomonas aeruginosa et les glycoclusters galactosylés.....	26
I.5.1 Généralité sur la bactérie Pseudomonas aeruginosa.....	26
I.5.2 La lectine PA-IL.....	28
I.5.3 Vers une nouvelle approche thérapeutique.....	30
I.5.4 Les glycoclusters étudiés.....	31
Références.....	38
II. Microscopie à force atomique.....	41
II.1 Principe général.....	41
II.1.1 Historique : du profilomètre à stylet au microscope à force atomique.....	41
II.1.2 Description générale du microscope à force atomique et de ses composants.....	44
II.2 Forces d'interaction.....	49
II.2.1 Propriétés mécaniques du levier.....	49
II.2.2 Mesure et courbe de force.....	51
II.2.3 Forces à longue portée.....	55
II.2.4 Forces à courte portée.....	57
II.2.5 Force en milieu liquide.....	58

II.3	<i>Modes d'imagerie</i>	59
II.3.1	Contact.....	60
II.3.2	Contact intermittent.....	61
II.3.3	Non-contact	61
II.4	<i>Le mode dynamique AM-AFM</i>	62
II.4.1	Approximation harmonique.....	62
II.4.2	Comportement oscillant dans un régime linéaire	63
II.4.3	Comportement oscillant dans un régime non linéaire	65
II.5	<i>Présentation de notre système expérimental</i>	69
II.5.1	Nos microscopes à force atomique.....	69
II.5.2	Pointes AFM.....	71
II.5.3	Substrat de mica	72
II.5.4	Artéfact d'image et anomalies de mesure.....	74
II.6	<i>Principales études par AFM sur les lectines et leur arrangement avec des glycoconjugués</i>	77
II.6.1	Etudes sur les lectines.....	77
II.6.2	Etude sur les lectines et les sucres	79
Références		83
III.	Chapitre 3 - Résultats expérimentaux.....	87
III.1	<i>Etude de la lectine PA-IL à l'air</i>	87
III.1.1	Chlorure de calcium déposé sur mica.....	88
III.1.2	Influence de la concentration.....	90
III.1.3	Influence du mode de séchage.....	95
III.1.4	Influence de la présence des ions Ca ²⁺	98
III.2	<i>Arrangement lectine PA-IL/glycoconjugué au cœur en calix[4]arène.....</i>	101
III.2.1	Influence de la concentration en glycoconjugué	101
III.2.2	Arrangement en filament.....	107
III.3	<i>Arrangement avec d'autres glycoclusters.....</i>	112
III.3.1	Etude avec le glycocluster au cœur en porphyrine : sucre2	113
III.3.2	Etude avec le glycocluster au cœur en mannose : sucre3	118
III.3.3	Comparaison des trois complexes lectine PA-IL/glycocluster.....	122
III.4	<i>Etude de la lectine PA-IL en milieu liquide</i>	125
III.4.1	Détermination du milieu d'observation.....	125
III.4.2	Expériences sur les lectines PA-IL.....	130
Références		136
Conclusion générale et perspectives		139

Introduction générale

La bactérie *Pseudomonas aeruginosa* est un pathogène opportuniste. Elle est à l'origine de nombreuses infections chez les personnes immunodéprimées : infections pulmonaires chez les personnes atteintes par la mucoviscidose, maladies nosocomiales, infections de la peau pour les grands brûlés, ... Actuellement, pour lutter contre ce pathogène, le traitement administré aux malades est sous forme d'antibiotique. Or, la bactérie a développé des souches résistantes à ce type de traitement. De nouvelles voies thérapeutiques sont actuellement en cours de développement pour compléter ce traitement et permettre ainsi la guérison des malades.

Une des approches envisagées consiste à empêcher l'adhésion du pathogène aux cellules épithéliales. Dans son processus d'adhésion, *P. aeruginosa* utilise ses lectines pour se lier, de manière spécifique et réversible, aux glycoconjugués des cellules-hôtes. L'interaction lectine/glycoconjugué sert alors de point d'ancrage au pathogène. Pour *P. aeruginosa*, la lectine tétravalente PA-IL est une des lectines impliquées dans ce mécanisme d'adhésion.

L'approche thérapeutique réside dans l'élaboration de nouvelles molécules glycosylées (glycomimétiques) capables d'inhiber l'interaction lectine PA-IL/glycoconjugué. En particulier, la géométrie de ces sucres doit être optimisée afin que l'interaction lectine/glycomimétique soit favorisée. La multivalence de la lectine laisse à penser que l'utilisation de glycomimétiques multivalents sera une solution appropriée pour inhiber l'interaction lectine/glycoconjugué.

Sur cette problématique, une collaboration a vu le jour entre notre équipe de recherche et les équipes "Chimie organique 2 – Glycochimie" de Jean-Pierre Praly (Institut de Chimie et Biochimie Moléculaire, Université de Lyon) et "Oligonucléotides modifiés" de Jean-Jacques Vasseur (Institut des Biomolécules Max Mousseron, Université de Montpellier) afin d'élaborer, dans un premier temps, de nouvelles structures glucidiques multivalentes, puis, dans un second temps, de caractériser leur interaction avec la lectine PA-IL. La synthèse de glycoclusters a été plus particulièrement recherchée. L'interaction entre les glycoclusters synthétisés et la lectine PA-IL a été analysée par plusieurs méthodes de caractérisation (ITC, ELLA, SPR, HIA, puce à sucre, ...) afin de déterminer le (ou les) glycomimétique(s) ayant la meilleure affinité avec la lectine PA-IL.

Dans ce contexte, il nous est apparu qu'aucune de ces techniques de caractérisation ne permettaient de visualiser les complexes lectine/glycocluster formés par l'interaction. Or, ce type d'observation apporterait des éléments de réponse concernant la formation des complexes, autrement que par la modélisation moléculaire ou par la valeur de stœchiométrie estimée par ITC. L'arrangement même de ces complexes entre eux pourrait être observé.

Au sein de notre équipe de recherche, des compétences en microscopie à force atomique sur objets biologiques et couches organiques ont été développées depuis plusieurs années. Parmi le panel de microscopies utilisées pour des applications biologiques, la microscopie à force atomique nous ait paru être la caractérisation appropriée pour ce genre d'étude. Elle permet l'observation de structure à l'air ou en milieu liquide sans dégradation majeure de l'échantillon et avec une résolution de l'ordre du nanomètre ce qui correspond aux dimensions des entités biologiques qui nous intéressent ici.

Ce travail de thèse traite donc de l'étude par microscopie à force atomique de l'arrangement de complexes lectine/sucre formés par la lectine PA-IL de *P. aeruginosa* avec des glycoclusters tétravalents. Nous nous sommes particulièrement intéressés à l'influence de la structure de cœur du glycocluster sur la formation et l'arrangement des complexes.

Le premier chapitre de ce manuscrit de thèse rappelle les notions fondamentales sur les sucres et les lectines. Nous aborderons l'interaction lectine/sucre et les méthodes d'analyse employées généralement pour caractériser l'interaction. Enfin, nous décrirons avec plus de précision le contexte scientifique dans lequel s'inscrit ce travail de recherche et les entités biologiques utilisées.

La microscopie à force atomique sera abordée dans le deuxième chapitre. Après la description générale de son fonctionnement, nous nous intéresserons aux forces engagées dans l'interaction pointe/surface. Nous expliquerons les différents modes de fonctionnement du microscope en insistant particulièrement sur le mode dynamique AM-AFM. Nous discuterons ensuite de notre système expérimental. Pour finir, nous présenterons les principales études faites par AFM sur les lectines et leur interaction avec des glycomolécules développées dans la littérature.

Le troisième et dernier chapitre sera dédié à nos résultats expérimentaux. En étude préliminaire, nous nous intéresserons uniquement à la lectine PA-IL. Nous discuterons de nos choix dans l'élaboration du protocole expérimental. Nous étudierons ensuite l'arrangement des complexes lectine/glycocluster pour trois sucres différents. Nous comparerons les arrangements obtenus par rapport à la structure de cœur des glycoclusters. Enfin, nous avons cherché à imager la lectine PA-IL en milieu liquide. Nous expliquerons les conditions expérimentales nécessaires.

Enfin, en conclusion, nous présenterons des perspectives envisagées pour la poursuite de ce travail.

Chapitre 1

Introduction aux interactions lectine/sucre

Dans ce premier chapitre, nous présenterons les entités biologiques concernés. Après un rappel général sur les sucres et les lectines, l'interaction lectine/sucre est abordée ainsi que les méthodes utilisées pour la caractériser. Enfin, nous décrirons les entités biologiques propres au système étudié et présenterons le contexte scientifique dans lequel s'inscrit notre projet.

I.1 Les sucres

Que ce soit par leur structure moléculaire ou leur fonction, il existe des différences entre les entités que nous appelons "sucre". Dans cette partie, nous allons préciser les termes attribués aux domaines de la chimie et de la biologie en allant des molécules les plus élémentaires aux plus complexes.

1.1.1 Les glucides

En chimie, le terme "sucre" désigne les glucides, appelés aussi saccharides ou encore hydrates de carbone. Ces molécules organiques, de formule brute $C_n(H_2O)_p$, sont composées d'une chaîne polyhydroxylée contenant une insaturation avec une fonction aldéhyde (-CHO) ou cétone ($>C=O$). Suivant la fonction, on a, pour une forme linéaire, des aldoses (polyhydroxy-aldéhydes) ou des cétooses (polyhydroxy-cétones) (Figure I.1).

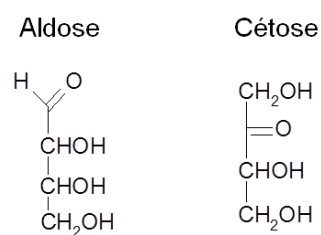


Figure I.1 Exemples d'aldose et de cétose en forme linéaire.

En tenant compte du nombre de monomères dont sont composés les glucides, on peut définir quatre catégories :

- Les *monosaccharides* sont formés d'un seul monomère (ou entité). Dans le cas de ces sucres simples, appelés aussi oses, la chaîne est composée de 3 à 7 atomes de carbone (Figure I.2 (a)). Le nombre de carbone dans la chaîne est d'ailleurs une autre manière de classer ces sucres. La numérotation des carbones commence à partir du carbone le plus oxydé (Figure I.2 (b)). Les sucres les plus stables chimiquement ont des chaînes de cinq ou six carbones.

(a)	Nombre de carbone	Nom	(b)	$\text{H} \quad \text{O}$	(1)
	3	Triose			(2)
	4	Tétrade			(3)
	5	Pentose			(4)
	6	Hexose			(5)
	7	Heptose			(6)
					(7)
				CH_2OH	

Figure I.2 (a) Nomination des sucres suivant le nombre d'atomes de carbone dans la chaîne.
 (b) Exemple de numérotation des carbones pour un heptose.

Dans le cas des hexoses, pour une même formule chimique $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$, les quatre carbones asymétriques amènent à la formation de huit molécules diastéréoisomères¹ (Figure I.3) ayant chacune un énantiomère² (L-hexose). D'un point de vue physico-chimique, deux énantiomères ont les mêmes propriétés. Au niveau biologique cependant, les deux énantiomères d'une molécule peuvent avoir des effets physiologiques différents voire totalement opposés. La stéréochimie et la fonctionnalisation de chaque atome de carbone a donc une importance dans la molécule de sucre.

¹ Diastéréoisomère : Molécules ayant le même enchaînement d'atomes mais n'étant ni superposables, ni image l'une de l'autre dans un miroir.

² Enantiomère : Molécules étant l'image l'une de l'autre dans un miroir mais non superposables.

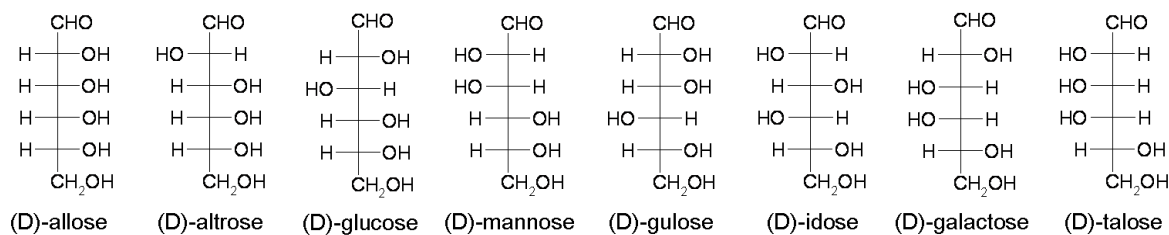


Figure I.3 Hexoses linéaires.

En plus de la stéréoisomérisation, il est possible que la molécule se mette sous la forme d'un cycle avec l'attaque d'un oxygène sur la fonction aldéhyde. Cette réaction peut former un cycle impliquant quatre carbones, appelé furanose, ou cinq carbones, nommé pyranose (Figure I.4). La numérotation des carbones dans le cycle est indiquée sur la Figure I.4. Cette forme cyclique est largement majoritaire en solution. Cependant, la forme de la molécule, qu'elle soit linéaire ou en cycle, est fortement dépendante des conditions expérimentales telles que la température et les cations présents dans la solution.

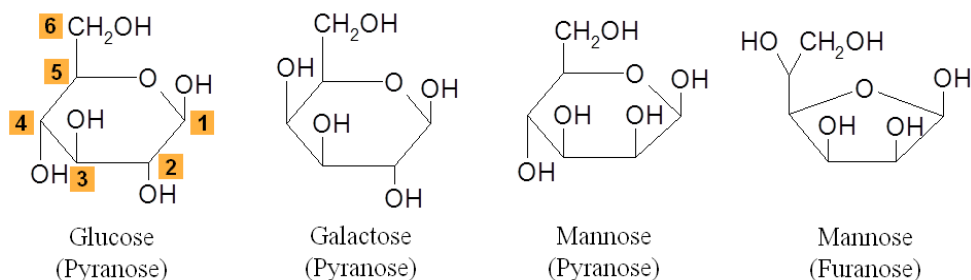


Figure I.4 Structure du glucose, galactose et mannose en forme cyclique. Numérotation des carbones dans le cycle sur le monomère de glucose.

En ce qui concerne la représentation de la molécule, plusieurs conformations sont possibles. Tout dépend de la représentation choisie : la projection de Fisher, d'Haworth ou en « chaise » (pour les pyranoses) (Figure I.5). Pour les deux dernières, elles sont spécifiques aux structures cycliques.

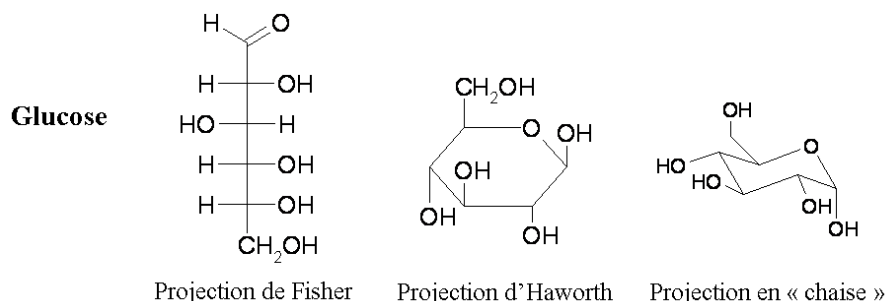


Figure I.5 Projection de Fisher, d'Haworth et en « chaise » du glucose.

▪ Les *disaccharides* sont composés de deux monosaccharides liés entre eux par une liaison covalente, appelé liaison glycosidique. On peut citer pour exemple le lactose qui est

l'association d'un monomère de galactose et d'un de glucose, ou encore le saccharose (sucre de table) composé de glucose et de fructose (avec une fonction cétose) (Figure I.6).

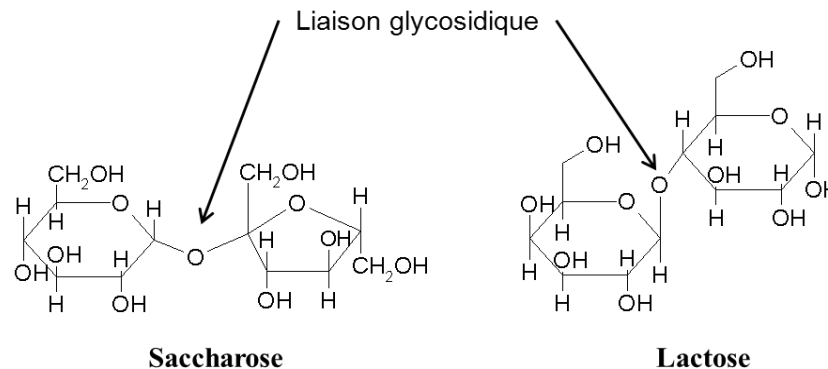


Figure I.6 Structures du saccharose et du lactose.

La liaison glycosidique entre les deux monomères peut se faire entre la position anomère³ du sucre donneur et plusieurs positions du sucre accepteur (position (2), (3), (4) et (6) des carbones pour les hexopyranoses et (2), (3), (5) et (6) pour les hexofuranoses). Par exemple, un glucose se liant à un autre glucose donne onze isomères structuraux différents. Cela montre la grande diversité structurale des glucides avec de nombreux points de ramification.

- On définit les *oligosaccharides* comme des molécules contenant jusqu'à vingt monosaccharides. Pour un enchaînement de six hexoses, plus de 10^{12} isomères sont possibles, ce qui montre la complexité et la diversité des structures [Laine 1994].

- Les *polysaccharides* forment des structures très complexes avec une taille et un nombre de résidus plus importants.

D'un point de vue biologique, le glucose est le "carburant" dans le monde du vivant. On le trouve en abondance, que ce soit dans les fruits ou le miel. Sous forme de polysaccharide, il est un composé essentiel à l'alimentation humaine. En polymérisant, il forme la cellulose, principal constituant des végétaux. Le galactose et le mannose se combinent avec d'autres monosaccharides pour constituer par exemple du lactose ou des molécules bien plus complexes comme les glycoprotéines.

1.1.2 Les glycoconjugués

Chez l'homme, les sucres sont présents sous différentes formes : mono-, oligo-, polysaccharides et aussi les glycoconjugués. Ces derniers sont des molécules associant de façon covalente une partie glucidique (mono- ou oligosaccharide) à une partie non glucidique appelée aglycone. Généralement, les glycanes⁴ se lient aux protéines ou aux lipides, formant

³ Position anomère : pour une configuration de monomère en cycle, il s'agit du carbone (1) pour les aldoses et du carbone (2) pour les cétoses.

⁴ Glycane : glucides sous forme de chaîne, reliés entre eux par une liaison glycosidique.

des glycoprotéines ou des glycolipides (Figure I.7). Dans le cas des protéines, une liaison O- ou N-glycosidique s'établit entre la chaîne de glucides et l'aglycone.

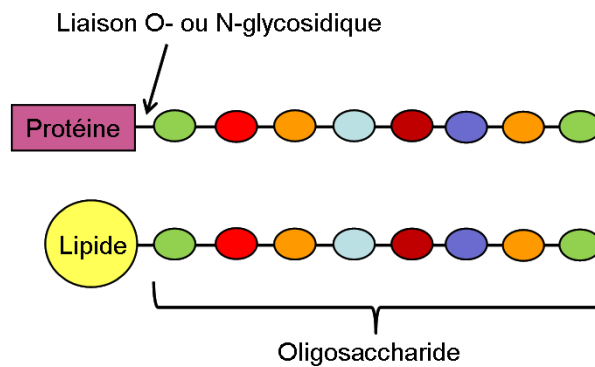


Figure I.7 Représentation schématique d'une glycoprotéine et d'un glycolipide.

Les glycoconjugués ont une grande importance en biologie. Ils jouent un rôle dans la structuration, la stabilisation et la protection de la cellule [Varki 1993]. Les cellules étant recouvertes de glucides, les oligosaccharides sont déterminants dans les interactions cellule-cellule. Dans le processus d'adhésion des virus, bactérie et autres parasites, ils sont aussi des récepteurs spécifiques. On parle alors d'interaction protéine-sucre.

I.2 Les lectines

Les lectines, situées à la surface des cellules ou des microorganismes ont un rôle de reconnaissance (Figure I.8). Dans leur stratégie d'adhésion, les microorganismes utilisent ces protéines spécifiques comme premier point d'accroche sur la cellule-hôte par l'intermédiaire des glycoconjugués. Dans ce paragraphe, nous présenterons de manière générale les lectines avant de les classer et de définir plus spécifiquement leurs rôles biologiques.

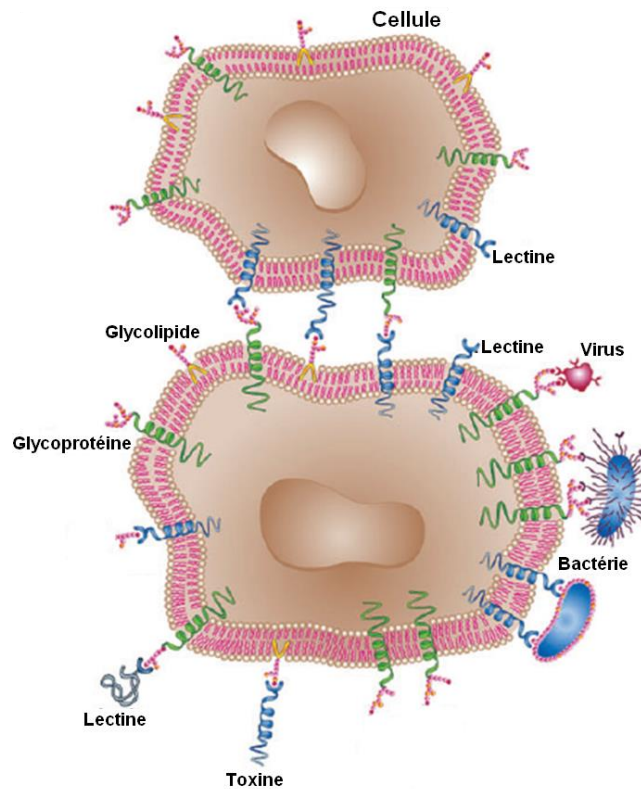


Figure I.8 Représentation schématique de l'interaction lectine-glycoconjugué. L'accroche entre deux cellules se fait par une reconnaissance mutuelle des lectines aux glycoconjugés de ces deux cellules. De même, les lectines des bactéries et des virus ainsi que les toxines se lient aux glycoconjugés (glycolipides et glycoprotéines) de la cellule. La reconnaissance des bactéries par la cellule se fait aussi par l'intermédiaire des lectines [Sharon 2004].

1.2.1 Généralité

Les lectines sont définies comme des protéines capables de reconnaître et de se lier de façon non-covalente à des sucres (mono- ou oligosaccharides) de manière réversible et avec une grande spécificité, sans pour autant les modifier [Kocourek 1981]. Elles n'ont pas d'activité enzymatique et ne sont pas dues à une réponse immunitaire. De plus, elles peuvent interagir avec des hématies pour provoquer leur agglutination (réticulation et précipitation) [Goldstein 1980]. Cette caractéristique des lectines, appelée hémagglutination, est souvent utilisée pour déterminer son affinité avec un sucre [Lis 1998].

Ces protéines sont présentes dans tout le règne du vivant : chez les micro-organismes (bactéries, virus, levures, champignons), chez les végétaux et chez les animaux. Ce caractère ubiquitaire⁵ indique une grande diversité de structure suivant l'organisme auquel elle appartient. La localisation et le rôle biologique diffèrent aussi selon l'origine de la lectine.

L'affinité entre la lectine et son ligand⁶ (mesurée à partir de la constante de dissociation K_d) est généralement assez faible, de l'ordre du millimolaire [Lee 2000]. De plus, l'interaction est très sélective avec peu de substitutions autorisées. Une lectine spécifique du galactose, ne peut pas interagir avec du mannose ou du glucose et inversement. Pour donner

⁵ Ubiquitaire : que l'on trouve partout.

⁶ Ligand : molécule qui se lie de manière spécifique et non-covalente à une macromolécule cible telle que les protéines ou l'acide nucléique.

une affinité fonctionnelle nécessaire entre la lectine et son ligand, plusieurs phénomènes ont été mis en évidence [Lis 1998]. Tout d'abord, la lectine est un récepteur généralement multivalent, présentant plusieurs sites de reconnaissance. En augmentant sa région d'interaction, elle peut interagir avec plusieurs monosaccharides à la fois, qu'ils soient isolés ou sur un même oligosaccharide [Merritt 1994]. Plusieurs sites de liaisons identiques peuvent aussi se regrouper en oligomère de protéines. Cette macromolécule peut alors se lier simultanément à des bras espacés d'un oligosaccharide. Dans les deux cas, c'est l'augmentation du nombre de liaisons qui renforce l'interaction entre les deux, on parle alors de l'« effet cluster » [Lundquist 2002].

1.2.2 Classification, rôles et applications

Les lectines ont une grande diversité que ce soit au niveau de leur origine, de leur structure ou de leur fonction ou affinité. Si l'on souhaite classer des lectines, ces caractéristiques peuvent être des critères de classement. Voici des exemples de classification réalisées :

- Lis et Sharon ont établi un classement basé sur l'affinité de la lectine à un des cinq monosaccharides suivant : mannose, galactose/N-acétylgalactosamine, N-acétylglucosamine, fucose et l'acide sialique [Lis 1998]. La pertinence de ce classement vient du fait que ces monosaccharides naturels sont les constituants de surface des cellules. Cependant, cette méthode oublie que certaines lectines se lient uniquement aux oligosaccharides.
- En prenant en compte cette dernière remarque, on peut créer deux groupes : un premier pour les lectines reconnaissant les monosaccharides et un deuxième pour celles qui ont une affinité avec les oligosaccharides [Sharon 2003].
- En se référant à leur structure, on peut répartir les lectines en trois groupes :
 - simples (masse en dessous de 40 kDa) ;
 - en mosaïque ou multidomaines (molécules de masse variable) ;
 - en assemblée macromoléculaire (petites unités qui s'insèrent dans la structure des organites filamenteux chez les bactéries).
- A partir de l'origine de la lectine, on définit quatre classes :
 - les lectines bactériennes et virales ;
 - les lectines végétales ;
 - les lectines animales ;
 - les lectines fongiques.

Nous avons choisi de présenter, dans un tableau, quelques exemples de lectines en utilisant la classification par origine (Figure I.9). Toutefois, une base de données plus complète est disponible sur le site du CERMAV (<http://www.cermav.cnrs.fr/lectines/>).

Origine	Nom	Lectine	Ligand	Fonction	Référence
Bactériennes					
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>				
		PA-IL (lectine soluble)	Galactose	Adhésion, formation du biofilm	Imberty 2004
		PA-III (lectine soluble)	Fucose	Adhésion, formation du biofilm	Imberty 2004
	<i>Escherichia coli</i>				
		Fim-H (adhésine fimbriale)	Mannose	Adhésion	Imberty 2005 Hung 2002
Virales					
	<i>Influenza</i>				
		HA (hémagglutinine)	NeuAc	Infection	Sharon 2004 Hughson 1995
Végétales					
	<i>Canavalia ensiformis</i>				
		ConA	Mannose/Glucose	Interaction avec d'autres glycoprotéines	Rüdiger 2001
Animales					
	<i>Galectine</i>				
		Galectine 1 (lectine soluble)	β -galactoside	Contrôle de récepteurs endocytose, interactions hôte-pathogène, l'activation et l'homéostasie des cellules immunitaires	Rabinovich 2007
Fongiques					
	<i>Aleuria aurantia</i>				
		AAL	Fucose	Toxicité, mécanisme de défense, adhésion	Imberty 2005

Figure I.9 Quelques exemples de lectines, classées en fonction de leur origine.

Les *lectines bactériennes et virales* reconnaissent les glycoconjugués puis se lient à eux. Elles facilitent les processus de colonisation et d'infection. On compte trois classes de lectines bactériennes : les adhésines fimbriales, les toxines et les lectines solubles (Figure I.10) [Imberty 2005].

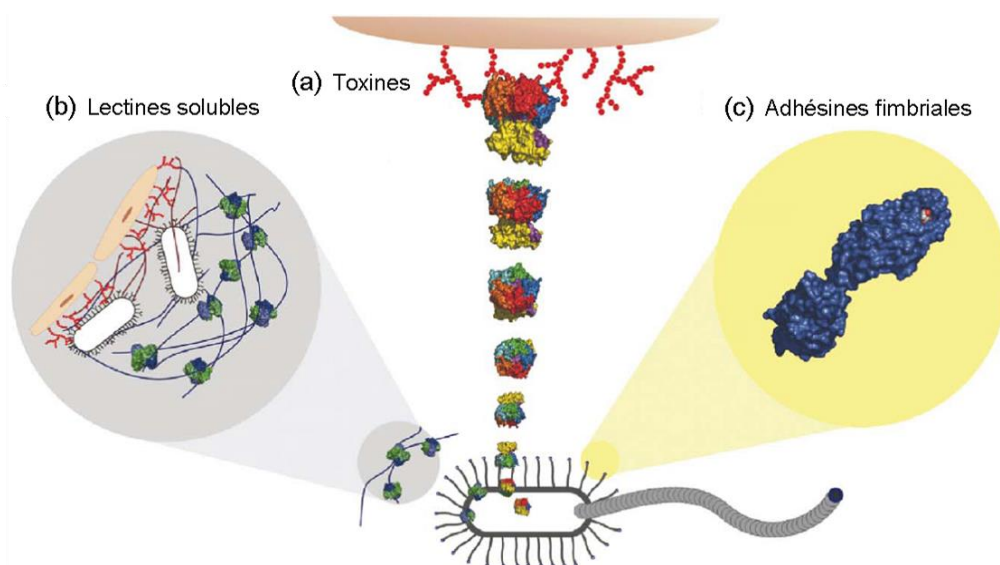


Figure I.10 Représentation schématique des lectines bactériennes : (a) toxines, (b) lectines solubles et (c) adhésines fimbriales [Imberty 2005].

Les *lectines animales* jouent, quant à elles, un rôle dans de nombreux processus d'adhésion, de migration et de communication inter- et intracellulaire [Sharon 2004].

On compte un grand nombre de *lectines végétales*. Elles semblent tout d'abord agir sur l'élongation des parois végétales. Elles interviennent aussi dans la reconnaissance et la défense des organismes contre les phytopathogènes. Cependant, leur rôle exact reste encore à définir [Rüdiger 2001].

Les *lectines fongiques* sont utilisées dans le processus de reconnaissance et d'adhésion aux hôtes ou aux sources de nourriture. Elles jouent aussi un rôle dans la toxicité des champignons [Imberty 2005].

Grâce à leurs propriétés, les lectines sont des outils précieux pour de nombreuses applications : l'identification et la séparation cellulaire, la détection, l'isolation et les études structurales des glycoprotéines, l'étude des glycoconjugués présents sur les cellules et les organelles, la différenciation des cellules cancéreuses,... [Sharon 2004].

I.3 L'interaction lectine-sucre

L'interaction lectine-sucre est présente dans de nombreux processus biologiques. Dans cette partie, après avoir défini certains termes et présenté les différentes liaisons entrant en jeu dans l'interaction, nous nous intéresserons à l'effet de la multivalence sur l'interaction.

I.3.1 Les notions de base

De manière générale, dans une interaction monovalente, les deux entités, le ligand (L) et le récepteur (R), s'associent pour former un complexe (LR). La formation de ce complexe est définie par sa constante d'association K_a (en $(\text{mol/L})^{-1}$ ou M^{-1}) ou de dissociation K_d avec $K_d = 1/K_a$ (en mol/L ou M) d'après :



Avec :

$[L]$, $[R]$ et $[LR]$ les concentrations respectives en mol/L du ligand, récepteur et complexe.

Ces deux constantes sont des caractéristiques de l'état du milieu à l'équilibre. Elles indiquent à l'équilibre dans quelle proportion deux espèces en présence se sont associées ou sont à l'état libre. L'affinité d'un ligand est définie comme sa capacité de fixation à un récepteur. La constante d'association (ou de dissociation) renseigne sur l'affinité, cependant sa valeur, en elle-même, n'a pas de sens. Seule la comparaison des valeurs obtenues pour un récepteur et différents ligands permet de définir celui qui a le plus d'affinité.

Rappelons que lorsqu'un ligand et un récepteur entrent en interaction, des échanges d'énergie ont lieu. L'enthalpie libre de l'interaction (énergie libre de Gibbs), à une température donnée, peut être calculée à partir de l'équation suivante :

$$\Delta G = -RT \ln K_a$$

Avec :

T la température ;

R la constante des gaz parfaits ;

K_a la constante d'association.

Cette valeur de l'enthalpie libre renseigne sur la spontanéité de la réaction. Si ΔG est négatif, la réaction chimique fournit de l'énergie au système. Elle est donc spontanée.

De même, l'enthalpie (ΔH) et l'entropie (ΔS) sont deux contributions énergétiques à l'enthalpie libre telles que :

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$$

Avec :

ΔH l'enthalpie ;

T la température ;

ΔS l'entropie.

Pour atteindre l'équilibre avec une minimisation de l'énergie, il faut que l'enthalpie ΔH soient dans le négatif et que le terme $T\Delta S$ tende vers des valeurs positives.

1.3.2 Les liaisons fondamentales dans l'interaction

Dans une interaction récepteur-ligand, plus particulièrement lectine-sucre, plusieurs types de liaison entrent en jeu. Dans la formation des complexes lectine-sucre, c'est un réseau de liaisons hydrogène et d'interactions hydrophobes qui lient l'ensemble. Dans certains cas, les interactions électrostatiques et la coordination avec un ion métallique jouent aussi un rôle [Sharon 2006a]. Les molécules d'eau interviennent aussi parfois comme intermédiaire dans ces liaisons.

La liaison hydrogène est directionnelle et supérieure, d'un point de vue énergétique, aux liaisons de type Van der Waals. Les groupements hydroxyles de la molécule de sucre s'associent aux chaînes d'acides aminés de la protéine (en particulier pour l'asparagine (Asn), l'acide aspartique (Asp), l'acide glutamique (Glu), l'arginine (Arg), la glutamine (Gln) et la sérine (Ser)). La liaison se fait sur les fonctions hydroxyles (OH), amines (NH₂) et les atomes d'oxygène [Lis 1998]. Cette liaison hydrogène est très intéressante pour le milieu biologique, puisqu'à température ambiante, l'association et la dissociation peuvent se faire rapidement.

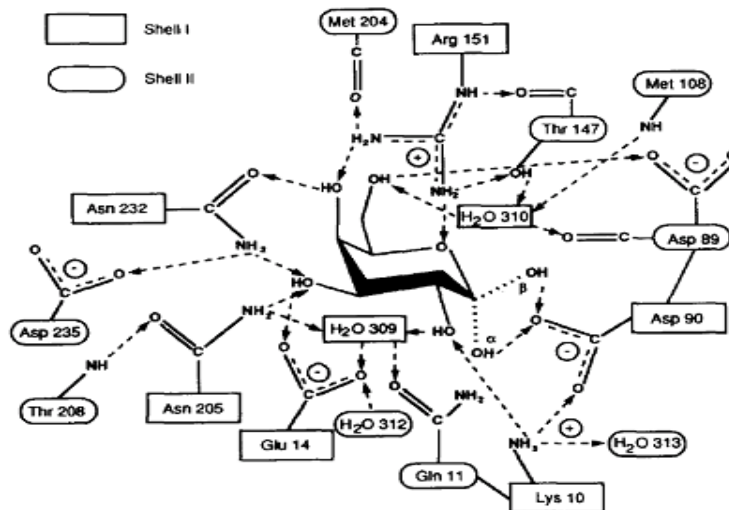


Figure I.11 Diagramme des liaisons hydrogène entre le sucre D-galactose et une protéine spécifique de ce sucre. Les rectangles indiquent les acides aminés de la structure primaire de la protéine. Les ovales indiquent les acides aminés de la structure secondaire qui interagissent avec les éléments de la structure primaire. [Quiocho 1991].

En général, les sucres sont des molécules fortement polaires. Cependant la disposition de leurs groupes hydroxyles peut former des zones hydrophobes. Une interaction peut alors se produire avec les sites hydrophobes de la lectine (par exemple avec les acides aminés valine (Val) et leucine (Leu)).

Les saccharides sont généralement neutres, les interactions ioniques de type charge-charge interviennent peu dans l'interaction sucre-protéine à quelques exceptions près [Lis 1998].

Les ions métalliques (Ca^{2+} , Mg^{2+} ou Mn^{2+}) peuvent être aussi impliqués dans l'interaction de façon indirecte [Elgavish 1997]. Deux cas sont possibles : ils peuvent être complexés par la protéine sans pour autant interagir avec le sucre ou alors ils participent à l'interaction en se coordonnant aux acides aminés chargés ou polarisés négativement. Pour certaines lectines bactériennes, il a été montré que les ions calcium étaient impliqués dans une reconnaissance de haute affinité avec le ligand comme par exemple pour la lectine PA-IL [Mitchell 2002].

Enfin, les molécules d'eau participent aussi à l'interaction. En plus d'être présentes dans les liaisons hydrogène, elles ont un rôle crucial dans la solvataion/désolvataion des molécules [Sharon 2006a].

1.3.3 Effet de la multivalence

En chimie, la valence pour un atome est définie comme le nombre de liaisons chimiques que peut former cet atome avec d'autres atomes. Dans le cas des interactions entre ligand et récepteur, le terme se réfère au nombre de sites de liaison que le récepteur peut impliquer dans l'interaction. D'un point de vue du ligand, il indique le nombre de motifs reconnus que le ligand utilise dans l'interaction avec le récepteur. Une interaction multivalente est caractérisée par une interaction entre un récepteur multivalent et un ligand multivalent (Figure I.12).

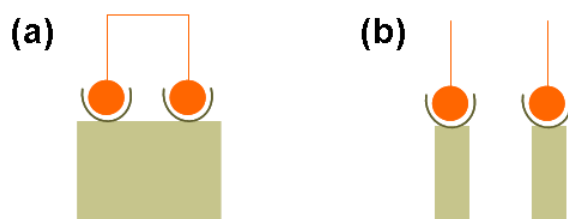


Figure I.12 Représentation schématique d'une interaction multivalente (a) et de deux interactions monovalentes (b), en vert le récepteur et en orange le ligand.

Dans une étude présentée par Lee, l'affinité entre le sucre et la protéine (dans ce cas de l'albumine de sérum bovin (BSA)) augmente logarithmiquement quand la densité de sucre déposée sur la couche de BSA augmente linéairement [Lee 1992]. On atteint la proportion de vingt sucres par protéine. Cette augmentation d'affinité ne peut pas s'expliquer uniquement par la concentration du monosaccharide. Cela est dû à l'« effet cluster » où la multivalence de la lectine et du sucre renforce l'affinité entre les deux. Expérimentalement, on a une diminution de la valeur de la constante de dissociation K_d . Lee indique que généralement la valeur du K_d pour une interaction avec un saccharide monovalent est de l'ordre du millimolaire alors que pour des di- ou des trivalents, l'ordre de grandeur est le micromolaire et le nanomolaire respectivement. Il complète cette étude en indiquant que pour favoriser cet effet, il est nécessaire que la lectine possède plusieurs sites de liaison et que le ligand soit multivalent avec des sucres ayant la bonne orientation et le bon espacement [Lee 1995, Lee 2000].

I.4 Les méthodes de caractérisation

Les lectines sont spécifiques à un sucre. Par exemple, une lectine, spécifique du mannose, ne peut pas reconnaître le galactose. La caractérisation de l'interaction lectine-sucre passe donc par la détermination de ce sucre spécifique et par la quantification de l'affinité pour celui-ci et ses dérivés.

Dans ce paragraphe, nous allons présenter les méthodes de caractérisation permettant de déterminer l'affinité, les données thermodynamiques de la liaison et l'arrangement moléculaire d'une interaction lectine-sucre.

I.4.1 Mesures d'affinité avec le sucre

L'affinité d'une lectine à un sucre se définit souvent grâce à la constante d'association K_a (ou de dissociation K_d). Cependant, la valeur du K_a pour un sucre donné n'a de signification que si elle est comparée à des valeurs pour d'autres sucres. Ainsi le sucre qui aura le K_a le plus élevé sera le plus spécifique à la lectine.

Plusieurs méthodes d'analyse ont été développées pour évaluer l'affinité. La comparaison pour divers sucres ne peut se faire que si la méthode d'analyse est la même. Toutefois, la multiplication des méthodes de caractérisation permet de conforter les résultats.

Toutes les méthodes de caractérisation ne permettent pas d'accéder au K_a de l'interaction. Lorsque le test utilise un sucre-inhibiteur, la concentration inhibitrice médiane (IC₅₀, Half Maximal Inhibitory Concentration) ou la concentration minimale d'inhibition du sucre (MIC, Minimum Inhibitory Concentration) peuvent être déterminées. Toutefois, tout comme pour le K_a , seule la comparaison des valeurs obtenues pour d'autres sucres-inhibiteurs a un sens.

Par la suite, nous allons présenter ces méthodes d'analyse et expliquer comment l'affinité du sucre à la lectine est déduite.

ELLA (Enzyme-Linked Lectin Assay)

Basée sur le test ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay, test destiné à détecter et/ou doser une protéine dans une solution biologique), le test ELLA (Enzyme-Linked Lectin Assay) mesure la quantité de lectines liées à des sucres immobilisés sur une plaque comportant 96 puits, en compétition avec un sucre-inhibiteur, par l'intermédiaire d'une réaction de catalyse par une enzyme fixée à la lectine [McCoy 1983].

La Figure I.13 reprend les différentes étapes du mode opératoire du test. Un polymère glycosylé tapisse le fond des puits de la plaque d'analyse (sur la figure, le sucre du polymère est représenté par des sphères orangées). La lectine, fonctionnalisée avec une biotine, et le sucre-inhibiteur sont ajoutés dans chaque cavité. La concentration du sucre-inhibiteur diminue progressivement (dilution en cascade) dans chaque puits pour analyser la compétition entre les deux sucres (sucre avec le polymère et sucre-inhibiteur). Après incubation et lavage, seules les lectines liées au sucre du polymère restent sur la plaque. Un complexe streptavidine-enzyme (peroxydase) est ensuite ajouté. Par interaction biotine-streptavidine, il se lie à la lectine. Les complexes streptavidine-enzyme non liés sont enlevés par lavage de la plaque d'analyse. Enfin, en dernière étape, une solution contenant un substrat⁷ de la peroxydase (OPD : *ortho*-phenylènediamine) et du peroxyde (H₂O₂) est déposée dans chaque puits. L'enzyme va dégrader le peroxyde et amener à la coloration des puits grâce à la formation d'un composé orangé ((OPD)₂H₂). L'analyse de la plaque se fait par spectrophotométrie. Plus la quantité de lectines fixées diminue, plus le signal diminue. Ainsi, on détermine la concentration qu'il faut en sucre-inhibiteur pour empêcher la lectine de se fixer au sucre au fond du puits. Ce test permet de définir lequel des deux sucres a le plus d'affinité avec la lectine et à quelle concentration se joue l'inhibition.

⁷ Substrat : en biochimie, il s'agit d'une molécule utilisée comme produit de départ à une réaction chimique catalysée par une enzyme.

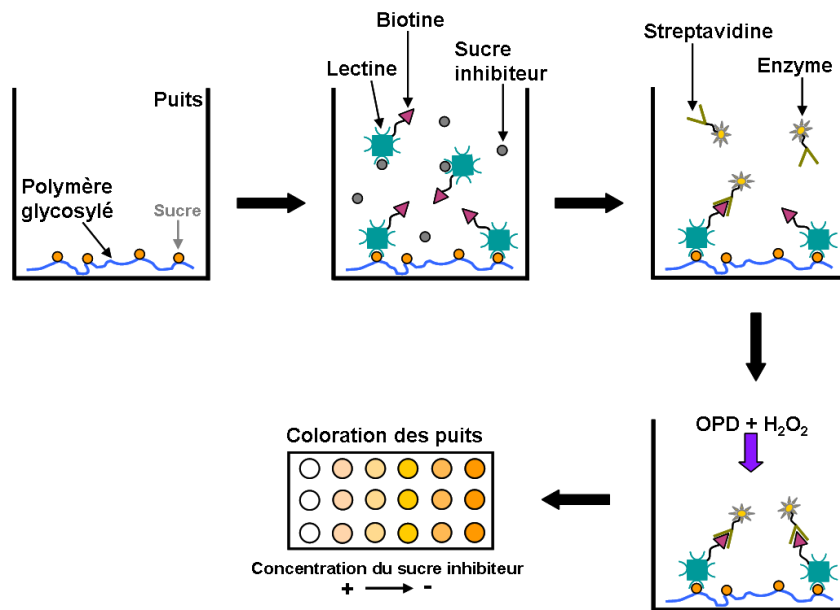


Figure I.13 Schéma des différentes étapes du mode opératoire du test ELLA.

A partir des valeurs d'intensité mesurées pour chaque puits, il est possible de tracer le pourcentage d'inhibiteur de l'adhésion en fonction de la concentration en inhibiteur (Figure I.14). Le point d'inflexion de cette courbe en forme de sigmoïde est le point équilibre de l'expérience. On obtient alors la concentration inhibitrice médiane, IC_{50} (Half Maximal Inhibitory Concentration) du sucre-inhibiteur. Cela correspond à la quantité de sucre-inhibiteur qu'il faut pour inhiber 50% de la fixation de la lectine au sucre immobilisé sur la surface. Plus la molécule a un fort potentiel inhibiteur, plus son IC_{50} est faible.

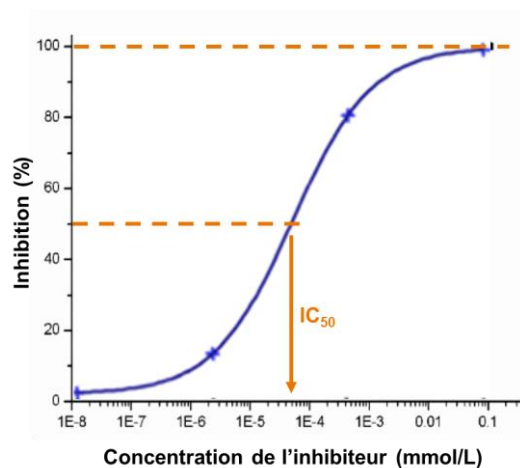


Figure I.14 Exemple de courbe expérimentale du pourcentage d'inhibition de l'adhésion en fonction de la concentration de l'inhibiteur pour un test ELLA avec détermination de l' IC_{50} .

Le test ELLA permet donc de comparer des sucres de façon très précise. Cependant, la modification chimique de la lectine peut modifier l'interaction. Etant sensible aux phénomènes d'aggrégation, cette expérience est délicate à mettre en place pour des sucres

multivalents. Par contre, elle est très efficace pour évaluer les sucres qui se lient aux lectines multivalentes.

Inhibition de l'hémagglutination (HIA, Hemagglutination Inhibition Assay)

Les lectines ayant la propriété d'hémagglutination, le test d'inhibition de l'hémagglutination (HIA) est une méthode d'analyse utilisant cette caractéristique pour déterminer la capacité d'un sucre-inhibiteur à empêcher ce phénomène d'agréation.

Dans une première expérience, les hématies sont déposées dans les puits de la plaque d'analyse et vont sédimenter naturellement au fond des cavités. Une solution de lectines est ajoutée avec une concentration croissante dans chaque puits pour déterminer la concentration minimale de lectines qu'il faut pour détecter l'hémagglutination. Ce phénomène d'hémagglutination se manifeste par la présence d'une suspension gélatineuse homogène dans le puits. Les étapes de l'expérience sont reprises dans la Figure I.15.

A partir de cette concentration minimale de lectine, une seconde expérience est réalisée avec un sucre-inhibiteur pour bloquer l'hémagglutination. Une solution de lectines à concentration fixe (supérieure à la concentration minimale de détection de l'hémagglutination) est ajoutée aux hématies avec une quantité de sucre-inhibiteur croissante. Ce sucre va occuper les sites de fixation de la lectine et donc empêcher l'agglutination. La concentration minimale en sucre (MIC, Minimum Inhibitory Concentration) qu'il faut pour inhiber l'interaction lectine/hématie est alors déterminée. Cette valeur permet de caractériser le pouvoir inhibant d'un sucre. Plus la valeur du MIC est faible, plus le sucre favorise l'inhibition de l'interaction.

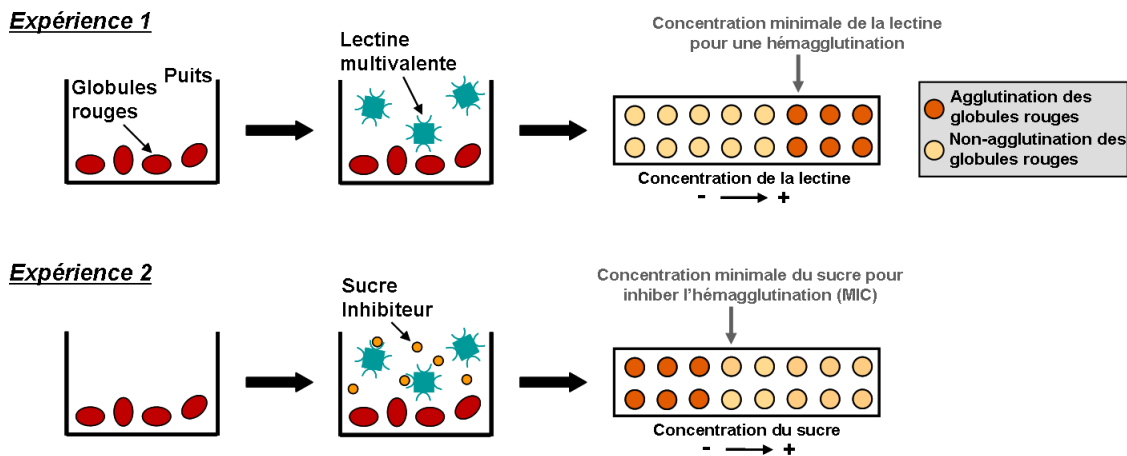


Figure I.15 Schéma des tests d'inhibition de l'hémagglutination.

Le test d'inhibition de l'hémagglutination est fortement dépendante des conditions opératoires. Les valeurs de MIC de différents sucres ne peuvent être comparées que pour une même lectine dans les mêmes conditions expérimentales.

Résonance plasmonique de surface (SPR, Surface Plasmon Resonance)

Cette méthode permet de détecter la fixation, spécifique et réversible, d'une molécule mobile à une molécule immobilisée sur une surface et ce, sans le marquage des molécules. Un faisceau lumineux monochromatique polarisé traverse un prisme et une surface (lame de verre) recouverte d'un film d'or de faible épaisseur (Figure I.16). En général, quand un faisceau lumineux arrive à une interface de deux milieux d'indice de réfraction différents, une partie de la lumière est réfléchie et une autre est réfractée à travers la surface. Cependant, à un certain angle d'incidence θ , elle est totalement réfléchie.

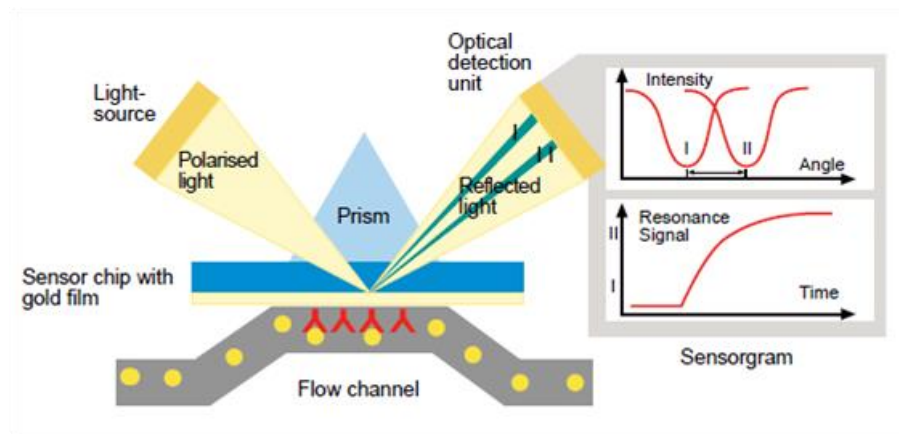


Figure I.16 Principe de fonctionnement du SPR (source : Biacore).

En l'absence de réfraction, une onde se forme à l'interface provenant du couplage entre les photons incidents arrivant à l'interface métallique (couche d'or) et les électrons libres de la couche d'or (Figure I.17). Après propagation de cette onde dans le milieu métallique, il va se créer, à l'interface avec un milieu diélectrique (air, eau,...), une oscillation collective longitudinale d'électrons libres et une onde électromagnétique évanescence. Ce sont les plasmons de surface.

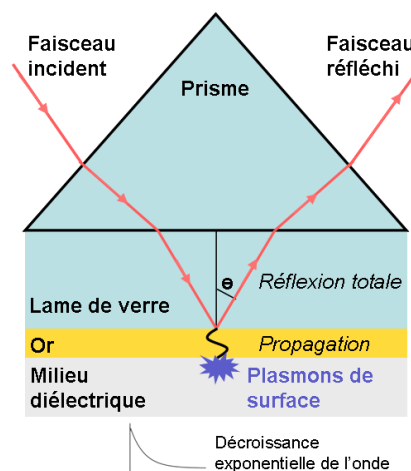


Figure I.17 Schéma explicatif de la formation des plasmons de surface.

La création de plasmons induit une diminution d'intensité de la lumière réfléchie à l'angle de résonance⁸ due à l'absorption de l'onde réfléchie par la couche d'or (courbe de l'intensité lumineuse en fonction de l'angle d'incidence, Figure I.16). La valeur de l'angle de résonance dépend de l'environnement chimique du milieu diélectrique. Ainsi, lors d'une expérience par SPR, une molécule immobilisée sur la surface d'or donnera un angle de résonance spécifique au système. Lorsqu'une molécule mobile va se lier à la molécule fixe, le système va changer, ainsi que l'angle de résonance. Ces variations de l'angle dues à l'association ou à la dissociation de complexes permettent de tracer un sensorgramme (Figure I.18). Il s'agit de la variation de l'angle de résonance (exprimée en Unité de Résonance (RU)) en fonction du temps. Par définition, 1000 RU correspondent à un déplacement de l'angle de résonance de 0,1°.

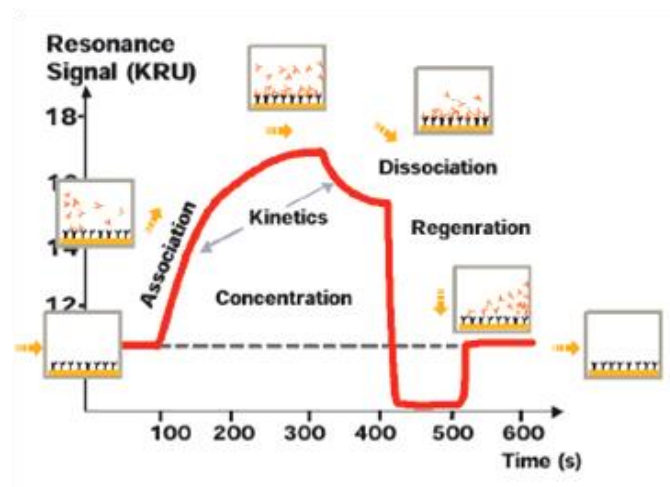


Figure I.18 Variation de l'angle de résonance en fonction du temps (sensorgramme) (source : Biacore).

De manière générale, au début de l'expérience, un flux continu de solution tampon traverse le milieu d'analyse composé uniquement des molécules fixées à la surface. L'angle de résonance du système initial (témoin négatif) est alors déterminé. Une solution contenant la molécule mobile est ensuite ajoutée au flux continu (ligne en tiret sur la Figure I.18). Au cours du temps, on observe l'association de cette molécule à la surface. On remarque sur le sensorgramme un changement de l'angle de résonance qui correspond à cette association. Un palier est atteint quand tous les sites de fixation sont occupés. Une fois ce palier atteint, seule la solution tampon est injectée dans le flux continu. On observe alors une phase de dissociation avec une variation de l'angle. Enfin une solution dite de "régénération" est introduite pour remettre la surface à son état initial.

Pour caractériser l'interaction lectine-sucre, des expériences d'inhibition sont réalisées afin de déterminer l'IC₅₀ pour différents sucres. La surface d'or est fonctionnalisée avec un sucre reconnu par la lectine. Pendant l'analyse, une solution contenant la lectine et un sucre-inhibiteur est injectée. Des mesures SPR sont effectuées pour différentes concentrations du sucre-inhibiteur. En traçant le pourcentage de lectines inhibées en fonction de la concentration du sucre-inhibiteur, on obtient l'IC₅₀ du sucre-inhibiteur. La comparaison des valeurs d'IC₅₀ pour différents sucres renseigne sur leur pouvoir d'inhibition de l'adhésion de la lectine à la surface fonctionnalisée.

⁸ Angle de résonance : angle pour lequel on a la formation de plasmon de surface, angle d'incidence particulier.

Puces à sucre (Microarrays)

Les techniques présentées ci-dessus nécessitent une quantité importante de matériels biologiques, ce qui est à la fois coûteux et aussi un facteur limitant lorsque peu de matière est disponible. Les puces à sucre permettent de diminuer la quantité de matière à analyser (de l'ordre du microlitre et du micromolaire). En effet, il est possible de tester en même temps l'affinité lectine/sucre pour un grand nombre de ligands et de déterminer ainsi celui qui est le plus spécifique à la lectine. De plus, cette technique est extrêmement rapide.

Le principe repose dans un premier temps sur l'immobilisation du complexe sucre-bras espaceur sur un support (substrat de verre, d'or,...). La lectine, fonctionnalisée avec un fluorophore est ensuite déposée dans chaque puits. Après incubation et lavage du support, une analyse par fluorescence du substrat est effectuée. Plus la fluorescence est importante, plus il y a de lectines fixées au sucre et donc plus l'affinité entre la lectine et le sucre est importante.

Au sein de l'Institut des Nanotechnologies de Lyon, dans l'équipe Chimie et Nanobiotechnologies où a été réalisé ce projet de thèse, une approche originale a été développée sur les puces à sucre en immobilisant les glycoconjugués sur le substrat à l'aide de deux brins d'ADN, l'un fixé au substrat, le second lié au sucre (Figure I.19) [Chevolot 2007].

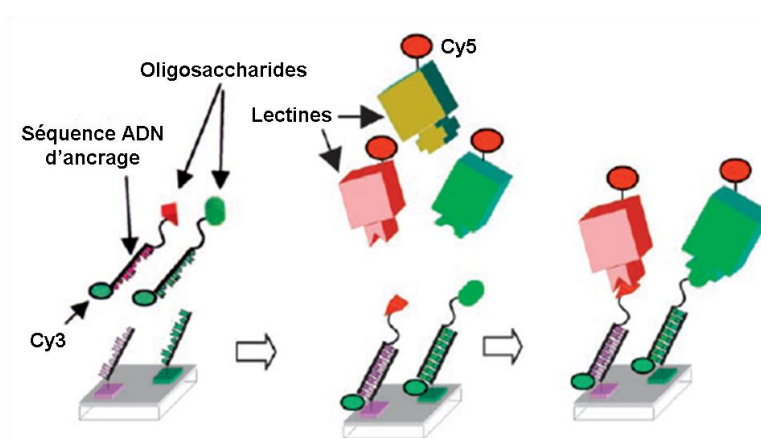


Figure I.19 Schéma du principe de la puce à sucre basée sur une immobilisation par hybridation de brin d'ADN [Chevolot 2007].

L'augmentation progressive de la concentration de la lectine dans les puits permet de réaliser des mesures de saturation afin de déterminer la constante de dissociation K_d de l'interaction à partir de l'expression suivante [Gordus 2006] :

$$K_d = FI_{\max} \cdot \left(\frac{[lectine]}{[FI]} - \frac{1}{FI_{\max}} [Lectine] \right)$$

Avec :

$[Lectine]$ la concentration de la lectine ;

$[FI]$ la valeur de la fluorescence ;

FI_{\max} la valeur de la fluorescence maximale, déterminée sur la courbe de saturation ;

K_d la constante de dissociation.

Cette nouvelle approche permet aussi de mesurer la concentration inhibitrice médiane (IC_{50}) en ajoutant un sucre-inhibiteur à la solution de lectines [Zhang 2009].

1.4.2 Données thermodynamiques de l'interaction

Comme nous l'avons indiqué dans le paragraphe I.3.1, l'interaction entre une lectine et un sucre donne lieu à un échange d'énergie. Plus l'enthalpie libre est négative, plus l'interaction lectine-sucre est forte. On définit deux expressions pour l'enthalpie libre dont une la reliant à la constante d'association K_a :

$$\Delta G = -RT \ln K_a \quad \text{et} \quad \Delta G = \Delta H - T\Delta S$$

Avec :

ΔG l'enthalpie libre de l'interaction ;

R la constante des gaz parfaits ;

T la température ;

K_a la constante d'association ;

ΔH l'enthalpie ;

ΔS l'entropie.

Nous allons par la suite décrire une méthode d'analyse, la microcalorimétrie de titration isotherme, qui permet d'extraire les données thermodynamiques de l'interaction lectine-sucre.

Microcalorimétrie de titration isotherme (ITC, Isothermal Titration Calorimetry)

Le fonctionnement du microcalorimètre est basé sur la régulation en température de deux cellules entourées par une enceinte adiabatique (Figure I.20 (a)). Initialement, les deux cellules sont à la même température stricte et contiennent une même solution-tampon. Contrairement à la cellule de référence, la cellule de mesure renferme les lectines.

A l'aide d'une microseringue sous agitation, de multiples injections de faible volume de sucre sont réalisées. Pour chaque injection, l'interaction entre la lectine et le sucre engendre un dégagement ou une absorption de chaleur. Le microcalorimètre mesure alors la quantité d'énergie nécessaire pour maintenir les deux cellules à la même température. Le signal mesuré est alors proportionnel à l'enthalpie d'association. La mesure correspond à la puissance électrique fournie (en $\mu\text{cal}/\text{sec}$) en fonction du temps pour chaque injection (en min) (Figure I.20 (b)). Les pics présents sur le thermogramme correspondent à chaque injection.

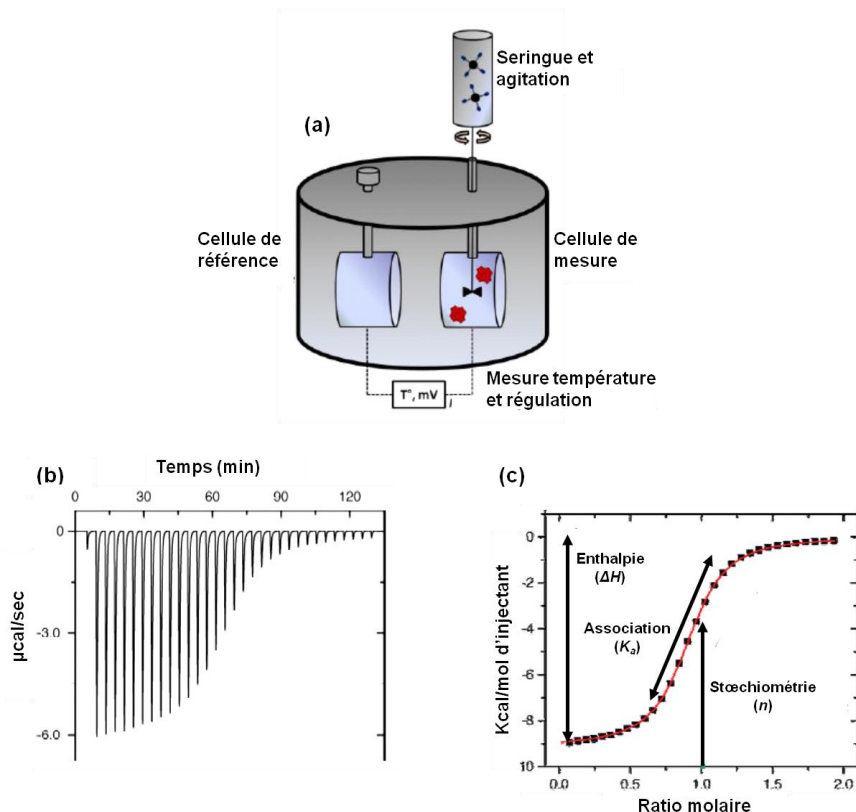


Figure I.20 (a) Représentation schématique du microcalorimètre ; (b) Thermogramme expérimental obtenu par ITC ; (c) Courbe isotherme d'association théorique extraite des points expérimentaux, valeurs déterminées par cette courbe [Cecioni 2010].

Au début de l'expérience, tous les sites de liaison de la protéine sont libres, le sucre peut donc s'associer. De nombreuses interactions lectine-sucre ont lieu, ce qui provoque une forte variation de la chaleur dans la cellule. Le pic sur le thermogramme est important (2^{ème} pic). Au fur et à mesure des injections, les sites deviennent saturés, les molécules de sucre ne peuvent plus se lier aussi facilement d'où la diminution progressive des pics. En fin d'expérience, tous les sites de la lectine sont occupés, il n'y a plus de dégagement ou d'absorption de chaleur. Le signal résiduel provient seulement de la chaleur de dilution de la solution de sucre injectée.

Par l'intégration du thermogramme, une courbe isotherme d'association peut être tracée (Figure I.20(c)). L'allure de cette courbe expérimentale permet de remonter aux valeurs de l'enthalpie (ΔH), à la constante d'association (K_a) et à la stœchiométrie de réaction (n). La valeur de n a une importance dans le cas de lectine et sucre multivalents. Elle correspond au nombre de monomère de lectine (ou de site de fixation) qui peuvent se lier à une molécule glycosylée tel que :

$$n = \frac{1 \text{ (molécule avec des résidus glycosidiques)}}{\text{Nombre de monomère de lectine}}$$

Les valeurs de l'énergie libre (ΔG) et de l'entropie (ΔS) peuvent se retrouver grâce aux équations données au début du paragraphe.

1.4.3 Arrangement structural du complexe lectine-sucre

La lectine et le sucre, en se liant, forme un complexe qui diffère suivant la structure de ces deux entités. Il est donc intéressant de visualiser les complexes formés pour comprendre l'influence de la géométrie et de la multivalence des deux macromolécules sur l'arrangement.

Cristallographie aux rayons X

La cristallographie aux rayons X est une technique d'analyse structurale permettant d'élucider la structure tridimensionnelle des protéines au niveau atomique. En traversant une protéine purifiée sous forme cristalline, le faisceau de rayons X est diffracté dans certaines directions. Il en résulte un diagramme de diffraction. En faisant tourner le cristal, tous les rayons diffractés en chaque point de l'espace sont collectés. L'analyse numérique de la position des taches de diffraction et de leur intensité permet de reconstruire la structure initiale de la protéine à l'échelle atomique.

En utilisant le même principe, un complexe lectine-sucre, préalablement cristallisé, peut être analysé structurellement [Sabin 2006].

L' "image" reconstruite après diffraction aux rayons X de l'arrangement du complexe lectine-sucre reste un résultat obtenu à un instant donné sur une structure figée cristallisée et analysée sous ultravide, loin de conditions biologiques viables.

Résonance magnétique nucléaire

Le principe de la résonance magnétique nucléaire repose sur les propriétés magnétiques de spin de certains noyaux d'atome. Dans le cas général, lorsqu'une protéine en solution est placée dans un champ magnétique intense, on observe une levée de dégénérescence (ou séparation) des niveaux énergétiques des différents états de spin pour un noyau considéré (principalement l'atome d'hydrogène). Propre à chaque noyau, cette séparation des niveaux d'énergie est dépendante de l'environnement chimique de l'atome. L'analyse de cette séparation, grâce à l'adsorption puis l'émission du rayonnement électromagnétique, permet d'identifier les atomes considérés. C'est l'étape d'attribution des raies de résonance que l'on réalise à partir des spectres de RMN.

Pour des protéines à fort poids moléculaire (supérieur à 20 kDa), on observe cependant, sur ces spectres, une diminution de l'intensité du signal spectral et un élargissement des pics qui rendent difficile l'identification. Il est alors nécessaire d'utiliser le marquage isotopique pour les atomes d'hydrogène (Deutérium D), de carbone (^{13}C) et d'azote (^{15}N) de la protéine pour améliorer la résolution spectrale. Enfin, en corrélant les différents spectres obtenus, on peut remonter par modélisation à la structure tridimensionnelle de la protéine.

De la même façon, à partir d'une solution contenant la lectine et son sucre spécifique, on peut déterminer la conformation structurale de leur complexe.

Même si on atteint ici des résolutions de l'ordre du nanomètre en maintenant la lectine et le sucre dans un environnement viable, la masse de la protéine reste un facteur limitant. Pour améliorer la sensibilité de cette technique, il est possible, en plus du marquage isotopique, d'augmenter la concentration de la lectine et du sucre. Or, dans ce cas-là, un phénomène d'agrégation des lectines, ou des protéines de manière générale, peut apparaître ce qui peut fausser les résultats.

Microscopie

Dans le panel des microscopies utilisées généralement pour des applications biologiques, les microscopes optiques classiques présentent l'avantage de travailler à l'air ou en milieu liquide. Cependant, le critère de Rayleigh ($\lambda/2$ avec λ la longueur d'onde) limite la résolution à 200 nm ce qui ne permet pas observer les complexes lectine/sucre. La même remarque peut être faite pour les autres microscopes optiques (en fluorescence, à contraste, confocal,...).

La microscopie dite électronique, a une résolution de l'ordre du nanomètre dans le cas d'observation d'échantillons biologiques. Cependant, elle ne semble pas convenir non plus à l'étude que nous souhaitons réaliser. Les images au microscope à transmission demandent, par exemple, à ce que le faisceau d'électron traverse l'échantillon. Actuellement, les techniques de préparation des échantillons ont évolué pour préserver au minimum les objets biologiques du faisceau d'électron [Müller 2008], mais les conditions d'observation, généralement sous vide, restent un frein à l'utilisation de ce type de microscope dans notre étude.

Enfin, au niveau de la microscopie à champ proche, afin d'avoir une observation directe et locale de l'arrangement des complexes lectine/sucre, à l'échelle nanométrique, la microscopie à force atomique peut être utilisée à la fois à l'air et en milieu liquide. C'est d'ailleurs le type de microscopie que nous avons choisie d'utiliser dans notre étude sur l'arrangement lectine/sucre. Il sera présenté en détail dans le chapitre 2.

I.5 Le cas étudié : la lectine PA-IL de la bactérie *Pseudomonas aeruginosa* et les glycoclusters galactosylés

Ce projet de thèse s'inscrit dans la recherche d'une nouvelle approche thérapeutique anti-adhésive pour lutter contre les infections pulmonaires de la bactérie *P. aeruginosa* grâce à des sucres multivalents. Dans ce paragraphe, nous allons présenter la bactérie et la lectine PA-IL qui lui est associée. Nous développerons ensuite l'approche thérapeutique envisagée. Enfin, nous décrirons les glycoclusters étudiés.

I.5.1 Généralité sur la bactérie *Pseudomonas aeruginosa*

La bactérie *Pseudomonas aeruginosa* est un bacille à Gram-négatif⁹, connue aussi sous le nom de bacille pyocyanique (dû au pigment bleu gris, la pyocyanine qu'elle produit). Elle est aérobique stricte, c'est-à-dire qu'elle ne peut vivre ou se multiplier qu'en présence d'oxygène. Sa forme est fine et droite ou légèrement courbée (Figure I.21). Sa mobilité est assurée par un flagelle polaire.

⁹ Gram-négatif : Test de coloration de Gram qui renseigne sur la composition membranaire de la bactérie. La structure de la membrane diffère pour les bactéries dites à Gram-négatif des bactéries à Gram-positif.

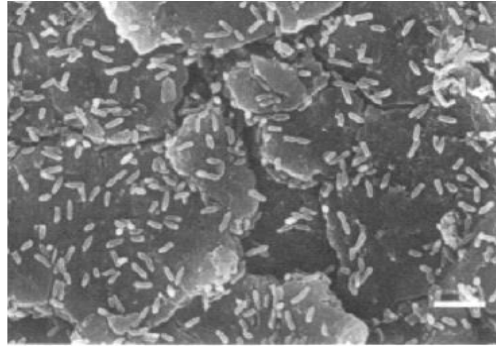


Figure I.21 Image au microscope électronique à balayage (MEB) de la bactérie *P. aeruginosa* [Nickel 1985].

Cette bactérie est un germe ubiquitaire vivant à l'état libre. On la trouve dans la nature en particulier dans les sols humides, l'eau ou à la surface des végétaux. Elle est aussi présente chez l'homme au niveau de la peau, de l'oreille interne, de l'appareil respiratoire et digestif. Pour les individus sains, elle ne représente pas de danger.

Ce bacille est toutefois opportuniste. Il profite d'un affaiblissement des défenses de l'hôte, au niveau de la peau ou des muqueuses, pour devenir un sévère pathogène, en particulier chez les personnes immunodéprimées. Il est ainsi responsable de 10% des maladies nosocomiales en France, derrière *Escherichia coli* (24,7 %) et *Staphylococcus aureus* (18,9 %) [Enquête nationale de prévalence des infections nosocomiales 2006, 2009 ; Floret 2009]. Il représente la principale cause de morbidité et de mortalité chez les patients atteints par la mucoviscidose en provoquant de graves infections pulmonaires (Figure I.22) [Registre Français de la Mucoviscidose, Bilan des données 2010, 2012]. Il est à l'origine d'infections de la peau pour les grands brûlés et des voies urinaires chez les personnes sondées.

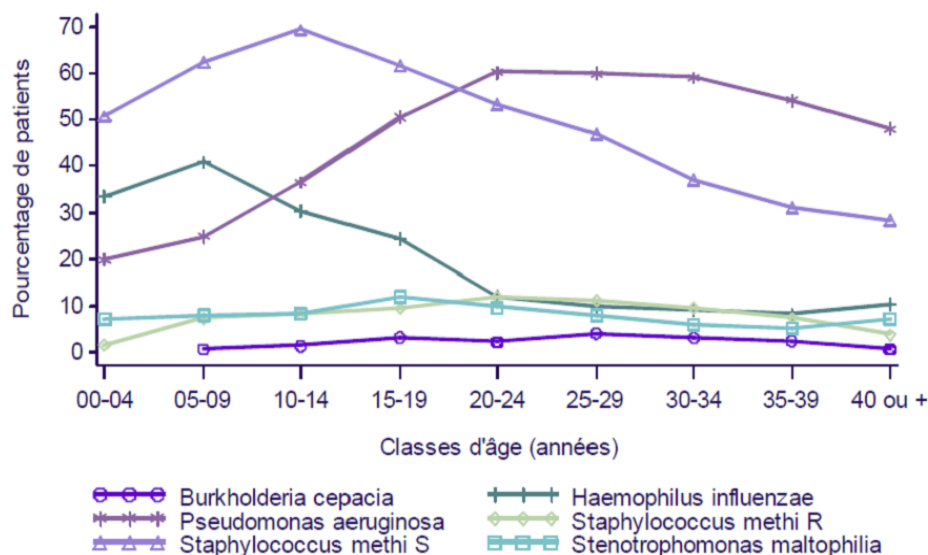


Figure I.22 Pourcentage de patients, atteints de mucoviscidose, infectés par des bactéries définies comme cliniquement importantes, en fonction de leurs tranches d'âges [Registre Français de la Mucoviscidose, Bilan des données 2010, 2012].

Ce pathogène possède une grande capacité d'adaptabilité. Il a développé de nombreuses souches résistantes aux antibiotiques. Lors d'une infection, les colonies de bactéries vont se structurer en biofilm sur les cellules-hôtes pour se prévenir des attaques naturelles et médicamenteuses (Figure I.23) [Imberty 2004].

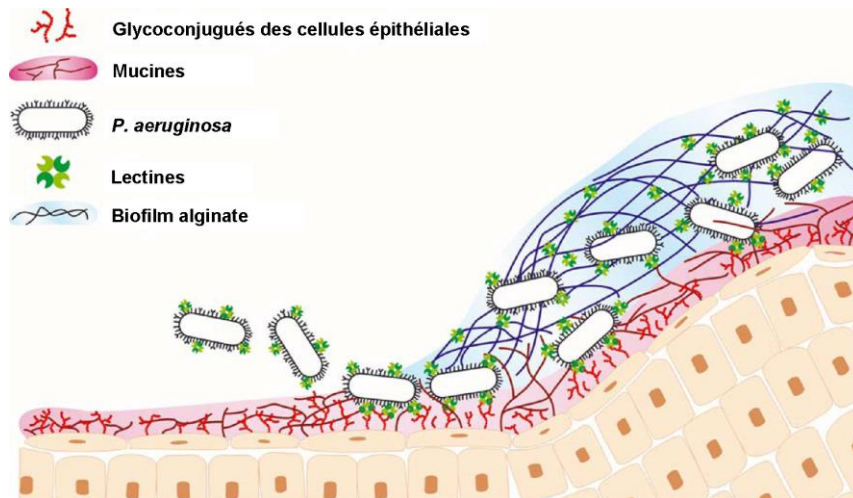


Figure I.23 Représentation schématique de l'adhésion aux mucines et de formation du biofilm de la bactérie *P. aeruginosa* [Imberty 2004].

Grâce à cette résistance aux antibiotiques et à cette organisation en biofilm, la bactérie *P. aeruginosa* est devenue une préoccupation majeure dans le monde médical puisqu'il est devenu difficile de la traiter cliniquement chez certains patients. C'est à partir d'une compréhension poussée de ce pathogène que peuvent émerger de nouvelles méthodes thérapeutiques, autres que les traitements antibiotiques.

Dans sa stratégie d'adhésion, la bactérie utilise les sucres de l'hôte comme cibles spécifiques pour se lier, que ce soit par les glycoconjugués présents à la surface de la cellule ou par les mucines de la muqueuse. Dans notre cas, cette sélectivité vient de la spécificité des lectines solubles, PA-IL et PA-III, et des adhésines fimbriales de *P. aeruginosa* [Imberty 2005].

Par la suite, nous nous sommes plus particulièrement intéressés à la lectine PA-IL.

1.5.2 La lectine PA-IL

La lectine PA-IL, (gène LecA), a été la première lectine de *P. aeruginosa* à être isolée par chromatographie d'affinité en 1972 [Gilboa-Garber 1972]. Elle est spécifique au D-galactose mais reconnaît également des dérivés galactose [Imberty 2004]. L'affinité entre PA-IL et le D-galactose a été caractérisée par l'intermédiaire de la constante d'association (K_a) et donne une valeur de $3,4 \cdot 10^{-4} \text{ (mol/L)}^{-1}$ [Garber 1992].

La protéine est constituée de quatre sous-unités de 121 acides aminés qui s'associent pour former un tétramère d'un poids moléculaire total de 51 kDa (Figure I.24). Les séquences d'ADN et d'acides aminés ont été présentées par Avichezer *et al.* et Gilboa-Garber *et al.*

[Avichezer 1992 ; Gilbao-Garber 2000]. L'activité de la protéine est aussi liée à la présence d'un ion calcium Ca^{2+} sur chaque monomère qui est complexé dans le site de liaison.

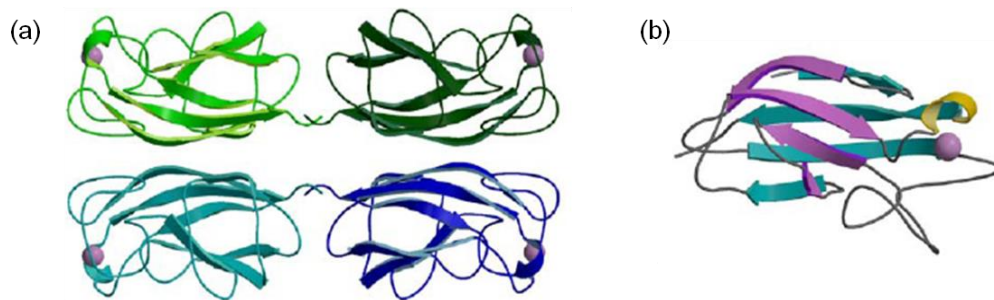


Figure I.24 Structure cristalline de la lectine PA-IL en tétramère (a) et en monomère (b). Les sphères mauves représentent les ions calcium (PDB code : 1OKO) [Imberty 2004].

La structure cristallographique de la lectine en présence du galactose a été établie en 2003 par Cioci *et al.* [Cioci 2003 ; Imberty 2004]. Les liaisons entre le site de reconnaissance de la lectine et le galactose sont présentés sur la Figure I.25.

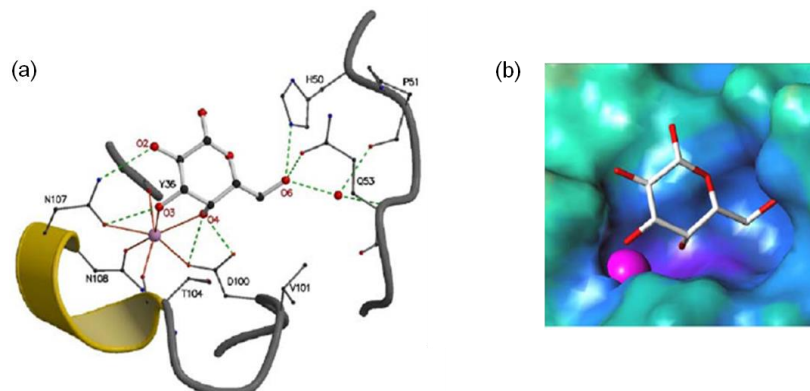


Figure I.25 (a) Sites de liaison de la structure cristalline de la lectine PA-IL avec un galactose. (b) Représentation de la surface électrostatique du site de liaison (code couleur : violet pour le négatif et orange pour le positif). La sphère violette est l'ion calcium Ca^{2+} [Imberty 2004].

Le point isoélectrique de la protéine a été déterminé à 4,94 [Gilbao-Garber 2000]. A l'état pur, il a été observé que, comme les lectines végétales, la lectine PA-IL avait tendance à s'agréger [Gilbao-Garber 1982].

PA-IL a été initialement identifiée et caractérisée dans la paroi de la bactérie (membrane cytoplasmique et périplasme) [Glick 1983] mais aussi sur la membrane externe [Bajolet-Laudinat 1994], ce qui indique que la lectine joue un rôle important dans l'adhésion.

La toxicité de cette lectine a été démontrée au niveau des cellules épithéliales [Bajolet-Laudinat 1994], digestives [Wu 2003] et pulmonaires [Chemani 2009]. Chemani *et al.* ont de plus montré que l'ajout de sucres-inhibiteurs *in vivo*, en particulier avec le composé Me- α -Gal, diminue la toxicité de la bactérie et améliore la survie et conduit à la réduction des infections pulmonaires.

1.5.3 Vers une nouvelle approche thérapeutique

Dans leur stratégie d'adhésion et d'infection, les pathogènes, tels que les bactéries et les virus, utilisent, entre autres, les interactions sucres-lectines. Actuellement, pour lutter contre ces infections, le traitement donné aux patients est essentiellement basé sur les antibiotiques. Ils agissent au niveau de la membrane et/ou de la paroi pour la détruire ou empêcher sa synthèse. Ils visent aussi l'ADN pour bloquer, entre autre, sa réplication. Cependant, l'utilisation excessive des antibiotiques a engendré des souches bactériennes résistantes. Dans le cas de la mucoviscidose avec la bactérie *Pseudomonas aeruginosa*, passées un certain âge, l'efficacité des antibiotiques diminue du fait de la prise longue et répétée de ces médicaments par les patients pour traiter leurs infections pulmonaires. On peut noter aussi que l'industrie pharmaceutique innove faiblement en matière de nouveaux antibiotiques. L'enjeu est donc de taille pour développer d'autres approches thérapeutiques complémentaires.

L'une des voies développées se concentre non pas sur la destruction du microorganisme comme les antibiotiques mais sur l'inhibition de l'adhésion du pathogène aux cellules-hôtes. Ce concept est intéressant pour deux raisons. Premièrement, il précède l'infection. On peut supposer alors que les défenses immunitaires du patient (souvent immunodéprimé) seraient préservées. Deuxièmement, comme dans cette thérapie le pathogène n'est pas détruit, il semblerait que le développement de souches résistantes soit ralenti [Sharon 2006b].

Les sucres sont bien adaptés pour ce genre d'approche. Tout d'abord, ils sont spécifiquement reconnus par les lectines, acteurs dans l'adhésion du pathogène aux cellules. Ils sont aussi peu susceptibles d'être toxiques ou allergènes puisque beaucoup sont des constituants présents chez l'homme. Les effets positifs de cette thérapie anti-adhésive ont été démontrés dans plusieurs études (expérimentation animales, *in vivo* et en essais cliniques) [Sharon 2006b]. Pour reprendre l'exemple de la *P. aeruginosa* dans la mucoviscidose, Hauber *et al.* ont montré dans un essai clinique que l'inhalation d'une solution contenant du fucose et du galactose diminuait la quantité de bactéries dans les crachats des malades sans pour autant affecter leurs fonctions pulmonaires ou vitales [Hauber 2008].

Cette approche tient donc ses promesses. Cependant, l'utilisation de composés monovalents, comme c'est le cas dans l'exemple ci-dessus, amène une faible affinité avec la lectine et oblige une posologie importante ce qui peut engendrer des problèmes de toxicité.

L'optimisation de cette thérapie anti-adhésive passe donc par la multivalence des sucres avec l'élaboration de molécules à géométrie originale [Imberty 2008]. Les équipes de chimistes doivent donc synthétiser des molécules mimant les glycoconjugués naturels (glycomimétiques) et surtout ayant une affinité supérieure avec la lectine. Deux structures moléculaires sont particulièrement étudiées : les glycodendrimères et les glyclusters (Figure I.26) [Lundquist 2002 ; Imberty 2008 ; Cecioni 2009]. Les premiers sont des structures synthétiques avec des unités de répétition que l'on peut assimiler à des branches d'arbre. Le cœur de la molécule est multifonctionnel et l'extrémité de chaque branche possède une fonction réactive. Les deuxièmes sont aussi des structures multivalentes, sans unité de répétition, où les sucres sont directement connectés au cœur de la molécule par un bras

espaceur. Il existe un grand nombre de cœurs qui peuvent servir dans ce type de molécule ce qui en fait une grande source de diversité.

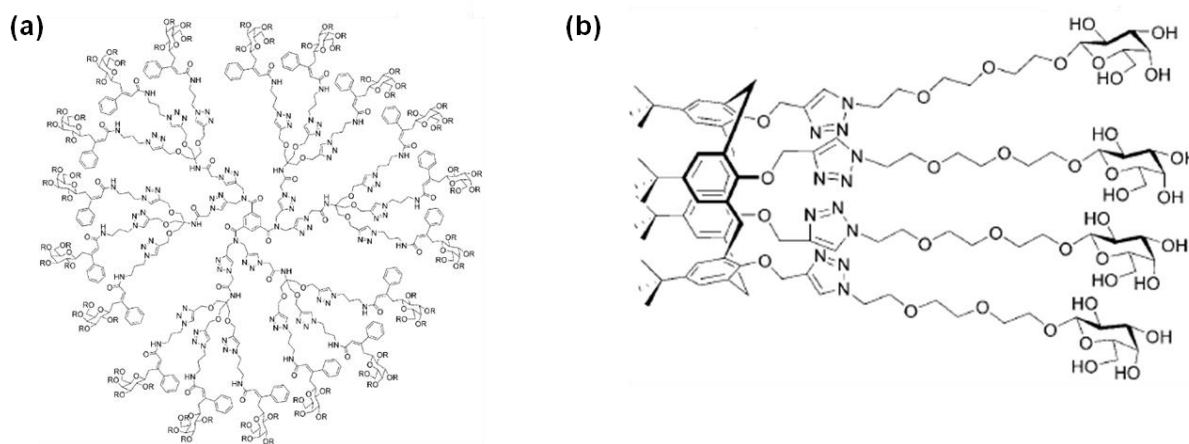


Figure I.26 Représentation structurale d'un glycodendrimère [Chabre 2011] et d'un glycocluster (calix[4]arène galactosylé en conformation cône [Cecioni 2011a]).

1.5.4 Les glycoclusters étudiés

Dans le cadre de cette nouvelle approche thérapeutique pour lutter contre l'adhésion de la bactérie *P. aeruginosa*, les équipes "Chimie organique 2 – Glycochimie" de Jean-Pierre Praly (Institut de Chimie et Biochimie Moléculaire, Université de Lyon) et "Oligonucléotides modifiés" de Jean Jacques Vasseur (Institut des Biomolécules Max Mousseron, Université de Montpellier) ont travaillé à la synthèse de glycoclusters galactosylés pour inhiber l'interaction de la lectine PA-IL avec les glycoconjugués des cellules épithéliales.

Il a été montré que la spécificité et l'efficacité d'un glycocluster dépendaient de sa structure de cœur et des caractéristiques géométriques de la molécule [Křenek 2007]. Le cœur du glycocluster doit ainsi permettre la multivalence de la molécule, amener à une diversité dans la géométrie en trois dimensions et enfin maintenir la stabilité dans la structure globale.

Le travail de ces deux équipes de recherche a permis de mettre en évidence trois glycoclusters de cœurs différents ayant une bonne affinité avec la lectine PA-IL. Dans la suite de ce paragraphe, nous allons présenter ces trois composés multivalents. Nous les observerons ensuite en complexe avec la lectine PA-IL pour comprendre l'influence de leur structure de cœur sur l'arrangement global des complexes. Nous utiliserons pour cela le microscope à force atomique. Les résultats seront présentés dans le chapitre 3 de ce manuscrit de thèse.

Glycocluster au cœur en calix[4]arène : sucre1

Le calixarène est un édifice moléculaire qui a déjà montré son efficacité dans des applications biologiques sur l'interaction lectine/glycoconjugué [Křenek 2007, André 2008]. De façon générale, les calixarènes sont des oligomères cycliques formés par condensation de phénols et d'aldéhydes. Le terme calixarène vient de la structure tridimensionnelle de la molécule en forme de calice ou de couronne (en grec, *calix* signifie calice) (Figure I.27). La cavité formée par ces oligomères a un fort caractère hydrophobe. La taille de cette cavité varie

en fonction du nombre de phénols. Le nombre de résidus phénoliques courant de 4 à 20, il est indiqué entre crochets dans le nom de la molécule, comme par exemple calix[4]arène ou calix[8]arène.

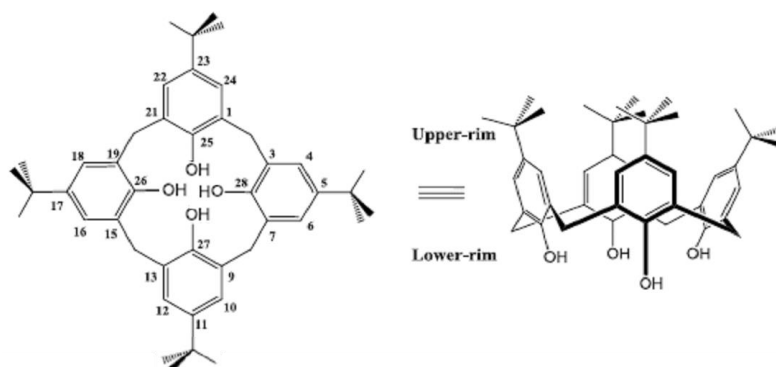


Figure I.27 Structure du calix[4]arène et conformation en cône [Cecioni 2010].

L'intérêt de cette structure repose sur la possibilité de créer des molécules de conformations différentes avec des topologies variables. Pour prendre le cas du calix[4]arène, auquel nous nous intéresserons dans notre étude, la Figure I.28 illustre les différentes conformations que peut prendre l'édifice moléculaire : cône, cône partiel, 1,2-alterné et 1,3-alterné. Suivant la conformation, la structure tridimensionnelle diffère.

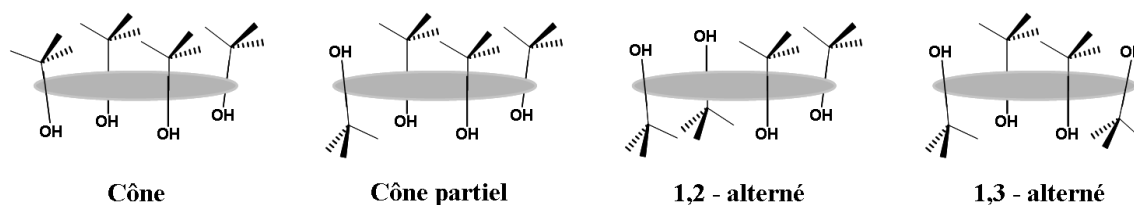


Figure I.28 Exemple de conformation pour le calix[4]arène.

Pour former le glycocluster, chaque extrémité de la molécule peut être fonctionnalisée avec un bras espaceur et une terminaison glucidique. Les bras espaceurs utilisés entre la terminaison glucidique et le calixarène ont une influence sur la rigidité, la densité électronique, la flexibilité et la stabilité chimique et biochimique [Křenek 2007]. La valence est définie par le nombre de fonctions glucidiques accrochées au calixarène. La structure en calix[4]arène permet d'avoir au maximum 4 ensembles "bras espaceur-glucide" en haut (upper-rim) et 4 en bas (low-rim) (Figure I.27). La répartition de ces terminaisons en haut ou en bas de la molécule est appelé la topologie et s'exprime à travers l'annotation : (nombre d'ensembles "bras espaceur-glucide" en bas : nombre d'ensembles "bras espaceur-glucide" en haut). Des exemples de glycoclusters avec des topologies et une valence différentes sont donnés sur la Figure I.29.

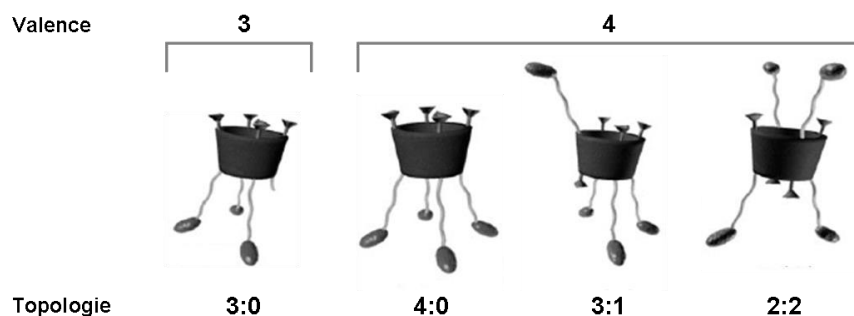


Figure I.29 Exemples de glycoclusters de calix[4]arène à différentes topologies et valences.

A partir de calix[4]arène multi-propargylés, nos collaborateurs ont relié ces derniers à des ensembles "bras espaceur-glucide" [Cecioni 2009]. Le couplage a été réalisé par cycloaddition 1,3-dipolaire catalysé au cuivre I par le couple CuI/DIPEA et sous activation micro-ondes (CuAAC).

Un seul ensemble "bras espaceur-glucide" a été considéré ici. Il s'agit d'un bras-espaceur de type triéthylèneglycol EG₃ et d'un galactose, glucide spécifique de la lectine PA-IL. Le composé final GalEG₃ est présenté sur la Figure I.30. La structure du bras a l'avantage d'être soluble dans l'eau et de donner une grande flexibilité donc une liberté de mouvement du bras grâce à l'hybridation sp³ des carbones et des oxygènes [Cecioni 2012].

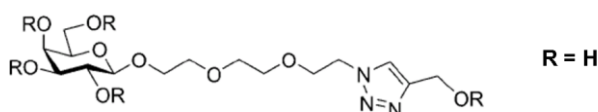
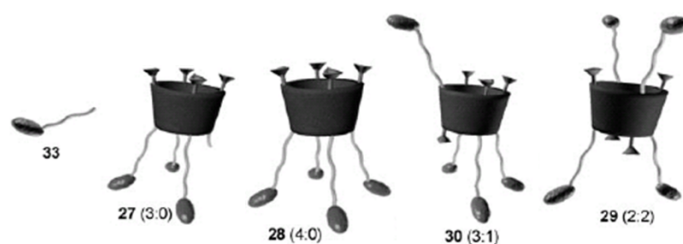


Figure I.30 Structure moléculaire du bras espaceur de type triéthylèneglycol avec un galactose en fonction terminale [Cecioni 2009].

Le couplage du bras galactosylé et du calix[4]arène donne lieu à un grand nombre de glycocluster de valence et de topologie différentes [Cecioni 2009]. Des schémas des structures réalisées avec leur topologie sont donnés sur la Figure I.31. L'affinité entre ces glycoclusters et la lectine PA-IL a été mesurée par résonance plasmonique de surface (SPR) et par microcalorimétrie de titration isotherme (ITC). Un composé GalEG₃ a servi de témoin monovalent. Ces analyses renseignent sur la constante de dissociation K_d , la concentration inhibitrice médiane IC_{50} et la valeur de stœchiométrie de chaque interaction lectine/glycocluster afin de définir le composé avec lequel l'affinité est la plus importante. Les résultats sont indiqués sur la Figure I.31.



Ligand	Valence	Topologie	SPR		ITC	
			K_d ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)	IC_{50} ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)	K_d ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)	n
33	1	-	150	71,9	150 ± 33	1
27	3	3:0	2,05	6,4	$2,05 \pm 0,389$	$0,79 \pm 0,03$
28	4	4:0	0,42	2,5	$0,42 \pm 0,16$	$0,33 \pm 0,01$
30	4	3:1	0,2	1,7	$0,2 \pm 0,005$	$0,26 \pm 0,01$
29	4	2:2	0,176	0,5	$0,176 \pm 0,006$	$0,24 \pm 0,01$

Figure I.31 Schéma de glycoclusters galactosylés et valeurs d'affinité et de stœchiométrie mesurées par SPR et ITC pour la lectine PA-IL [Cecioni 2009].

Le composé **29**, ayant les plus faibles valeurs de K_d et d' IC_{50} , présente la meilleure affinité avec la lectine PA-IL. La valence de la molécule est de 4 avec une topologie de 2:2 et une conformation 1,3-alterné. Le plan formé par les deux bras en haut est perpendiculaire à celui du bas (Figure I.32). Le glycocluster a une configuration en trois dimensions. Ses dimensions en nanomètre sont indiquées sur la Figure I.32.

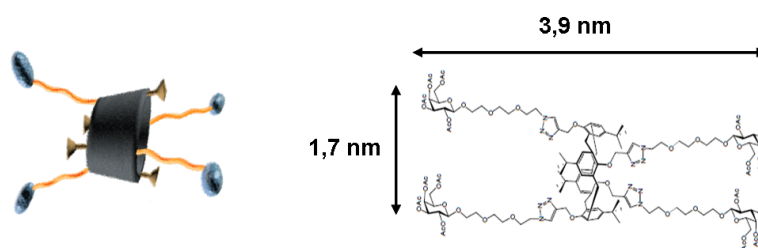


Figure I.32 Schéma du composé **29** 1,3-alterné et ses dimensions en nanomètre.

L'affinité étant la meilleure avec ce glycocluster, c'est celui que nous avons choisi d'observer par microscopie à force atomique sous forme de complexe avec la lectine PA-IL. Pour des facilités de compréhension et d'écriture pour la suite de ce manuscrit, nous nommerons **sucré1** le glycocluster galactosylé au cœur en calix[4]arène de conformation 1,3-alterné (composé **29**).

Glycocluster au cœur en porphyrine : sucre2

En biologie, l'hémoglobine et les globules rouges sont constitués en partie par des porphyrines. Cette molécule intervient aussi dans le transport de l'oxygène. Cependant, ses structures peuvent aussi servir de support à la synthèse de nouveaux glycoclusters.

Les porphyrines sont des structures moléculaires résultant de la condensation de noyaux pyrroles¹⁰ et d'aldéhydes pour former des macrocycles plans à quatre unités pyrroles (Figure III.20) [Cecioni 2011a]. On a alors la formation d'une tétraphénylporphyrine tétrapropargylée. Les porphyrines ont la capacité de complexer un cation métal en son centre. Dans notre cas, un ion zinc est introduit dans la molécule lors de l'étape de métallation. Cecioni *et al.* ont ainsi relié cette structure à des ensembles glucidiques composés d'un bras espaceur de type triéthylèneglycol EG₃ et d'un galactose pour former un nouveau glycoconjugué. Tout comme pour le **sucre1**, le couplage a été réalisé dans les conditions classiques de CuAAC. Il en résulte alors un glycocluster tétravalent avec une structure de cœur porphyrine-Zn plane et hydrophobe. Pour des facilités de compréhension, nous le nommerons **sucre2**. La structure finale est présentée sur la Figure I.33. D'un point de vue géométrique, cette molécule est plane avec un centre hydrophobe. Etendue, elle peut être considérée comme un carré de 3 nm de côté.

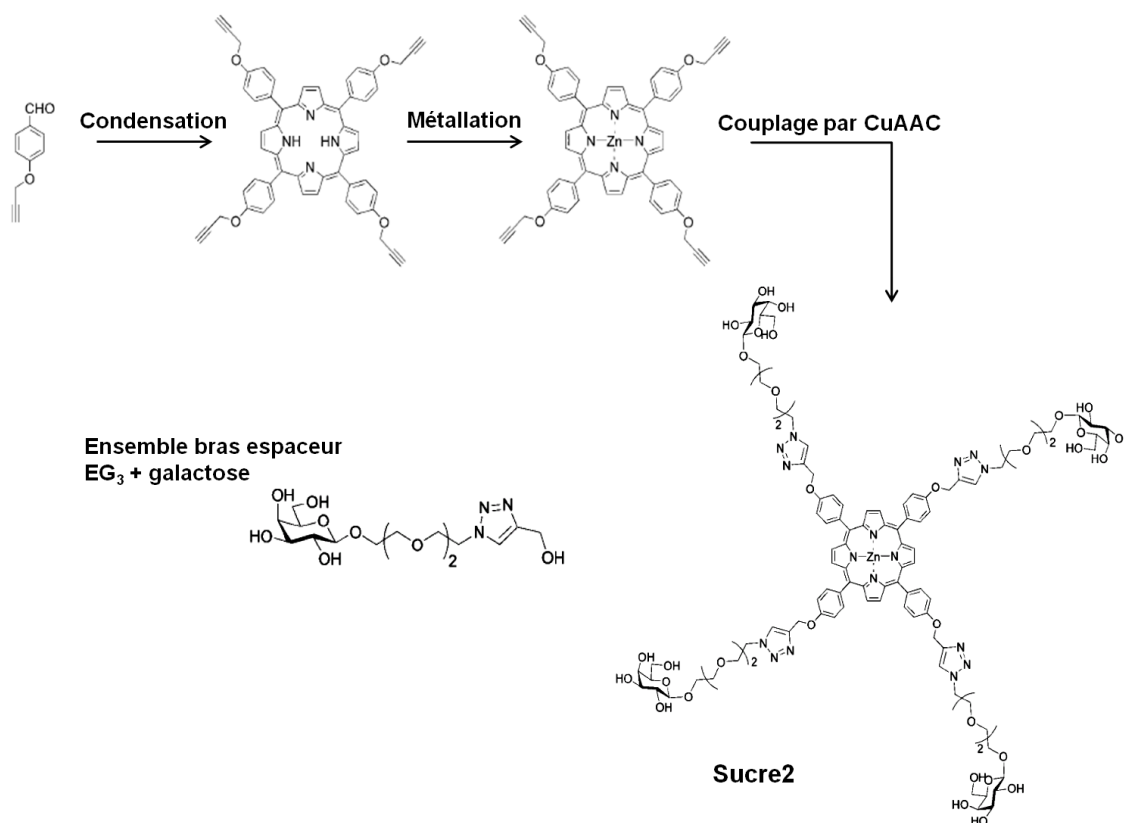


Figure I.33 Schéma de synthèse du **sucre2** [Cecioni 2011a].

La molécule de porphyrine a la caractéristique d'absorber la lumière visible. Elle doit donc être conservée à l'abri de la lumière. Cette photosensibilité est étudiée dans le cadre de nouvelles applications médicales liées au traitement de tumeurs par thérapie photodynamique [Sol 1998 ; Sol 2008].

¹⁰ Pyrrole : Cycle aromatique de cinq atomes dont un atome d'azote.

L'affinité entre le **sucre2** et la lectine PA-IL a été mesurée par SPR et ITC [Cecioni 2011a]. L'affinité entre la lectine et un ensemble "bras espaceur-galactose" a aussi été évaluée pour avoir un composé monovalent de référence. Les résultats sont présentés sur la Figure I.34.

Ligand	Valence	SPR	ITC	
		IC ₅₀ (μmol.L ⁻¹)	n	K _d (μmol.L ⁻¹)
Bras espaceur EG ₃ + galactose	1	210	1	150 ± 33
Sucre2	4	1,4	0,46 ± 0,04	0,33 ± 0,06

Figure I.34 Valeurs d'affinité et données thermodynamiques mesurées par SPR et ITC pour l'interaction de la lectine PA-IL et de deux glycoconjugués : le bras espaceur fonctionnalisé avec du galactose et le **sucre2** [Cecioni 2011a].

Cette glycoporphyrine a été utilisée par Chen *et al.* dans le développement d'un système de détection basé sur un transistor à effet de champ fonctionnalisé avec des nanotubes dans le cadre de la détection de bactéries [Chen 2012]. Les porphyrines glycosylées absorbées sur les nanotubes servent alors de marqueurs spécifiques au pathogène.

Glycluster au cœur en mannose : sucre3

Le cœur en calix[4]arène ayant donné de bon résultats en terme d'affinité, la synthèse d'un nouveau glycluster avec une conformation en couronne a été lancée en utilisant comme cœur un glucide : le mannose. Ce glycoconjugué, que nous appellerons **sucre3**, est en cours de brevet, nous décrivons donc très succinctement sa structure et les valeurs d'affinité déterminées avec la lectine PA-IL.

Le cœur de la structure est un mannose auquel ont été liés des bras espaceurs rigides galactosylés (Figure I.35) [Pourceau 2010].

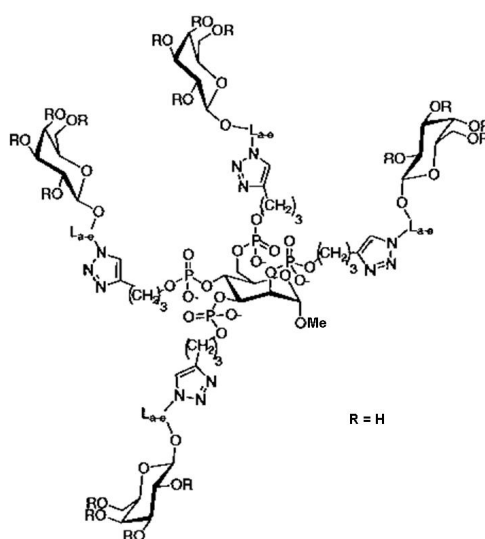


Figure I.35 Structure du glycluster au cœur mannose, **sucre3** (d'après [Pourceau 2010]).

Dans notre cas, le glycocluster est tétravalent. Autant par le cœur que par la nature des bras espaceurs, il a une configuration en trois dimensions ce qui favorise l'accessibilité des galactoses. L'analyse de l'affinité avec la lectine PA-IL a montré des résultats satisfaisant avec dans le cas de l'ITC, une valeur de stœchiométrie n comprise entre 0,5 et 0,33 (Figure I.36).

Ligand	Valence	ITC	
		n	K_d ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)
Sucre3	4	$0,46 \pm 0,01$	$0,194 \pm 0,007$

Figure I.36 Valeurs de stœchiométrie et de la constante de dissociation du **sucre3** déterminées par ITC avec la lectine PA-IL.

Dans ce premier chapitre de thèse, nous sommes revenus, en première et deuxième partie, sur les notions de base des sucres et des lectines. Nous avons ensuite décrit l'interaction lectine/sucre et introduit l'effet de la multivalence sur l'interaction. Les méthodes de caractérisation de l'interaction lectine/sucre pour déterminer l'affinité et les données thermodynamiques ont été présentées. Nous avons aussi discuté de la cristallographie, de la résonance magnétique nucléaire et des microscopes capables d'étudier l'arrangement de complexe lectine/sucre. Il nous a semblé que l'AFM était l'outil adéquat à notre étude. Enfin, en dernière partie, nous avons présent notre système biologique et le contexte scientifique auquel il appartient.

Nous allons donc nous intéresser à la lectine PA-IL de la bactérie *P. aeruginosa* et à trois glycoclusters tétravalents galactosylés de cœurs différents et étudié l'arrangement de leur complexes par AFM. L'interaction entre la lectine et ces sucres a déjà été analysée par plusieurs méthodes de caractérisation (HIA, ELLA, SPR, ITC,...) dans le cadre de l'étude de l'inhibition, grâce à des glycomimétiques, de l'adhésion de la bactérie *P. aeruginosa* aux cellules épithéliales.

Références

André S., Sansone F., Kaltner H., Casnati A., Kopitz J., Gabius H.-J. et Ungaro R., Calix[n]arene-based glycoclusters: bioactivity of thiourea-linked galactose/lactose moieties as inhibitors of binding of medically relevant lectins to a glycoprotein and cell-surface glycoconjugates and selectivity among human adhesion/growth-regulatory galectins, *ChemBioChem*, 2008, **9**, 1946-1661.

Avichezer D., Katcoff D. J., Garber N. C. et Gilboa-Garber N., Analysis of the amino acid sequence of the *Pseudomonas aeruginosa* galactophilic PA-I lectin, *J. Biol. Chem.*, 1992, **267**, 32, 23023-23027.

Bajolet-Laudinat O., Girod De Bentzmann S., Tournier J. M., Madoulet C., Plotkowski M. C., Chippaux C. et Puchelle E., Cytotoxicity of *Pseudomonas aeruginosa* internal lectin PA-I to respiratory epithelial cells in primary culture, *Infect. Immun.*, 1994, **62**, 10, 4481-4487.

Cecioni S., Approche multivalente des interactions saccharides – lectines : Synthèse de glycoclusters et analyse de la reconnaissance biomoléculaire, Thèse, 2010, Université de Lyon, Lyon, France

Cecioni S., Lalor R., Blanchard B., Praly J.-P., Imberty A., Matthews S. E. et Vidal S., Achieving high affinity towards a bacterial lectin through multivalent topological isomers of calix[4]arene glycoconjugates, *Chem. Eur. J.*, 2009, **15**, 13232-13240.

Cecioni S., Faure S., Darbost U., Bonnamour I., Parrot-Lopez H., Roy O., Taillefumier C., Wimmerová M., Praly J.-P., Imberty A. et Vidal S., Selectivity among two lectins: probing the effect of topology, multivalency and flexibility of “cliked” multivalent glycoclusters, *Chem. Eur. J.*, 2011, **17**, 2146-2159.

Cecioni S., Praly J.-P., Matthews S. E., Wimmerová M., Imberty A. et Vidal S., Rational design and synthesis of optimized glycoclusters for multivalent lectin-carbohydrate interactions: influence of the linker arm, *Chem. Eur. J.*, 2012, **18**, 6250-6263.

Chabre Y. M., Giguère D., Blanchard B., Rodrigue J., Rocheleau S., Neault M., Rauthu S., Papadopoulos A., Arnold A. A., Imberty A. et Roy R., Combining glycomimetic and multivalent strategies toward designing potent bacterial lectin inhibitors, *Chem. Eur. J.*, 2011, **17**, 6545-6562.

Chemani C., Imberty A., De Bentzmann S., Pierre M., Wimmerová M., Guery B. P. et Faure K., Role of LecA and LecB lectins in *Pseudomonas aeruginosa*-induced lung injury and effect of carbohydrate ligands, *Infect. Immun.*, 2009, **77**, 5, 2065-2075.

Chen Y., Vedala H., Kotchey G. P., Audfray A., Cecioni S., Imberty A., Vidal S. et Star A., Electronic detection of lectins using carbohydrate-functionalized nanostructures: grapheme versus carbon nanotubes, *ACS Nano*, 2012, **6**, 1, 760-770.

Chevolot Y., Bouillon C., Vidal S., Morvan F., Meyer A., Cloarec J.-P., Jochum A., Praly J.-P., Vasseur J.-J. et Souteyrand E., DNA-based carbohydrate biochips: a platform for surface glycol-engineering, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2007, **46**, 2398-2402.

Cioci G., Mitchell E. P., Gautier C., Wimmerová M., Sudakevitz D., Pérez S., Gilboa-Garber N. et Imberty A., Structural of calcium and galactose recognition by the lectin PA-IL of *Pseudomonas aeruginosa*, *FEBS Lett.*, 2003, **555**, 297-301.

DaSilva L. L. P., Blanco de Molfetta-Mahado J., Panunto-Castelo A., Denecke J., Goldman G. H., Roque-Barreira M.-C. et Goldman M. H. S., cDNA cloning and functional expression of KM+, the mannose-binding lectin from *Artocarpus integrifolia* seeds, *Biochim. Biophys. Acta*, 2005, **1726**, 251-260.

Elgavish S. et Shaanan B., Lectin-carbohydrate interactions: different folds, common recognition principles, *Trends Biochem. Sci.*, 1997, **22**, 22, 462-467.

Enquête nationale de prévalence des infections nosocomiales 2006, Institut de veille sanitaire, 2009, www.invs.sante.fr.

- Floret N., Bertrand X., Thouverez M. et Talon D., Infections nosocomiales à *Pseudomonas aeruginosa* : origine exogène ou endogène de la bactérie responsable ?, *Pathol. Biol.*, 2009, **57**, 9-12.
- Garber N., Guempel U., Belz A., Gilboa-Garber N. et Doyle R. J., On the specificity of the D-galactose-binding lectin (PA-I) of *Pseudomonas aeruginosa* and its strong binding to hydrophobic derivatives of D-galactose and thiogalactose, *Biochim. Biophys. Acta*, 1992, **1116**, 331-333.
- Gilboa-Garber N., Inhibition of broad spectrum hemagglutinin from *Pseudomonas aeruginosa* by D-galactose and its derivatives, *FEBS Lett.*, 1972, **20**, 2, 242-244.
- Gilboa-Garber N., *Pseudomonas aeruginosa* lectins, *Methods Enzymol.*, 1982, **83**, 378-385.
- Gilboa-Garber N., Katcoff D. J. et Garber N. C., Identification and characterization of *Pseudomonas aeruginosa* PA-III lectin gene and protein compared to PA-IL, *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 2000, **29**, 53-57.
- Glick N. et Garber N., The intercellular localization of *Pseudomonas aeruginosa* lectins, *J. Gen Microbiol.*, 1983, **129**, 3085-3090.
- Goldstein I. J., Hughes R. C., Monsigny M., Osawa T. et Sharon N., What should be called a lectin?, *Nature*, 1980, **285**, 66.
- Gordus A. et MacBeath G., Circumventing the problems caused by protein diversity in microarrays: implications for protein interaction networks, *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, **128**, 13668-13669.
- Hauber H.-P., Schulz M., Pforte A., Mack D., Zabel P. et Schumacher U., Inhalation with fucose and galactose for treatment of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis patients, *Int. J. Mol. Sci.*, 2008, **5**, 6, 371-376.
- Hughson F. M., Structural characterization of viral fusion proteins, *Curr. Biol.*, 1995, **5**, 3, 265-274.
- Imberty A., Wimmerová M., Mitchell E. P. et Gilboa-Garber N., Structures of the lectins from *Pseudomonas aeruginosa*: insights into the molecular basis for host recognition, *Microb. Infect.*, 2004, **6**, 221-228.
- Imberty A., Mitchell E. P. et Wimmerová M., , Structural basis of high-affinity glycane recognition by bacterial and fungal lectins, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 2005, **15**, 525-534.
- Imberty A., Chabre Y. M. et Roy R., Glycomimetics and glycodendrimers as high affinity microbial anti-adhesins, *Chem. Eur. J.*, 2008, **14**, 7490-7499.
- Kocourek J. et Horejsi V., Defining a lectin, *Nature*, 1981, **290**, 188.
- Křenek K., Kuldová M., Hulíková K., Stibor I., Lhoták P., Dudič M., Budka J., Pelantová H., Bezouška K., Fišerová A. et Křen V., N-acetyl-D-glucosamine substituted calix[4]arenes as stimulators of NK cell-mediated antitumor immune response, *Carbohydr. Res.*, 2007, **342**, 1781-1792.
- Laine R. A., Invited Commentary: A calculation of all possible oligosaccharide isomers both branched and linear yields 1.05 x 10¹² structures for a reducing hexasaccharide: the *Isomer Barrier* to development of single-method saccharide sequencing or synthesis systems, *Glycobiology*, 1994, **4**, 759-767.
- Lee R. T. et Lee Y. C., Affinity enhancement by multivalent lectin-carbohydrate interaction, *Glycoconjugate. J.*, 2000, **17**, 543-576.
- Lee Y. C., Biochemistry of carbohydrate-protein interaction, *FASEB J.*, 1992, **6**, 3193-3200.
- Lee Y. C. et Lee R. T., Carbohydrate-protein interactions: basis of glycobiology, *Acc. Chem. Res.*, 1995, **28**, 8, 321-327.
- Lis H. et Sharon N., Lectins: Carbohydrate-specific proteins that mediate cellular recognition, *Chem. Rev.*, 1998, **98**, 637-374.

- Lundquist J. J. et Toone E. J., The cluster glycoside effect, *Chem. Rev.*, 2002, **102**, 555-578.
- McCoy J. P., Varani J. et Goldstein I. J., Enzyme-Linked Lectin Assay (ELLA): Use of alkaline phosphatase-conjugated *Griffonia simplicifolia* B₄ isolectin for the detection of α -D-galactopyranosyl end groups, *Anal. Biochem.*, 1983, **130**, 437-444.
- Merritt E. A., Sarfaty S., Akker F., L'Hoir C., Martial J. A. et Hol W. G. J., Crystal structure of cholera toxin B-pentamer bound to receptor G_{M1} pentasaccharide, *Protein Science*, 1994, **3**, 166-175.
- Mitchell E., Houles C., Sudakevitz D., Wimmerová M., Gautier C., Pérez S., Wu A. M., Gilboa-Garber N. et Imberty A., Structural basis for oligosaccharide-mediated adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* in the lungs of cystic fibrosis patients, *Nat. Struct. Biol.*, 2002, **9**, 12, 918-921.
- Müller S. A., Aebi U. et Engel A., What transmission electron microscopes can visualize now and in the future, *J. Struct. Biol.*, 2008, **163**, 235-245.
- Nickel J. C., Ruseska I., Wright J. B. et Costerton J. W., Tobramycin resistance of *Pseudomonas aeruginosa* cells growing as a biofilm on urinary catheter material, *Antimicrob. Agents Chem.*, 1985, **27**, 4, 619-624.
- Pourceau, G., Mise au point de nouvelles méthodes de conjugaison oligonucléotide/sucre et développement d'un microsystème d'analyse des interactions lectine/sucre, Thèse, 2010, Université Montpellier 2, Montpellier, France.
- Quiococho F. A., Atomic structures and function of periplasmic receptors for active transport and chemotaxis, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 1991, **1**, 922-933.
- Registre français de la mucoviscidose, bilan des données 2010, Vaincre la mucoviscidose, 2012, www.vaincrelamuco.org.
- Rüdiger H. et Gabius H.-J., Plant lectins: occurrence, biochemistry, functions and applications, *Glycoconjugate J.*, 2001, **18**, 589-613.
- Sabin C., Mitchell E. P., Pokorná M., Gautier C., Utille J.-P., Wimmerová M. et Imberty A., Binding of different monosaccharides by lectin PA-III from *Pseudomonas aeruginosa*: thermodynamics data correlated with X-ray structures, *FEBS Lett.*, 2006, **580**, 982-987.
- Sharon N., Atomic basis of protein-carbohydrate interactions: an overview, Chap1, *Protein-carbohydrate interaction in infection diseases*, 2006a, Bewley C. A.
- Sharon N., Carbohydrates as future anti-adhesion drugs for infectious diseases, *Biochim. Biophys. Acta*, 2006b, **1760**, 527-537.
- Sharon N. et Lis H., Lectins, 2003, Kluwer Academic Publishers.
- Sharon N. et Lis H., History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecule, *Glycobiology*, 2004, **14**, 11, 53R-62R.
- Sol V., Branland P., Granet R., Kaldapa C., Verneuil B. et Krausz P., Nitroglycosylated *meso*-arylporphyrins as photoinhibitors of Gram positive bacteria, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1998, **8**, 3007-3010.
- Sol V., Chaleix V., Granet R. et Krausz P., An efficient route to dimeric porphyrin-RGD peptide conjugates via olefin metathesis, *Tetrahedron*, 2008, **64**, 364-371.
- Varki A., Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct, *Glycobiology*, 1993, **3**, 97-130.
- Zhang J., Pourceau G., Meyer A., Vidal S., Praly J.-P., Souteyrand E., Vasseur J.-J., Morvan F. et Chevolut Y., DNA-directed immobilisation of glycomimetics for glycoarrays application: comparaison with covalent immobilisation, and development of an on-chip IC₅₀ measurement assay, *Biosens. Bioelectron.*, 2009, **24**, 2515-2521.

Chapitre 2

Microscopie à force atomique

Dans ce deuxième chapitre, consacré à la microscopie à force atomique, nous présenterons, dans un premier temps, son principe de fonctionnement basé sur l'interaction entre une pointe et une surface. Nous décrirons alors les forces qui entrent en jeu dans ce système. Nous discuterons ensuite des différents modes d'imagerie pour nous intéresser plus spécifiquement au mode dynamique AM-AFM. Enfin, après avoir présenté notre système expérimental, nous ferons un état de l'art sur les études réalisées par AFM sur les lectines et leur interaction avec des sucres.

II.1 Principe général

Dans cette partie, nous allons tout d'abord revenir sur les découvertes scientifiques qui ont amené à l'élaboration du microscope à force atomique. Nous décrirons ensuite son fonctionnement ainsi que ses composants.

II.1.1 Historique : du profilomètre à stylet au microscope à force atomique

En 1929, un profilomètre à stylet est développé par Schmalz pour mesurer la rugosité d'une surface [Schmalz 1929]. Son principe de fonctionnement repose sur le déplacement horizontal du stylet à la surface de l'échantillon. Le mouvement vertical de la sonde, pressée légèrement contre la surface, est mesuré à l'aide d'un faisceau lumineux réfléchi sur le dessus du stylet et redirigé vers une émulsion photographique. Ce système donne un profil agrandi de la surface. La résolution de ce profileur est de l'ordre de 2500 nm en latéral et de 2,5 nm en vertical [Young 1972]. Elle reste très limitée à cause des dimensions du stylet et des systèmes de mouvement et de détection utilisés qui sont sujets aux bruits thermiques et acoustiques.

Young *et al.*, en 1972, construisent un microscope à émission de champ, appelé "topographiner", basé sur la mesure du courant entre une pointe métallique et un échantillon conducteur [Young 1972]. Des positionneurs en céramique piézoélectrique et un système électronique de rétro-action sont utilisés pour déplacer la pointe horizontalement et maintenir une distance de travail entre la pointe et la surface de l'échantillon constante. Cette distance est ajustée afin que pour une forte tension appliquée entre la pointe et la surface, un régime

d'émission de champ s'établit entre les deux. Le bruit instrumental et la distance entre la pointe et la surface affectent toutefois la résolution des mesures qui est estimée à 1000 nm en latéral et à 3 nm vertical.

En s'appuyant sur l'instrumentation du "topographiner", Binnig et Rohrer, dans les laboratoires d'IBM à Zurich, élaborent en 1982 un nouveau type de microscope, appelé microscope à effet tunnel (Scanning Tunneling Microscope, STM), afin de réaliser des mesures de topographie et de spectroscopie avec une sonde locale sur des films minces [Binnig 1982, Binnig 1987]. Expérimentalement, une pointe métallique avec à son extrémité un atome unique est approchée d'une surface conductrice à typiquement un nanomètre. A cette distance, quand une tension est appliquée entre la pointe et la surface, les ondes évanescentes associées aux électrons de la pointe et de la surface se recouvrent et un courant traverse la barrière de potentiel. Comme les ondes évanescentes décroissent exponentiellement avec la distance, le courant tunnel, typiquement de 1 nA, est dépendant de la distance pointe-surface. En maintenant le courant constant, on peut maintenir la distance fixe. En balayant la pointe au dessus de la surface à distance fixe, on réalise une image, c'est le principe de fonctionnement du microscope à effet tunnel. Le schéma fonctionnel du STM est donné sur la Figure II.1 [Binnig 1982].

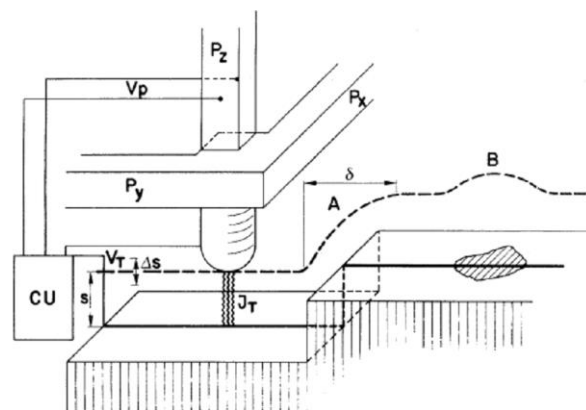


Figure II.1 Schéma fonctionnel du microscope à effet tunnel [Binnig 1982]. Une pointe métallique est fixée à l'extrémité d'un tripode piézoélectrique. Les systèmes piézoélectriques P_x et P_y permettent le balayage de la pointe sur la surface conductrice. Une tension V_p est appliquée entre la pointe et la surface et un courant tunnel de consigne J_T est définie par l'expérimentateur. Le système piézoélectrique P_z va ajuster la distance d entre la pointe et la surface afin d'atteindre cette valeur de consigne. Au cours du balayage, le courant est mesuré en permanence et comparé au courant de consigne J_T . Si le courant est différent de J_T , l'unité de contrôle CU , grâce à la boucle de rétro-action, ajuste la distance d entre la pointe et la surface avec le système piézoélectrique P_z pour revenir à la valeur du courant de consigne. Les mouvements de la pointe pour maintenir cette valeur de consigne renseignent sur la topographie de surface. La ligne en pointillé sur le schéma indique le déplacement en z pour un balayage en y pour une marche (A) et une zone contaminée (B) sur la surface.

Pour maintenir la pointe à une distance de 1 nm, il a fallu vaincre plusieurs verrous technologiques. En particulier, il a fallu attendre la découverte des céramiques piézos pour contrôler les déplacements nanométriques de la pointe. De plus, pour pouvoir mesurer avec précision ces grandeurs nanométriques (1 nm, 1nA), il a fallu réduire ou éliminer toutes formes de bruit auxquelles serait sensibles la pointe comme la dérive thermique, le bruit mécanique et acoustique mais aussi les perturbations électromagnétiques (secteur, courant de fuite,...). C'est pour cela que les microscopes reposent sur des systèmes d'amortissement. Ils

sont aussi placés dans des enceintes faisant office de cage de Faraday et d'isolant acoustique et disposés dans des salles climatisées [Binnig 1987].

Les microscopes à effet tunnel permettent d'atteindre des résolutions de l'ordre de 0,1 nm en latéral et 0,01 nm en vertical. Son extrémité doit se terminer par un seul atome à distance tunnel. Dès les premières applications, Binnig *et al.* montrent le potentiel remarquable de ce microscope en imageant les atomes d'une surface de silicium (111), confirmant ainsi l'hypothèse d'une reconstruction 7x7 pour un substrat chauffé à une température de 300°C [Binnig 1983]. Malgré cette haute résolution, l'utilisation du STM est restreinte. Pour que l'effet tunnel puisse s'établir, il faut que des échantillons soient conducteurs, ce qui limite l'analyse aux métaux, semi-conducteurs fortement dopés et à une utilisation sous vide pour éviter la contamination de la surface.

En 1986, Binnig, Quate et Gerber présentent un nouveau type de microscope combinant les principes du microscope à effet tunnel et du profilomètre à stylet, appelé microscope à force atomique (Atomic Force Microscope, AFM). Son principe de fonctionnement repose sur la détection des "forces atomiques" (répulsion coulombienne, forces de Van der Waals, électrostatiques,...) s'exerçant entre les atomes de l'extrémité de la sonde et ceux de la surface [Binnig 1986]. Le montage expérimental du premier AFM est présenté sur la Figure II.2.

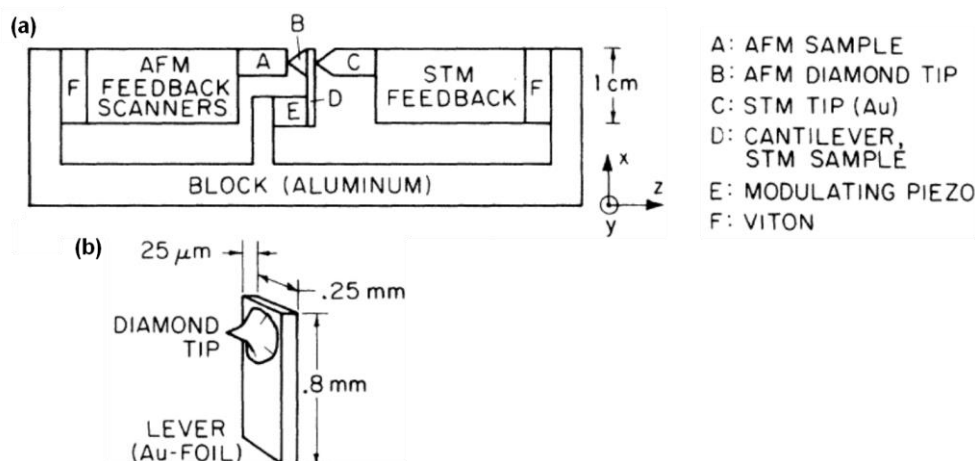


Figure II.2 (a) Schéma du montage expérimental du microscope à force atomique développé par Binnig *et al.*
(b) Schéma de la pointe diamant [Binnig 1986].

Proche de la surface, la pointe (sonde) à l'extrémité d'un levier très souple se déforme sous l'action des forces interatomiques. Initialement, ces déformations élastiques du levier étaient détectées par la pointe d'un STM. L'image de topographie est générée par le déplacement horizontal de la pointe sur la surface et la mesure de la déflexion et de la position de la pointe en chaque point.

Pour ce premier AFM, la pointe avec un rayon de courbure de 1 μm mesurait des forces d'interaction entre 10^{-2} et 10^{-5} N. La résolution de l'AFM pour un substrat de céramique (Al_2O_3) était alors de 3 nm en latéral et de moins de 0,1 nm en vertical [Binnig 1986].

La même année, Binnig et Rohrer reçoivent le prix Nobel de physique pour leur découverte du microscope à effet tunnel moins de quatre ans après la publication de leur invention en décembre 1982 [Binnig 1982].

II.1.2 Description générale du microscope à force atomique et de ses composants

De nos jours, le principe du microscope à force atomique reste le même, même si la notion de force atomique est un peu réductrice. Le système instrumental est schématisé sur la Figure II.3. La surface est balayée en x et y par une sonde nanométrique placée à l'extrémité d'un levier flexible rattaché à un scanner (céramique piézoélectrique). A l'approche de la surface, la pointe et la surface rentrent en interaction. Le levier subit une déformation (déflexion) proportionnelle à la force F ressentie tel que :

$$F = k_C \cdot Z_C$$

Avec :

k_C la constante de raideur du levier ;

Z_C la déflexion du levier.

Durant le balayage, le système de détection mesure cette déflexion en chaque point et envoie au système de contrôle un signal proportionnel à la valeur de la déflexion mesurée. Si la valeur de déflexion mesurée n'est pas égale à la valeur de consigne, appelée point de fonctionnement ou setpoint (définie par l'expérimentateur), le contrôleur électronique grâce à la boucle d'asservissement (rétro-action) ajuste la position en hauteur de la pointe au moyen du scanner en z . Ce changement de déflexion du levier résulte d'un changement de topographie ou de nature de la surface. Ainsi la valeur de ce déplacement vertical ou réajustement est enregistrée et interprétée pour retranscrire la topographie de l'échantillon.

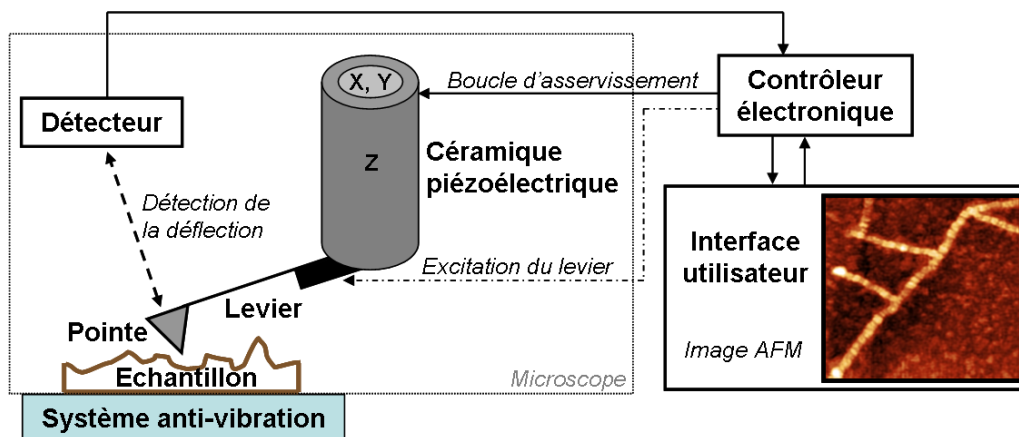


Figure II.3 Schéma de principe du microscope à force atomique.

Nous allons maintenant décrire les principaux composants du microscope :

Scanner

Le positionneur ou scanner permet de déplacer la pointe dans les trois directions de l'espace avec une grandeur sur des distances allant de la fraction d'angström à plusieurs dizaines de microns. Il contrôle deux mouvements indépendants : le balayage en x et y et le mouvement vertical de la pointe en z . Il s'agit généralement d'un matériau piézoélectrique qui, sous l'action d'un champ électrique, a la propriété de se contracter ou de se dilater. Ce matériau se compose de céramique ferroélectrique polycristalline telle que le PZT (titanate zirconate de plomb).

Pour créer des déplacements dans les trois directions de l'espace, soit deux piézotubes sont utilisés, le piézo en x - y étant imbriqué dans celui en z , soit un piézo séparé en 4 secteurs identiques sont utilisés. Pour obtenir le déplacement en z du levier, une tension électrique est appliquée sur le piézo dans le premier cas, ou sur les 4 secteurs dans le deuxième, conduisant suivant le signe à l'élongation ou la rétraction de la céramique. Les déplacements latéraux sont obtenus par torsion de la céramique suivant x ou y en appliquant des tensions opposées sur deux secteurs opposés.

Suivant l'AFM utilisé, l'amplitude de déplacement en x - y du système piézoélectrique varie entre 1 et 100 μm . Cependant, il faut noter que pour de grandes amplitudes, la réponse de la céramique à la tension appliquée peut être non-linéaire. Pour limiter ses effets, le calibrage des positionneurs doit être régulièrement effectué à l'aide de réseaux de calibration dont les dimensions latérales sont bien définies. De même, pour le déplacement vertical, l'application de forte tension induit un comportement hystérétique du piézo. Une surveillance et un réajustement sont aussi pratiqués avec des réseaux spécifiques.

Pour éviter un bruit électrique et mécanique du système piézoélectrique sur la pointe, il est possible de dissocier le balayage en x - y du mouvement vertical de la pointe en z en utiliser deux scanners différents : un positionneur dans la tête AFM pour le déplacement vertical et un autre scanner, placé sous l'échantillon, pour le mouvement plan de la surface.

Pointe AFM

Par définition, la sonde d'un AFM est un objet microscopique qui interagit localement avec la surface de l'échantillon au moyen de forces "interatomiques". Elle est composée de trois éléments : une pointe, un levier flexible et un support. Elle est généralement en silicium ou en nitrure de silicium (Si_3N_4).

La pointe est l'élément essentiel puisque c'est par elle que va se faire l'interaction. Son rayon de courbure a une influence sur l'interaction et sur la qualité de l'image. Généralement, le rayon de courbure a une valeur autour de 10 nm. Il existe des pointes dites "ultrasharp" avec un rayon de courbure de 1-2 nm. La forme de la pointe peut être conique ou pyramidale (Figure II.4).

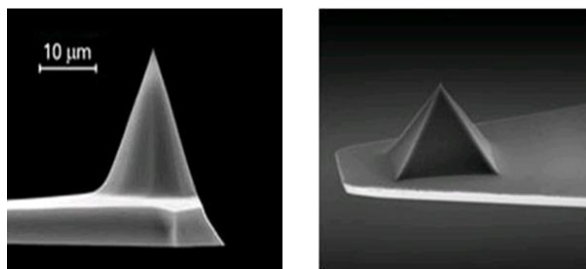


Figure II.4 Image au MEB de pointes AFM de forme conique (à droite) et pyramidale (à gauche)
(Source : µMasch et Nanoworld).

Le levier de la sonde peut avoir deux types de géométrie : rectangulaire (autrement dit poutre) ou triangulaire (en forme de V) (Figure II.5). Les leviers triangulaires sont plus stables d'un point de vue mécanique. Deux caractéristiques sont à prendre en compte : la raideur normale du levier et sa fréquence de résonance. Elles ont une importance suivant le mode d'imagerie, le milieu d'observation et le type d'échantillon observé.

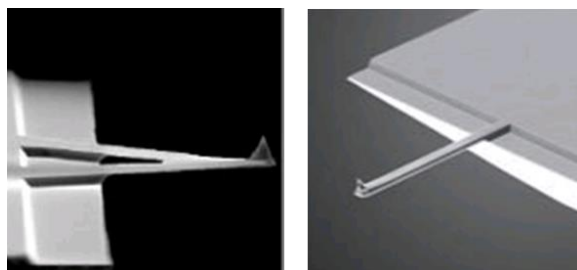


Figure II.5 Image au MEB de pointes AFM avec un levier triangulaire (à gauche) et rectangulaire (à droite)
(source : µMasch).

La pointe peut être modifiée pour atteindre une sensibilité à d'autres forces. Il est possible de recouvrir la pointe de métal pour mesurer des forces électrostatiques sur des surfaces conductrices (or) ou des forces magnétiques sur des surfaces magnétiques. Pour étudier une interaction intermoléculaire avec les fonctions chimiques présentes sur la surface, la pointe peut être fonctionnalisée chimiquement.

Système de détection

La déflexion du levier est un effet important dans l'AFM puisqu'il rend compte des variations des forces d'interaction entre la pointe et la surface. Plusieurs modes de détection sont possibles. En 1986, Binnig *et al.* ont utilisé la pointe d'un microscope à effet tunnel pour mesurer le courant tunnel circulant entre celle-ci et la surface supérieure conductrice du levier d'AFM [Binnig 1986]. Des systèmes de détection par interférométrie [Martin 1987], mesure de capacitance [Neubauer 1990] ou encore de piézorésistivité [Tortonesi 1993] ont été développés par la suite.

La détection optique reste la plus couramment utilisée par sa facilité d'utilisation et son application dans tous les milieux d'observation. Son principe est basé sur la réflexion d'un faisceau laser ($\lambda = 670 \text{ nm}$) sur l'extrémité supérieure du levier vers un capteur (Figure II.6 (a)) [Meyer 1988]. Divisée en 4 quadrants, la photodiode permet de définir précisément la position et l'intensité du spot lumineux et de convertir ces données en valeur d'intensité

électrique. Généralement, la direction du faisceau laser réfléchi est ajustée vers la photodiode afin que le maximum d'intensité soit détecté au centre de la photodiode. C'est la position de consigne du spot (Figure II.6 (a)). Si on nomme les quatre zones de la photodiode par les lettres A, B, C et D en partant d'en haut à gauche, les zones sont associées par deux en fonction du mouvement que l'on veut détecter. L'intensité maximale du laser est donnée par la somme des quatre segments (A+B+C+D) (Figure II.6 (a)). La déflexion verticale est déduite de l'expression des valeurs du signal (A+B)-(C+D) (Figure II.6 (b)). La déflexion latérale ou torsion est quant à elle donnée par (A+C)-(B+D) (Figure II.6 (c)). Ces résultats convertis en signaux électriques sont envoyés au contrôleur électronique pour être comparés au point de fonctionnement (valeur et position de consigne).

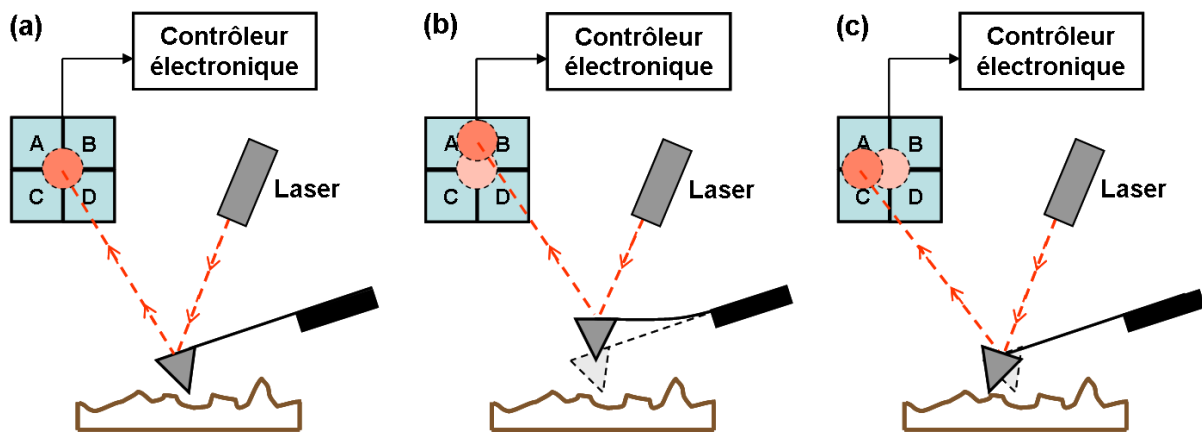


Figure II.6 Principe de détection optique (a), pour un mouvement de flexion (b) et pour un mouvement de torsion (c) de la pointe.

Cette détection crée toutefois un échauffement du levier ce qui provoque une dérive thermique. Le système a donc besoin de temps avant de se stabiliser.

Boucle d'asservissement

Le contrôleur électronique a pour rôle de comparer le signal envoyé par la photodiode au setpoint défini par l'utilisateur. Ce signal erreur passe ensuite par un contrôleur PID (Proportionnel, Intégral, Différentiel) avant d'être envoyé au système piézoélectrique pour réajuster si besoin verticalement la position de la pointe et ramener le signal sur la photodiode à sa valeur (ou position) de consigne (Figure II.7). La précision et la vitesse de réponse du système d'asservissement dépendent du facteur de gain de la boucle définie avec le contrôleur PID et doivent être ajustées par l'expérimentateur.

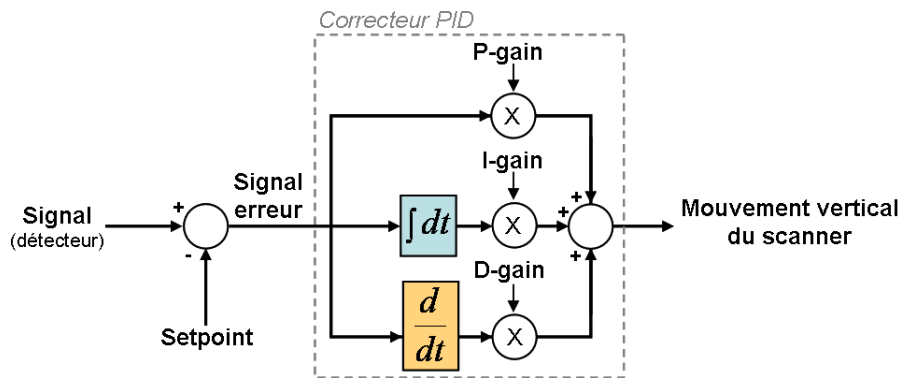
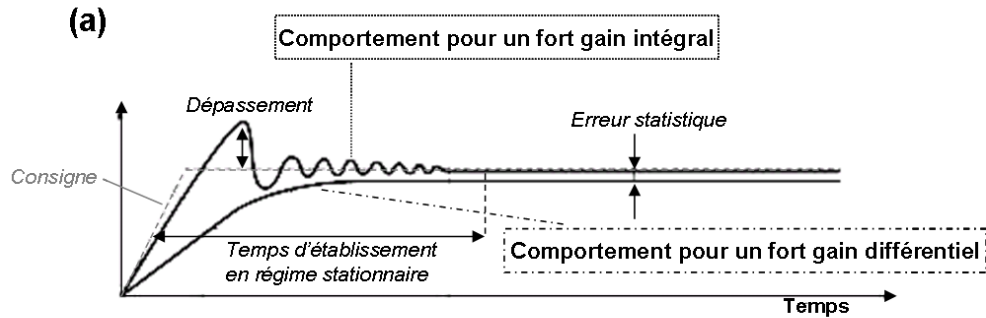


Figure II.7 Schéma électronique d'un régulateur PID.

Sur l'interface utilisateur, ce paramètre est défini comme le gain. Dans certains cas, il est séparé en trois : gain Proportionnel (P-gain), gain Intégral (I-gain) et gain Différentiel (D-gain). Ce correcteur sert à moduler la réponse du piézo.

- Pour un gain proportionnel, la commande est proportionnelle à l'erreur. Quand ce gain augmente, on a un dépassement important de la consigne.
- Par le gain intégral, le signal erreur est intégré. En augmentant ce gain, le signal erreur diminue avec le temps même si on a un fort dépassement (Figure II.8 (a)). Cependant le temps de retour au régime stationnaire s'allonge. L'erreur statistique est toutefois nulle. Pour une forte valeur, la réponse du système est longue (Figure II.8 (b)).
- Pour le gain différentiel, la commande est proportionnelle à la dérivée de l'erreur. En augmentant ce paramètre, le temps de réponse est plus court, on diminue les brusques changements dans le signal erreur (Figure II.8 (a)), mais on amplifie le bruit en haute fréquence.

On peut dire qu'en général, pour un gain trop fort, des oscillations du système piézoélectrique amènent à des images bruitées. À l'inverse, un gain trop faible affecte aussi le juste fonctionnement du positionneur vertical en "gommant" des détails sur les images. Ce paramètre de gain est donc un facteur important dans la qualité des images AFM et les trois gains sont ajustés par l'expérimentateur en fonction des points, des surfaces à analyser, du milieu environnant pour améliorer la qualité de l'image.



(b)

	Précision	Stabilité	Rapidité
Gain proportionnel	↗	↘	↗
Gain intégral	↗	↘	↘
Gain différentiel	↘	↗	↗

Figure II.8 (a) Représentation graphique de la réponse-type à un comportement de fort gain intégral et différentiel ; (b) Tableau récapitulatif du comportement des gains PID sur des trois facteurs de qualité (Source : Schneider Electric).

Le fonctionnement de la boucle d'asservissement définit deux modes de travail : "déflexion constante" ou "hauteur constante". Dans le premier cas, appelé aussi "force constante", la boucle est active tout au long du scan pour ajuster la distance pointe-surface grâce au piézo. Les résultats topographiques seront déduits de cette variation de hauteur. Dans le second cas, la boucle est déconnectée. La pointe scanne la surface sans que le piézo vertical ne bouge. C'est la variation de déflexion du levier qui va être utilisée pour reconstruire l'image AFM.

II.2 Forces d'interaction

Le principe du microscope à force atomique est basé sur la détection de la déflexion d'un levier souple soumis à des forces lors de l'approche de la pointe vers la surface à étudier. Dans cette partie, nous allons, dans un premier temps, présenter les propriétés mécaniques du levier pour ensuite expliquer son comportement lors de l'approche et le retrait de la pointe de la surface. Nous donnerons l'expression des forces rentrant en jeu dans ce système approche-retrait et finirons en expliquant l'influence du milieu liquide sur ces forces d'interaction.

II.2.1 Propriétés mécaniques du levier

Quand une force est appliquée sur la pointe, le levier se déforme. Dans le cas d'une détection optique, le spot du faisceau laser réfléchi sur la face supérieure du levier va se déplacer sur la photodiode d'un angle proportionnel à la variation du levier à son extrémité $\frac{dZ_c}{dX}$ d'après la Figure II.9.

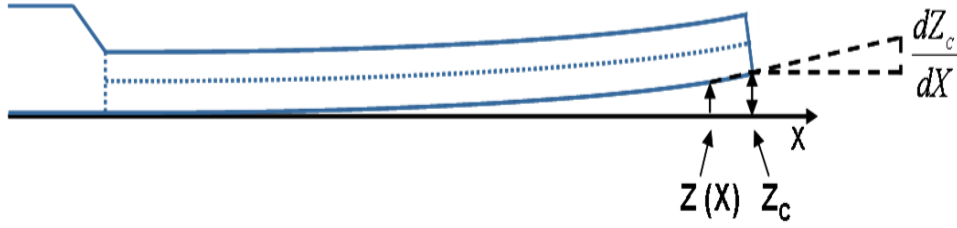


Figure II.9 Représentation schématique de la déformation du levier pour une force F appliquée à son extrémité. X est la coordonnée horizontale du levier, $Z(X)$ est la déflexion du levier à la position X et Z_c la déflexion à l'extrémité du levier. dZ_c/dX exprime la déformation à l'extrémité du levier [Butt 2005].

Dans le cas simple d'un levier rectangulaire de largeur w , de longueur L et d'épaisseur t_c , cette variation peut s'exprimer de la façon suivante :

$$\frac{dZ_c}{dX} = \frac{6FL^2}{Ewt_c^3}$$

Avec :

E le module de Young du levier ;

F la force appliquée au levier dans la direction normale.

La déflexion du levier peut alors être déduite :

$$Z_c = \frac{4FL^3}{Ewt_c^3} = \frac{2}{3}L \frac{dZ_c}{dX}$$

Les leviers sont définis par leur constante de raideur k_c et leur fréquence de résonance ν_0 . L'expression de la constante de raideur dépend de la géométrie du levier :

$$k_c = \frac{F}{Z_c} = \frac{Ewt_c^3}{4L^3} \quad \text{pour un levier rectangulaire [Butt 2005]}$$

$$k_c = \frac{Ewt_c^3}{2L^3} \cos \alpha_0 \left[1 + \frac{4w^3}{t_c^3} (3 \cos \alpha_0 - 2) \right]^{-1} \quad \text{pour un levier triangulaire [Sader 1995]}$$

Avec :

α_0 l'angle d'ouverture du levier triangulaire.

Quant à la fréquence de résonance, elle est définie par l'expression suivante :

$$\nu_0 = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k_c}{m^*}}$$

Avec :

m^* la masse effective du système levier-pointe.

La haute sensibilité vient de la faible valeur de k_c ou du faible ratio t_c/L . Pour éviter des problèmes d'interférence causés par le bruit, la fréquence de résonance doit être grande devant les fréquences des vibrations externes (bâtiment, bruit acoustique, table) et devant celle de la boucle d'asservissement.

II.2.2 Mesure et courbe de force

Par des mesures de force entre la pointe et la surface, il est possible de se renseigner sur les propriétés mécaniques et chimiques de l'échantillon. Le mouvement d'approche et de retrait de la pointe vers la surface en un point donné et les valeurs de la déflexion du levier prises lors de ce déplacement vertical permettent de tracer une courbe de force (ou d'approche-retrait) d'où peuvent être tirées ces informations. Dans ce paragraphe, l'allure de la courbe de force sera expliquée ainsi que la méthode de conversion utilisée pour tracer une courbe force-distance.

Description générale

La spectroscopie de force en AFM est basée sur la mesure de la déflexion du levier en fonction de la position du piézo. Cela revient à mesurer le champ de force perçu par la pointe à une distance donnée de la surface. La Figure II.10 présente une courbe approche-retrait caractéristique pour un substrat dur.

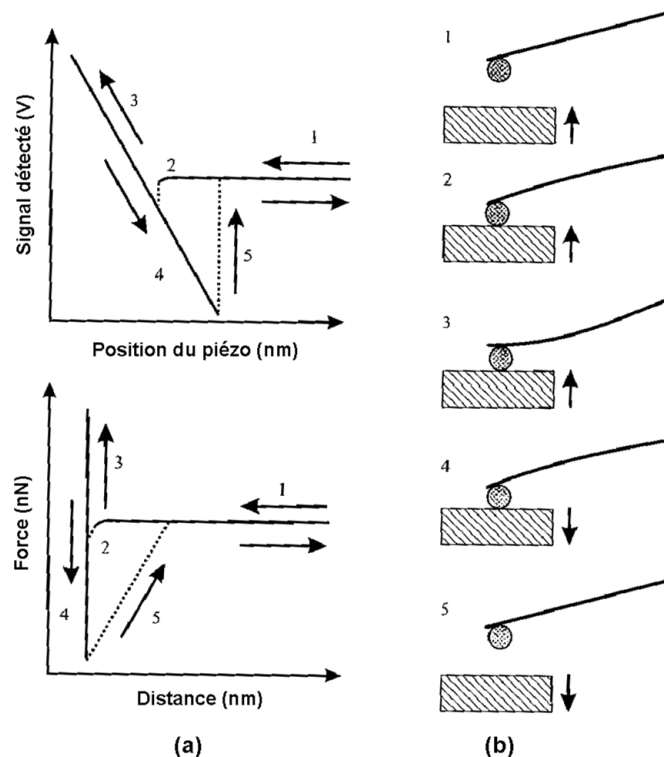


Figure II.10 Représentation schématique d'une courbe signal détecté-déplacement du piézo (a, haut) et de sa correspondance en courbe force-distance (a, bas). (b) traduit la forme du levier à différents moments sur la courbe [Butt 2010].

D'après la Figure II.10, en 1, la pointe se situe loin de la surface, elle ne ressent pas la présence de l'échantillon. La déflexion du levier ne varie pas, la force est donc nulle. A l'approche de la surface, en 2, la pointe entre en interaction avec la surface avec une force attractive. Le levier fléchit alors vers le bas jusqu'à faire un saut sur la surface (saut au contact). Une fois la pointe et l'échantillon en contact, le levier continue à être rapproché de la surface (en 3). Il se courbe alors de façon concave (flexion vers le haut) sous l'effet d'une

force répulsive. La force appliquée sur l'échantillon augmente fortement. Au retrait (en 4), tant que la pointe reste en contact, le trajet est identique à l'aller. Dans le cas d'une force d'adhésion entre la pointe et l'échantillon, la pointe est maintenue plus longtemps en contact avec la surface jusqu'à se détacher brutalement (en 5) et revenir à sa position initiale de force nulle pour une distance pointe-surface plus grande.

Différents paramètres influencent ces courbes de force tels que la distance parcourue, la vitesse d'approche, la force appliquée sur la surface (setpoint), la nature de l'échantillon, le milieu...

Conversion des données en courbes de force :

Les données brutes d'une mesure de force donnent une courbe de la déflexion du levier Z_C , en fonction de la position du piézo Z_P , normal à la surface. Pour obtenir une courbe force-distance, les deux paramètres Z_C et Z_P doivent être convertis pour ensuite pouvoir en déduire des données sur l'élasticité de l'échantillon ou son adhésion à la pointe par exemple.

La force est obtenue par le produit de la déflexion du levier et de la constante de raideur du levier k_C tel que :

$$F = k_C \cdot Z_C$$

La séparation, "distance" entre la pointe et la surface, D , est donnée en ajoutant la déflexion de la pointe à la position du levier :

$$D = Z_P + Z_C$$

Trois paramètres sont donc à connaître : la sensibilité de la photodiode, la constante de raideur de la pointe et la distance-zéro c'est-à-dire la position à laquelle la pointe rentre en contact avec la surface.

A partir de la courbe représentant l'intensité de la photodiode I_{PSD} en fonction de la position du piézo Z_P , deux de ces paramètres peuvent être déduits (Figure II.11). La partie linéaire dans la zone de contact permet de déterminer la distance-zéro et la pente de cette partie définit la valeur de la sensibilité. Cependant, suivant la nature de la surface et son interaction avec la pointe, la détermination de ces paramètres diffère. La Figure II.11 présente trois cas, pointe et échantillon infiniment durs et sans force de surface (a), pointe et échantillon infiniment durs et avec force de surface (b) et pointe et échantillon déformables mais sans force de surface (c) décrits par Butt *et al.* [Butt 2005]. On parle ici plus particulièrement de fortes forces répulsives.

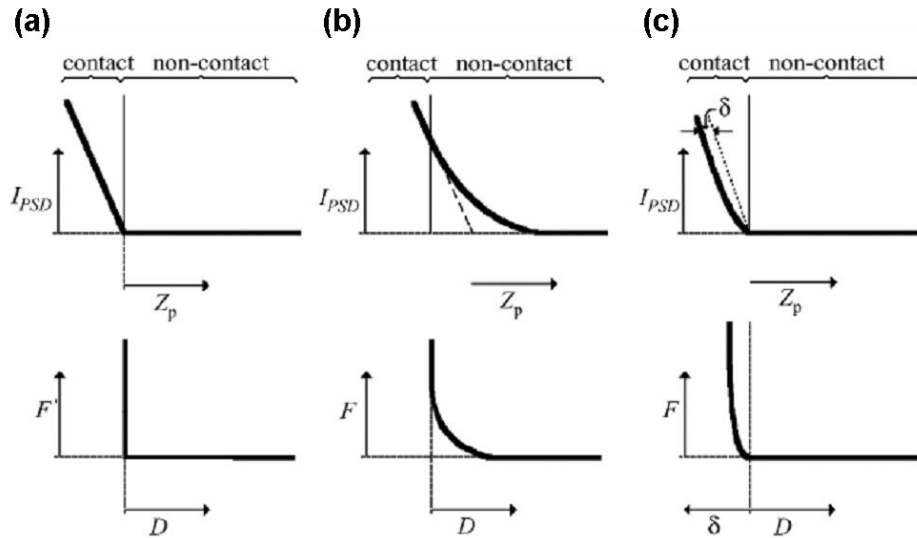


Figure II.11 Courbes représentant l'intensité de la photodiode I_{PSD} en fonction de la position du piézo Z_p (courbes du haut) et conversion en une courbe donnant la force F en fonction de la distance D (courbes du bas) dans trois cas différents : (a) pointe et échantillon infiniment durs et sans force de surface, (b) pointe et échantillon infiniment durs avec des forces de surface et (c) pointe et échantillon déformables sans force de surface [Butt 2005].

- Pointe et échantillon infiniment durs et sans force de surface (Figure II.11 (a)) : la courbe $I_{PSD}-Z_p$ est composée de deux parties linéaires : la première, horizontale, dans le régime non-contact, indique une déflexion nulle du levier ; la seconde, dans le régime contact, augmente linéairement. A partir de cette seconde partie, la sensibilité peut être déduite de la pente par l'expression $\Delta I_{PSD} / \Delta Z_p$. La déflexion est exprimée par le signal d'intensité de la photodiode et de la sensibilité par :

$$Z_C = I_{PSD} / (\Delta I_{PSD} / \Delta Z_p)$$

Avec la constante de raideur du levier, le signal de la photodiode est converti en force :

$$F = k_C \cdot Z_C = k_C \cdot (I_{PSD} / (\Delta I_{PSD} / \Delta Z_p))$$

La vraie distance entre la pointe et la surface est définie par :

$$D = Z_p + Z_C$$

Avec :

Z_p , déterminé comme zéro au point de changement d'allure de la courbe $I_{PSD}-Z_p$.

Par référence, Z_p est positif et augmente quand la pointe s'éloigne de la surface, comme indiqué sur la Figure II.10. Dans le régime en non-contact, comme le système n'est pas soumis à des forces, Z_C est nul. Le déplacement est donc uniquement dépendant de Z_p : $D = Z_p$.

Dans le régime contact, la déflexion du levier est inversement proportionnelle au déplacement du piézo ($Z_p = -Z_C$), le déplacement est donc nul, $D = 0$. L'allure de la courbe force-distance ($F-D$) est donc composée de deux parties : la première,

horizontale, où la force est nulle, la seconde, verticale avec un déplacement nul mais une force avec une valeur finie.

- Pointe et échantillon infiniment durs avec des forces de surface (Figure II.11 (b)) : on distingue sur la courbe $I_{PSD}-Z_P$ les deux régimes, contact et non-contact, avec une force répulsive exponentiellement décroissante. La sensibilité est déterminée, en régime contact, sur la partie linéaire de la courbe. Loin de la surface, la pointe n'est pas soumise à la force répulsive, la déflexion Z_C est nulle. Les courbes de force peuvent être converties à partir de l'expression classique :

$$F = k_C \cdot Z_C$$

Le point de contact, $Z_P = 0$, est évalué par extrapolation, à l'intersection de la partie linéaire dans le régime contact et l'axe des abscisses. Il est donc important d'appuyer suffisamment sur la surface pour arriver à cette réponse linéaire. Le degré d'extrapolation renseigne sur l'erreur de la distance-zéro. La distance D est déterminée en régime non-contact par :

$$D = Z_P + Z_C = Z_P + F/k_C$$

En contact, on a le même comportement que dans le cas précédent : $Z_P = -Z_C$ et $D = 0$.

- Pointe et échantillon déformables sans force de surface (Figure II.11 (c)) : le système ne prenant pas en compte les forces de surface, la partie en non-contact, est nulle avec la distance égale à la valeur du déplacement du piézo : $D = Z_P$. Dans le régime contact, l'allure de la courbe, non linéaire, indique une déformation de l'échantillon et/ou de la pointe, une indentation δ de la surface. Pour parvenir à convertir la courbe $I_{PSD}-Z_P$ en courbe force-distance, plusieurs théories ont été développées en considérant la déformation de l'échantillon comme plastique, c'est-à-dire, que l'échantillon reprend sa forme originale une fois que la pointe n'applique plus d'action sur celui-ci. Dans la phase d'approche et de retrait de la pointe, la déformation élastique de l'échantillon est relative à son module de Young E . Plusieurs théories ont été développées pour modéliser cette déformation. Dans le cas où les forces de surface sont négligeables, le modèle de Hertz, qui met en relation la force F , le rayon de courbure de la pointe au contact a et la déformation (ou indentation) δ , peut être appliqué en considérant une pointe sphérique et une surface plane [Hertz 1882]. La force est donnée par l'expression :

$$F = \frac{\delta^{3/2} 2E\sqrt{R}}{3(1-\nu^2)}$$

Avec :

R le rayon de courbure de la pointe ;

ν le ratio de Poisson.

Pour une faible indentation ($\delta \ll Z_C$), le calcul de la sensibilité de la photodiode reste le même. Si ce n'est pas le cas, un modèle plus spécifique doit être choisi pour la déterminer déduit des théories Derjaguin-Muller-Toporov (DMT) ou Johnson-Kendall-Roberts (JKR) [Derjaguin 1975 ; Johnson 1971] qui considèrent l'adhésion

de la pointe à l'échantillon. Pour la théorie DMT, on considère le cas d'une pointe de faible rayon de courbure et d'un échantillon dur. Durant le contact, la surface ne subit pas de déformation. La force d'adhésion agit à l'extérieur de l'aire de contact. A l'inverse la théorie JMT s'applique aux pointes de large rayon de courbure et aux échantillons dits "mous". La force d'adhésion se situe alors à l'aire de contact et l'échantillon est déformé sous la pression de la pointe.

Pour la détermination de la distance-zéro, en général, il est établi qu'avant le contact, le déplacement est considéré comme la distance de déplacement alors qu'après le contact, il s'agit de l'indentation.

II.2.3 Forces à longue portée

Nous allons tout d'abord nous intéresser aux forces qui interagissent entre la pointe et l'échantillon à longue portée : les forces de Van der Waals et électrostatiques.

Interaction de Van der Waals

Par définition, l'interaction de Van der Waals entre deux molécules est la somme des interactions de Keesom (deux dipôles en rotation libre, effets de rotation), de Debye (dipôle permanent-dipôle induit, effets d'induction) et de London (fluctuations de charges quantiques, effets de dispersion) [Butt 2010]. L'expression de l'énergie de Van der Waals est donnée par :

$$E_{vdw} = \frac{1}{r^6} \left[\frac{\mu_1^2 \cdot \mu_2^2}{3(4\pi \cdot \varepsilon_0 \cdot \varepsilon)^2 \cdot k_B \cdot T} + \frac{\mu_1^2 \cdot \alpha_{e2} + \mu_2^2 \cdot \alpha_{e1}}{(4\pi \cdot \varepsilon_0 \cdot \varepsilon)^2} + \frac{3}{4} \cdot \frac{h \cdot \nu_e \cdot \alpha_{e1} \cdot \alpha_{e2}}{(4\pi \cdot \varepsilon_0)^2} \right]$$

Avec

ε la constante diélectrique du milieu ;

ε_0 la constante diélectrique du vide ;

h la constante de Planck ;

k_B la constante de Boltzmann ;

T la température ;

r la distance moyenne entre les deux molécules 1 et 2 ;

μ le moment dipolaire des deux molécules 1 et 2 ;

ν_e la fréquence électronique d'absorption ;

α_{e1} et α_{e2} la polarisabilité électroniques des deux molécules 1 et 2.

Dans cette expression, le premier terme exprime l'énergie de Keesom, le deuxième l'énergie de Debye et le troisième l'énergie de London. Tous ces termes dépendent de la distance entre les deux molécules (en $1/r^6$).

Dans le cas de l'AFM où on a l'interaction entre une pointe et une surface, on ne peut pas considérer ce modèle à deux atomes. L'atome au bout de la pointe interagit à la fois avec ses proches voisins du côté de la pointe mais aussi avec plusieurs atomes de la surface qui sont eux aussi en interaction avec leurs plus proches voisins. Il nous faut donc considérer le cas de solide macroscopique où l'expression de l'interaction de Van der Waals va dépendre de la géométrie des objets en utilisant l'approximation de Derjaguin [Butt 2005 ; Israelachvili 1991]. Le tableau ci-dessous présente la force calculée dans deux cas typiques en AFM : l'interaction sphère/plan et cône/plan.

Géométrie	Force
Sphère - plan	$F = -\frac{A_H R}{6d^2}$
Cône - plan	$F = -\frac{A_H \tan^2 \theta}{6d}$

Figure II.12 Tableau indiquant l'expression de la force de Van der Waals suivant la géométrie des objets avec d la distance entre les deux objets, R le rayon de la sphère, A_H la constante d'Hamaker et θ l'angle de demi-ouverture du cône [Butt 2005].

L'interaction entre les deux objets ou matériaux va alors dépendre de leurs propriétés physico-chimiques incluses dans la constante d'Hamaker A_H [Hamaker 1937]. Cette constante peut être calculée théoriquement à partir de l'expression :

$$A_H = \pi^2 C \rho_1 \rho_2$$

Avec :

C une constante spécifique aux matériaux ;
 ρ le nombre d'atomes par unité de volume.

Elle peut être aussi déterminée expérimentalement pour des courbes de force par AFM. Butt et Kappl ont répertorié un grand nombre de valeurs de la constante d'Hamaker suivant la nature des matériaux en interaction et le milieu environnant [Butt 2010]. A titre d'exemple, dans le cas d'une géométrie sphère-plan avec une pointe en Si_3N_4 de rayon de courbure de 10 nm et une surface de mica dans le vide, la valeur expérimentale de la constante d'Hamaker est de $64 \cdot 10^{-21}$ J. Pour une distance de 1 nm entre la surface et la pointe, la force de Van der Waals a une valeur de -0,1 nJ/m soit -0,1 nN. La force est donc attractive.

En remarque sur cette force d'interaction, on peut dire que pour deux corps identiques, la force de Van der Waals est toujours attractive (pour A_H positive). Pour deux corps différents, la force peut être attractive ou répulsive.

Force électrostatique

La force électrostatique attractive est générée par une pointe et une surface, toutes deux conductrices ou chargées avec une différence de potentiel V_0 non nulle. Tout comme pour les forces de Van der Waals, la géométrie de la pointe a une influence sur l'expression de la force. De plus, Belaidi *et al.* montrent que le modèle approximatif de l'interaction change suivant la distance pointe-surface [Belaidi 1997].

Pour de faible distance, $D < R$ avec D la distance entre la pointe et la surface, et R le rayon de courbure de la pointe, la pointe est modélisée par une sphère. L'expression de la force électrostatique a donnée par [Erlandsson 1988] :

$$F = -\frac{\pi \epsilon_0 V_0^2 R}{D}$$

Avec :

ϵ_0 la permittivité du vide.

Pour une distance intermédiaire, $R < D < L$ avec L la longueur de la pointe, la pointe peut être considérée comme une ligne chargée uniformément (en forme de cône). Dans ce cas-là, la force a pour équation [Olsson 1998 ; Hao 1991] :

$$F = \frac{\lambda_0^2}{4\pi\epsilon_0} \ln\left(\frac{L}{4D}\right) \quad \text{avec} \quad \lambda_0 = \frac{2\pi\epsilon_0 V_0}{\arg sh(\tan^{-1} \theta)}$$

Avec :

λ_0 la densité de charge ;

θ le demi-angle du cône.

Pour exemple, avec $D < R$, la valeur de la force électrostatique dans le cas d'une différence de potentiel de 1 V, un rayon de courbure de pointe de 10 nm et une distance D de 1 nm, est de l'ordre de -0,2 nN.

Si la pointe et la surface ont des propriétés magnétiques, une force magnétique peut aussi apparaître à longue portée.

II.2.4 Forces à courte portée

Nous détaillerons ici les forces à courte portée qui interviennent quand la pointe est en contact avec la surface ou quand la distance entre les deux est inférieure à 0,1 nm : les forces de Pauli, d'adhésion et de capillarité.

Force de Pauli

Généralement, lorsque deux atomes se rapprochent à une distance suffisamment faible, l'énergie électrostatique venant des nuages électroniques devient répulsive à cause du principe d'exclusion de Pauli [Kittel 2007]. Ce phénomène peut être décrit par le potentiel de Lennard-Jones où l'énergie potentielle est définie par [Seo 2008] :

$$V_{LJ} = -4\epsilon \left[\left(\frac{\sigma}{D} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma}{D} \right)^6 \right]$$

Avec :

ϵ la profondeur du puits de potentiel ;

σ la distance à laquelle la force est égale à zéro.

Le terme de la distance en D^{-12} exprime la force répulsive entre les deux atomes.

Force d'adhésion

García et Pérez définissent que lorsque l'aire de contact entre la pointe et la surface est comprise entre 10 et 100 atomes, il faut considérer les forces mises en jeu comme des forces mécaniques ou élastiques et non plus comme de la répulsion [García 2002]. On est dans le cas de déformations physiques de la surface qui dépendent de la force appliquée par la pointe et des propriétés du matériau étudié. On a une force d'adhésion attractive.

Comme nous l'avons montré précédemment, plusieurs modèles ont été développés pour déterminer la force élastique ou de déformation dans le cas d'indentation de surface (Hertz, Derjaguin-Muller-Toporov (DMT) ou Johnson-Kendall-Roberts (JKR)) [Hertz 1882 ; Derjaguin 1975 ; Johnson 1971] (cf. II.2.2). Les relations entre le rayon de contact a , la déformation de l'échantillon δ et l'expression de la force d'adhésion F_{ad} pour une pointe sphérique et une surface plane pour les trois théories Hertz, DMT et JKR, sont données dans la Figure II.13 :

	Hertz	DMT	JKR
a	$\sqrt[3]{\frac{RF}{E_{tot}}}$	$\sqrt[3]{\frac{R}{E_{tot}}(F + 2\pi RW)}$	$\sqrt[3]{\frac{R}{E_{tot}}\left(F + 3\pi RW + \sqrt{6\pi RWF + (3\pi RW)^2}\right)}$
δ	$\frac{a^2}{R} = \left(\frac{F^2}{RE_{tot}^2}\right)^{1/3}$	$\frac{a^2}{R} = \frac{(F + 2\pi RW)^{2/3}}{\sqrt[3]{RE_{tot}^2}}$	$\frac{a^2}{R} = \frac{2}{3} \sqrt{\frac{6\pi Wa}{E_{tot}}}$
F_{ad}	0	$2\pi RW$	$\frac{3\pi RW}{2}$

Figure II.13 Tableau reprenant la relation entre le rayon de contact a , la déformation de l'échantillon δ et la force d'adhésion F_{ad} pour une pointe sphérique et une surface plane pour les théories de Hertz, DMT et JKR avec R le rayon de la pointe, W le travail d'adhésion par unité d'aire, F la force exercée par la pointe sur la surface et E_{tot} le module de Young réduit [Butt 2005].

Force de capillarité

Dans les conditions ambiantes, les molécules d'eau ont tendance à s'adsorber sur les surfaces hydrophiles. Quand la pointe s'approche près de cette couche aqueuse, un ménisque (pont liquide) se forme entre la pointe et la surface. Ce ménisque va entraîner la présence d'une force attractive entre la pointe et l'échantillon. Sur les courbes d'approche-retrait, le saut au contact est dû à cette force. García *et al.* expriment la force de capillarité pour une pointe sphérique par l'équation [García 1999a] :

$$F_{cap} = \pi\gamma_L\kappa R^2 \sin^2 \phi_i \quad \text{avec} \quad \kappa = -\frac{\cos\phi_i + 1}{R(1 - \cos\phi_i) + D} + \frac{1}{R}$$

Avec :

R le rayon de courbure de la pointe ;

κ la courbure du ménisque ;

γ_L l'énergie de surface de l'eau ;

D la distance entre la pointe et la surface ;

ϕ_i l'angle intérieur formé entre la pointe et le ménisque.

L'expression de la force de capillarité est dépendante de la géométrie de la pointe et découle de l'équation différentielle de Young-Laplace. En considérant la forme convexe ou concave de la couche d'eau, l'expression de la force peut évoluer [Stifter 2000].

II.2.5 Force en milieu liquide

En milieu liquide, les forces qui agissent entre la pointe AFM et la surface sont décrites par la théorie DLVO (développée par Derjaguin, Landau, Verwey et Overbeek)

[Derjaguin 1941 ; Verwey 1948]. Cette théorie est basée sur le fait que l'interaction entre deux surfaces dans un électrolyte est la somme de deux contributions : la force attractive de Van der Waals et la force répulsive de la double-couche électrostatique due à la présence d'ions dans le liquide.

A de faibles concentrations en sel dans l'électrolyte, la force de double-couche électrostatique repousse la pointe. En augmentant la concentration en sel, la force répulsive va être écrantée. Pour une certaine valeur de la concentration, l'attraction de Van der Waals va dépasser la barrière répulsive de la double-couche et dominer dans l'interaction pointe/surface [Müller 1997a ; Müller 1997b].

Cette répulsion électrostatique est un effet de la charge de surface de la pointe et de l'échantillon. A l'interface liquide/solide, les ions de l'électrolyte et les charges de surface forment une double-couche électronique. En approchant la pointe de l'échantillon, la double-couche électronique de la surface est perturbée par la présence de celle formée autour de la pointe et réciproquement. Cela crée la force répulsive de double-couche. Cette force décroît exponentiellement avec la distance entre la pointe et la surface. On définit une longueur de Debye λ_D qui est l'épaisseur de la diffusion de la double-couche électrostatique formée par les contre-ions. Plus elle est faible, plus la pointe peut s'approcher de la surface. Elle dépend de la concentration de l'électrolyte e_c (en mol/L) et de la nature des ions en solution. Pour une température de 25°C, l'expression de la longueur de Debye pour différents électrolytes est donnée par [Israelachvili 1991] :

$$\lambda_D = \frac{0,304}{\sqrt{e_c}} nm \quad \text{pour les électrolytes monovalents}$$

$$\lambda_D = \frac{0,174}{\sqrt{e_c}} nm \quad \text{pour les électrolytes divalents (1:2 ou 2:1)}$$

$$\lambda_D = \frac{0,152}{\sqrt{e_c}} nm \quad \text{pour les électrolytes divalents (2:2)}$$

Ainsi, pour diminuer efficacement l'étendue de la double-couche électrostatique, il est préférable de travailler dans un électrolyte avec des ions divalents.

II.3 Modes d'imagerie

En première approximation, le potentiel d'interaction entre la pointe et l'échantillon peut être présenté par le potentiel de Lennard-Jones (Figure II.14). A de courtes distances, les nuages électroniques des deux atomes ne peuvent s'interpénétrer (principe d'exclusion de Pauli). La force, dans un régime répulsif, augmente dans le sens positif quand la distance entre les deux atomes tend vers 0. A longues distances, l'interaction est soumise aux forces de Van der Waals attractives. La force est alors négative.

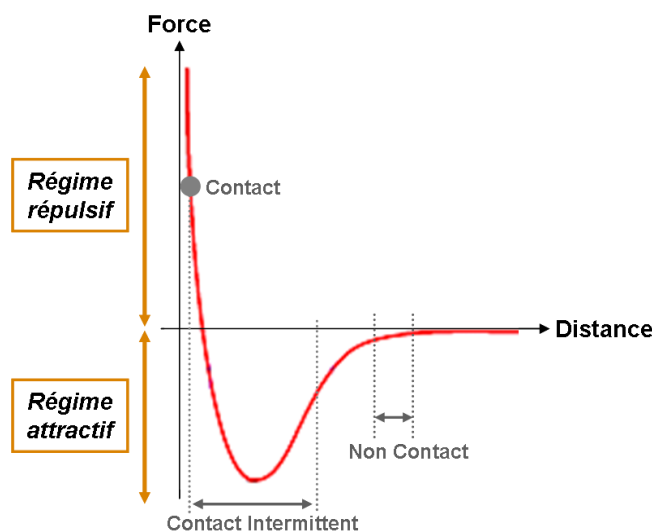


Figure II.14 Courbe du potentiel de Lennard-Jones (force en fonction de la distance) pour présenter les zones d'interaction où s'appliquent les trois modes d'imagerie de l'AFM.

Pour l'imagerie topographique, trois modes de fonctionnement peuvent être déduits de ce potentiel, un mode statique : le mode contact ; et deux dynamiques : les modes contact intermittent et non contact. Leurs domaines de fonctionnement étant différents, les interactions mises en jeu ne sont pas les mêmes. Dans cette partie, nous détaillerons ces trois modes d'imagerie en indiquant leurs caractéristiques et les informations physico-chimiques ou mécaniques que l'on peut déduire des images.

II.3.1 Contact

Ce mode est le premier à avoir été développé pour la microscopie à force atomique. La pointe est statique et l'interaction avec la surface est dans un régime répulsif (Figure II.14). La pointe reste en permanence en contact ("touche") avec la surface. La force entre les deux va provoquer la déflexion du levier, enregistrée ensuite pour retracer la topographie de la surface. La boucle d'asservissement assure que la force d'interaction et le contact soient maintenus pendant le scan. Comme nous l'avons présenté dans la partie II.1.2, deux modes de travail sont possibles suivant l'ouverture ou la fermeture de la boucle d'asservissement : "déflexion constante" ou "hauteur constante".

Ce mode, très simple d'utilisation, peut être appliqué à différents types d'échantillon. La valeur de consigne (setpoint) qui définit la force que l'on souhaite appliquer doit toutefois être ajustée pour éviter l'usure de la pointe et de l'échantillon (force latérales et d'adhésion) et donc une diminution de la résolution. Dans le cas d'échantillons "mous", la force appliquée risque de déformer et/ou d'endommager les structures que ce soit pendant l'approche ou lors du balayage de la pointe. Il est donc peu conseillé d'utiliser ce mode de fonctionnement pour ces objets.

II.3.2 Contact intermittent

Ce mode, développé par Zhong *et al.*, oscille entre le régime attractif et répulsif, d'où son nom de mode contact intermittent ou tapping (terme déposé par la marque Brüker) (Figure II.14) [Zhong 1993]. La pointe est mise en oscillation par un modulateur piézoélectrique (mode d'excitation appelé acoustique) à une fréquence proche de la résonance (le gradient de force décale la fréquence de résonance du levier) et avec de grandes amplitudes libres (20-100 nm). A chaque cycle, la pointe "touche" la surface dans le régime répulsif. Quand la pointe se rapproche de la surface, la force de Van der Waals attractive modifie l'amplitude et la phase de l'oscillation du levier. Ces changements d'allure sont enregistrés et contrôlés par le système d'asservissement vertical et la photodiode dans le cas d'une détection optique. De même, lors d'un changement de relief sur la surface, l'interaction entre la pointe et la surface va être modifiée, ce qui va se refléter sur l'amplitude de l'oscillation. La réponse du positionneur en z pour revenir à la valeur de consigne va servir pour tracer la topographie de la surface.

Ce mode est aussi appelé AM-AFM (Amplitude Modulation) puisqu'il est basé sur la détection de la modification des valeurs d'amplitude du levier par rapport à une amplitude fixe de consigne (setpoint). Dans ce mode oscillant, les forces de friction sont fortement réduites (par comparaison avec le mode contact) et donc l'endommagement de la surface qui en résulte est limité. Une meilleure résolution des images sur les échantillons biologiques a aussi été mise en évidence [Colton 1997 ; Luybchencko 2011].

A une amplitude de consigne correspond une phase (un déphasage par rapport à la valeur de la phase hors interaction). Les variations en cours de balayage par rapport à la phase de consigne permettent de réaliser des images particulières, dites "de phase", différentes des images de topographies, qui renseignent sur les propriétés physico-chimiques et mécaniques locales de l'échantillon.

Dans notre étude, nous avons essentiellement travaillé dans le mode AM-AFM. Nous le présenterons plus en détail dans la partie II.4.

II.3.3 Non-contact

Dans le régime attractif sur la courbe de potentiel de l'interaction pointe-surface, on est dans le mode non-contact (NC-AFM) (Figure II.14). La pointe est mise en oscillation par un modulateur piézoélectrique à une fréquence proche de la résonance et à de faibles amplitudes libres (inférieures à 5nm). La distance pointe-échantillon reste toutefois de l'ordre du nanomètre ce qui fait que le mode de détection est basé sur la modification de la fréquence d'oscillation, développée par Martin *et al.* [Martin 1987]. La pointe ne rentre pas en contact avec la surface. Développé principalement pour une application sous ultravide où le mode AM-AFM ne fonctionne pas, il a permis d'atteindre la résolution atomique sur de nombreux échantillons et en particulier sur la face (111) du silicium [Seo 2008]. Aujourd'hui, certaines équipes développent ce mode haute résolution en solution [Khan 2010].

II.4 Le mode dynamique AM-AFM

En mode dynamique, la pointe et le levier sont mis en oscillation par un système piézoélectrique, à une fréquence ω fixe proche de la fréquence de résonance ω_0 et à une amplitude A_{libre} (supérieure à 10 nm), inférieure à l'amplitude de résonance A_0 . En topographie, lors de l'approche de la pointe, la boucle d'asservissement ajuste la position du levier en hauteur de sorte que l'interaction pointe-surface affecte l'amplitude d'oscillation du levier jusqu'à une valeur déterminée par l'utilisateur (setpoint) A_{sp} tel que $A_{sp} < A_{libre}$. La boucle maintient ensuite, tout au long du balayage, cette amplitude de consigne A_{sp} constante. L'image en topographie sera tracée à partir de la variation de position du levier. La variation de la phase de l'oscillation par rapport à une valeur de consigne est aussi un paramètre qui peut être utilisé pour tracer des images.

De manière générale, le mouvement q du système pointe-levier peut être modélisé à partir de l'équation du mouvement de Newton pour une masse m^* attachée à un ressort [García 2002 ; Butt 2005 ; Seo 2008] :

$$m^* \ddot{q} + \frac{m^* \omega_0}{Q} \dot{q} + k_C q = F_{ts} + F_0 \cos(\omega t)$$

Avec :

Q le facteur de qualité du levier ;

ω_0 la fréquence de résonance du levier ;

k_C la constante de raideur du levier ;

F_{ts} la force d'interaction pointe-surface ;

F_0 l'amplitude de la force excitatrice du levier ;

ω la fréquence de la force excitatrice du levier ;

t le temps ;

m^* la masse effective du système levier-pointe.

Dans cette partie, nous allons expliquer le comportement dynamique du levier lors de l'approche et du retrait de la pointe de la surface.

II.4.1 Approximation harmonique

Si on considère les forces d'interaction entre la pointe et la surface comme étant nulles ($F_{ts} = 0$) (cas par exemple où la pointe est loin de la surface), l'équation prend la forme d'un système d'oscillateur harmonique forcé à une dimension. La solution générale, sous forme d'amorti sinusoïdal, est la suivante :

$$q = A \cos(\omega t - \phi) + B e^{-\omega t / 2Q} \cos(\omega_r t - \beta)$$

Avec :

ω_r la fréquence de résonance angulaire du levier influencée par l'effet d'amortissement ;

ϕ la différence de phase entre la force motrice et le mouvement du levier.

Le premier terme donne une solution stable alors que le second indique un état transitoire dans l'établissement de l'oscillation avec une dépendance en temps. L'amortissement intervient dans le terme par exponentielle.

L'amplitude A et la phase ϕ de la réponse sinusoïdale sont dépendantes de la pulsation ω ($\omega = 2\pi f$) et ont pour expression :

$$A(\omega) = \frac{F_0/m^*}{\sqrt{(\omega_0^2 - \omega^2)^2 + (\omega\omega_0/Q)^2}}$$

$$\tan \phi = \frac{\omega\omega_0/Q}{\omega_0^2 - \omega^2}$$

L'expression de l'amplitude $A(\omega)$, de type Lorentzienne, montre que l'amplitude d'oscillation dépend de la force excitatrice F_0 , de l'amortissement et de la fréquence d'excitation par rapport à la fréquence de résonance.

Dans le cas où la fréquence est égale à la fréquence de résonance, en absence d'amortissement, on a pour l'amplitude :

$$A(\omega = \omega_0) = A_0 = \frac{QF_0}{k_C}$$

L'amortissement a une influence sur la fréquence de résonance du levier de telle sorte que :

$$\omega_r = \omega_0 \sqrt{\left(1 - \frac{1}{2Q^2}\right)}$$

II.4.2 Comportement oscillant dans un régime linéaire

En considérant un potentiel d'interaction pointe-surface parabolique et de faibles amplitudes d'oscillation de la pointe autour de sa position d'équilibre, on se trouve dans le cas d'un régime linéaire. Cette force s'exprime :

$$F_{ts} = \left(\frac{dF_{ts}}{dz}\right)q + const.$$

En reprenant l'équation du mouvement, on a alors :

$$m^* \ddot{q} + \frac{m^* \omega_r}{Q} \dot{q} + \left(k_C - \frac{dF_{ts}}{dz}\right)q = F_0 \cos(\omega t) + const.$$

A partir de cette équation, on peut définir la constante de raideur effective k_e et la fréquence de résonance modifiée ω_e respectivement :

$$k_e = k_C - \frac{dF_{ts}}{dz}$$

$$\omega_e = \sqrt{\frac{k_e}{m^*}} = \sqrt{\frac{k_C - (dF_{ts}/dz)}{m^*}}$$

Avec ces deux paramètres, la résolution de l'équation du mouvement est du même type que celle obtenue en l'absence d'interaction. La solution sera aussi de type Lorentzienne avec un décalage de pulsation ω_e . Pour une interaction attractive, le décalage se fera vers les pulsations inférieures, alors que pour une interaction répulsive, il sera vers les pulsations supérieures.

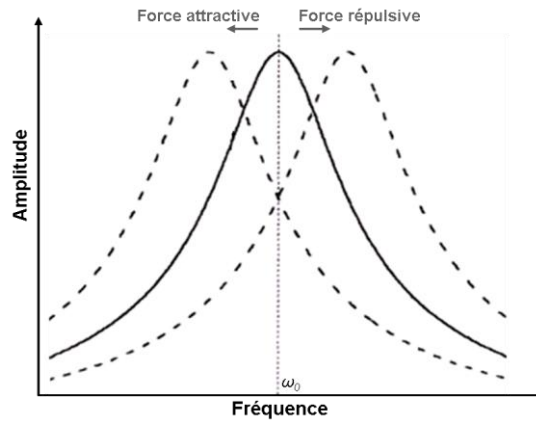


Figure II.15 Représentation de l'allure de l'amplitude d'oscillation du levier en fonction de la fréquence excitatrice. La courbe en trait plein donne le profil dans le cas où il n'y a pas de force d'interaction. Les courbes en pointillé sont dans le cas de forces attractives ou répulsives entre la pointe et la surface (d'après [García 2002]).

Ce décalage de la fréquence de résonance du levier peut être expliqué à travers les courbes de potentiels tracées sur la Figure II.16. Loin de la surface, le mouvement de la pointe suit le potentiel parabolique (tracé en point sur la Figure II.16). Son oscillation est en régime harmonique. Si la distance d entre la pointe et la surface diminue, le potentiel effectif est modifié (ligne pleine sur le graphique). Il est la somme entre le potentiel parabolique et le potentiel d'interaction pointe-échantillon (en pointillé sur la courbe). Le potentiel effectif est donc asymétrique. Les oscillations de la pointe deviennent alors non-harmoniques et la fréquence de résonance va être influencée par l'amplitude d'oscillation de la pointe. On peut définir que le décalage de la fréquence de résonance est dépendant de la distance d entre la pointe et la surface et de l'amplitude A d'oscillation du levier.

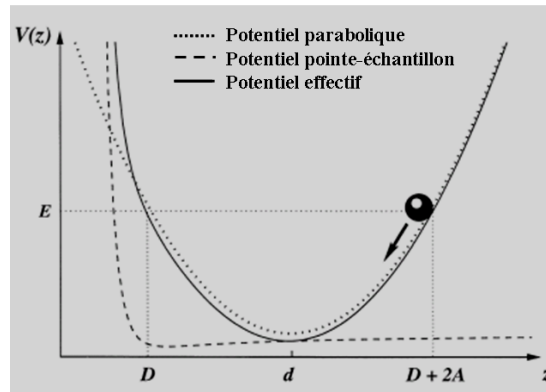


Figure II.16 Courbe de potentiel en fonction de la distance avec A l'amplitude de résonance pour le levier en oscillation, D la distance la plus proche entre la pointe et la surface et d la distance entre la pointe et la surface quand la pointe est sans mouvement oscillatoire [Hölscher 1999].

Le comportement non-harmonique du levier à faible distance de la surface et la difficulté à déterminer avec exactitude l'amortissement du mouvement conduisent à envisager un modèle de mouvement dynamique dans un régime non-linéaire.

II.4.3 Comportement oscillant dans un régime non linéaire

Pour comprendre le comportement de la pointe, nous allons dans un premier temps nous intéresser aux courbes d'approche-retrait en mode dynamique. A partir de ces courbes, nous pourrions ainsi voir comment se comporte le système pointe-levier en fonction de la distance à la surface.

L'allure générale d'une courbe de spectroscopie en mode dynamique est présentée sur la Figure II.17 (a). A_{libre} est considérée comme l'amplitude des oscillations loin de la surface, amplitude libre appliquée au système par l'actionneur piézoélectrique. La fréquence de travail est légèrement inférieure à la fréquence excitatrice, on est donc dans un régime attractif. On peut définir trois domaines sur la courbe. On se place dans le cas d'une surface infiniment dure et non adhésive. Loin de la surface, l'amplitude des oscillations est constante, à la valeur d' A_{libre} déterminée. On est dans le domaine 1, il n'y a pas d'interaction. En diminuant la distance pointe-surface, on entre dans le domaine 2. L'amplitude diminue linéairement avec la distance. Quand la distance entre la position du levier au repos et la surface est nulle, les amplitudes le sont aussi. On touche la surface, on est alors dans le domaine 3. Le levier ne peut plus osciller.

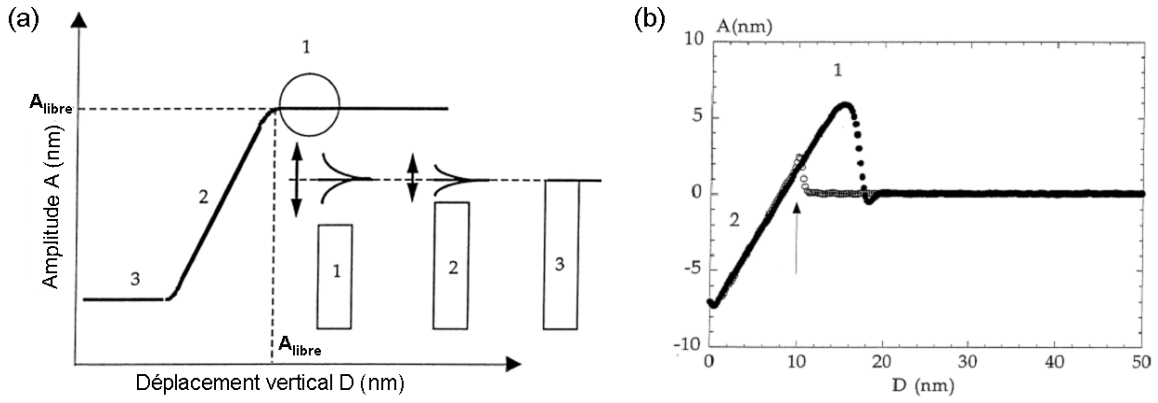


Figure II.17 (a) Allure typique en S d'une courbe approche-retrait en mode dynamique. A_{libre} est l'amplitude des oscillations loin de la surface. Trois domaines définis sur la courbe. (b) Grossissement sur la zone cerclée sur (a). Hystérésis entre l'aller et le retour du à l'influence des forces attractives [Boisgard 1998].

Si on regarde de plus près, dans le domaine 1, avant la diminution linéaire, on a l'apparition de deux phénomènes : une hystérésis entre l'aller et le retour de la courbe, et une augmentation soudaine de l'amplitude d'oscillation à l'aller (Figure II.17 (b)). Expérimentalement, il a été montré que l'hystérésis a lieu quelque soit la position de la fréquence par rapport à la fréquence de résonance et que sa largeur n'est pas simplement proportionnelle à la valeur de A_{libre} [Anczykowski 1996 ; Boisgard 1998].

Dans le phénomène d'hystérésis, Boisgard *et al.* présentent une approche analytique du comportement hystérétique du système pointe-levier qui aboutit à l'expression de deux branches d_+ et d_- , en mettant en relation l'amplitude et la distance [Boisgard 1998] :

$$d_{\pm} = \left[a^2 + \frac{\alpha^{2/3}}{\left(\cos \phi_0 \pm \sqrt{\frac{1}{a^2} - \sin^2 \phi_0} \right)^{2/3}} \right]^{1/2}$$

Avec :

a le rapport d'amplitude A/A_{libre} ;

ϕ_{libre} la valeur de la phase du déplacement de l'oscillateur loin de la surface ;

$\sin \phi_{libre}$ est défini comme : $\sin \phi_{libre} = -\frac{A_{libre} \omega}{A_0 \omega_0}$ avec A_0 et ω_0 l'amplitude et la pulsation de résonance ;

α un paramètre défini par $\alpha = 2 \frac{A_H R}{A_{libre}^2} \frac{1}{F_0}$ avec A_H la constante d'Hamaker, R le rayon de la pointe et F_0 exprimé en $F_0 = \frac{A_{libre} \omega_{libre} \omega_0}{Q \sin \phi_{libre}}$ avec Q le facteur de qualité du levier.

La branche d_+ a une phase au dessus de $-\pi/2$ alors que la branche d_- a sa phase en dessous. Suivant les valeurs du paramètre α , on a des différences dans les variations d'amplitude (Figure II.18). Pour de faibles valeurs de α , les solutions générées amènent à un comportement instable du levier. Dans le domaine ABCD défini sur la Figure II.18 (a), pour

une distance pointe-surface donnée, il existe trois valeurs d'amplitude. Quand la pointe approche de la surface, l'amplitude augmente jusqu'au point D puis saute au point A. Si la pointe continue à approcher, l'amplitude diminue. Si la pointe se rétracte, l'amplitude augmente jusqu'à atteindre le point B puis saute au point C. La distance entre les points B et D donne la largeur de l'hystérésis. Pour de grandes valeurs de α , l'hystérésis n'a pas lieu (Figure II.18 (b)). Les courbes d'approche et de retrait suivent le même tracé.

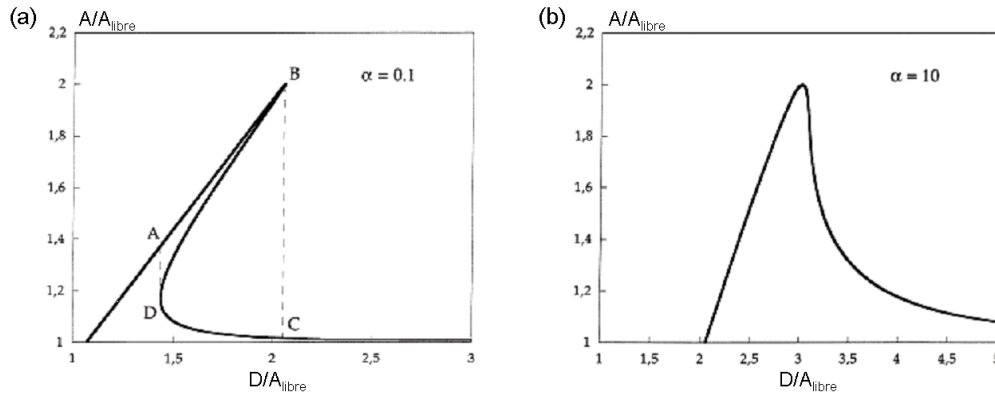


Figure II.18 Courbes du rapport d'amplitude A/A_{libre} en fonction de d ($d = D/A_{libre}$ avec D la distance entre la surface et la pointe au repos). (a) pour une valeur de α de 0,1. (b) pour une valeur de α de 10.

Dans les deux cas, $\phi_{libre} = \pi/6$ [Boisgard 1998].

On peut noter que quand l'amplitude libre A_{libre} diminue, le domaine de coexistence de solutions disparaît.

Intéressons maintenant au deuxième phénomène présenté sur la Figure II.17 (b), le saut d'amplitude sur la courbe d'approche. García *et al.* attribuent ce changement abrupt à une transition entre un régime purement attractif et un régime répulsif et attractif du mode contact intermittent du à la coexistence de deux états oscillatoires stables (Figure II.19) [García 1999b ; García 2000].

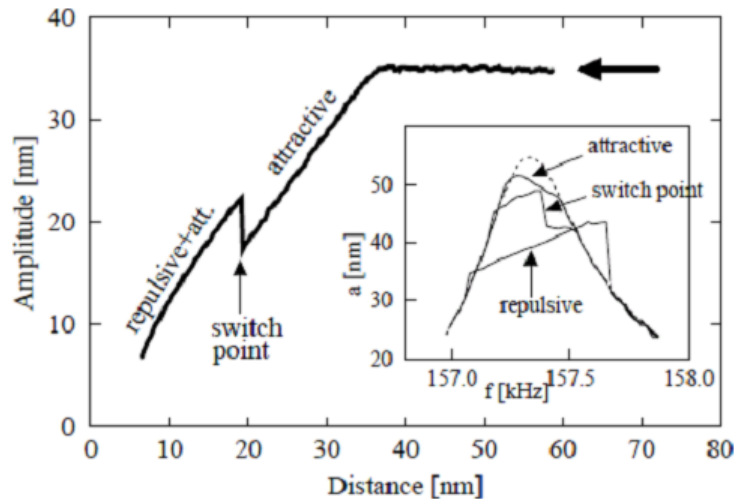


Figure II.19 Courbe d'amplitude en fonction de la distance pointe-surface sur un échantillon de SiO_x . L'insertion est plusieurs courbes spectrales d'amplitudes. Le tracé en pointillé représente l'allure de la courbe à l'amplitude libre du levier [Kühle 1998].

Loin de la surface, on est dans le régime attractif en présence de forces attractives de longue portée, quasiment en mode non-contact (Figure II.19). En approchant la pointe, elle entre dans le domaine du mode tapping où les forces attractives et répulsives interagissent. Cette transition va dépendre de l'amplitude libre et des propriétés de l'échantillon.

Par simulation, García et San Paulo ont montré que plus l'amplitude libre était grande, plus le saut d'amplitude se décalait vers la valeur de l'amplitude libre [García 1999b].

Le saut et le passage entre les domaines attractifs et attractifs-répulsifs sont aussi visibles sur les courbes spectrales d'amplitude (Figure II.19, insertion) [Kühle 1998]. Pour chacune des courbes, la distance entre la pointe et la surface est restée constante. L'amplitude d'oscillation est mesurée pour une plage de la fréquence d'excitation du levier (des plus basses au plus hautes en passant par la fréquence de résonance du levier). La courbe en pointillé est représentative du cas où le levier est en oscillation libre (sans interaction). Pour une distance pointe-surface importante, où le système se trouve dans un régime attractif, la courbe d'amplitude (en fonction de la fréquence) a une allure négative (courbe du haut), elle se décale vers les fréquences inférieures. Il s'agit d'un amortissement attractif. A l'inverse, pour une faible distance, en travaillant dans le domaine répulsif, l'allure de la courbe est positive (courbe du bas). On est dans le cas d'un amortissement répulsif. L'allure de la courbe du milieu est caractéristique pour une distance pointe-surface qui se situe au saut d'amplitude. Le changement de pente traduit la transition entre le domaine purement attractif et celui attractif et répulsif.

Compte tenu de ce comportement non linéaire, le choix de l'amplitude de travail (setpoint) utilisée pour réaliser l'image est crucial. Une amplitude de travail proche de l'amplitude libre permettra de réaliser des images en faible interaction et donc en évitant le risque de déformation des objets biologiques. Une amplitude de travail faible devant l'amplitude libre conduit à réaliser des images à plus forte interaction avec une variation de phase sensible aux propriétés physico-chimiques. Si on choisit l'amplitude de travail au "switch point", l'image sera bruitée avec un dédoublement des structures au passage d'une branche à l'autre [García 2002].

Dans nos expériences, nous choisirons des rapports d'amplitude de travail sur amplitude libre A_{sp}/A_{libre} élevés, entre 50 et 80 %, pour réaliser des images dans les conditions les plus appropriées afin de ne pas dégrader les complexes lectine/sucre sur le substrat.

Le comportement oscillant du système pointe-levier dépend du milieu environnant. En milieu liquide, la fréquence de résonance est plus basse qu'à l'air pour un même levier. L'environnement liquide augmente la masse effective du levier et l'amortissement hydrodynamique [Schäffer 1996]. L'amortissement hydrodynamique exprimé par la valeur du facteur de qualité Q dépend du milieu. Sous ultravide, Q atteint typiquement une valeur de plusieurs centaines de milliers et le mode AM-AFM n'est pas utilisable car le système ne s'amortit qu'après un temps très long, de plusieurs secondes. A l'air, Q est typiquement de l'ordre de plusieurs centaines et en liquide de quelques dizaines.

II.5 Présentation de notre système expérimental

Dans cette partie, nous allons présenter les dispositifs expérimentaux utilisés. Nous discuterons aussi du substrat choisi et des artéfacts d'images ou de mesures qui peuvent être rencontrés dans ce type d'étude.

II.5.1 Nos microscopes à force atomique

Au cours de ces travaux de thèse, nous avons utilisé deux appareils commerciaux. Le premier est un SMENA B, développé par la société russe NT-MDT (www.ntmdt.com) (Figure II.20 (a)). Les déplacements horizontaux et verticaux sont assurés par le même scanner piézoélectrique avec une amplitude maximale de mouvement de $50 \times 50 \times 2,5 \mu\text{m}$. La résolution du positionneur est de l'ordre de 0,012 nm en x - y et de 0,006 nm en z . La tête de l'AFM possède un support de pointe pouvant pivoter et ainsi permettre des observations à l'air et en liquide (Figure II.20 (b)). Une cellule liquide est aussi utilisée afin d'éviter l'évaporation et la contamination de la solution (Figure II.20 (c)). Pour s'affranchir des vibrations mécaniques, le microscope repose sur une table anti-vibration, développée au laboratoire, composée d'un marbre et de quatre chambres à air. Il est aussi placé à l'intérieur d'une boîte en polypropylène recouverte de feutre isolant et d'aluminium pour protéger le système des ondes acoustiques et électromagnétiques. Le porte-échantillon et la boîte sont reliés à la terre par un fil de masse pour éviter tout bruit électrique parasite.

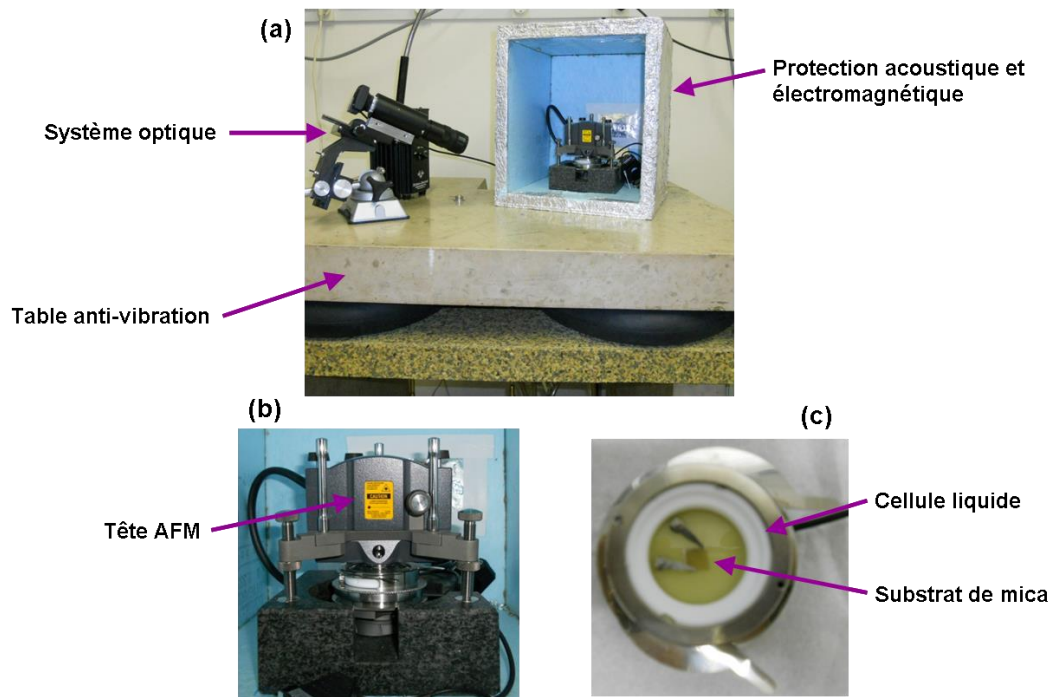


Figure II.20 Photographie du montage expérimental de l'AFM commercial SMENA :
 (a) ensemble général du microscope, (b) tête AFM et (c) cellule liquide.

Nous avons aussi exploité le microscope de modèle Di-Cp-II, conçu par la société américaine Bruker (www.bruker.com) (Figure II.21). Contrairement à l'AFM précédent, les mouvements verticaux et horizontaux sont effectués par deux scanners différents. Pour le déplacement horizontal, le scanner, placé sous l'échantillon, a une amplitude maximale de 90 μm avec une résolution de 0,025 nm. Pour le vertical, situé dans la tête AFM, l'amplitude maximale est de 7,5 μm avec une résolution de 0,025 nm. Une cloche métallique permet d'isoler le système du bruit acoustique. Une table anti-vibration commerciale protège des autres vibrations environnantes.

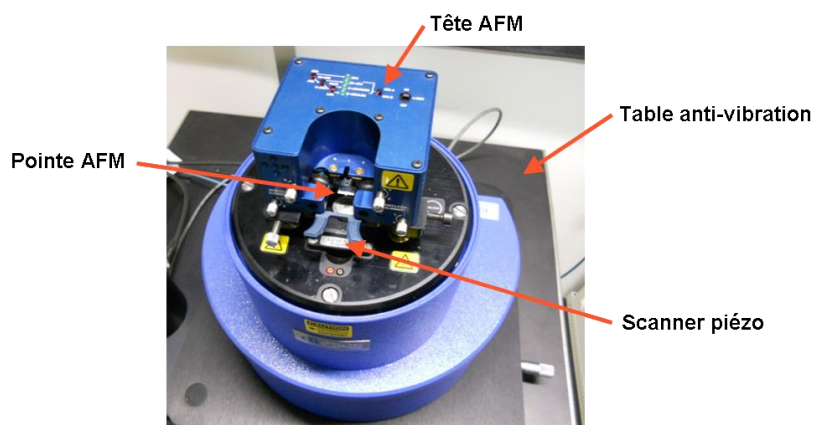


Figure II.21 Photographie du montage expérimental de l'AFM commercial Di-Cp-II.

II.5.2 Pointes AFM

Dans nos expériences, les images AFM ont été réalisées avec des pointes triangulaires en silicium dopé n de type NSC 21 de la société μ Masch (www.spmtips.com) (Figure II.22 (a)). La pointe, conique avec un angle de 40° , a un rayon de courbure estimé par le constructeur à 10 nm. Le levier A que nous utilisons en mode oscillant, a une fréquence de résonance donnée à $25 \text{ kHz} \pm 5 \text{ kHz}$ et une constante de raideur de $1 \text{ N/m} \pm 0,5 \text{ N/m}$. Ses dimensions sont de $290 \mu\text{m} \pm 5 \mu\text{m}$ en longueur, $40 \mu\text{m} \pm 3 \mu\text{m}$ en largeur et $2 \mu\text{m} \pm 0,3 \mu\text{m}$ en épaisseur (Figure II.22 (b)).

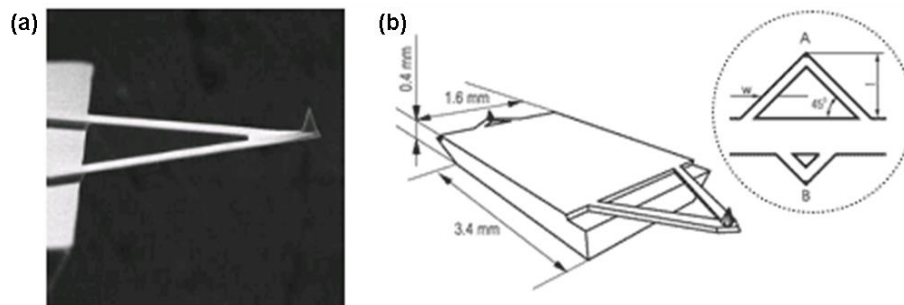


Figure II.22 (a) Image par microscopie électronique à balayage de l'ensemble pointe-levier d'une pointe de type NSC21. (b) Schéma de la pointe avec les deux leviers A et B (source : μ Masch).

Dans certains cas, pour obtenir une plus grande résolution à l'intérieur des structures observés, nous avons utilisé des pointes "ultrasharp" avec un rayon de courbure de 2 nm de type SSS-NCHR de la société NanoAndMore (www.nanoandmore.fr) (Figure II.23). Le levier est en forme de poutre avec une constante de raideur de 10-130 N/m et une fréquence de résonance comprise entre 204-497 kHz.

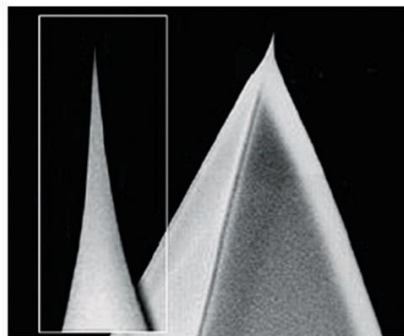


Figure II.23 Image au microscope électronique à balayage d'une pointe "ultrasharp" de type SSS-NCHR (source : Nanoworld).

Après plusieurs utilisations, les pointes peuvent être polluées, ce qui affecte la résolution des images. Cette contamination peut être due à des éléments extérieurs inorganiques (poussière, contaminants venant de l'air ambiant,...) et/ou aux systèmes biologiques que nous observons (objets biologiques, milieux d'observation,...). Pour les contaminants inorganiques, il est recommandé de plonger les pointes dans de l'eau ultrapure

ou des solvants comme pré-nettoyage pour les dissoudre. Pour nettoyer les pointes des polluants organiques, nous les avons passées 30 min à l'UV-Ozone.

Le principe du nettoyage à l'UV-Ozone est de décomposer par photolyse les composés organiques en éléments volatiles (eau, dioxyde de carbone, diazote,...) à l'aide de rayons ultraviolets et d'une forte oxydation de la surface durant la formation et la décomposition de l'ozone [Vig 1985]. De l'oxyde peut toutefois se former à la surface du silicium. Compte tenu du faible temps d'exposition des pointes à l'UV-Ozone, on peut négliger ce phénomène. De manière générale, l'efficacité de cette technique de nettoyage est vérifiée par la mesure de l'angle de contact (hydrophilicité de la surface).

Comme nous l'expliquerons en détail dans le chapitre 3, nous avons réalisé des expériences en liquide dans des solutions salines de fortes concentrations. Pour dissoudre les cristaux de sels formés sur les pointes après leur utilisation, nous les avons immergées à plusieurs reprises dans de l'eau ultrapure pendant des périodes de temps variables (de quelques heures à plusieurs jours). Elles sont ensuite séchées à l'azote avec une soufflette à une pression d'air très faible pour éviter de les endommager. Enfin, elles sont passées à l'UV-Ozone pendant 30 min.

II.5.3 Substrat de mica

En microscopie à force atomique, le verre, le mica, le graphite (HOPG), l'or épitaxié (111) ou encore le silicium sont généralement utilisés comme substrats pour les applications biologiques à cause de leur faible rugosité de surface [Ikai 1996]. Dans notre étude, nous avons privilégié l'utilisation du mica dont la rugosité est inférieure au nanomètre sur de large surface. Il permet ainsi de distinguer des molécules biologiques isolées sur la surface sans que leur structure ou leurs propriétés chimiques ne soient affectées [Czajkowsky 2003].

De manière générale, le mica (muscovite) est une espèce minérale composée de silicate hydroxylé d'aluminium et de potassium de formule chimique $KAl_2(AlSi_3O_{10})(OH)_2$ qui cristallise selon un réseau monoclinique à bases centrées (Figure II.24 (a)).

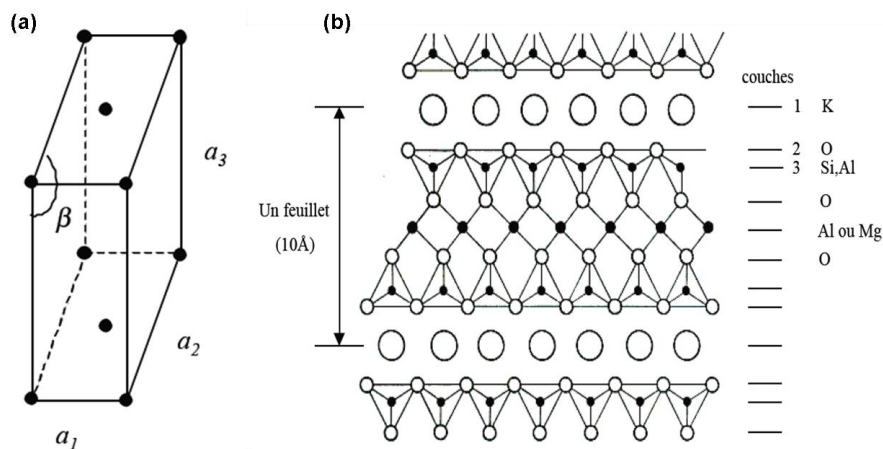
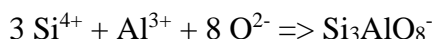


Figure II.24 (a) Réseau monoclinique à bases centrées du mica muscovite ; (b) Schéma de la structure en feuillet du mica [Dorel 2000].

Il est composé d'une structure en feuillets (d'une épaisseur de 10 Å) liés entre eux par des ions potassium K^+ (Figure II.24 (b)) [Czajkowsky 2003 ; Dorel 2000]. La couche est constituée de tétraèdres de SiO_4 où 3 atomes d'oxygène sont partagés avec les tétraèdres voisins. Ces atomes d'oxygène, dits "basaux" (base du tétraèdre), forment un assemblage hexagonal. Les autres atomes d'oxygène au sommet du tétraèdre sont eux dits "apicaux". Un atome aluminium se substitue tous les quatre atomes de silicium dans la couche. L'équilibre des charges est alors déduit de [Sides 2009] :



La surface du mica possède donc une charge négative par unité de surface. Deux couches tétraédriques forment le feuillet, leur sommet pointant vers l'intérieur. Un atome de potassium est logé dans la cavité formée par deux tétraèdres en vis-à-vis, séparant ainsi les feuillets. La liaison K-O étant faible, il est très facile de séparer ses feuillets dans le plan (001). Cet arrangement structural a été montré par microscopie à force atomique [Baba 1997].

En étude préliminaire, nous avons imagé par AFM la surface d'un de nos substrats de mica fraîchement clivé pour vérifier sa rugosité. Nous avons aussi réalisé plusieurs mesures de force avec une pointe AFM en silicium.

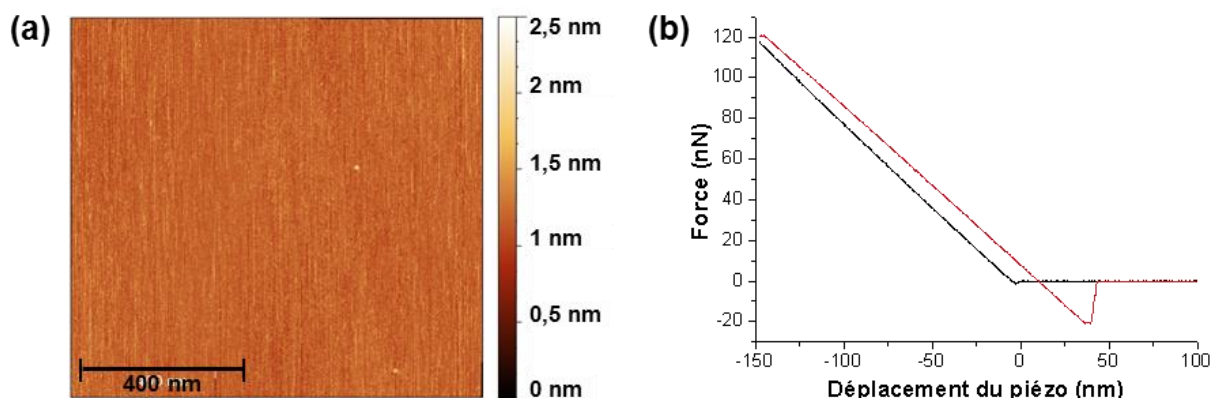


Figure II.25 (a) Image AFM d'un substrat de mica fraîchement clivé. Taille de l'image : 1x1 μm . (b) Courbes force-déplacement du piézo sur une surface de mica à l'approche (en noir) et au retrait (en rouge) de la pointe.

L'image AFM et la valeur de la rugosité (RMS) de 0,27 nm pour une zone de balayage de 1 μm de côté nous indiquent que la surface de notre substrat est entièrement plane (Figure II.25 (a)). La courbe force-distance du piézo, présentée sur la Figure II.25 (b), est la moyenne de 21 courbes de force faites en mode contact à l'air sur le substrat. Nous avons au préalable estimé la sensibilité de la photodiode par des mesures de spectroscopie de force sur un substrat de SiO_2 . La constante de raideur de la pointe a été déterminée numériquement par la méthode de Sader (cf. II.2.1) [Sader 1995]. Les courbes ont été repositionnées afin que le zéro du déplacement du piézo corresponde au changement d'allure de la courbe d'approche. La courbe d'approche présente une pente raide après le saut au contact (tracé en noir). Cette allure est caractéristique d'un substrat dur avec une adhésion de la pointe à la surface (faible pic d'adhésion au retrait).

Pour les applications biologiques, la préparation des échantillons est une étape importante. Il faut parvenir à immobiliser les molécules biologiques sur le substrat sans les

endommager ou les dénaturer. Le mica étant chargé négativement, ces objets s'adsorbent généralement par physisorption sur la surface grâce aux ions présents dans la solution tampon [Müller 1997a ; Lyubchenko 2011 ; Ikai 1996]. Le mica subit parfois un traitement de surface avec des ions Mg^{2+} ou Ni^{2+} pour favoriser l'interaction entre le substrat chargé négativement et l'objet biologique chargé lui aussi négativement, comme c'est le cas pour l'ADN [Hansma 1996]. Enfin, il est possible de fonctionnaliser la surface du mica avec par exemple un dépôt d'APTES (3-aminopropyltriethoxy silane) afin de la charger positivement et ainsi fixer les entités biologiques chargées négativement [Lyubchenko 2011 ; Lyubchenko 1993].

L'important dans ces méthodes d'immobilisation sur le mica est de trouver celles appropriées à l'objet biologique observé afin qu'il soit immobilisé sur la surface assez fortement pour que l'action de la pointe lors du balayage ne le décroche pas et assez "légèrement" pour qu'il ne soit déformé ou dénaturé sur la surface à cause de son interaction avec celle-ci.

II.5.4 Artéfact d'image et anomalies de mesure

La résolution des images AFM est étroitement liée à la pointe et aux conditions expérimentales. Nous allons présenter ici deux effets indésirables souvent présents sur les images AFM dans les applications biologiques et qu'il faudra prendre en compte dans les interprétations.

Effet de pointe et déconvolution

Pour le microscope à force atomique, la résolution spatiale est liée à la géométrie et au rayon de courbure de la pointe [Velegol 2003]. Bustamante *et al.* indiquent que l'image AFM d'un objet réel infiniment fin présente un "objet-image" avec des dimensions plus élargies en particulier dans le sens du balayage de la pointe (Figure II.26 (a)) [Bustamante 1997]. Sur la figure ci-dessous, les traits en pointillé indiquent le trajet de la pointe et donc le profil de la surface sur l'image. Cet effet est d'autant plus grand que le rayon de courbure de la pointe est important.

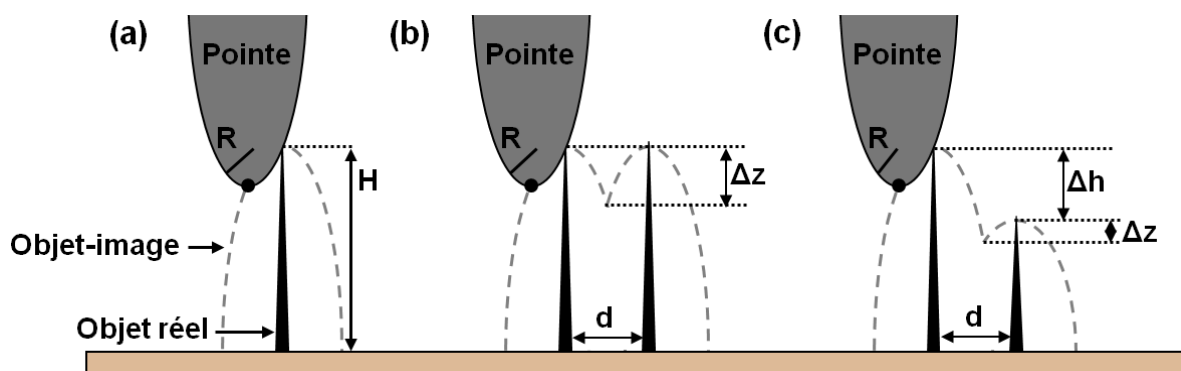


Figure II.26 Représentation schématique de l'effet de pointe d'après [Bustamante 1997], (a) élargissement en latéral des dimensions de l'objet sur l'image AFM pour une pointe conique, (b) effet de la pointe pour deux objets similaires séparés d'une distance d et (c) même effet pour des objets de taille différente.

Si on considère deux objets infiniment fins séparés d'une distance d largement inférieure au rayon de courbure de la pointe, les dimensions pour l'ensemble des deux objets-

images ne sont pas la somme des dimensions pour deux objets-images isolés. On a un recouvrement des deux effets de pointe des objets, présenté sur la Figure II.26 (b). Il s'agit d'un critère de résolution. On peut déterminer la distance d entre deux objets d'une hauteur H par l'expression :

$$d = \sqrt{2R}(\sqrt{\Delta z} + \sqrt{\Delta z + \Delta h}) \quad \text{pour } d > \sqrt{2R\Delta z}$$

Avec :

d la distance entre les deux objets ;

R le rayon de courbure d'une pointe parabolique ;

Δh la hauteur relative entre les deux objets ;

Δz la distance verticale entre le haut des objets et l'intersection des deux traits en pointillé (Figure II.26 (c)).

Cet effet dépend donc à la fois du rayon de courbure de la pointe mais aussi de la sensibilité du microscope (Δz).

Pour comprendre et atténuer cet effet, plusieurs algorithmes ont été développés : calcul et construction de l'image AFM à partir des données sur l'échantillon et sur la pointe (dilatation), reconstruction de la "vraie" image de topographie à l'aide de l'image AFM et des caractéristiques de la pointe (érosion), détermination de la forme de la pointe grâce à des images AFM dont la pointe AFM était connue, estimation de la forme de la pointe à partir d'une image AFM par reconstruction à l'aveugle ("blind reconstruction"),... [Villarrubia 1997 ; Dongmo 1996 ; Odin 1994].

A partir de ses algorithmes, Stadelmann a extrait des expressions pour calculer les dimensions apparentes des objets à partir des dimensions de la pointe et des objets pour deux profils de surface caractéristiques (Figure II.27) [Stadelmann 2006].

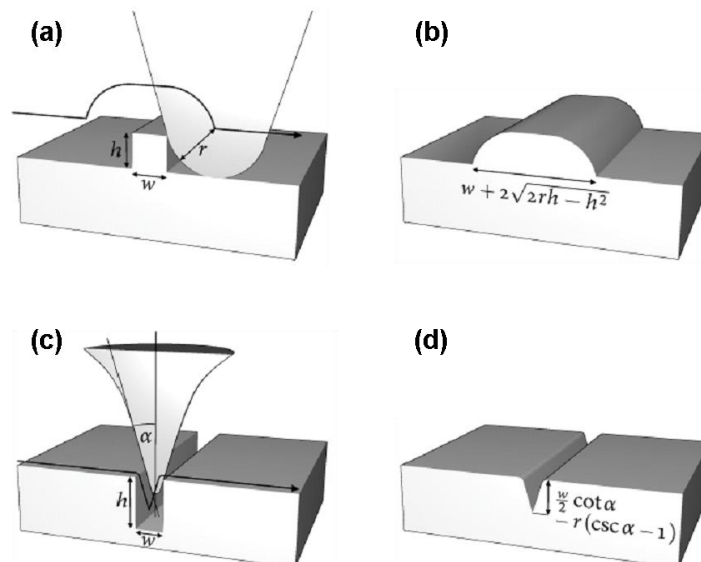


Figure II.27 Représentation schématique de l'effet de convolution pour un objet rectangulaire avec une pointe conique (a) et un trou avec une pointe ultrasharp (c). (b) et (d) présentent la topographie apparente de (a) et (c) respectivement [Stadelmann 2006].

Pour un rectangle de largeur w et de hauteur h avec une pointe de rayon de courbure R (tel que $R > h$), la largeur apparente w' a pour expression (Figure II.27 (a) et (b)) :

$$w' = w + 2\sqrt{2Rh + h^2}$$

De même, pour un trou ou une rainure de largeur w et de profondeur h , la profondeur apparente est donnée par (Figure II.27 (c) et (d)) :

$$h' = \frac{w}{2} \cot \theta \quad \text{pour une pointe "ultrasharp" de demi-angle } \theta$$

$$h' = \frac{w}{2} \cot \theta - R(\csc \theta - 1) \quad \text{pour une pointe avec } R > h$$

Par ces deux expressions, il est possible à partir des dimensions d'un objet mesurées sur une image AFM de revenir aux "vraies" dimensions de l'objet. Toutefois, ces formules ne prennent pas en compte l'indentation de l'échantillon par la pointe qui dépend de ces propriétés mécaniques et de la force appliquée.

Déformation de structure et anomalie de hauteur :

Lors du balayage, la pointe exerce sur les biomolécules une force appelée "force appliquée" comprise entre 10^{-11} et 10^{-7} N suivant les conditions d'imagerie [Weisenhorn 1993]. Cette force cause une nanoindentation sur la molécule biologique qui la déforme. La Figure II.28 présente deux types de déformation. Dans le cas d'un échantillon mou déposé sur un substrat dur (verre, mica, silicium...), il subit une pression de la pointe. Cela induit une anomalie de hauteur (réduction de la hauteur apparente) et un élargissement de la biomolécule (Figure II.28 (a)). S'il existe de fortes forces d'adhésion entre la pointe et l'échantillon, dans l'air en particulier, la biomolécule peut être étirée par la pointe. La hauteur apparente est alors surestimée (Figure II.28 (b)). Les conditions d'imagerie ont donc une influence sur ces anomalies.

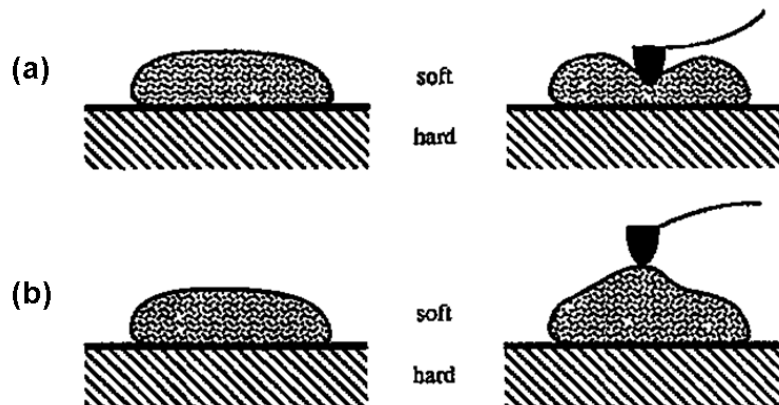


Figure II.28 Représentation schématique de déformations d'échantillons mous causées par la pointe AFM [Weisenhorn 1993].

Müller et Engel ont relevé des variations dans la valeur de la hauteur apparente d'un même type d'échantillon biologique pour des mesures réalisées par AFM en milieu liquide (cas de la membrane pourpre) [Müller 1997b]. Ces anomalies de hauteur ne sont pas dues à

des déformations mécaniques de l'échantillon sous l'action de la pointe mais à la présence d'interactions électrostatiques entre la pointe et l'échantillon. En ajustant la concentration ionique du milieu d'observation, il est possible d'éliminer cette double-couche électrostatique.

II.6 Principales études par AFM sur les lectines et leur arrangement avec des glycoconjugués

Comme nous l'avons énoncé en introduction, ce travail de thèse porte sur l'étude par microscopie à force atomique de l'arrangement des complexes lectine/glycoconjugué. Avant de rendre compte de nos résultats dans le chapitre 3, nous allons présenter les études déjà réalisées sur le sujet. Tout d'abord, cet état de l'art sera fait pour les études par AFM sur les lectines seules. Les travaux sur l'interaction lectine/glycoconjugué seront ensuite abordés.

II.6.1 Etudes sur les lectines

Actuellement, l'étude par AFM de la structure des lectines ou du comportement des lectines sur une surface est un sujet peu présent dans la littérature. Le cas de la lectine spécifique au mannose (Mannan-Binding Lectin, MBL) impliquée dans la réponse immunitaire inné contre les infections microbiennes a été observé par Dong *et al.* et Jensenius *et al.* [Dong 2007 ; Jensenius 2009].

Dans la première étude, Dong *et al.* imagent la lectine immobilisée sur deux substrats et dans deux environnements différents [Dong 2007].

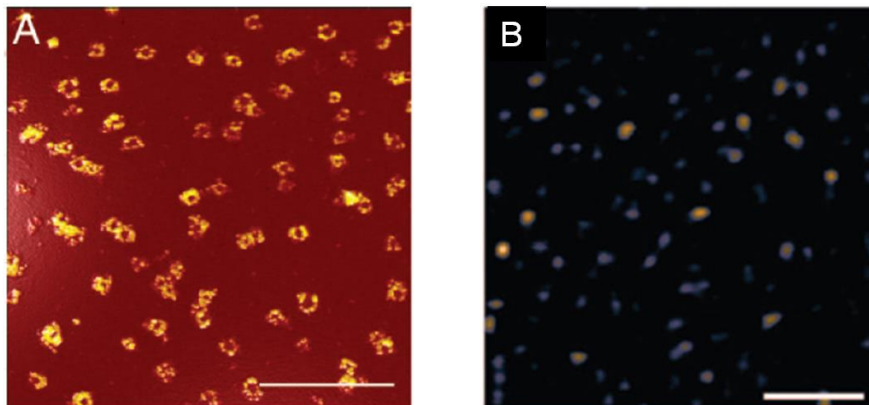


Figure II.29 Images AFM de lectines MBL immobilisées sur du mica recouvert de spermine, à l'air (a) ou recouvert de mannosamine, dans une solution tampon (b) [Dong 2007]. Les barres d'échelle sur les images indiquent une distance de 500 nm.

Sur la Figure II.29 (a), les lectines sont déposées sur un substrat de mica recouvert de spermine. Les lectines sont immobilisées électrostatiquement sur une surface chargée positivement. On remarque sur l'image que les lectines, isolées les unes des autres sur la surface, ont une forme d'anneau. A la Figure II.29 (b), les lectines sont immobilisées sur du mica recouvert de mannosamine. C'est l'interaction lectine/mannose qui permet de lier la

protéine à la surface. Dans cette expérience, les images, réalisées en liquide dans une solution tampon, ne permettent pas de distinguer clairement les structures. Cette étude montre que le type d'immobilisation des lectines sur le substrat a une influence sur leur structure. L'observation en liquide réduit aussi la résolution des images.

Jensenius *et al.* réalisent une étude similaire avec le cas de lectines MBL observées à l'air après leur dépôt sur un substrat de mica fraîchement clivé (Figure II.30 (b)) et ces mêmes lectines immobilisées de façon covalente sur du mica fonctionnalisé puis observées en liquide dans du TBS (Figure II.30 (c)) [Jensenius 2009]. Un modèle géométrique de la lectine est donné sur la Figure II.30 (a).

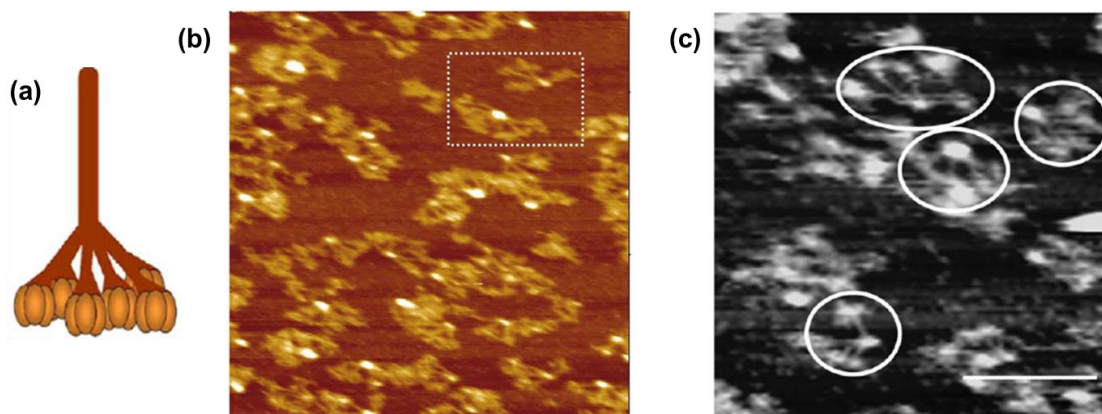


Figure II.30 (a) Modèle géométrique de la lectine MBL. Images AFM des lectines MBL (b) à l'air, immobilisées électrostatiquement sur un substrat de mica et (c) dans une solution de TBS, fixées de manière covalente sur du mica fonctionnalisé [Jensenius 2009]. Pour (b), la taille de l'image est de 250 nm de côté. Sur (c), la barre d'échelle correspond à une distance de 100 nm.

Dans ce cas, les images AFM ont une haute résolution. On distingue les différentes parties de la lectine, ce qui n'était pas le cas dans l'étude précédente. Toutefois, il apparaît une nouvelle fois que la préparation de l'échantillon, en particulier au niveau du mode d'immobilisation, affecte la conformation de la lectine.

Une étude par AFM de la lectine Concanavalin A (ConA) sur un substrat de mica à l'interface liquide/solide montre une structuration de la protéine en dimère alors qu'en solution elle est typiquement sous la forme d'un tétramère [Waner 1998].

Plus généralement, les lectines sont utilisées pour valider l'efficacité de nouveaux biocapteurs : transistor à effet de champs à base de graphène ou de nanotube de carbone [Chen 2012], biocapteur pour diagnostiquer les infections de dengue [Andrade 2011], biocapteur impédimétrique [Oliveira 2011]. L'AFM est alors utilisé pour observer les modifications de topographie de surface après chaque étape de l'élaboration du dispositif. En dernière étape, les lectines sont immobilisées (ou pas) sur la surface du capteur. La surface de l'échantillon est alors imagée par AFM pour vérifier leur présence sans pour autant les étudier véritablement. L'adsorption de lectines sur une surface contenant des polysaccharides peut être aussi suivie par AFM [Sierakowski 2007]. On peut alors comprendre leur comportement suivant la nature du substrat et leur concentration.

II.6.2 Etude sur les lectines et les sucres

L'observation par AFM de complexes lectine/sucre semble être un sujet de recherche peu abordé d'après la littérature. Seulement deux études ont attiré notre attention.

Gour et Verma, en 2008, présentent une étude AFM sur l'auto-assemblage lectine/sucre avec la lectine ConA et deux glycoconjugués mannolysés : un composé bivalent le N,N'-di- α -D-mannopyranosylurea (nommé **(1)**) et l'autre trivalent le tris[N,N'- α -D-mannopyranosyl-2-aminoethyl]amine (nommé **(2)**) [Gour 2008]. Les images AFM, données sur la Figure II.31, montrent les arrangements ConA/**(1)** (Figure II.31 (b)) et ConA/**(2)** (Figure II.31 (c)) sur un substrat de mica, à l'air. La différence de valence entre les deux composés semble être à l'origine de la différence de structuration entre les deux images. On remarque, de plus, qu'à la même concentration, la lectine ConA, seule sur la surface, est sous la forme d'objets sphériques isolés les uns des autres (Figure II.31 (a)).

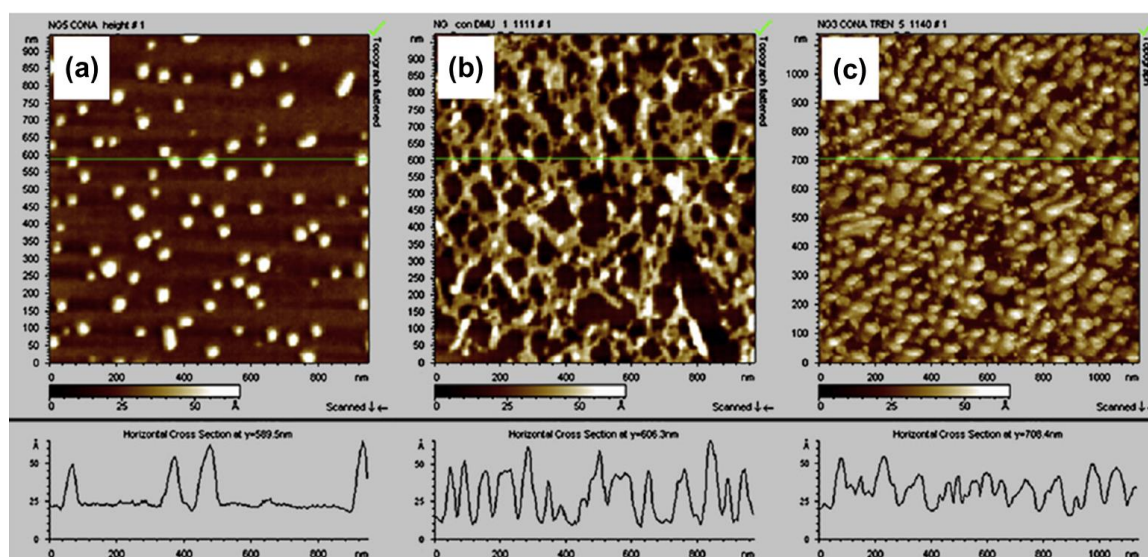


Figure II.31 Images topographiques de (a) la lectine Con A, (b) Con A avec le composé mannose divalent **(1)** et (c) Con A avec le composé mannose trivalent **(2)** [Gour 2008].

Les auteurs ont réalisé des modèles géométriques avec une configuration de la lectine Con A en dimère pour expliquer l'arrangement des complexes (Figure II.32). Enfin, ils démontrent expérimentalement que la lectine ConA est spécifique du mannose et que leur interaction nécessite la présence d'ions Ca^{2+} et Mn^{2+} .

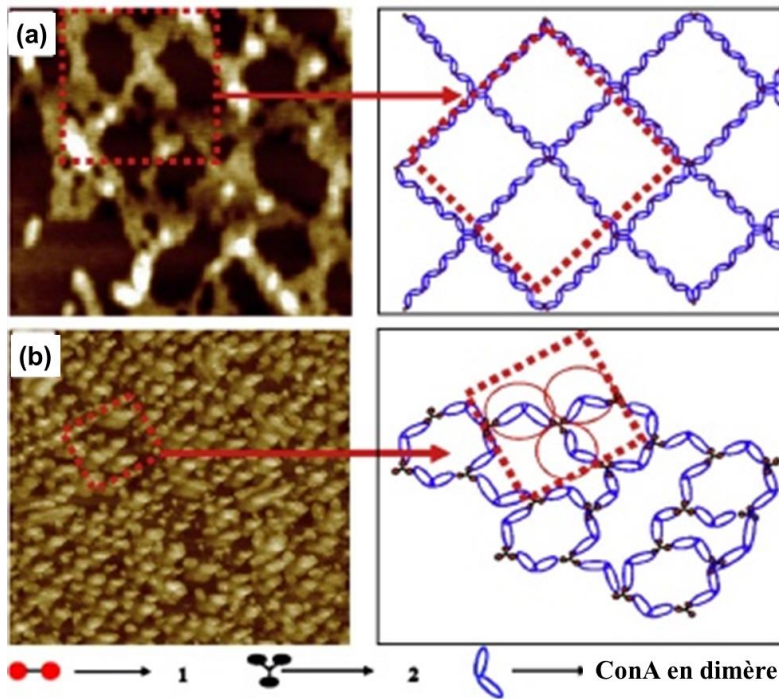


Figure II.32 Modèles structuraux développés pour l'arrangement entre la lectine ConA et le composé mannose divalent (1) (a), et trivalent (2) (b) [Gour 2008].

En s'appuyant sur cette étude, Lameignere *et al.* publient, en 2010, des travaux par AFM sur l'arrangement entre la lectine BC2L-A de la bactérie *Burkholderia cenocepacia* et un trimannose (Figure II.33) [Lameignere 2010].

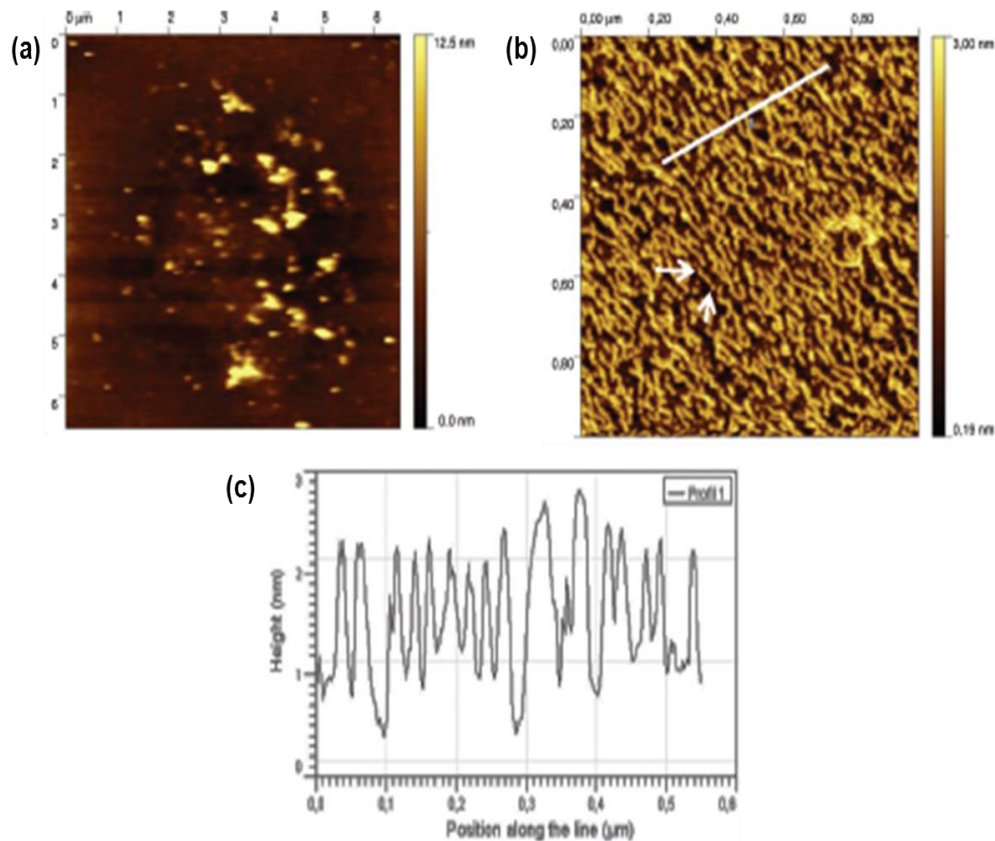


Figure II.33 Images de topographie de la lectine BC2L-A seule (a) et du complexe BC2L-A/trimannose (b). (c) Profil de l'image (b).

Seules, les lectines BC2L-A interagissent entre elles pour former de larges agrégats désordonnés sur la surface du substrat de mica (Figure II.33 (a)). En présence du composé trimannose, les complexes se structurent en filaments d'une hauteur de 1,5 nm (Figure II.33 (c)) (dimension de la lectine séchée) et d'une longueur de 20 à 200 nm ce qui montre qu'on a bien l'arrangement de plusieurs complexes entre eux (Figure II.33 (b)). L'arrangement en filament semble indiquer que seulement deux mannoses du composé trivalent interagissent avec un site de reconnaissance de la lectine. Un modèle moléculaire a été développé pour valider cette hypothèse (Figure II.34).



Figure II.34 Modèle moléculaire de l'arrangement des complexes BC2L-A/trimannose [Lameignere 2010].

L'interaction lectine/sucre est plus généralement étudiée par l'AFM en mode spectroscopie. On peut classer ces études en deux catégories. La première porte sur l'interaction lectine/sucre elle-même [Li 2011 ; Zhang 2009 ; Yan 2009]. La seconde utilise

cette interaction pour sonder la surface de cellules ou d'organismes afin de déterminer sa chimie et ses propriétés de surface [Grandbois 2000 ; Gunning 2008 ; Touhami 2003 ; Prazeres 2003, Chen 2006].

Pour conclure sur ce deuxième chapitre dédié à la microscopie à force atomique, nous avons rappelé dans un premier temps le principe de fonctionnement. Basé sur l'interaction entre une pointe nanométrique et une surface, nous avons décrit les forces qui jouent un rôle dans cette interaction, à l'air et en milieu liquide, à longue et courte portée.

Plusieurs modes d'imagerie sont possibles, nous avons plus particulièrement développé le mode AM-AFM qui sera utilisé dans la suite dans notre étude. Ce mode oscillant induit, dans un régime non-linéaire, la coexistence de deux états stables. Suivant le setpoint appliqué, les images AFM peuvent montrer un dédoublement des structures. Dans les observations d'objets biologiques, il faut donc accorder une grande importance au choix du rapport A_{sp}/A_{libre} afin de ne pas endommager la surface avec des rapports trop faibles et de ne pas tomber dans ce domaine de coexistence qui amène des artefacts.

Notre système expérimental a ensuite été présenté. Nous avons expliqué les artefacts et les anomalies de mesure souvent observés en AFM. Enfin, avant de discuter de notre étude AFM sur l'arrangement de complexes lectine/sucre dans le troisième chapitre, nous avons fait une étude bibliographique sur ce sujet. Elle met en évidence que ce sujet de recherche est encore peu présent dans la littérature.

Références

- Anczykowski B., Krüger D. et Fuchs H., Cantilever dynamics in quasinoncontact force microscopy: spectroscopy aspects, *Phys. Rev. B*, 1996, **53**, 23, 15485.
- Andrade C. A. S., Oliveira M. D. L., De Melo C. P., Coelho L. C. B. B., Correia M. T. S., Nogueira M. L., Singh P. R. et Zeng X., Diagnosis of dengue infection using a modified gold electrode with hybrid organic-inorganic nanocomposite and *Bauhinia monandra* lectin, *J. Colloid Interf. Sci.*, 2011, **362**, 517-523.
- Baba M., Kakitani S., Ishii H. et Okuno T., Fine atomic image of mica cleavage planes obtained with an atomic force microscope (AFM) and a novel procedure for image processing, *Chem. Phys.*, 1997, **221**, 23-31.
- Belaidi S., Girard P. et Leveque G., Electrostatic forces acting on the tip in atomic force microscopy: modelization and comparison with analytic expressions, *J. Appl. Phys.*, 1997, **81**, 3, 1023-1030.
- Binnig G., Quate C. F. et Gerber C., Atomic force microscope, *Phys. Rev. Lett.*, 1986, **56**, 9, 930-933.
- Binnig G. et Rohrer H., Scanning tunnelling microscopy – from birth to adolescence, *Rev. Mod. Phys.*, 1987, **59**, 3, 615-625.
- Binnig G., Rohrer H., Gerber C. et Weibel E., Surface studies by scanning tunnelling microscopy, *Phys. Rev. Lett.*, 1982, **49**, 1, 57-61.
- Binnig G., Rohrer H., Gerber C. et Weibel E., 7x7 Reconstruction on Si(111) resolved in real space, *Phys. Rev. Lett.*, 1983, **50**, 2, 120-123.
- Boisgard R., Michel D. et Aimé J. P., Hysteresis generated by attractive interaction: oscillating behaviour of a vibrating tip-microlever system near a surface, *Surf. Sci.*, 1998, **401**, 199-205.
- Bustamante C., Rivetti C. et Keller D. J., Scanning force microscopy under aqueous solutions, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 1997, **7**, 709-716.
- Butt H.-J., Cappella B. et Kappl M., Force measurements with the atomic force microscope: technique, interpretation and applications, *Surf. Sci. Rep.*, 2005, **59**, 1-152.
- Butt H.-J. et Kappl M., Surface and interfacial forces, *ED. Wiley-VCH*, 2010.
- Chen J.-L., Lin S. et Lin L.-P., Rhizobial surface biopolymers and their interaction with lectin measured by atomic force microscopy, *World J. Microb. Biot.*, 2006, **22**, 565-570.
- Chen Y., Vedala H., Kotchey G. P., Audfray A., Cecioni S., Imberty A., Vidal S. et Star A., Electronic detection of lectins using carbohydrate-functionalized nanostructures: grapheme versus carbon nanotubes, *ACS Nano*, 2012, **6**, 1, 760-770.
- Czajkowsky D. M. et Shao Z., Inhibition of protein adsorption to muscovite mica by monovalent cations, *J. Microsc.*, 2003, **211**, 1, 1-7.
- Derjaguin B. V. et Landau L., The theory of stability of highly charged lyophobic sols and coalescence of highly charged particles in electrolyte solutions, *Acta Physicochim.*, 1941, **14**, 633.
- Derjaguin B. V., Muller V. M. et Toporov Y. P., Effect of contact deformations on the adhesion of particules, *J. Colloid Interf. Sci.*, 1975, **53**, 2, 314-326.
- Dong M., Xu S., Oliviera C. L. P., Pedersen J. S., Thiel S., Besenbacher F. et Vorup-Jensen T., Conformational changes in mannan-binding lectin bound to ligand surfaces, *J. Immunol.*, 2007, **178**, 3016-3022.
- Dongmo S., Troyon M. et Vautrot P., Blind restoration method of scanning tunneling and atomic force microscopy images, *J. Vac. Sci. Technol. B*, 1996, **14**, 2, 1552-1556.

- Dorel S., Nanostructure de la muscovite : une étude par diffraction d'électrons lents en mode oscillant, Thèse, 2000, Université de Paris-Sud, Centre d'Orsay, France.
- Drake B., Prater C. B., Weisenhorn A. L., Gould S. A. C., Albrecht T. R., Quate C. F., Cannell D. S., Hansma H. G. et Hansma P. K., Imaging crystals, polymers, and processes in water with the atomic force microscope, *Science*, 1989, **243**, 1586-1589.
- Erlandsson R., McClelland G. M., Mate C. M. et Chiang S., Atomic force microscopy using optical interferometry, *J. Vac. Sci. Technol. A*, 1988, **6**, 2, 266-270.
- García R., Calleja M. et Rohrer H., Patterning of silicon surfaces with noncontact atomic force microscopy: field-induced formation of nanometer-size water bridges, *J. Appl. Phys.*, 1999a, **86**, 4 1898-1903.
- García R. et Pérez R., Dynamic atomic force microscopy methods, *Surf. Sci. Rep.*, 2002, **47**, 197-301.
- García R. et San Paulo A., Attractive and repulsive tip-ample interaction regimes in tapping-mode atomic force microscopy, *Phys. Rev B*, 1999a, **60**, 7, 4961-4966.
- García R. et San Paulo A., Dynamics of a vibrating tip near or in intermittent contact with a surface, *Phys. Rev B*, 1999b, **61**, 20, 13381.
- Gour N. et Verma S., Synthesis and AFM studies of lectin-carbohydrate self-assemblies, *Tetrahedron*, 2008, **64**, 7331-7337.
- Grandbois M., Dettmann W., Benoit M. et Gaub H. E., Affinity imaging of red blood cells using an atomic force microscope, *J. Histochem. Cytochem.*, 2000, **48**, 5, 719-724.
- Gunning A. P., Chambers S., Pin C., Man A. L., Morris V. J. et Nicoletti C., Mapping specific adhesive interactions on living human intestinal epithelial cells with atomic force microscopy, *FASEB J.*, 2008, **22**, 2331-2339.
- Hamaker H. C., The London-Van der Waals attraction between spherical particles, *Physica*, 1937, **4** 1058-1072.
- Hansma H. G. et Laney D. E., DNA binding to mica correlates with cationic radius: assay by atomic force microscopy, *Biophys. J.*, 1996, **70**, 1933-1939.
- Hao H. W., Baro A. M. et Saenz J. J., Electrostatic and contact forces in force microscopy, *J. Vac. Sci. Technol. B*, 1991, **9**, 2, 1323-1328.
- Hertz H., Ueber die berührung fester elastischer körper, *J. Reine Angew. Math.*, 1882, **92**, 156-171.
- Hölscher H., Schwarz U. D. et Wiesendanger R., Calculation of the frequency shift in dynamic force microscopy, *Appl. Surf. Sci.*, 1999, **140**, 344-351.
- Ikai A., STM and AFM of bio/organic molecules and structures, *Surf. Sci. Rep.*, 1996, **26**, 261-332.
- Israelachvili J., Intermolecular & surface force, *Academic Press*, 2nd edition, 1991.
- Jensenius H., Klein D. C. G., Van Hecke M., Oosterkamp T. H., Schmidt T. et Hensenius J. C., Mannan-binding lectin: structure, oligomerization, and flexibility studied by atomic force microscopy, *J. Mol. Biol.*, 2009, **391**, 246-259.
- Johnson K. L., Kendall K. et Roberts A. D., Surface energy and the contact of elastic solids, *Proc. R. Soc. Lond. A.*, 1971, **324**, 301-313.
- Khan Z., Leung C., TAhir B. A. et Hoogenboom B. W., Digitally tunable, wide-band amplitude, phase, and frequency detection for atomic-resolution scanning force microscopy, *Rev. Sci. Instrum.*, 2010, **81**, 073704.
- Kittel C., Physique de l'état solide, *Dunod*, 8^{ème} édition, 2007.

- Kühle A., Sorensen A. H., Zandbergen J. B. et Bohr J., Contrast artifacts in tapping tip atomic force microscopy, *Appl. Phys. A*, 1998, **66**, S329-332.
- Lameignere E., Shiao T. C., Roy R., Wimmerova M., Dubreuil F., Varrot A. et Imbert A., Structural basis of the affinity for oligomannosides and analogs displayed by BC2L-A, a *Burkholderia cenocepacia* soluble lectin, *Glycobiology*, 2010, **20**, 1, 87-98.
- Li Y., Qiao H., Xing C., Zhang J., Wang L.-X., Wang H., Zhang B. et Tang J., Molecular recognition force spectroscopy of a specific spectroscopy lectin-carbohydrate interaction at single-molecule level, *J. Struct Biol*, 2011, **176**, 46-51.
- Loos J., The art of SPM: scanning probe microscopy in materials science, *Adv. Mater.*, 2005, **17**, 1821-1833.
- Lyubchenko Y., Preparation of DNA and nucleoprotein samples for AFM imaging, *Micron*, 2011, **42**, 196-206.
- Lyubchenko Y., Shlyakhtenko L., Harrington R., Oden P. et Lindsay S., Atomic force microscopy of long DNA: imaging in air and under water, *P. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, **90**, 2137-2140.
- Martin Y., Williams C. C. et Wickrasinghe H. K., Atomic force microscope-force mapping and profiling on a sub 100-Å scale, *J. Appl. Phys.*, 1987, **61**, 10, 4723-4729.
- Meyer G. et Amer N. M., Novel optical approach to atomic force microscopy, *Appl. Phys. Lett.*, 1988, **53**, 12, 1045-1047.
- Müller D. J., Amrein M. et Engel A., Adsorption of biological molecules to a solid support for scanning probe microscopy, *J. Struct. Biol.*, 1997a, **119**, 172-188.
- Müller D. J. et Engel A., The height of biomolecules measured with the atomic force microscope depends on electrostatic interactions, *Biophys. J.*, 1997b, **73**, 1633-1644.
- Neubauer G., Cohen S. R., McClelland G. M., Horne D. et Mate C. M., Force microscopy with a bidirectional capacitance sensor, *Rev. Sci. Instrum.*, 1990, **61**, 9, 2296-2308.
- Odin C., Aimé J.P., El Kaabour Z. et Bouhacina T., Tip's finite size effects on atomic force microscopy in the contact mode: simple geometrical considerations for rapid estimation of apex radius and tip angle based on the study of polystyrene latex balls, *Surf. Sci.*, 1994, **317**, 321-340.
- Oliveira M. D. L., Andrade C. A. S., Correia M. T. S., Coelho L. C. B. B., Singh P. R. et Zeng X., Impedimetric biosensor based on self-assembly hybrid cystein-gold nanoparticles and CramoLL lectin for bacterial lipopolysaccharide recognition, *J. Colloid Interf. Sci.*, 2011, **362**, 194-201.
- Olsson L., Lin N., Yakimov V. et Erlandsson R., A method for *in situ* characterization of tip shape in ac-mode atomic force microscopy using electrostatic interaction, *J. Appl. Phys.*, 1998, **84**, 8, 4060-4064.
- Prazeres G. M. P., Batista E. J. O., De Souza W., Bish P. M. et Weissmüller G. , Interaction between chondroitin-6-sulfate and *Entamoeba histolytica* as revealed by force spectroscopy, *Exp. Parasitol.*, 2003, **104**, 40-46.
- Sader J. E., Parallel beam approximation for V-shaped atomic force microscope cantilevers, *Rev. Sci. Instrum.*, 1995, **66**, 9, 4583-4587.
- Schäffer T. E., Cleveland J. P., Ohnesorge F., Walters D. A. et Hansma P. K., Studies of vibrating atomic force microscope cantilevers in liquid, *J. Appl. Phys.*, 1996, **80**, 7, 3622-3627.
- Schmalz G., Über glatte und ebenheit as physikalisches und physiologisches problem, *Zeitschrift des Verbandes Deutscher Ingenieure*, 1929, **73**, 144-161.
- Seo Y. et Jhe W., Atomic force microscopy and spectroscopy, *Rep. Prog. Phys.*, 2008, **71**, 16101-16123.

- Sides P. J., Faruqui D. et Gellman A. J., Dynamics of charging of muscovite mica: measurement and modeling, *Langmuir*, 2009, **25**, 1475-1481.
- Sierakowski M. R., Castro L. B. R., Lucyszyn N. et Petru D. F. S., Assembling of xyloglucans and lectin onto Si wafers and onto amino-terminated surfaces, *J. Braz. Chem. Soc.*, 2007, **18**, 5, 1017-1023.
- Stadelmann T. O., Antidot superlattices in InAs–GaSb double heterostructures: transport studies, Thèse, 2006, Trinity Term, University College, Oxford, UK.
- Stifter T., Marti O. et Bhushan B., Theoretical investigation of the distance dependence of capillarity and Van der Waals forces in scanning force microscopy, *Phys. Rev. B*, 2000, **62**, 20, 13667-13673.
- Tortonese M., Barrett R. C. et Quate C. F., Atomic resolution with an atomic force microscope using piezoresistive detection, *Appl. Phys. Lett.*, 1993, **62**, 8, 834-836.
- Touhami A., Hoffmann B., Vasella A., Denis F. A. et Dufrière Y. F., Aggregation of yeast cells: direct measurement of discrete lectin-carbohydrate interactions, *Microbiology*, 2003, **149**, 2873-2878.
- Velegol S. B., Pardi S., Li X., Velegol D. et Logan B. E., AFM imaging artifacts due to bacterial cell height and AFM tip geometry, *Langmuir*, 2003, **19**, 851-857.
- Verwey E. J. W. et Overbeek J. T. G., Theory of the stability of lyophobic colloids, *Elsevier Publishing Company*, New York, 1948.
- Villarrubia J. S., Algorithms for scanned probe microscope image stimulation, surface reconstruction, and tip estimation, *J. Res. Natl. Stand. Technol.*, 1997, **102**, 425-454.
- Vig J. R., UV/ozone cleaning of surface, *J. Vac. Sci. Technol. A*, 1985, **3**, 3, 1027-1034.
- Waner M. J., Gilchrist M., Schindler M. et Dantus M., Imaging the molecular dimensions and oligomerization of proteins at liquid/solid interfaces, *J. Phys. Chem. B*, 1998, **102**, 1649-1657.
- Weisenhorn A. L., Khorsandi M., Kasas S., Gotzos V. et Butt H.-J., Deformation and height anomaly of soft surfaces studied with an AFM, *Nanotechnology*, 1993, **4**, 106-113.
- Yan C., Yersin A., Afrin R., Sekiguchi H. et Ikai A., Single molecular dynamic interactions between glycoprotein A and lectin as probed by atomic force microscopy, *Biophys. Chem.*, 2009, **114**, 72-77.
- Young R., Ward J. et Scire F., The topographiner: an instrument for measuring surface microtopography, *Rev. Sci. Instrum.*, 1972, **43**, 7, 999-1011.
- Zhang X. et Yadavalli V., Functionalized self-assembly monolayers for measuring single molecule lectin carbohydrate interactions, *Anal. Chim. Acta*, 2009, **649**, 1-7.
- Zhong Q., Inniss D., Kjoller K. et Elings V. B., Fractured polymer/silica fiber surface studied by tapping mode atomic force microscopy, *Surf. Sci. Lett.*, 1993, **290**, 688-692.

Chapitre 3

Résultats expérimentaux

Après avoir décrit dans le chapitre 1 le système biologique étudié et la technique AFM dans le chapitre 2, nous présenterons dans ce chapitre l'étude proprement dite de l'interaction de la lectine PA-IL avec trois sucres par AFM. Nous nous intéresserons principalement à l'influence de la structure de cœur de ces glycoclusters sur l'arrangement. La lectine PA-IL fera aussi l'objet d'une étude AFM à l'air et en milieu liquide. Nous discuterons également de l'influence de notre protocole expérimental sur les résultats obtenus.

III.1 Etude de la lectine PA-IL à l'air

Rappelons que la lectine PA-IL est une protéine spécifique du D-galactose et de ses dérivés. Elle est composée de quatre monomères avec pour chacun un ion calcium Ca^{2+} qui intervient dans la liaison avec le galactose. Ces dimensions, calculées entre les ions calcium, sont indiquées sur la Figure III.1.

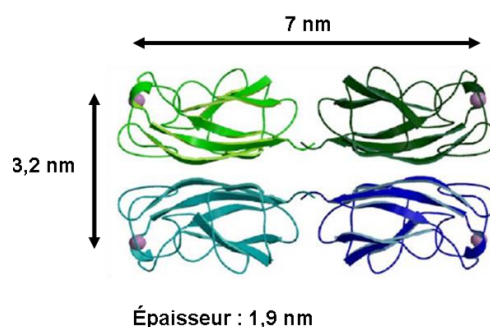


Figure III.1 Structure cristalline de la lectine PA-IL, les dimensions sont mesurées à partir des ions calcium Ca^{2+} , ici représentés par les sphères mauves (PDB code : 1OKO) [Imberty 2004].

Gilboa-Garber a noté que les lectines avaient tendance à s'agréger à l'état pur [Gilboa-Garber 1982]. Dans la suite de ce paragraphe, l'influence de la concentration des lectines sera considérée pour mieux comprendre ce phénomène d'agrégation.

L'ajout d'une solution de chlorure de calcium CaCl_2 à la solution finale contenant les lectines et les glycoclusters favorise leur interaction [Gour 2008 ; Lameignere 2010]. Dans le cas d'une étude AFM, les ions Ca^{2+} vont aussi permettre de fixer électrostatiquement les lectines au substrat de mica ici utilisé. En effet, il est nécessaire que les objets biologiques soient immobilisés sur le substrat afin d'éviter leur déplacement par la pointe pendant le balayage de la surface. Dans nos expériences, le pH des solutions est autour de 7. Les lectines PA-IL ayant un point isoélectrique estimé à 4,94, les conditions expérimentales sont telles que les lectines sont chargées négativement. De même, la surface du mica est chargée négativement [Sides 2009]. Les cations assurent alors l'immobilisation électrostatique des lectines sur la surface.

En étude préliminaire, nous nous assurerons toutefois que la concentration de CaCl_2 utilisée n'amène pas de cristaux de sel sur la surface après le séchage de l'échantillon. De même, l'influence de cette solution ionique sur l'arrangement des lectines sera examinée. Enfin, deux modes de séchage ont été appliqués à l'échantillon. Nous comparerons les résultats obtenus.

Tout au long de ce chapitre, nous indiquerons dans nos protocoles expérimentaux les concentrations finales des solutions utilisées. Pour le cas des solutions de lectine, la concentration est donnée en tétramère. Toutes les images AFM présentées par la suite ont une taille de 256 ou 512 pixels.

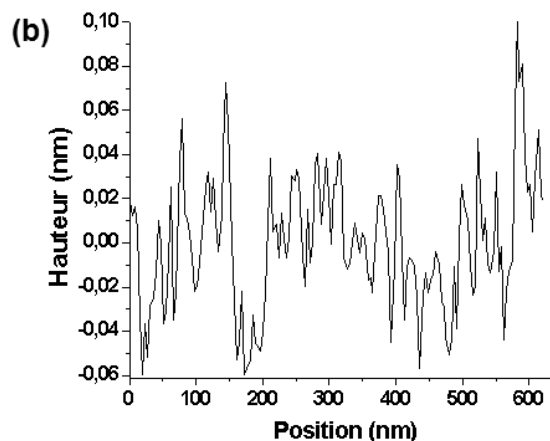
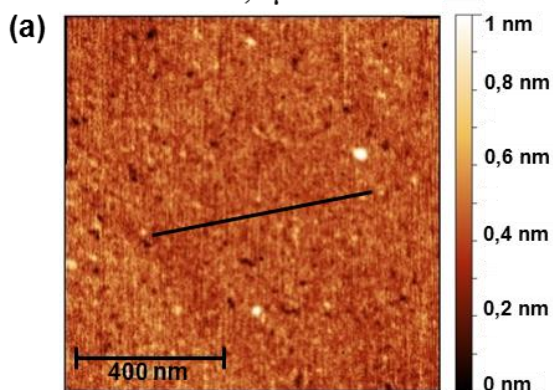
III.1.1 Chlorure de calcium déposé sur mica

Dans nos expériences, le chlorure de calcium est utilisé à la fois pour favoriser l'interaction entre les lectines et les sucres mais aussi pour fixer les objets biologiques au substrat de mica.

En nous appuyant sur les travaux de Gour *et al.*, 20 μL de solution de CaCl_2 sont déposées sur un substrat de mica fraîchement clivé [Gour 2008]. Deux concentrations finales en sels sont analysées : 0,3 $\mu\text{mol/L}$ et 12 nmol/L . Les observations se faisant à l'air, les échantillons sont placés toute une nuit dans un dessiccateur avec des sels de silice à température et pression ambiantes afin de sécher la surface.

Les images obtenues par AFM aux deux concentrations considérées sont reportées sur la Figure III.2. Elles ont pour dimension 1 μm de côté et ont été réalisées en mode contact intermittent avec un rapport d'amplitude de travail sur amplitude libre supérieur de 70 %.

Concentration : 0,3 $\mu\text{mol/L}$



Concentration : 12 nmol/L

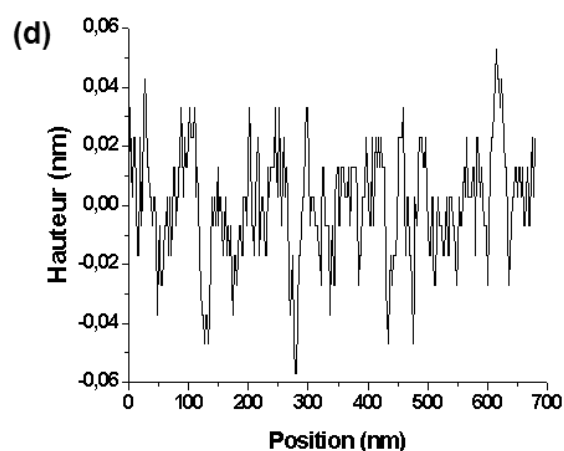
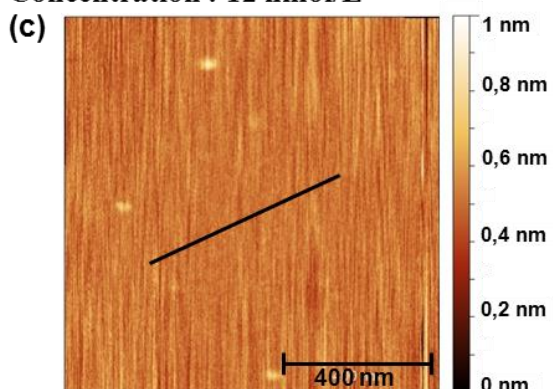


Figure III.2 Images de la surface d'un substrat de mica après un dépôt de solution de CaCl_2 à la concentration de 0,3 $\mu\text{mol/L}$ (a) et de 12 nmol/L (c). (b) et (d) Profils des surfaces (a) et (c) respectivement.

Après le dépôt de chlorure de calcium, la surface du mica reste plane avec une rugosité RMS (Root Mean Square) autour de 0,11 nm, mesurée à partir des Figure III.2 (a) et Figure III.2 (c). Les profils tracés en Figure III.2 (b) et Figure III.2 (d) montrent une amplitude de hauteur de l'ordre de 0,16 nm. Ces fluctuations sont largement inférieures aux dimensions de la lectine, ce qui ne devrait pas perturber les mesures de hauteur faites par la suite sur les objets biologiques. Les lignes verticales sur la Figure III.2 (c) témoignent d'un niveau de bruit d'environ $0,04 \text{ nm} \pm 0,02 \text{ nm}$. Enfin, il n'apparaît pas de cristaux de sel dus au séchage de l'échantillon.

Les propriétés planaires du mica permettent d'observer des objets à des dimensions de l'ordre du nanomètre en hauteur. Il est donc adapté à notre étude. Dans la suite de nos expériences, le chlorure de calcium va être utilisé aux concentrations présentées ici. D'après nos résultats, ces concentrations de travail semblent être adaptées pour imager la surface sans ajouter de rugosité au substrat.

III.1.2 Influence de la concentration

Le phénomène d'agrégation des lectines est connu et évoqué dans la littérature sans pour autant être étudié, à notre connaissance. Nous allons ici essayer de comprendre comment les lectines PA-IL s'organisent entre elles en comparant leur arrangement ou structuration sur un substrat de mica pour deux concentrations, 2,5 $\mu\text{mol/L}$ et 50 nmol/L (en nous référant à l'étude de Gour *et al.*). Nous rappelons ici que la concentration des lectines est donnée en tétramère.

La solution de lectines à 2,5 $\mu\text{mol/L}$ en concentration finale est préparée à partir de :

- 20 μL de CaCl_2 à 0,3 $\mu\text{mol/L}$;
- 10 μL d'une solution aqueuse de lectines PA-IL à 2,5 $\mu\text{mol/L}$ (soit 0,125 mg/mL) ;
- 10 μL d'eau ultrapure.

La solution de lectines à 50 nmol/L est une dilution par 50 de la solution précédente.

L'échantillon est élaboré avec 20 μL de solution finale déposée sur du mica fraîchement clivé.

Il est ensuite séché toute une nuit dans un dessiccateur.

A forte concentration, 2,5 $\mu\text{mol/L}$, les lectines PA-IL se déposent et se structurent sur la surface sous forme de couche, comme le montre les images AFM de la Figure III.3. On compte trois couches pour une surface de 1 μm^2 (Figure III.3 (b)), voire quatre dans le cas d'une surface d'observation de 5 μm^2 (Figure III.3 (a)).

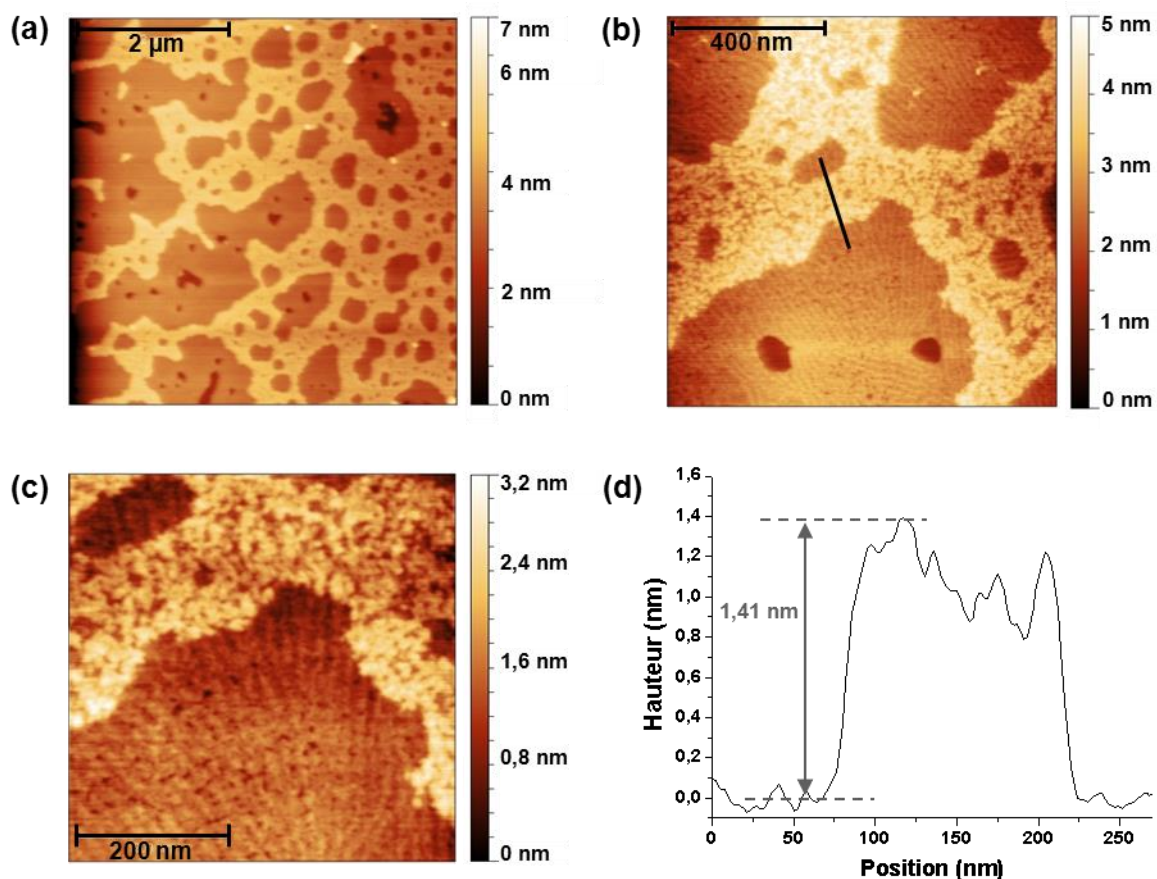


Figure III.3 Arrangement des lectines PA-IL déposées sur un substrat de mica à une concentration finale de 2,5 $\mu\text{mol/L}$. Les images AFM de la surface sont de dimensions 5x5 μm (a), 1x1 μm (b) et 500x500 nm (c) avec une rugosité RMS de 0,97 nm, 0,76nm et 0,46 nm respectivement. Le profil de l'image (b) est tracé sur le graphique (d).

En calculant l'occupation spatiale des lectines sur le substrat de mica, le rapport "surface totale des lectines" sur "surface du substrat" est supérieur à 13. Dans ce calcul, nous prenons en compte que l'échantillon est un carré de 7 mm de côté et que les lectines se déposent sur le côté le plus large de leur structure [Waner 1998]. Ce résultat signifie que si les lectines s'organisaient de façon homogène, environ treize couches de lectines recouvriraient le mica, soit environ 614500 lectines par μm^2 . Même si les 13 couches ne peuvent pas être observées, les images AFM révèlent un arrangement sur au moins trois niveaux.

A partir de la Figure III.3 (b), la hauteur de la couche supérieure est estimée à $1,35 \pm 0,37$ nm. Le profil de la couche est tracé sur la Figure III.3 (d). Cette valeur est inférieure aux dimensions théoriques de la lectine. Il faut toutefois prendre en compte que les lectines sont observées après avoir été séchées toute une nuit. Leur structure peut en être affectée, leur hauteur peut diminuer [Mori 1997]. Toujours d'un point de vue expérimental, nous travaillons en contact intermittent avec un rapport setpoint sur amplitude libre A_{sp}/A_{libre} de l'ordre de 60 % à une vitesse de scan de 1 Hz. Weisenhorn *et al.* ont montré que la forme de la pointe et son action sur les échantillons biologiques amenaient à une diminution de la hauteur apparente et à un élargissements des structures (cf. Chap. 2) [Weisenhorn 1993]. La différence de hauteur entre la valeur mesurée et la valeur théorique peut donc être une action conjuguée du séchage et de l'action de la pointe sur l'échantillon biologique.

Sur les Figure III.3 (b) et Figure III.3 (c), on distingue des lignes de sillon provenant d'une sous-structure dans la couche intermédiaire. Les lectines semblent s'auto-organiser. Ces lignes présentent des orientations différentes sur une même image. Leur orientation est donc indépendante du sens de balayage de la pointe et de la structure du mica, d'autant plus qu'on a plusieurs couches superposées de lectines sur le substrat. Ce type d'arrangement des lectines entre elles laissent à penser qu'elles interagissent à la fois latéralement et longitudinalement. On est en présence d'une interaction lectine/lectine.

On peut considérer que cet arrangement ou auto-organisation est dû à la structure en trois dimensions de la protéine et aux acides aminés qui la composent. En effet, la structure tridimensionnelle d'une protéine appelée aussi structure tertiaire est le résultat du repliement de la chaîne d'acides aminés. Ce repliement est dû à diverses interactions entre les acides aminés non voisins. Les liaisons peuvent être à la fois covalentes, électrostatiques, de Van der Waals ou encore liées aux propriétés hydrophiles ou hydrophobes des acides aminés. Si ces interactions ont lieu entre les acides aminés de la protéine, il est envisageable que des interactions avec des acides aminés d'une autre protéine se produisent. Comme la solution contient des protéines identiques, les liaisons peuvent se faire aux mêmes endroits sur la structure de la protéine et ainsi créer, à grande échelle, des structures reproductibles. Le séchage de la surface peut aussi favoriser cette interaction [Maciel 2007].

Même si Avichezer *et al.* et Imberty *et al.* ont défini la séquence d'acides aminés et la structure en trois dimensions de la lectine PA-IL, une modélisation moléculaire de l'interaction entre deux lectines voire plusieurs, en considérant toutes les liaisons possibles sur les six faces de la protéine, représente un travail considérable et n'a pas été entrepris dans cette thèse [Avichezer 1992 ; Imberty 2004].

Sur la Figure III.3 (c), on remarque que la couche supérieure ne présente pas cette même structuration des lectines. A cette concentration, on ne distingue d'ailleurs pas de lectines isolées sur la surface. Ces images démontrent que la concentration choisie ici est trop importante pour observer des lectines isolées, nous avons donc décidé de faire nos observations à une concentration cinquante fois plus faible. Les images AFM découlant de ces expériences sont données dans la Figure III.4.

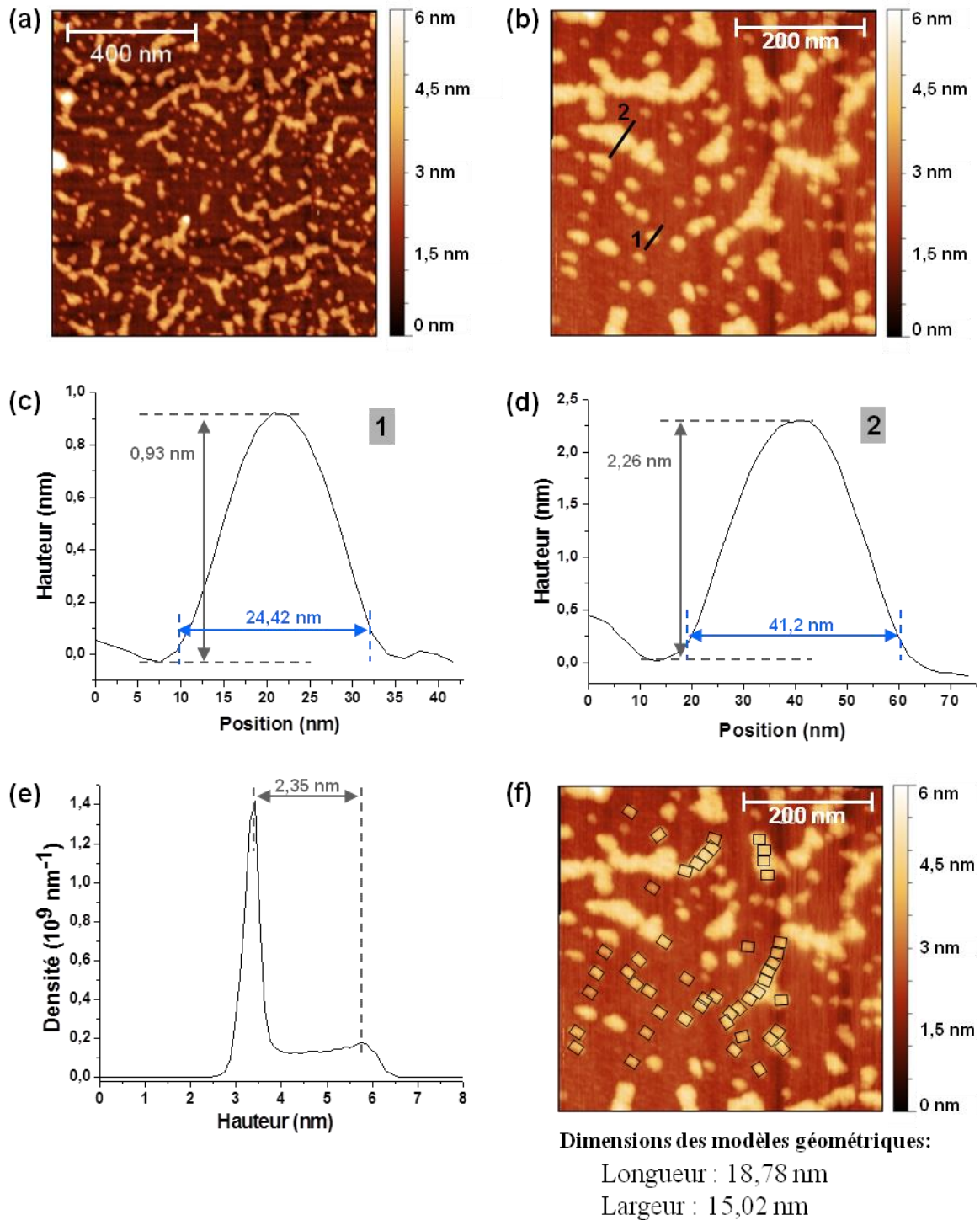


Figure III.4 Arrangement des lectines PA-IL à la concentration de 50 nmol/L sur un substrat de mica. Les images AFM sont de dimensions 1x1 μm (a) et 500x500 nm (b) avec une rugosité RMS de 1 nm et 0,80 nm respectivement. Les profils et la distribution des hauteurs de l'image (b) sont tracés sur les graphiques (c), (d) et (e). A partir de l'image (b), un modèle géométrique en rectangle a été tracé sur (f) avec les dimensions en nanomètre relative au modèle.

On remarque deux types de structures sur les Figure III.4 (a) et Figure III.4 (b) : des objets de forme ovale isolés sur la surface que l'on peut identifier comme des lectines seules sur le substrat et des ensembles plus filaires qui semblent être des lectines agrégées entre

elles. En reprenant le calcul sur l'occupation spatiale des lectines sur le mica, le rapport "surface totale des lectines" sur "surface du substrat" a une valeur de 0,27 soit environ 12300 lectines par μm^2 . Les lectines sont ici isolées sur la surface du mica, on n'observe pas la présence de multicouches, comme dans le cas précédent. Les interactions lectine/lectine qui dominaient l'arrangement surfacique de l'expérience précédente sont moins présentes ici puisqu'on trouve des objets unitaires.

Les Figure III.4 (c) et Figure III.4 (d) présentent les profils caractéristiques des lectines isolées et agrégées respectivement. Les mesures de hauteur et de largeur pour les protéines seules donnent des valeurs de $1,07 \text{ nm} \pm 0,45 \text{ nm}$ et $24,07 \text{ nm} \pm 5,42 \text{ nm}$ respectivement alors que dans le cas de l'amas de protéines elles sont de $2,21 \text{ nm} \pm 0,46 \text{ nm}$ et $42,05 \text{ nm} \pm 13,25 \text{ nm}$ respectivement aussi. Sur la distribution de hauteur (Figure III.4 (e)), un pic bien marqué correspondant à la hauteur moyenne du mica est observé à $3,47 \text{ nm}$. La distribution des hauteurs est ensuite plus ou moins constante jusqu'à un petit pic situé à $2,35 \text{ nm}$ du premier. Cette hauteur correspond à la hauteur mesurée pour les lectines agrégées. Sur ce graphique, on remarque que la partie représentant les lectines (large pic secondaire) correspond en proportion à un tiers de la surface totale de la Figure III.4 (b). On retrouve bien sur cette figure à un rapport "surface totale des lectines" sur "surface du substrat" proche de 0,27.

A partir de la Figure III.4 (b), un modèle géométrique en rectangle a été créé, reprenant la forme des lectines isolées sur la surface pour voir si cette structure était reproductible, en particulier au niveau de ses dimensions. La Figure III.4 (f) présente ce modèle sur plusieurs lectines. En retranscrivant les dimensions du modèle géométrique en nanomètre avec l'échelle de l'image, on peut remonter aux dimensions des lectines isolées. La formule de déconvolution de la pointe, donnée juste après, permettra ensuite d'estimer le rayon de courbure de la pointe à partir de la hauteur mesurée expérimentalement de la lectine ainsi que des longueurs et largeurs apparentes et théoriques.

Stadelmann définit la largeur apparente w' d'un objet rectangulaire de largeur w et de hauteur h avec une pointe de rayon de courbure R (avec $R > h$) par l'expression (cf. II.5.4) [Stadelmann 2006] :

$$w' = w + 2\sqrt{2Rh + h^2}$$

Sur l'image, nous avons défini un modèle de $18,78 \text{ nm}$ de longueur et de $15,02 \text{ nm}$ de largeur (la hauteur ne pouvant pas être déduite de ce modèle). En appliquant cette formule dans les deux directions de l'espace, avec une hauteur estimée précédemment à $1,07 \text{ nm}$ (pour les lectines isolées) et les dimensions théoriques de la lectines, le rayon de courbure de la pointe a une valeur de $15,7 \text{ nm} \pm 0,1 \text{ nm}$, ce qui apparaît vraisemblable expérimentalement. Il semble donc que la lectine se soit adsorbée sur la surface du mica dans la position la plus favorable énergétiquement, c'est-à-dire à plat, afin de maximiser l'aire de contact avec le substrat, d'où une hauteur inférieure à sa valeur théorique [Mori 1997 ; Waner 1998].

Pour les agrégats de lectine, nous avons essayé ce même modèle géométrique. On voit sur la Figure III.4 (f), que pour que le modèle respecte la forme des structures, les rectangles doivent être rapprochés, voire même superposés sur les bords. L'interaction entre les lectines paraît se faire dans un premier temps sur les bords longs. Bustamante *et al.* ont démontré qu'il existait un effet de pointe lorsque deux objets de même hauteur étaient séparés d'une distance d , inférieure au rayon de courbure de la pointe (cf. II.5.4) [Bustamante 1997]. Expérimentalement, cet effet se traduit par une largeur mesurée pour les deux objets

rapprochés inférieure à la somme de la largeur de deux objets isolés. Dans notre cas, les lectines sont liées entre elles. La distance entre deux lectines est largement inférieure au rayon de courbure de la pointe, estimé à 15,7 nm. La présence de cet effet de pointe est montrée par le chevauchement des modèles géométriques sur la Figure III.4 (f).

En étudiant l'agencement des lectines PA-IL sur la surface du mica à deux concentrations, des éléments de réponse apparaissent concernant la formation d'un arrangement de lectines en deux dimensions puis en couche venant d'une interaction lectine/lectine longitudinale puis latérale, visible sur la Figure III.3. Ces étapes sont présentées dans la Figure III.5.

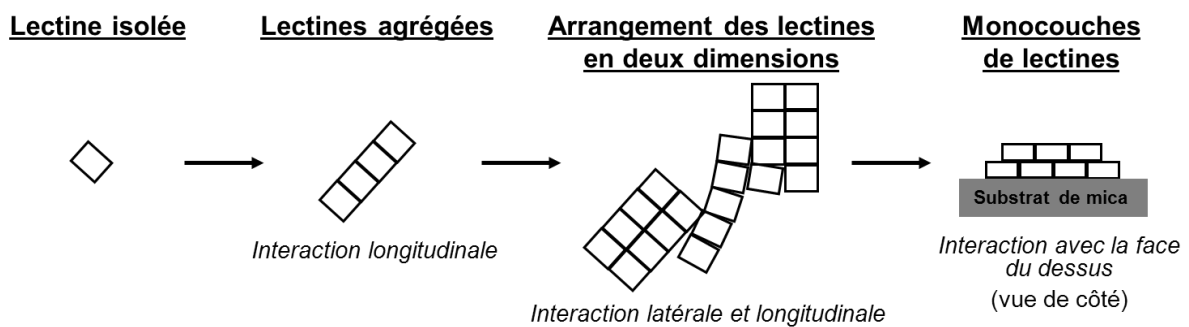


Figure III.5 Représentation schématique des étapes de structuration des lectines PA-IL en couche.

A faible concentration, les lectines sont isolées sur la surface. En augmentant leur nombre, elles commencent à se lier entre elles longitudinalement en formant des structures filaires. A concentration plus élevée, ces structures interagissent latéralement pour constituer des ensembles en deux dimensions. L'orientation des lignes de sillon, observé sur la Figure III.3 (b) pourrait être due à un défaut de liaison entre les lectines. Enfin, pour une très importante quantité de lectines, l'interaction se fait avec le dernier côté libre (la face supérieure), on a alors la formation de couche de lectines auto-organisées.

III.1.3 Influence du mode de séchage

Pour observer des objets biologiques à l'air par AFM, une étape de séchage de l'échantillon est nécessaire. Dans notre étude précédente, nous avons placé l'échantillon toute une nuit avec un dessiccateur avec des sels de silice à température et pression ambiante pour que la surface sèche progressivement. Cependant, on peut se demander si cette méthode ne dégrade pas les lectines. Leur structure tridimensionnelle étant liée, entre autres, par des interactions hydrophiles et hydrophobes, elle peut être modifiée si on déshydrate trop la molécule [Dong 2007]. Dans l'étude qui suit, nous avons changé de mode de séchage pour en observer l'effet sur l'arrangement des lectines pour une concentration de 2,5 $\mu\text{mol/L}$ (la plus concentrée).

La préparation de l'échantillon suit le protocole développé pour le dépôt de lectines à la concentration finale de 2,5 $\mu\text{mol/L}$ sur un substrat de mica fraîchement clivé (cf. III.1.2). L'échantillon est ensuite laissé 1h dans une étuve à 37°C. Nous avons choisi de travailler à une température proche de la température corporelle. Les observations AFM sont réalisées

dans la foulée, à l'air, en mode contact intermittent avec un rapport d'amplitude autour de 60 %.

L'arrangement des lectines, dans le cas d'un séchage à l'étuve, est présenté sur la Figure III.6. On remarque une structuration en couche. Sur l'image de $5 \times 5 \mu\text{m}$ (Figure III.6 (a)) et de $1 \times 1 \mu\text{m}$ (Figure III.6 (b)), le dégradé de couleur des plus sombres aux plus clairs permet de mettre en évidence la présence de quatre couches de lectines superposées. Compte tenu de la quantité de lectines déposées, on considère que le mica n'est pas observable sur ces images et que la surface la plus basse (noire) correspond à la première couche de lectines. La deuxième et la troisième sont respectivement en orange et jaune. Enfin, la quatrième couche, la plus haute, est en jaune pâle. Le profil de la Figure III.6 (b) met en évidence les quatre couches (Figure III.6 (f)).

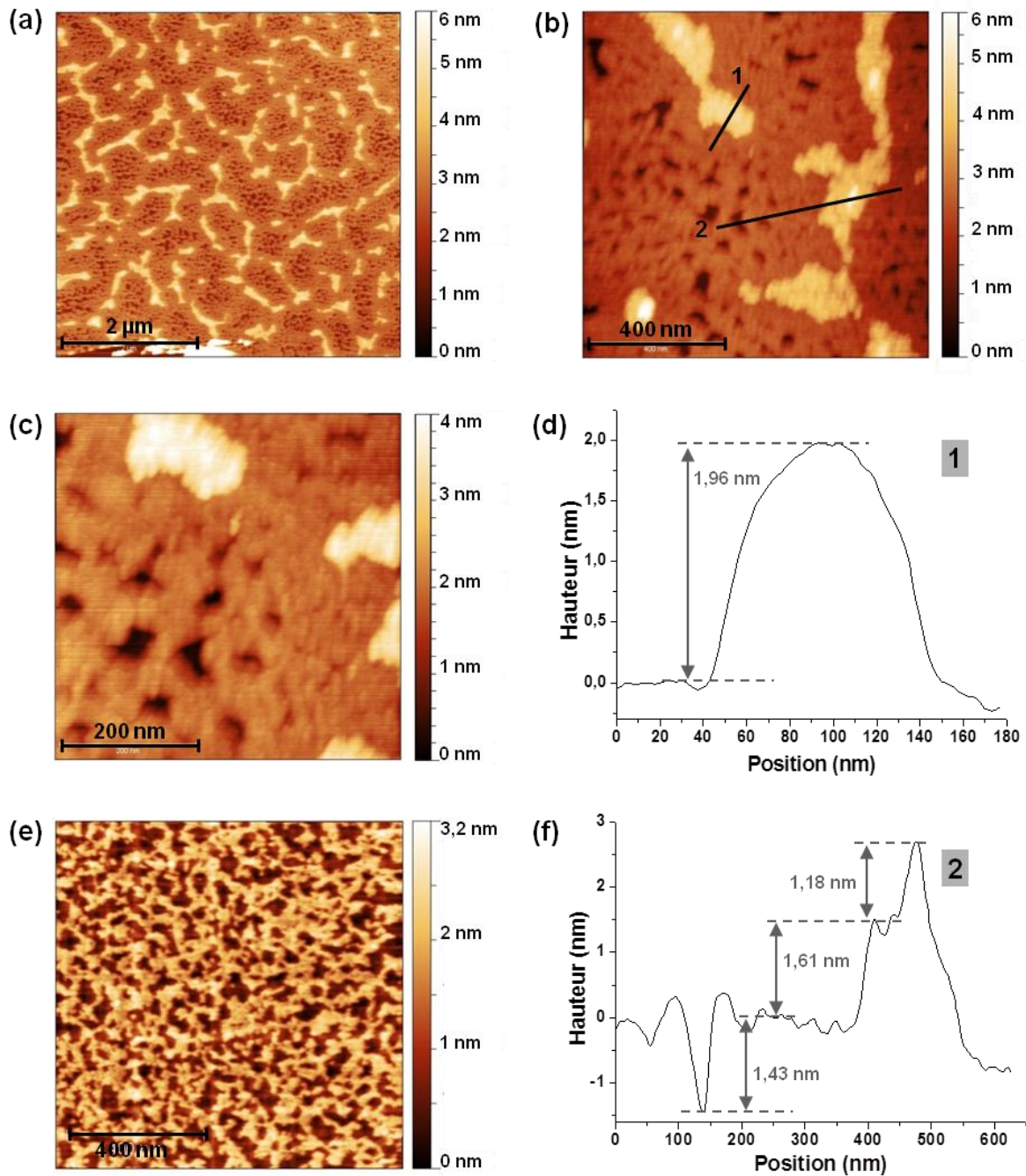


Figure III.6 Images AFM des lectines PA-IL déposées sur un substrat de mica à la concentration de $2,5 \mu\text{mol/L}$ puis séchées à l'étuve à 37°C pendant 1h. Taille des images : $5 \times 5 \mu\text{m}$ pour (a), $1 \times 1 \mu\text{m}$ pour (b) et (e) et $500 \times 500 \text{ nm}$ pour (c). Le profil caractéristique des structures de l'image (b) est représenté sur (d) et (f). Les valeurs de rugosité RMS pour les images (a), (b), (c) et (e) sont respectivement $1,03 \text{ nm}$, $0,76 \text{ nm}$, $0,55 \text{ nm}$ et $0,72 \text{ nm}$.

Cette formation en multicouche a déjà été observée dans le cas du séchage en dessiccateur, cependant la structuration des couches elles-mêmes diffère de ce que nous avons vu précédemment. On remarque que les couches sont inhomogènes avec par exemple, pour la troisième couche, une structure en "dentelle" (Figure III.6 (a)).

La couche secondaire se compose de structures filaires isolées non connectées d'une hauteur estimée à $1,86 \text{ nm} \pm 0,26 \text{ nm}$ (Figure III.6 (d)). Une image AFM de la structuration de

la couche supérieure est visible sur la Figure III.6 (e). Les lectines se regroupent donc en couche mais ne forment pas de structure particulière sur les images AFM. Aucune direction n'est mise en évidence dans l'arrangement.

En utilisant l'étuve, le temps de séchage de l'échantillon est beaucoup plus rapide. Il semble que la surface se sèche sans que les lectines n'aient le temps de s'auto-organiser, ce qui donne un arrangement plus dentelé, avec des couches incomplètes. L'interaction lectine/lectine existe mais l'auto-organisation des lectines en monocouches ordonnées nécessite du temps pour s'établir.

Cependant, la rapidité de ce mode de séchage semble moins endommager la structure tridimensionnelle des lectines. En effet, la hauteur mesurée de la couche secondaire est plus proche des valeurs théoriques que dans le cas d'un séchage en dessiccateur (on considère ici que dans les deux expériences AFM, l'action de la pointe sur les objets biologiques est la même, on ne la prend donc pas en compte pour expliquer la différence de hauteur).

Avec le dessiccateur, si on considère que l'échantillon n'est pas chauffé ou que les protéines ne subissent pas de choc thermique, l'action de séchage est plus "douce". Mais le temps appliqué étant plus long, les lectines sont plus susceptibles de se dégrader ou de se déstructurer.

Dans la suite de nos travaux, nous avons favorisé le séchage par dessiccateur avec des sels de silice afin que les lectines aient le temps de s'auto-organiser.

III.1.4 Influence de la présence des ions Ca^{2+}

Dans l'interaction entre des lectines et des glycoconjugués, il a été démontré que les ions calcium Ca^{2+} étaient souvent nécessaire à l'interaction [Murray 1988; Gour 2008]. Gour *et al.* montrent par AFM que l'arrangement entre la lectine Concanavalin A (ConA) et un composé mannose divalent, N,N'-di- α -D-mannopyranosylurea, prend la forme d'un réseau sur un substrat du mica en présence d'ions Ca^{2+} (Figure III.7 (b)). En l'absence de calcium, des objets de forme ovale apparaissent sur la surface (Figure III.7 (c)) sans pour autant être assimilés à des lectines ConA seules sur le mica (Figure III.7 (a)).

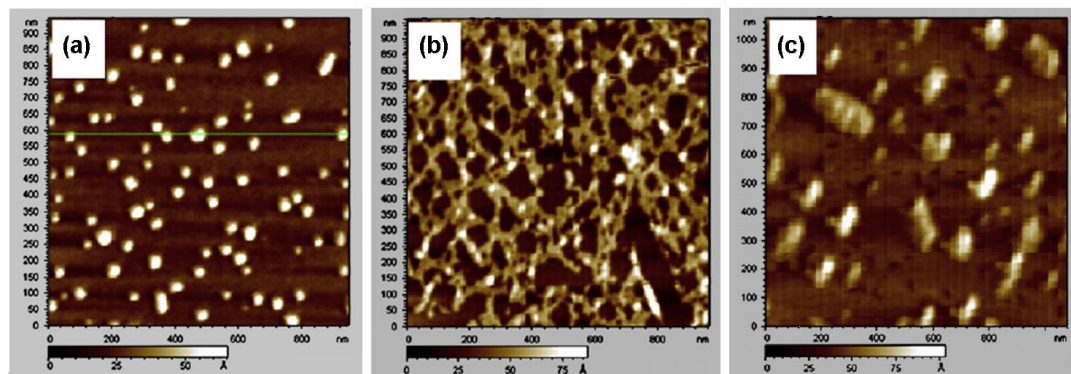


Figure III.7 Images AFM de (a) la lectine ConA seule, (b) de l'arrangement entre ConA et du N,N'-di- α -D-mannopyranosylurea en présence d'ions Ca^{2+} et (c) l'arrangement des mêmes composés sans Ca^{2+} [Gour 2008].

Sans calcium, l'interaction lectine/composé mannose reste donc limitée quant à l'organisation et à la structuration de l'arrangement. Les ions Ca^{2+} semblent aider à la croissance de l'arrangement en favorisant les interactions lectine/composé mannose.

Devant l'importance des ions calcium sur l'interaction lectine/glycoconjugué, on peut se demander s'ils agissent sur un objet biologique en particulier ou sur les deux. Nous nous sommes ainsi intéressés à l'influence du Ca^{2+} sur l'arrangement des lectines PA-IL.

Nous avons modifié notre protocole expérimental établi pour l'observation de lectines PA-IL à une concentration de 2,5 $\mu\text{mol/L}$ en remplaçant la quantité de solution de chlorure de calcium utilisée par de l'eau ultrapure (cf. III.1.2). Le dépôt de la solution sur le substrat et le séchage restent les mêmes. Nous avons indiqué précédemment que le CaCl_2 permettait de fixer les lectines à la surface sur mica. Nous considérons ici qu'avec le mode de séchage utilisé et la quantité de lectines déposées, les objets ont peu de chance dans ces conditions de se déplacer sur la surface sous l'action de la pointe. De plus, les images ont été réalisées avec une vitesse de balayage faible, autour de 0,5-0,6 Hz pour un rapport d'amplitude de 71 %.

La Figure III.8 fait état des images AFM obtenues en analysant la surface.

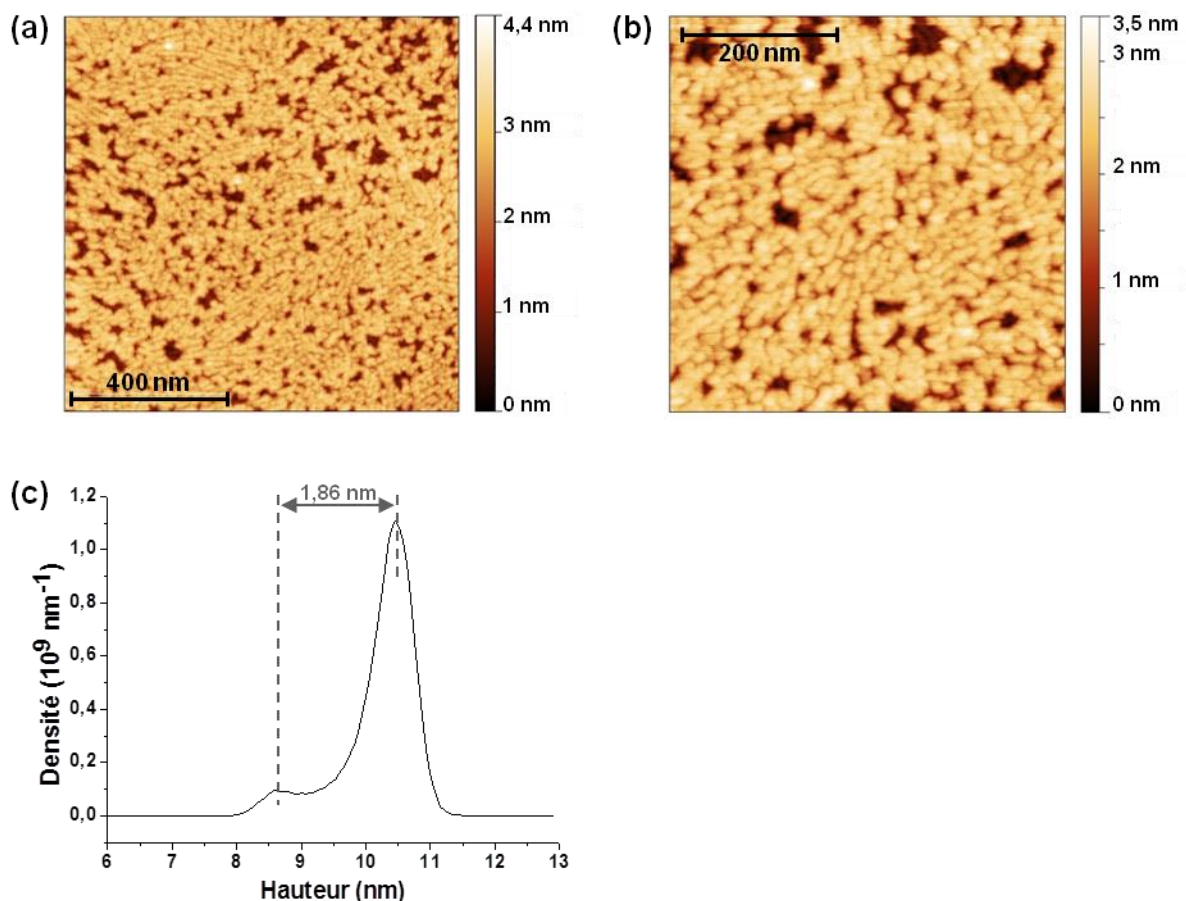


Figure III.8 Arrangement des lectines sur un substrat de mica à une concentration de 2,5 $\mu\text{mol/L}$ sans ajout de chlorure de calcium CaCl_2 . Les images AFM ont pour taille $1 \times 1 \mu\text{m}$ (a) et $500 \times 500 \text{ nm}$ (b). Les valeurs de RMS sont respectivement de 0,62 nm et 0,58 nm. (c) Graphe de la distribution de hauteur de (a).

Sur les images AFM, l'arrangement des lectines est tel que seule la couche superficielle est visible avec quelques trous par endroits. La distribution des hauteurs donne une hauteur caractéristique des lectines à 1,86 nm, ce qui correspond aux valeurs théoriques.

A l'intérieur de la couche, on observe un arrangement de bâtonnets juxtaposés les uns à côté des autres. Les lectines semblent donc s'être auto-organisées. Les lignes de sillon indiquent qu'on a un arrangement dans deux directions de l'espace avec des interactions longitudinales et latérales, comme nous avons vu précédemment. Toutefois, cette organisation n'est pas homogène sur la surface, des espaces existent entre les lectines. On n'a pas un arrangement aussi bien organisé que pour les lectines en présence de calcium (Figure III.3).

Kimura *et al.* ont noté que les ions Ca^{2+} avaient une influence sur l'interaction lectine/glycoconjugué mais pouvaient aussi maintenir la conformation de la lectine [Kimura 1995]. Ainsi le Ca^{2+} agit sur la lectine au niveau de sa structure. L'interaction lectine/lectine est renforcée. Sa présence, en plus d'opérer sur le site de liaison du glycoconjugué, semble aussi changer la chimie de surface de la lectine pour augmenter le nombre d'interaction lectine/lectine.

Pour conclure sur cette première partie, nous avons vu, en étude préliminaire, que le dépôt de chlorure de calcium, à des concentrations inférieures à 1 $\mu\text{mol/L}$ sur le substrat de mica, ne modifiait pas la topologie du mica. Il conserve sa planéité.

Nos observations de la lectine PA-IL de la bactérie *Pseudomonas aeruginosa* par microscopie à force atomique montrent qu'il existe des interactions lectine/lectine longitudinales et latérales qui structurent les lectines en fonction de leur concentration sur la surface. Cette structuration est renforcée par l'ajout d'ions Ca^{2+} dans la solution. Enfin, l'auto-organisation des lectines sur la surface demande un certain temps. Le séchage de l'échantillon dans un dessiccateur avec des sels de silice toute une nuit semble être la méthode appropriée à l'étude de ces arrangements moléculaires.

III.2 Arrangement lectine PA-IL/glycoconjugué au cœur en calix[4]arène

Pour notre étude sur l'arrangement des complexes formés par la lectine PA-IL et des glycoclusters, nous nous sommes intéressés, dans un premier temps, à un glycomimétique avec un cœur en calix[4]arène. Comme nous l'avons énoncé dans le chapitre 1 (cf. I.5.4), le composé tétravalent de conformation 1,3-alterné galactosylé, élaboré par Cecioni *et al.*, a attiré notre attention de part ses performances en terme d'affinité démontrées par les travaux de recherche sur l'élaboration de nouveaux glycoclusters mimétiques pour inhiber l'interaction lectine PA-IL/glycoconjugué des cellules-hôtes [Cecioni 2009]. La Figure III.9 rappelle la structure et la configuration de cette molécule.



Figure III.9 Schéma du sucre1.

Nommé **sucre1**, nous l'avons fait interagir avec la lectine PA-IL afin d'observer par microscopie à force atomique la structuration de leur complexe à la surface d'un substrat de mica. Dans une première série d'expériences, nous avons essayé de comprendre l'influence de la concentration du sucre sur la formation des complexes pour une forte concentration de lectine PA-IL. Les résultats obtenus nous amèneront ensuite à travailler à des valeurs de concentration plus faibles afin d'observer un arrangement sous forme de filaments.

III.2.1 Influence de la concentration en glycoconjugué

Suite à nos observations sur les lectines PA-IL à une concentration finale de 2,5 $\mu\text{mol/L}$ et à la mise en évidence d'une interaction lectine/lectine, nous avons choisi de faire

interagir en solution les lectines et le **sucré1** à cette forte concentration. La constante de dissociation étant estimée à 0,176 $\mu\text{mol/L}$ entre ces deux entités [Cecioni 2009], nous avons supposé qu'à de telles concentrations la formation des complexes primerait sur l'interaction lectine/lectine, nous permettant ainsi d'observer un grand nombre de structures formées sur la surface du substrat.

L'échantillon a donc été préparé à partir d'une solution contenant :

- 20 μL de CaCl_2 à 0,3 $\mu\text{mol/L}$;
- 10 μL d'une solution aqueuse de lectines PA-IL à 2,5 $\mu\text{mol/L}$;
- 10 μL d'une solution aqueuse de **sucré1** à 2,5 $\mu\text{mol/L}$.

Nous rappelons que ce sont les concentrations finales qui sont indiquées ici. Pour la lectine, nous parlons de concentration en tétramère.

La solution finale est laissée une heure à température ambiante pour permettre l'interaction entre les macromolécules. Une goutte de 20 μL de solution finale est déposée sur le substrat de mica fraîchement clivé. L'échantillon est séché toute une nuit dans un dessiccateur avec des sels de silice à température et pression ambiante. Les ions calcium favorisent à la fois l'interaction lectine/sucre et aident aussi à l'adsorption des biomolécules sur le substrat.

Les images AFM, données dans la Figure III.10, sont réalisées à l'air en mode contact intermittent avec un rapport d'amplitude de 50 %.

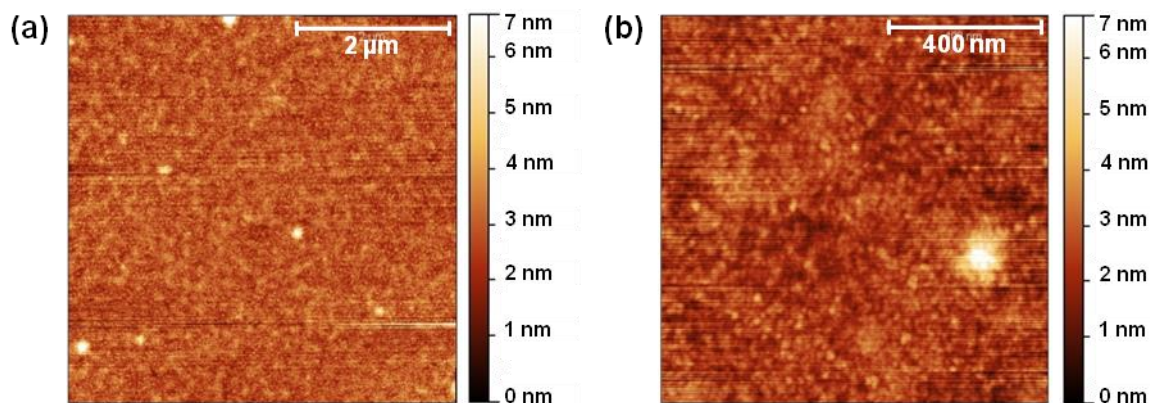


Figure III.10 Images AFM des complexes lectine PA-IL/**sucré1** pour une concentration de 2,5 $\mu\text{mol/L}$.
Taille des images : 5x5 μm (a) et 1x1 μm (b).

Les échantillons présentent une surface granuleuse sans objet isolé ou structure définissable avec une rugosité d'environ 0,7 nm (RMS). Pour une forte concentration (2,5 $\mu\text{mol/L}$) de lectines seules déposées sur un substrat de mica, nous avons remarqué un empilement de couches avec la présence d'interaction lectine/lectine qui les auto-organisent à l'intérieur même d'une couche (cf. III.1.2). Il semble ici que le sucre agisse sur l'organisation des couches superficielles puisque les images AFM typiques diffèrent de celles obtenues pour les lectines seules (plus d'organisation en multicouche à la surface). Cependant il est difficile de se prononcer sur l'arrangement, la structuration ou même la formation de complexes compte tenu de l'état de surface de l'échantillon. De même, on ne peut pas dire si l'interaction lectine/lectine est altérée.

Nous avons posé l'hypothèse que pour une forte concentration de lectine, le **sucre1** influence l'arrangement des lectines entre elles sans pour autant parvenir à inhiber l'interaction lectine/lectine. Pour vérifier cette supposition, nous avons réalisé plusieurs expériences en préparant des échantillons avec différents rapports de concentration sucre/lectine. La concentration de lectine reste fixe à 2,5 $\mu\text{mol/L}$ et la quantité de **sucre1** dans la solution évolue de 125 pmol/L à 2,5 nmol/L en concentration finale. Ainsi nous pouvons observer l'évolution de l'arrangement des lectines en fonction de la concentration en sucre. Nous rappelons que la quantité de lectines déposées est telle qu'elles recouvrent le substrat sur une hauteur d'environ 13 couches. Nos observations par AFM concernent donc seulement les couches superficielles.

Nous avons travaillé à quatre rapports de concentration sucre/lectine différents : 1/1000, 1/5000, 1/10000, 1/20000. Dans le cas 1/1000, par exemple, on a 1 sucre pour 1000 lectines. Les ratios correspondent respectivement à une concentration en **sucre1** de 2,5 nmol/L, 500 pmol/L, 250 pmol/L et 125 pmol/L. Le protocole expérimental est similaire à celui décrit précédemment, seule la concentration en sucre change suivant le rapport de concentration sucre/lectine souhaité.

Les images AFM obtenues pour les différents rapports sucre/lectine sont présentées sur la Figure III.11. Les observations ont été réalisées à l'air en mode contact intermittent avec des rapports d'amplitude supérieur à 50 %. La taille des images est de 5 μm de côté. La distribution des hauteurs de chaque image est tracée également.

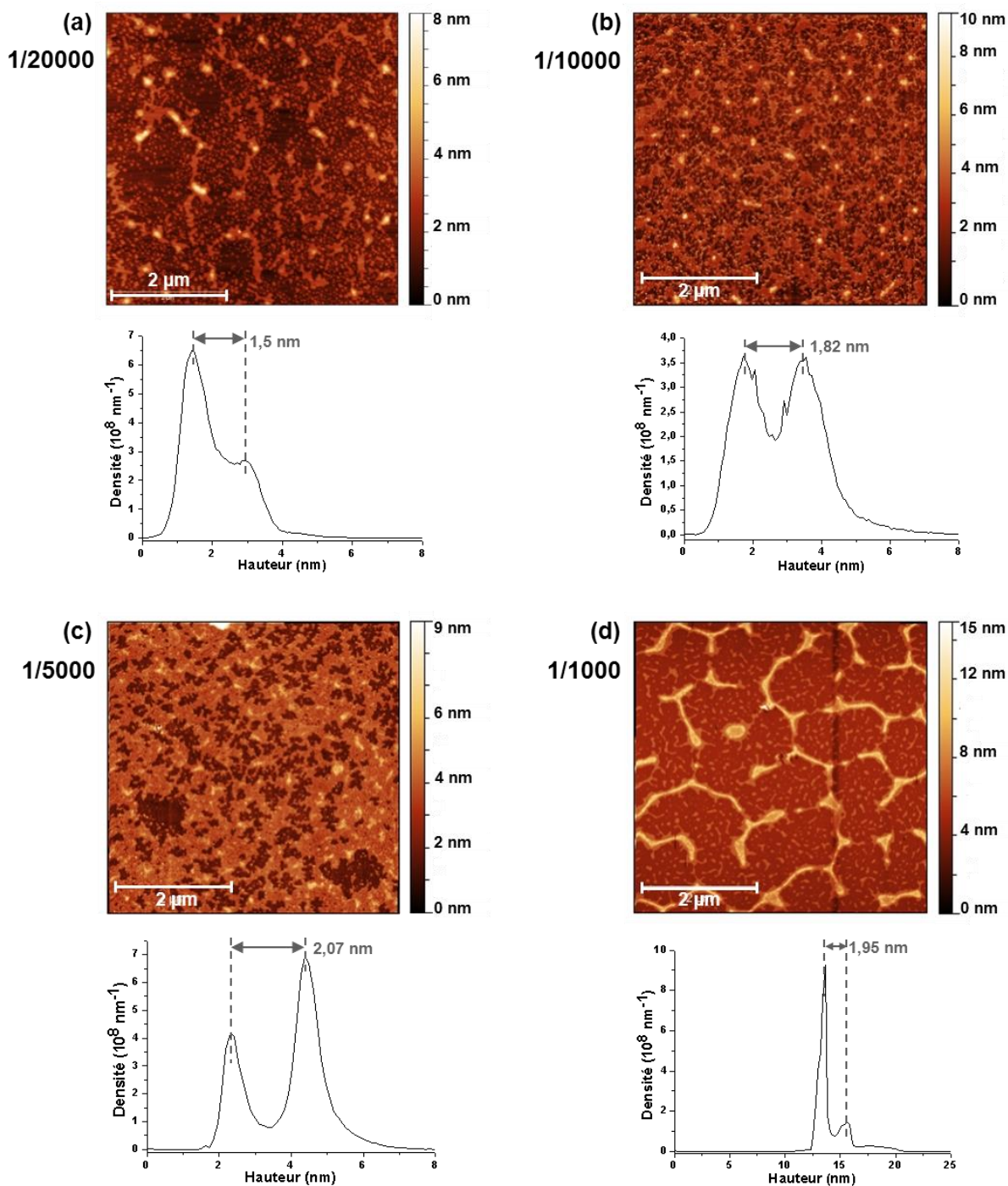


Figure III.11 Images AFM après le dépôt de solution contenant des lectines PA-IL et le **sucré1** avec des rapports de concentration sucre/lectine de 1/20000 (a), 1/10000 (b), 1/5000 (c) et 1/1000 (d). Pour chaque image, la distribution des hauteurs est tracée. Taille des images de 5 μm de côté.

Pour une faible quantité de **sucré1** dans la solution de lectines (1/20000), on remarque sur la surface de l'échantillon des objets, plus ou moins sphériques, de petites tailles et isolés qui tendent à se rassembler en structure filaire polymorphe (Figure III.11 (a)). La distribution des hauteurs montre que ces petits objets ne sont pas majoritaires sur la surface et ont une hauteur de l'ordre de 1,5 nm. Au centre de ces structures agrégées, on trouve des objets plus élevés (bosse après le second pic sur le graphe de la distribution des hauteurs). La

structuration de la surface est complètement différente de celle observée pour des lectines seules alors que la proportion de sucre ajouté est relativement faible, un sucre pour 20000 lectines. Compte tenu de la taille des petits objets sur la surface et de la quantité de lectines déposées, on peut supposer que ce sont des lectines agrégées entre elles.

Pour un rapport de 1/10000, on a l'apparition d'une couche sur la surface qui forme un réseau en dendrite. La couche occupe quasiment la moitié de la surface (cf. distribution des hauteurs) avec une hauteur de 1,8 nm. On remarque la présence de structures plus élevées sur la surface mais leur proportion est inférieure à celle observée pour le ratio 1/20000. Il semble que la présence de sucre favorise, à ce ratio 1/10000, l'arrangement latéral plutôt que vertical des lectines. On observe l'apparition de petits îlots dendrimériques reliés entre eux par des structures filaires 1D. On retrouve une même tendance pour le ratio de 1/5000, la couche de lectines se densifie, les espaces entre les îlots diminuent et la hauteur augmente à 2,1 nm. La couche inférieure n'est presque plus visible.

Pour un rapport de concentration de 1/1000, la surface change complètement. On observe de petits objets d'une hauteur de 1,9 nm qui semblent correspondre à un assemblage de lectines. Des structures filaires de hauteur plus importante sont aussi présentes.

Dans la littérature, Nagahori *et al.* ont montré que l'adsorption de complexes protéiques spécifiques du mannose (MBP-GalT) sur des films Langmuir-Blodgett dépendaient de la composition de ces films en glycolipides. La surface des échantillons après adsorption des protéines a été imagée par AFM pour différentes compositions du film en glycolipides et présentent des structures similaires à nos résultats (couche superficielle non complète en réseau ou dendrite) (Figure III.12). La structuration de la surface est ici dépendante de la nature du substrat.

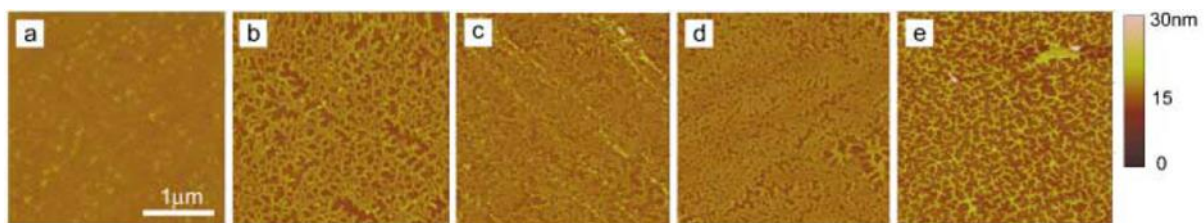


Figure III.12 Images AFM de l'immobilisation d'une protéine spécifique du mannose (MBP-GalT) sur un film Langmuir-Blodgett de glycolipides. La densité de glycolipides est de 0 % (a), 5 % (b), 10% (c), 20% (d) et 100 % (e) [Nagahori 2003].

Dans notre cas, le mica ne peut pas influencer les couches superficielles de nos échantillons compte tenu de la quantité déposée. Le **sucre1** et sa quantité dans la solution avec les lectines semblent donc être à l'origine de cette réorganisation surfacique. On peut constater une évolution dans la réorganisation de la couche comme si, avec l'augmentation de la quantité de sucre, la couche supérieure des lectines se complétait.

Nous avons interprété cette réorganisation surfacique de la façon suivante : pour prendre le cas du rapport 1/20000, on peut dire qu'au maximum un sucre peut interagir avec 4 lectines puisqu'il est tétravalent. Il reste donc 19996 lectines qui vont interagir entre elles et s'auto-organiser latéralement et longitudinalement dans un premier temps puis en hauteur si l'espace manque (présence de différentes hauteurs sur la surface). Lors de cette

structuration des lectines, certaines peuvent se lier aux lectines du complexe formé avec le sucre. Ainsi l'organisation surfacique va différer quelque peu par rapport à une structuration sans sucre.

Plus le ratio sucre/lectine augmente, plus le nombre de complexes formés augmente et de ce fait, l'arrangement surfacique évolue.

L'interaction lectine/lectine n'est pas inhibée pour autant. Pour les ratios 1/5000 et 1/10000, on remarque une organisation latérale et longitudinale des lectines sur les images AFM présentées sur la Figure III.13 comme nous l'avons mis en évidence dans la première partie de ce chapitre (III.1.2).

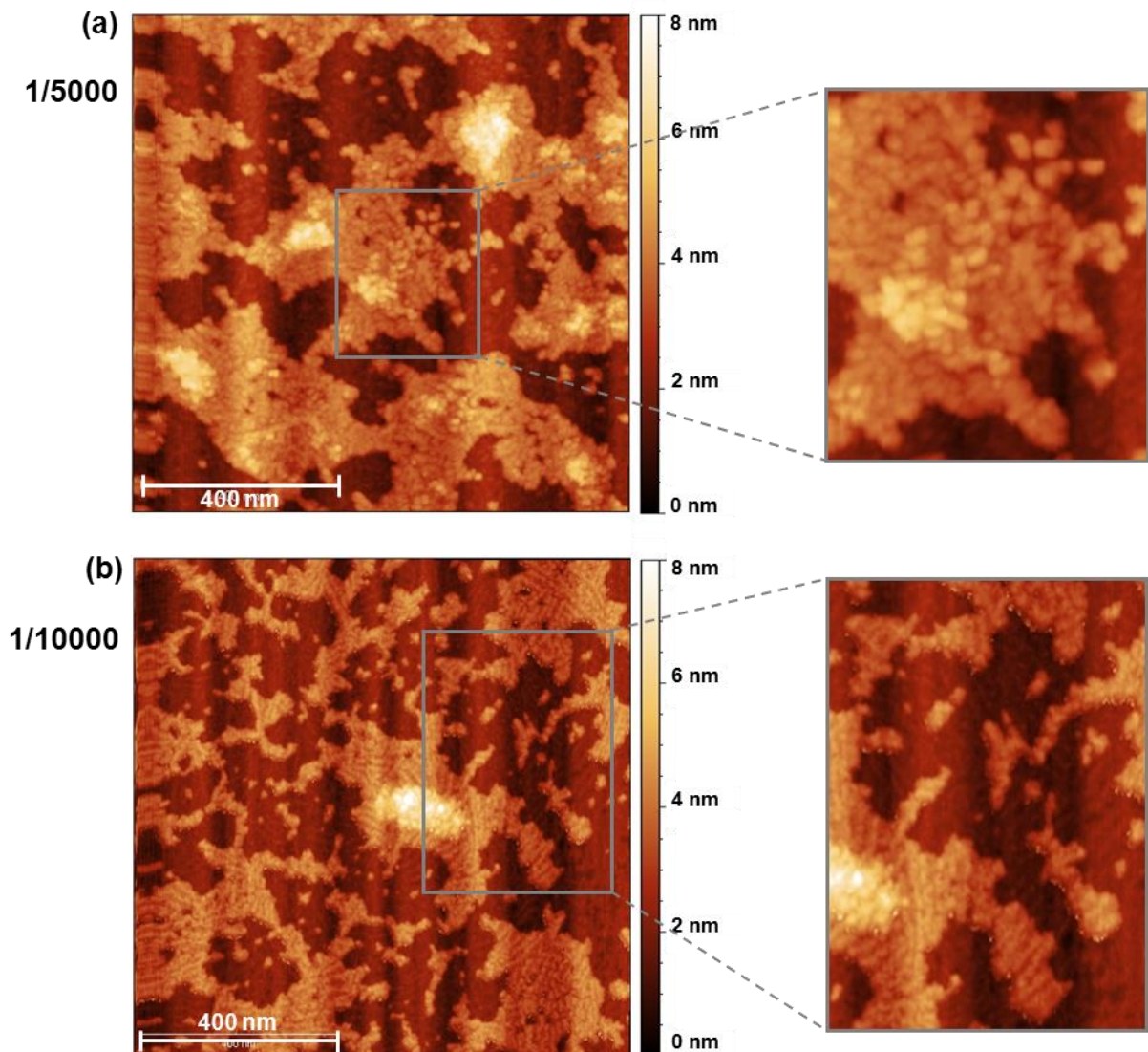


Figure III.13 Images AFM de 1 µm de côté montrant pour des rapports 1/5000 (a) et 1/10000 (b) la structuration des lectines à l'intérieur de la couche supérieure.

Dans le cas du rapport 1/1 (Figure III.10), il semble qu'il y ait trop de sucre pour que nous puissions voir l'interaction lectine/lectine et trop de lectines pour distinguer des complexes lectine/sucre¹.

En conclusion sur ces expériences, il nous est apparu que, pour une forte concentration de lectine, la présence du **sucre1**, même en faible proportion, influençait leur organisation sans inhiber pour autant l'interaction lectine/lectine. La quantité de protéine utilisée nous empêche cependant d'observer les complexes lectine/**sucre1**. Nous allons donc revoir le protocole expérimental au niveau de la concentration en lectine et en sucre afin d'étudier plus en détail la formation des complexes.

III.2.2 Arrangement en filament

Pour pouvoir comprendre comment interagissent la lectine PA-IL et le **sucre1** et quel est l'arrangement de leur complexe, nous avons diminué fortement leur concentration pour arriver à une valeur de 25 pmol/L en concentration finale. Nous avons estimé que dans ce cas nous serions affranchis de l'interaction lectine/lectine afin d'observer uniquement l'interaction lectine/sucre.

En reprenant le protocole expérimental établi dans le paragraphe précédent (III.2.1), la solution de complexes est préparée à partir de :

- 20 μL de CaCl_2 à 0,3 $\mu\text{mol/L}$;
- 10 μL d'une solution aqueuse de lectines PA-IL à 25 pmol/L ;
- 10 μL d'une solution aqueuse de **sucre1** à 25 pmol/L.

La solution est incubée une heure à température ambiante. 20 μL de solution finale sont déposées sur une surface de mica fraîchement clivée. L'échantillon est séché toute une nuit dans un dessiccateur à température et pression ambiante. L'analyse AFM de la surface de l'échantillon est réalisée à l'air en mode contact intermittent avec un rapport d'amplitude de travail sur l'amplitude libre compris entre 56 et 76 %.

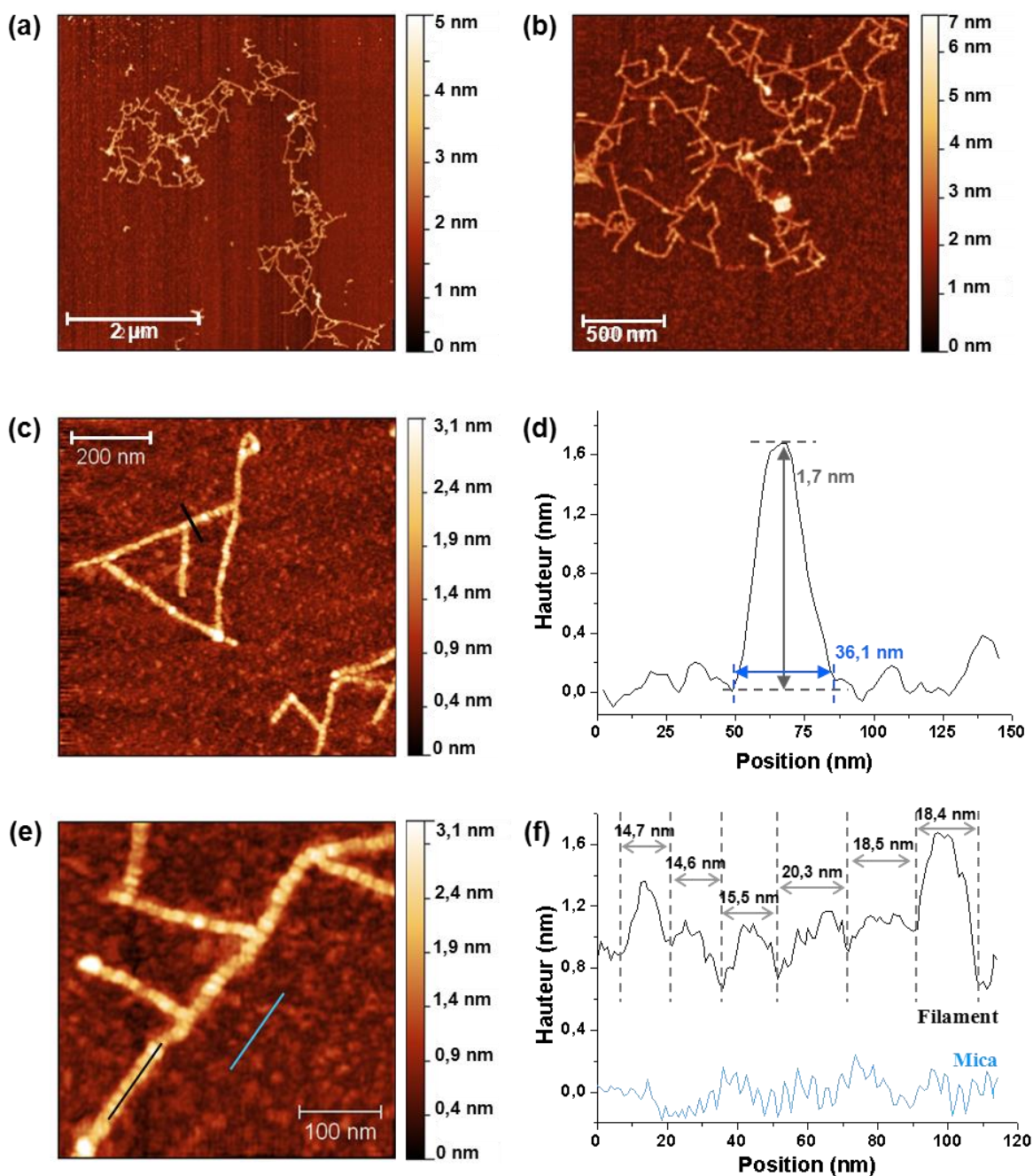


Figure III.14 (a), (b), (c) et (e) Images AFM des complexes lectine PA-IL/**sucre1** en filament sur un substrat de mica avec une taille d'image de 5x5 μm , 2x2 μm , 850x850 nm et 400x400 nm respectivement. (d) Profil de l'image (d). (f) Profil du filament (trait noir) et de la surface du mica (trait bleu) mesurés sur (e).

La Figure III.14 montre que les complexes lectine PA-IL/**sucre1** s'organisent sous forme de filaments sur le mica. Les fils sont des segments linéaires avec des bifurcations et des points de branchement. La longueur des filaments varie entre 45 et 505 nm (Figure III.15 (a)). Leur hauteur est estimée à $1,7 \text{ nm} \pm 0,5 \text{ nm}$ (Figure III.14 (d)), proche de l'épaisseur théorique de la lectine établie à 1,9 nm. Cependant, la largeur des structures filaires, mesurée à $36,4 \text{ nm} \pm 8,5 \text{ nm}$ (Figure III.14 (d)), est 5 à 10 fois supérieure aux dimensions théoriques de PA-IL. On distingue de plus à l'intérieur même des filaments des structures parallélépipédiques (Figure III.14 (e)).

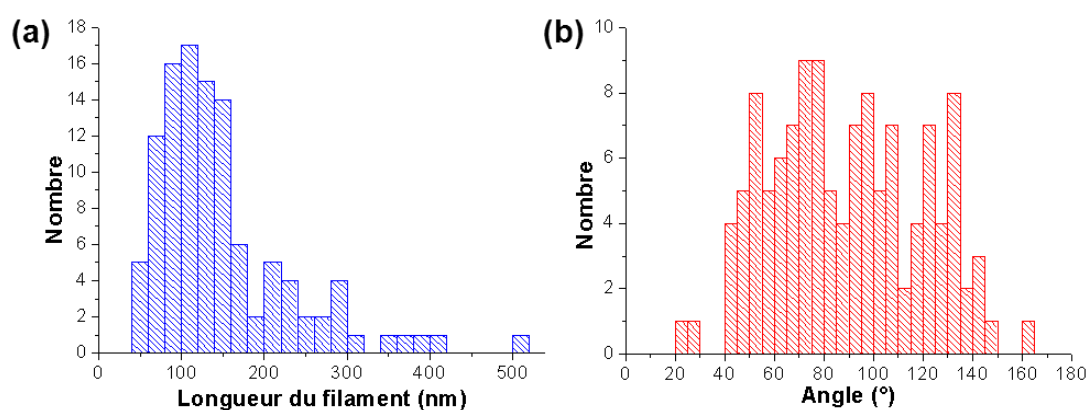


Figure III.15 Statistique des valeurs des longueurs des filaments et des angles de bifurcation mesurés sur la **Figure III.14**.

On remarque que les filaments ne sont pas disposés dans une orientation particulière. Une statistique sur la valeur des angles des bifurcations a, de plus, été réalisée pour écarter une influence de la structure hexagonale du mica sur l'orientation des filaments. D'après la **Figure III.15 (b)**, aucun angle de bifurcation ne semble prédominer. De plus, la formation des complexes a lieu en solution avant le dépôt sur le substrat, le mica ne peut donc pas influencer les points de branchement.

Il semble que les filaments ne se soient pas déposés les uns à côté des autres mais qu'ils soient liés entre eux. Les expériences d'ITC effectuées par Cecioni *et al.* donnent une valeur de stœchiométrie n de 0,24 pour l'interaction entre la lectine PA-IL et le **sucre1** (composé **29**) (cf. I.5.4) [Cecioni 2009]. Cela indique que le glycocluster interagit avec quatre monomères de lectine. Tous les galactoses du **sucre1** sont donc liés à un monomère. Plusieurs modes d'association sont possibles (**Figure III.16**) [Cecioni 2009].

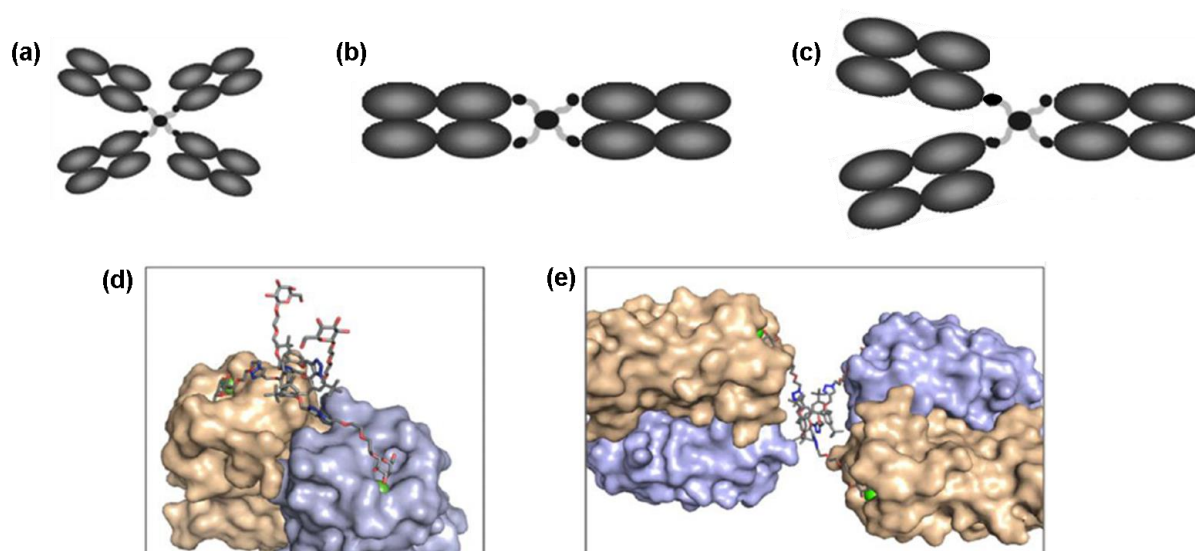


Figure III.16 Associations moléculaires possibles en agrégation (a), en chélate agrégatif (b) et liaison simple et liaison en chélate (c). Modélisation moléculaire des complexes lectine PA-IL/**sucre1** en chélate (d) et chélate agrégatif (e) (d'après [Cecioni 2009]).

La première association, en agrégation, présente une interaction du glycocluster avec quatre monomères, régit par des liaisons intermoléculaires (Figure III.16 (a)). D'un point de vue énergétique, ce type d'association est peu stable. De plus, la proximité des lectines augmente la probabilité d'interaction lectine/lectine et donc de formation d'agrégats. Il ne semble donc pas que cet arrangement corresponde à la structure en filament que nous observons.

Par modélisation sous Sybyl, Cecioni *et al.* ont montré que le **sucre1** pouvait se lier en même temps à deux sites de liaison de la lectine sur un même côté pour former un arrangement dit "chélate" (Figure III.16 (d)) [Cecioni 2009]. Sans qu'il y ait de conflit stérique, une seconde lectine peut se fixer aux deux autres galactoses encore libre. Une association en chélate agrégatif est alors possible (Figure III.16 (b) et Figure III.16 (e)). Si ce type d'association se prolonge, une structure filaire peut se former, ce qui semble être les filaments que nous observons sur les images AFM.

Enfin, en considérant toujours une association en chélate entre le glycocluster et la lectine sur un côté, il est possible d'avoir de l'autre côté du glycocluster un défaut dans la "double liaison". Ainsi, deux lectines peuvent se lier aux deux galactoses. Il apparaît alors un point de branchement à l'origine des bifurcations dans les filaments. Ce type d'association a toutefois une probabilité plus faible de se produire à cause de l'encombrement stérique entre les deux lectines. Cela expliquerait pourquoi l'arrangement des complexes PA-IL/**sucre1** soit sous forme de filaments avec par endroit des bifurcations.

Un modèle moléculaire du filament a été réalisé sous Sybyl en considérant la longueur et la flexibilité des bras espaceurs (Figure III.17) (collaboration avec Dr A. Imberty). Le résultat montre un arrangement filaire de lectines PA-IL et de **sucre1** avec un point de branchement et une bifurcation. Dans ce modèle, il a été pris en compte le fait que les lectines ne devraient pas subir d'encombrement stérique au point de bifurcation.

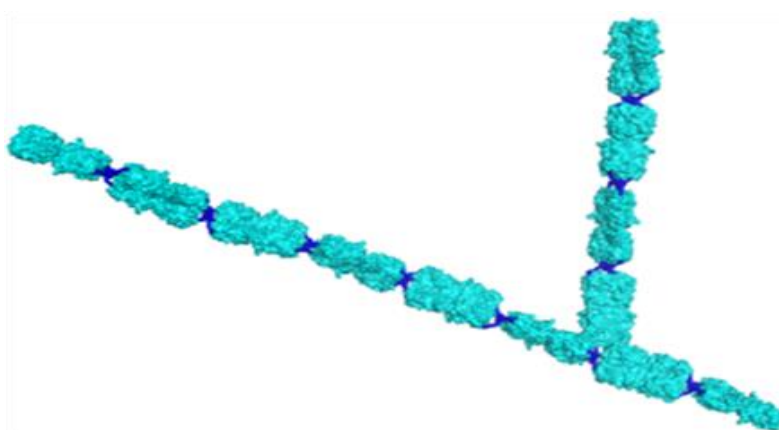


Figure III.17 Modélisation moléculaire sous Sybyl de l'arrangement en filament avec une bifurcation des complexes PA-IL/**sucre1**. Les lectines sont en bleu cyan alors que les glycoclusters sont de couleur bleu foncé.

Sur la Figure III.14 (e), on remarque que le filament est composé de petites structures rectangulaires que l'on peut identifier comme des lectines. La résolution de notre image est

telle que l'on peut différencier ces lectines les unes des autres. Le glycoconjugué, cependant, n'est pas observable. La taille moyenne des lectines sur l'image AFM est de $28 \text{ nm} \pm 7,7 \text{ nm}$ en latéral et de $17 \text{ nm} \pm 3,3 \text{ nm}$ dans la direction du filament. Ces dimensions sont très grandes par rapport à la taille réelle des lectines même en ajoutant les dimensions du **sucre1** : plus de 8 fois en largeur (sans sucre) et 1,5 à 2,4 fois en longueur si on prend ou pas en compte le glycocluster. Cet étirement est interprété par une action conjuguée de l'adsorption des filaments sur la surface, du séchage de l'échantillon et de la convolution de la pointe. Lors de l'adsorption des objets biologiques sur le substrat, ils ont tendance à s'étaler pour améliorer l'accroche [Waner 1998]. L'étalement de la lectine le long du filament est cependant limité par la proximité des autres lectines contrairement à l'étalement latéral [Davies 2005]. Ce phénomène peut expliquer la forme rectangulaire des lectines sur l'image.

On constate que les lectines n'ont pas toutes la même hauteur (ou le même contraste). La Figure III.14 (f) présente un profil de hauteur de six lectines pris sur un filament. Une différence de 0,6 nm de hauteur existe entre ces lectines. Cette différence de hauteur semble être causée par la géométrie du **sucre1**. En effet, la conformation 1,3-alterné du glycocluster implique que les quatre bras espaceurs et les galactoses associés ne sont pas dans le même plan. Les deux épitopes dans le lower-rim sont dans le plan horizontal alors que les deux du upper-rim sont dans le plan vertical. Ainsi pour se lier au sucre, la lectine doit pivoter pour que son site de fixation soit dans la même orientation que les galactoses. Dans le cas d'association en chélate agrégatif, d'un côté du glycocluster, la lectine va être dans le plan horizontal (la surface aux dimensions les plus larges en contact avec le substrat) alors que de l'autre côté, la lectine va être posée sur le côté. La Figure III.18 donne deux modèles, l'un purement géométrique (Figure III.18 (b)), l'autre réalisé sous Sybyl (Figure III.18 (a)) montrant le pivotement de la lectine pour se lier au **sucre1**. A chaque lectine sur le filament, on a un basculement à 90° de l'orientation de la lectine. Les images AFM ne nous permettent toutefois pas d'affirmer que l'écart de hauteur est seulement du de l'alternance de la position des lectines. Cette alternance correspond à une différence de hauteur de 0,6 nm alors que la rugosité du substrat peut atteindre par endroit 0,4 nm.

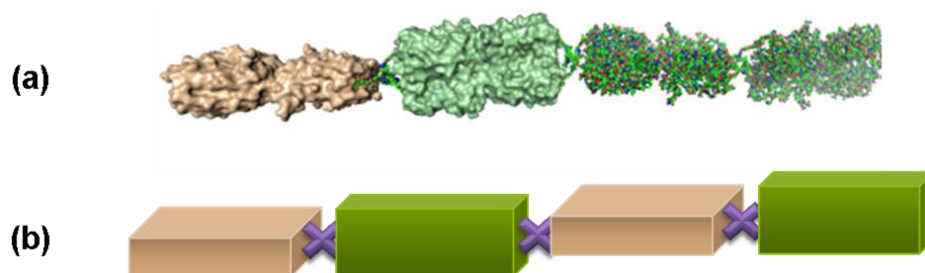


Figure III.18 Modélisation moléculaire par Sybyl (a) et géométrique (b) du pivotement de la lectine PA-IL pour se lier au **sucre1** à cause de la conformation en 1,3-alterné.

Par comparaison avec les travaux de Lameignere *et al.* et Gour *et al.*, nos conditions expérimentales nous permettent d'observer des filaments isolés formés par les complexes lectine/**sucre1** [Lameignere 2010 ; Gour 2008]. La concentration des lectines est telle que le rapport d'occupation de la "surface totale des lectines" sur la "surface totale du substrat de mica" est très faible, de l'ordre de 0,000137, soit environ 6 lectines par μm^2 . Même si les filaments semblent sur les images se regrouper, ils restent difficiles à localiser sur la surface.

Sacchettini *et al.* ont étudié par cristallographie aux rayons X l'arrangement de complexes formés par des lectines et des glycoconjugués multivalents [Sacchettini 2001]. Dans le cas où les deux entités biologiques sont bivalentes, ils ont défini que l'arrangement du complexe, dit de "type 1", était de forme filaire avec un fort degré de polymorphisme à cause de sa flexibilité (Figure III.19).

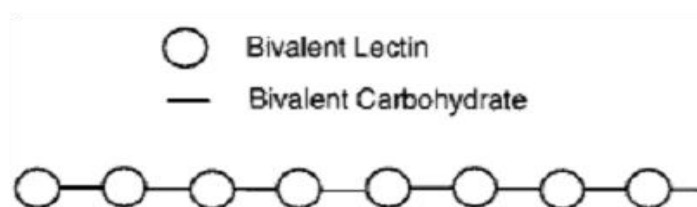


Figure III.19 Schéma de la structure filaire de complexes de "type 1" pour des lectines et des carbohydrates bivalents [Sacchettini 2001].

Dans notre cas, on observe aussi un arrangement filaire. Cependant la tétravalence de nos biomolécules et leur association en chélate agrégatif (sauf pour les points de branchement) amènent à des "doubles liaisons" dans la structure. La rigidité de l'ensemble filaire est alors assurée avec des structures rectilignes.

La lectine PA-IL étant spécifique au galactose, des expériences de témoin négatif ont été réalisées avec un glycocluster tétravalent mannosylé. Le cœur de la molécule, de même que sa conformation et les bras espaceurs restent inchangés. Dans les mêmes conditions expérimentales, l'analyse de l'échantillon par AFM n'a révélé aucune structure sur la surface.

Les résultats obtenus sur l'arrangement en filament des complexes lectine PA-IL/**sucre1** ont fait l'objet d'un article dans la revue *Chemical Communications* [Sicard 2011].

Pour conclure sur cette étude avec le **sucre1**, la concentration en sucre et en lectine a une forte influence sur l'arrangement des complexes et leur visualisation par AFM. Pour de forte concentration, nous avons mis en évidence que le sucre influençait, même en faible quantité, l'organisation superficielle des lectines sur le substrat de mica. A de faible concentration, la lectine PA-IL et le **sucre1** s'associent en chélate agrégatif pour former des complexes filaires.

III.3 Arrangement avec d'autres glycoclusters

L'affinité entre une lectine et un glycocluster dépend de la structure de cœur du sucre et de la nature des bras espaceurs [Cecioni 2012]. On peut donc considérer que l'arrangement des complexes est aussi influencé par ces deux paramètres. Après les résultats obtenus pour l'arrangement des complexes lectine PA-IL/**sucre1**, nous avons souhaité étudier l'arrangement de la lectine avec deux autres glycoclusters de cœur et de bras espaceurs différents afin de les comparer. Nous avons choisi un sucre avec un cœur en porphyrine et des bras espaceurs flexibles (**sucre2**) et un autre avec un cœur en mannose et des bras rigides (**sucre3**). Dans cette partie, nous présenterons les résultats obtenus pour ces deux sucres et les comparerons ensuite avec ceux du **sucre1**. La valence des glycoclusters est aussi un

paramètre important dans l'affinité avec la lectine. Cependant ce paramètre ne sera pas pris en compte dans cette étude. Toutes nos molécules sont tétravalentes.

III.3.1 Etude avec le glycocluster au cœur en porphyrine : **sucre2**

Le **sucre 2**, que nous avons présenté dans le chapitre 1 (cf. I.5.4), a donc un cœur en porphyrine avec quatre bras espaceurs de type triéthylèneglycol EG₃ donnant de la flexibilité à la molécule [Cecioni 2011a]. On trouve à l'extrémité de chaque bras un galactose pour la reconnaissance avec la lectine PA-IL. La structure moléculaire est représentée sur la Figure III.20. Le cœur donne une géométrie plane au sucre. L'affinité avec la lectine PA-IL a été évaluée par ITC et donne une valeur de K_d de 0,33 $\mu\text{mol/L}$.

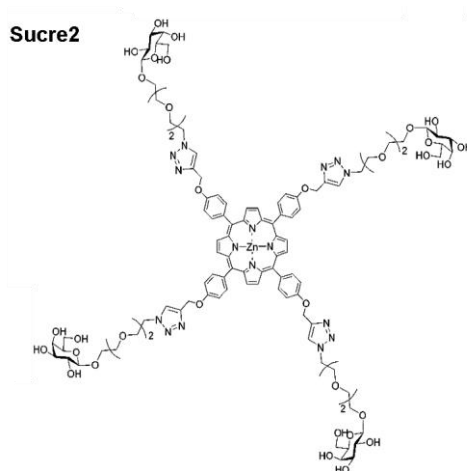


Figure III.20 Schéma moléculaire du **sucre2** [Cecioni 2011a].

Pour pouvoir comparer l'arrangement des complexes avec ceux du **sucre1**, nous avons appliqué le même protocole expérimental avec une concentration finale pour le sucre et la lectine de 25 $\mu\text{mol/L}$ (cf. III.2.2). Les images AFM des complexes formés sont présentées sur la Figure III.21 pour un rapport d'amplitude d'environ 65 %.

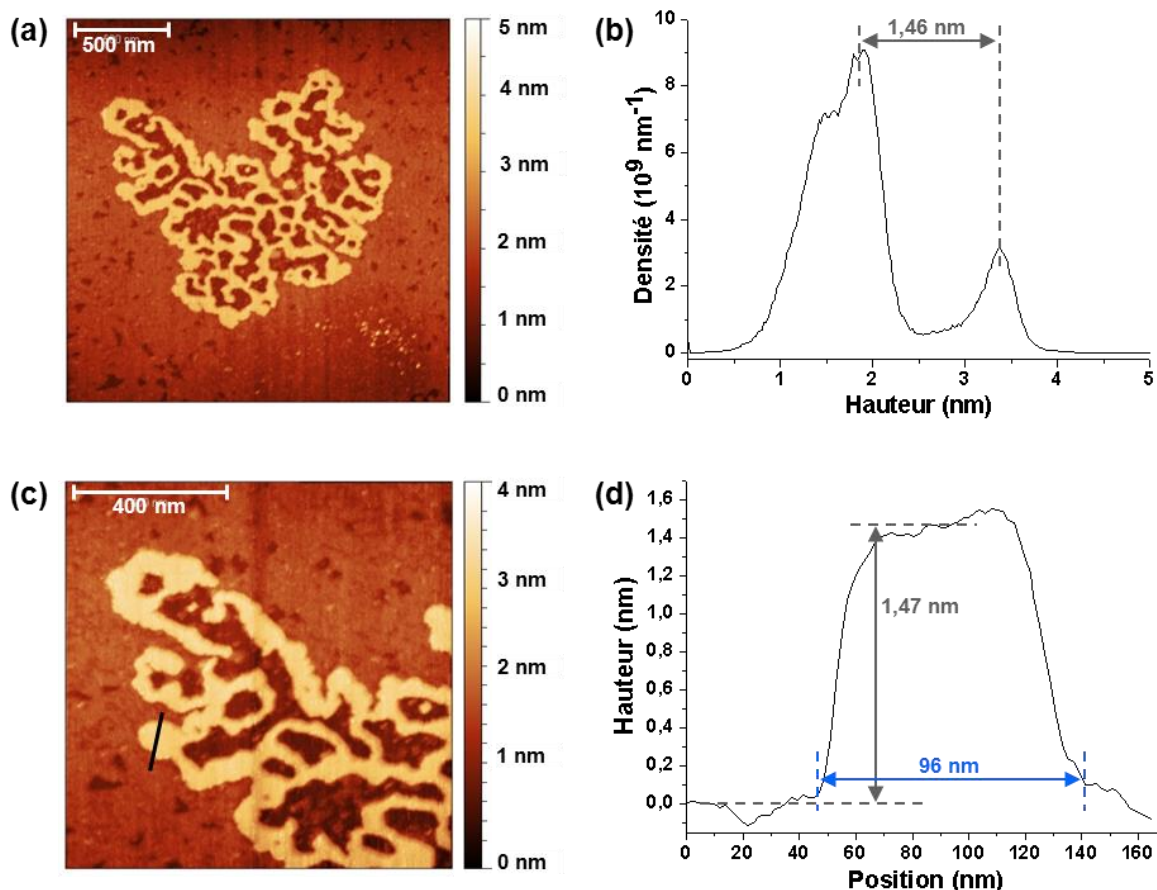


Figure III.21 Complexes lectine PA-IL/**sucrose2** imagés par AFM. (a) et (c) sont les images de topographies de $2 \times 2 \mu\text{m}$ et $1 \times 1 \mu\text{m}$ de côté respectivement. La distribution de hauteur de (a) est tracée sur (b). Le profil de hauteur relatif au trait noir de (c) est présenté sur (d).

Typiquement, les complexes forment de larges structures dentelées comme celles de la Figure III.21 (a). Sur le graphique de la distribution des hauteurs de la Figure III.21 (a), il apparaît un large pic autour de 1,85 nm représentant le substrat de mica (Figure III.21 (b)). Son extrémité est découpée (décrochement sur la gauche du pic) montrant des irrégularités sur la surface du substrat que l'on peut remarquer sur l'image AFM. Le second pic, plus petit, à 1,46 nm du premier, renseigne sur la hauteur des complexes adsorbés sur la surface. Le profil de hauteur de la Figure III.21 (d) confirme cette hauteur moyenne mesurée à $1,4 \text{ nm} \pm 0,21 \text{ nm}$. Ici la structure s'étale de 1,46 μm en longueur sur une largeur de 1,36 μm (Figure III.21 (a)). Elle est constituée de branches sinueuses qui se rejoignent pour former des fils plus larges. Les embranchements sont plus larges et arrondis. La largeur des branches de l'arrangement varie entre 40 et 125 nm (Figure III.22).

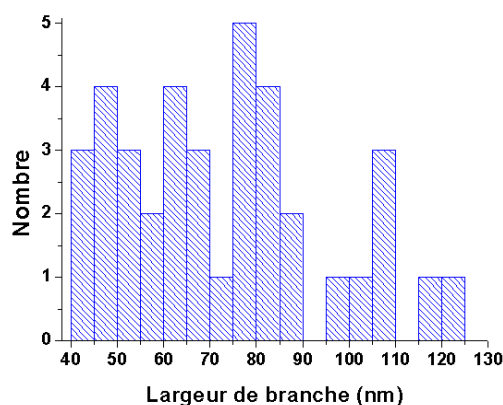


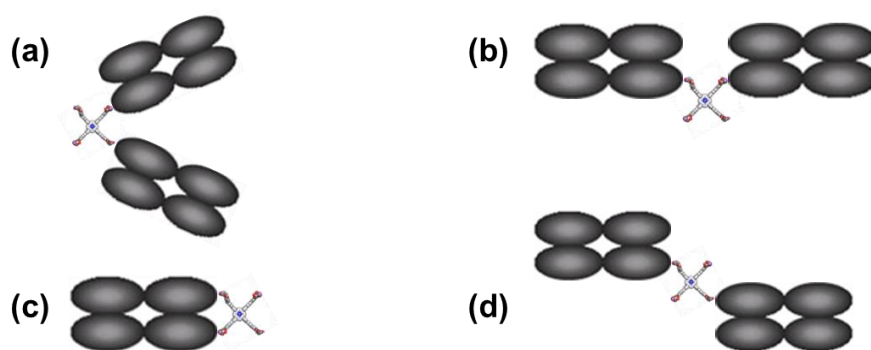
Figure III.22 Statistique des largeurs des branches de l'arrangement dentelée des complexes lectine PA-IL/sucre2.

A la surface des complexes, on ne distingue ni sillon ou ni changement de topographie qui indiquerait une délimitation des lectines dans la structure. Le pic représentant les complexes sur le graphique de la distribution des hauteurs est d'ailleurs unique et fin (Figure III.21 (b)) ce qui montre qu'il n'y a pas de variation significative dans la hauteur des complexes. Seul, quelques sites de branchement présentent des "points sombres" en leur centre indiquant que le substrat est visible dans la structure. Ces points pourraient constituer des carrefours (rond point) autour desquels les branches se connectent entre elles. On remarque aussi, entre les branches de la structure, quelques lectines isolées.

Les tests d'ITC donnent une valeur de stœchiométrie n de 0,46 pour l'interaction lectine PA-IL/sucre2 [Cecioni 2011a]. Dam *et al.* ont montré que pour une valeur de stœchiométrie n de 0,40 comprise entre 0,5 et 0,33 pour une lectine tétravalente et un glycoconjugué multivalent, plus de la moitié des liaisons étaient trivalentes et moins de la moitié étaient bivalentes [Dam 2000]. En tenant compte de cette étude, nous avons schématisé toutes les associations possibles dans le cas de $n = 0,5$ et $n = 0,33$ (Figure III.23). On considère que les bras du glycluster sont assez flexibles pour se lier à deux monomères sur un même côté de la lectine.

Pour $n = 0,5$

1 glycocluster pour 2 monomères



Pour $n = 0,33$

1 glycocluster pour 3 monomères

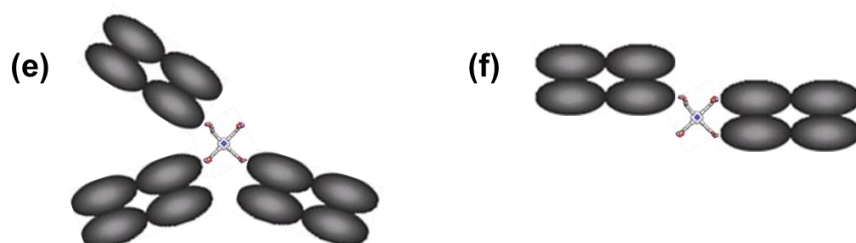


Figure III.23 Schéma des associations lectine PA-IL/sucre2 possibles pour une valeur de stœchiométrie de n de 0,5 et 0,33.

Pour une valeur n de 0,5, le glycocluster se lie à deux monomères. On compte quatre associations possibles. Pour trois d'entre elles, deux lectines sont impliquées (Figure III.23 (a), (b) et (d)). L'arrangement (a) peut amener, vue la proximité des lectines, à des interactions lectine/lectine latérales. L'association (c) forme un complexe en chélate. Pour $n = 0,33$, trois monomères interagissent avec le **sucre2**. L'association (e) présente un encombrement stérique susceptible de créer des liaisons entre les lectines. Pour (f), un côté du glycocluster est associé à la lectine en chélate alors que de l'autre, seul un galactose interagit avec une lectine.

Pour une valeur n de 0,46, il est difficile d'affirmer que pour plus de 76 % des complexes forment une association de type " $n = 0,5$ " et que les 24 % restant donnent des liaisons de type " $n = 0,33$ ". Seul les arrangements (b), (d) et (f) peuvent amener à des structures allongées en branche si on a une répétition des liaisons. Pour (a) et (c), le sucre étant déjà lié à deux monomères, il ne peut pas faire d'autre liaison. Après le sucre, il ne peut plus y avoir de lectine liée. On est dans une configuration où la croissance de la structure s'arrête. La configuration (e) peut donner lieu à un point de branchement ce qui expliquerait les larges structures que l'on observe.

Seule une étude par modélisation pourrait déterminer quelle serait la configuration des associations la plus basse énergétiquement et donc la plus probable à se réaliser, pour (b) et (d) en particulier. Si, toutefois, ces configurations s'équivalaient énergétiquement, cela expliquerait la structure sinueuse des branches et leur variation de largeur. La nature des bras espaceurs en EG₃ qui leur donne une grande flexibilité, peut aussi être responsable de cette structuration [Cecioni 2012].

A partir de la Figure III.21 (c), un modèle géométrie rectangulaire a été créé sur la plus petite entité isolée sur la surface ayant une hauteur semblable à celle de la structure sinueuse (Figure III.24).

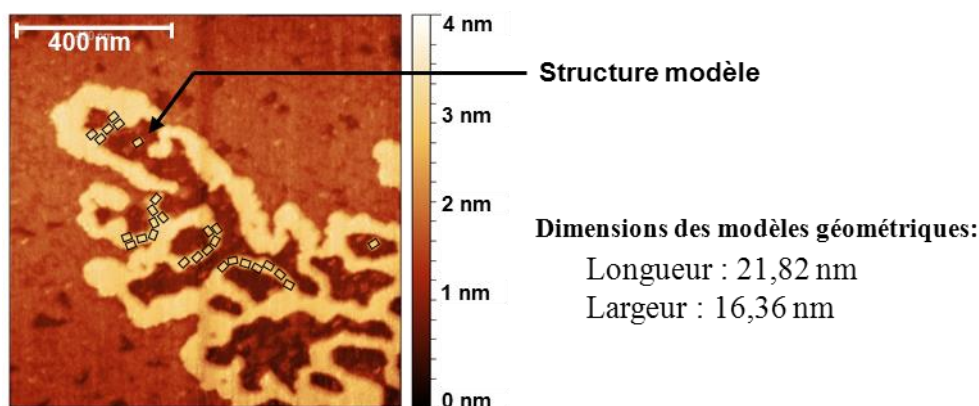


Figure III.24 Modèle géométrique construit sur l'image AFM des complexes lectine PA-IL/sucrose2.

Avec l'échelle de l'image, les dimensions du modèle donnent une longueur de 21,8 nm et une largeur de 16,36 nm au rectangle. En appliquant la formule de déconvolution de la pointe pour une hauteur de 1,4 nm, on a une correspondance des dimensions mesurées et théoriques pour un rayon de courbure de la pointe estimé à 16,8 nm \pm 2 nm [Stadelmann 2006]. Il semble donc que ce soit une lectine isolée sur la surface du mica.

Nous avons essayé de placer plusieurs modèles géométriques de cette lectine pour voir leur disposition sur des branches de la structure. Cependant, le nombre d'associations possibles est trop important et les branches trop larges pour que ces modèles soient disposés avec précision.

Les travaux de Sacchetti *et al.* décrivent pour une interaction entre une lectine tétravalente et un sucre bivalent la formation de complexes de "type 2" en deux ou trois dimensions (Figure III.25) [Sacchetti 2001].

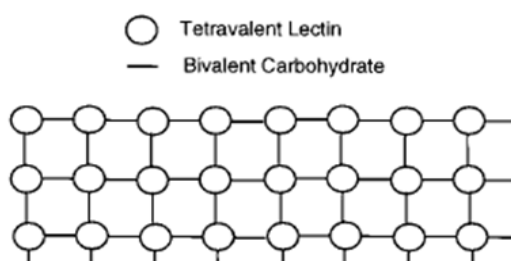


Figure III.25 Schéma du complexe de "type 2" entre une lectine tétravalente et un glycoconjugué bivalent [Sacchetti 2001].

Dans notre cas, le sucre et la lectine étant tétravalents, un réseau uniforme ne peut pas se former. De plus, la configuration de la lectine avec deux sites de liaison de chaque côté ne permet pas cet arrangement. Les différentes associations lectine/sucre données par la valeur

de stœchiométrie et la flexibilité des bras espaceurs confèrent un caractère polymorphe à la structure. La structure plane du **sucre2** maintient la lectine sur son côté le plus large et ne crée pas de variation de hauteur comme ce fut le cas avec le **sucre1**.

III.3.2 Etude avec le glycocluster au cœur en mannose : **sucre3**

Le **sucre3**, présenté sur la Figure III.26, est un glycocluster tétravalent galactosylé avec un cœur en mannose et des bras espaceurs rigides. La constante de dissociation K_d pour la lectine PA-IL a été mesurée par ITC à 0,194 $\mu\text{mol/L}$.

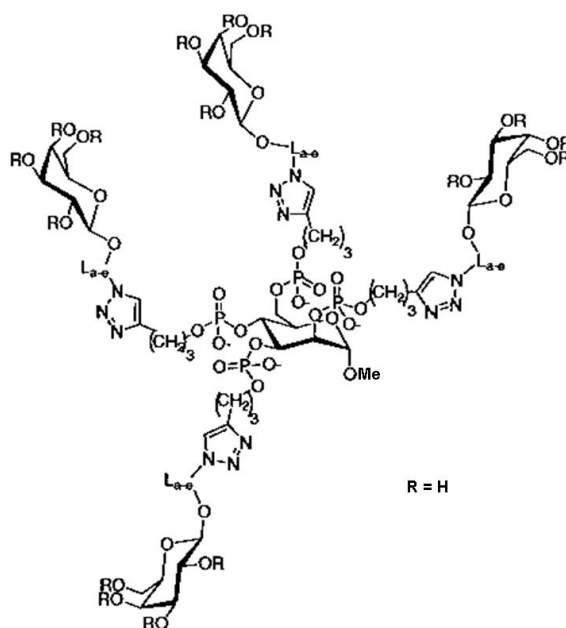


Figure III.26 Structure moléculaire du **sucre3** [Pourceau 2010].

Les complexes lectine PA-IL/**sucre3** ont été imagés par AFM après leur dépôt sur un substrat de mica fraîchement clivé et un séchage en dessiccateur toute une nuit. La solution a été préparée à partir du protocole établi pour les complexes lectine PA-IL/**sucre1** à une concentration finale de 25 pmol/L (cf. III.2.2). Les images de topographie obtenues ont été réalisées à l'air avec des rapports de l'amplitude de travail sur l'amplitude libre de 71 et 76 % (Figure III.27).

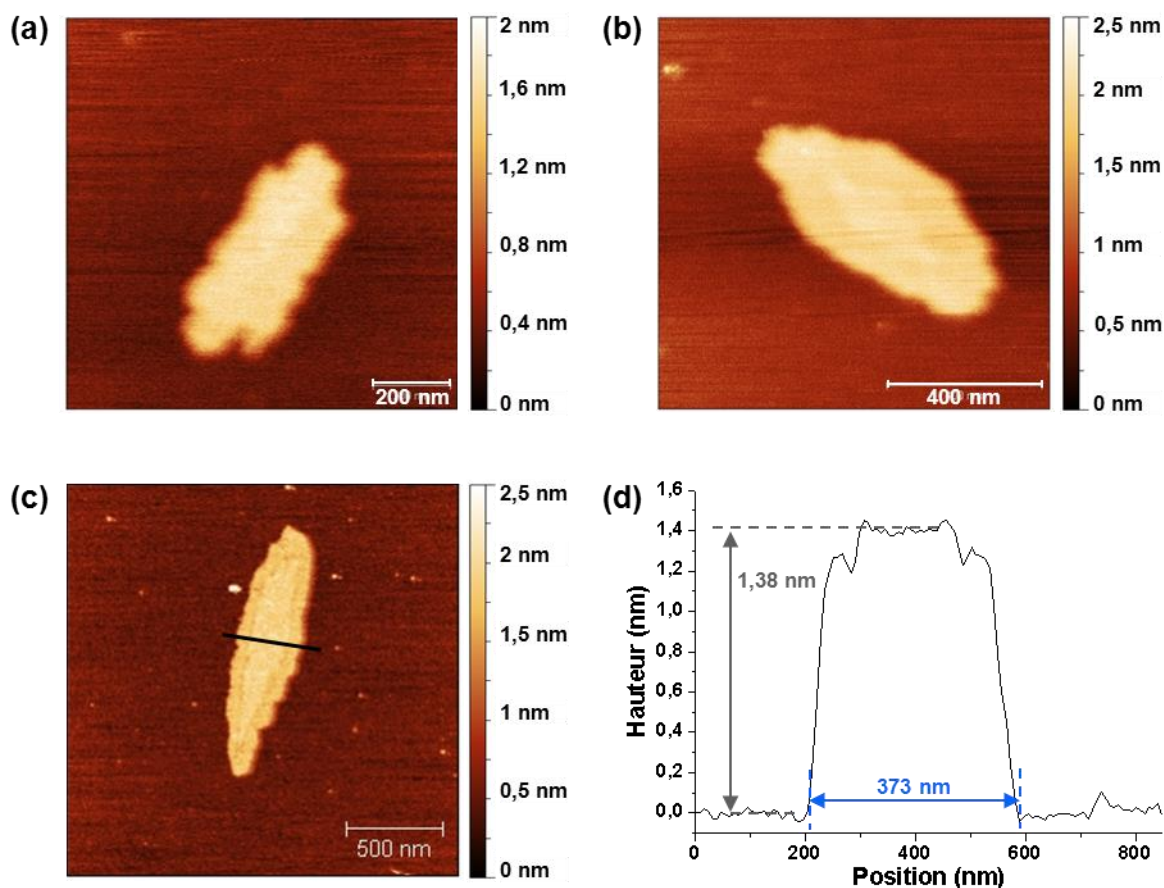


Figure III.27 Images AFM des complexes lectine PA-IL/**sucrose3** à $1 \times 1 \mu\text{m}$ (a) et (b) et $2 \times 2 \mu\text{m}$ (c). Le profil de hauteur de (c) est tracé sur (d).

La Figure III.27 présente des exemples de structures obtenues avec le **sucrose3**. A la surface du mica, l'arrangement des complexes apparaît compact avec des structures larges et allongées. Pour la Figure III.27 (c), la longueur de la structure est de $1,3 \mu\text{m}$ pour une largeur de 373 nm mesurée à partir du profil (Figure III.27 (d)). La hauteur moyenne est de $1,32 \text{ nm} \pm 0,12 \text{ nm}$. On remarque de plus une surélévation au centre de l'arrangement, estimée à $0,16 \text{ nm}$ pour l'objet sur la Figure III.27 (c). La surface du mica montrant une planéité sur les images AFM, il ne semble donc pas que cette variation de hauteur soit due à la rugosité du substrat.

On ne distingue pas de structure ou de motif à l'intérieur qui pourrait nous indiquer l'arrangement spatial des lectines. Contrairement aux deux autres sucres, les bras espaceurs du **sucrose3** sont rigides et hydrophobes. Ces caractéristiques semblent être à l'origine de l'aspect compact de l'arrangement.

Si on considère que la structure sur la Figure III.27 (c) est un rectangle de $1,3 \mu\text{m}$ de long par 373 nm de côté, elle rassemble environ 21650 lectines, sans compter les sucres. On ne peut donc pas envisager d'expliquer la hauteur de l'édifice ou la surélévation par un comportement individuel des lectines comme nous avons pu le faire précédemment (étalement et affaissement des lectines).

L'interaction entre les lectines PA-IL et le **sucrose3** ayant lieu en solution, l'arrangement initial est en trois dimensions. Lors de son adsorption sur la surface du mica puis durant le

séchage, la structure doit s'adapter pour minimiser son interaction avec la surface. Or, avec des bras espaceurs rigides, la structure a moins de degré de liberté pour s'ajuster. On peut supposer que la hauteur de la structure (inférieure aux valeurs théoriques de la lectine) et la surélévation sont un effet de rétraction des complexes à cause du séchage. Un hypothétique "effet de cloque" est envisagé en considérant que les bords de la structure, plus flexibles, s'adaptent pour s'adsorber sur le mica alors que le cœur rigide se surélève afin de maintenir l'ensemble et d'éviter des cassures dans l'édifice.

En considérant les travaux de Dam *et al.*, nous avons modélisé géométriquement les associations possibles entre la lectine PA-IL et le **sucre3** pour des valeurs de stœchiométrie n de 0,5 et 0,33 (Figure III.28) [Dam 2000]. Ces modèles ne tiennent toutefois pas compte de la configuration en trois dimensions de l'interaction. Pour alléger le schéma, seuls des "associations-types" ont été représentées. Il est indiqué entre parenthèse le nombre de combinaisons possibles pour chaque association si on prend en compte chaque bras de façon singulière. Une étude de modélisation plus poussée serait nécessaire pour connaître l'arrangement spatial le plus probable de se réaliser.

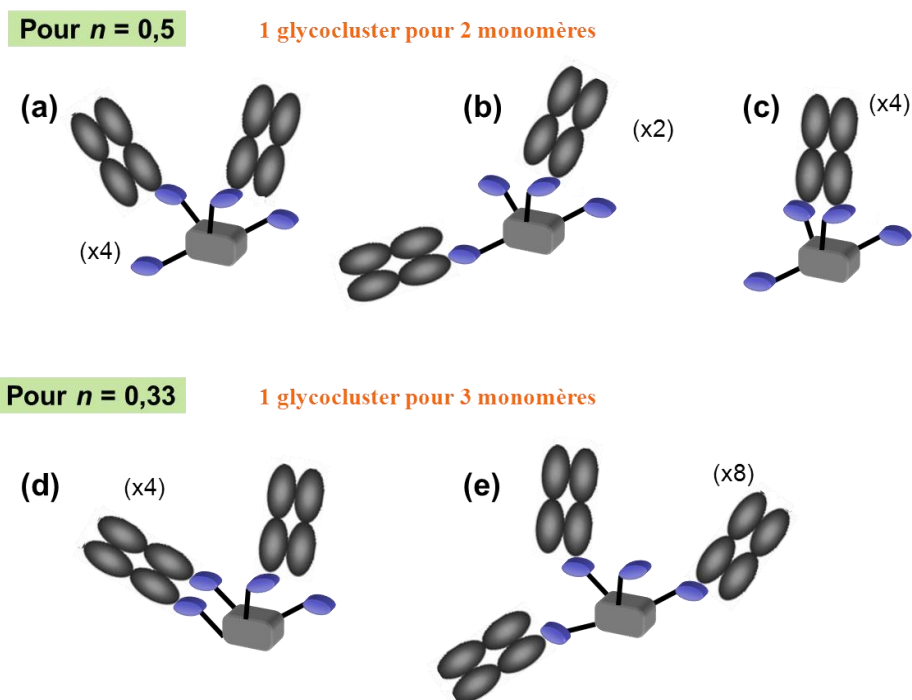


Figure III.28 Schéma des associations lectine PA-IL/sucre3 possibles pour des valeurs de stœchiométrie de n de 0,5 et 0,33.

En plus des valeurs de stœchiométrie, la structure en couronne apportée par le cœur en mannose donne une grande diversité de complexes. Avec la rigidité des bras, leur orientation spatiale et les interactions lectine-lectine possibles, on s'attendrait à avoir un arrangement polymorphe en trois dimensions. On peut supposer que l'édifice formé par les complexes n'est pas assez stable pour se maintenir en hauteur pendant le séchage.

Afin d'améliorer la résolution des images AFM et distinguer une structure interne dans l'arrangement, des expériences ont été réalisées avec une pointe "ultrasharp" en silicium d'un rayon de courbure de 2 nm (cf. II.5.2). La préparation de l'échantillon et les autres conditions

expérimentales restent les mêmes. Les images AFM de topographie et de phase des complexes déposés sur un substrat de mica sont présentées sur la Figure III.29.

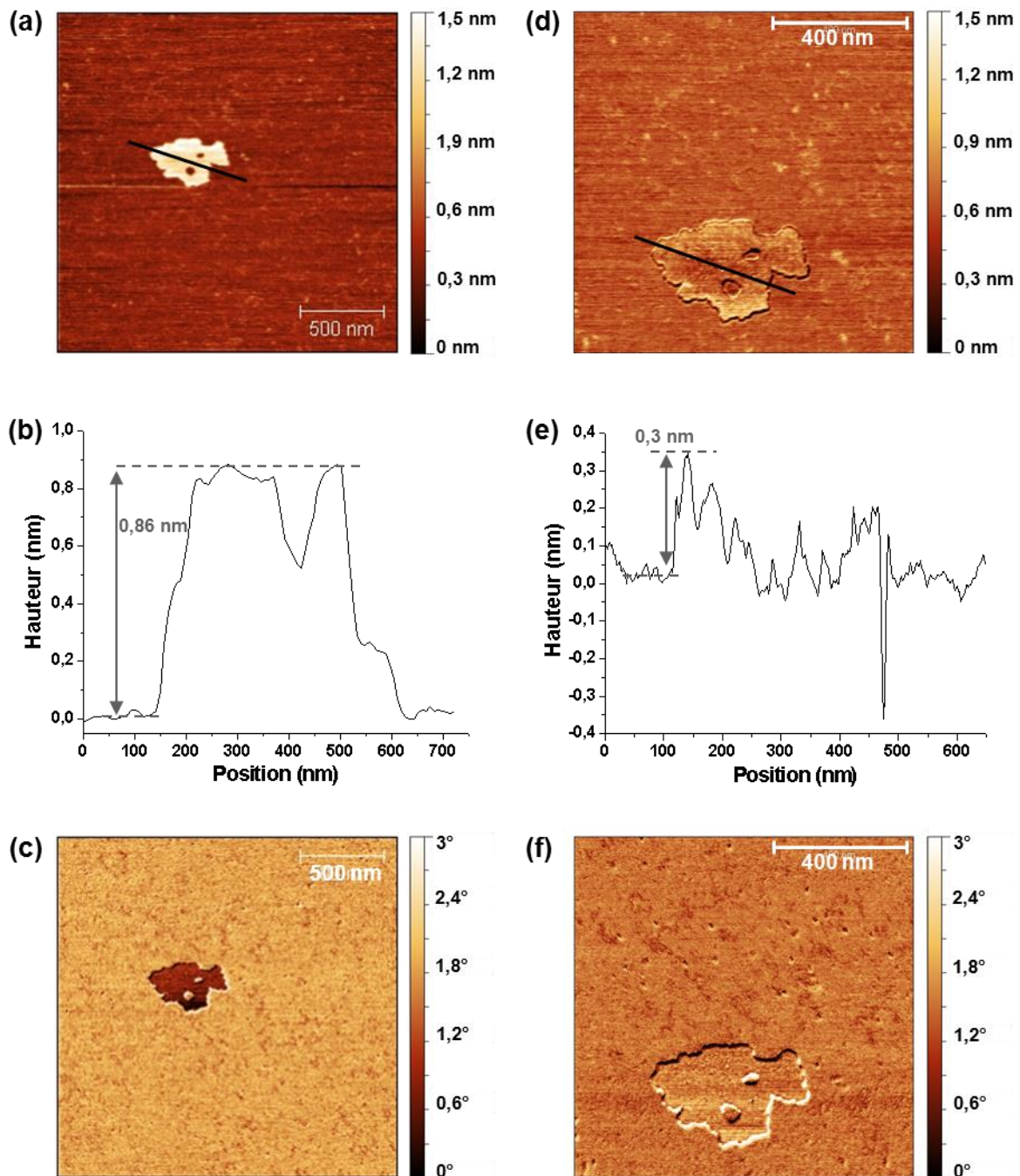


Figure III.29 Images AFM de topographie des complexes PA-IL/sucre3 avec une taille de $2 \times 2 \mu\text{m}$ de côté pour (a) et $1 \times 1 \mu\text{m}$ pour (d). Le profil de hauteur des complexes présents sur la surface sont données sur (b) et (e). (c) et (f) sont les images de phase associées aux images de topographie.

Sur l'image de topographie à $2 \mu\text{m}$ de côté, on distingue nettement l'arrangement des complexes lectine/sucre3 sur la surface du mica (Figure III.29 (a)). La structure est large avec des décrochements sur les contours et deux trous en son centre. Elle est similaire aux objets observés sur la Figure III.27. Sa hauteur est toutefois 1,6 fois inférieure aux résultats

précédents (Figure III.29 (b)). L'image de phase présente un fort contraste entre le mica et l'arrangement (Figure III.29 (c)). Ce sont bien deux structures de nature physicochimique différentes.

Les Figure III.29 (d) et Figure III.29 (f) présentent les images AFM réalisées juste après avec une taille de 1 μm de côté pour zoomer sur la structure. Les paramètres de l'image tels que le setpoint et le gain restent inchangés entre les deux images, seule la vitesse de balayage est abaissée. On observe que ce soit sur l'image topographique ou sur l'image de phase que les contrastes entre la structure et le mica ne sont pas aussi nets que sur les images précédentes. La hauteur a diminué de trois fois par rapport à l'image précédente (Figure III.29 (e)). Le profil montre de plus que la hauteur diminue progressivement au cours du balayage (balayage de la pointe du haut vers le bas, de gauche à droite).

L'hypothèse de l'accroche par la pointe d'une lectine ou complexe ou autre objet sur la surface est possible. Cependant, si on considère qu'il s'agit d'une lectine ou d'un complexe, l'interaction de cet objet avec la surface du mica ou la surface de l'arrangement des complexes doit être différente. Or les contrastes de couleur sont identiques.

Schabert *et al.* ont montré, pour la porine OmpF de la bactérie *E. coli*, que la raideur de la pointe jouait un rôle dans la résolution des images AFM [Schabert 1994]. Dans notre cas, les pointes "ultrasharp" ont une constante de raideur comprise entre 10-130 N/m alors que pour celle des pointes triangulaires utilisées habituellement est estimée entre 0,5 et 1,5 N/m. Les conditions d'imagerie font que la pointe "ultrasharp" exerce une trop forte contrainte sur l'arrangement biologique. Ce genre d'échantillon demande donc des pointes avec une constante de raideur faible pour éviter des artefacts d'image.

III.3.3 Comparaison des trois complexes lectine PA-IL/glycocluster

Trois glycoclusters tétravalents différents ont été étudiés afin de comprendre l'influence des structures de cœur sur l'arrangement. Nous allons donc comparer la structure de ces glycoclusters, leur affinité avec la lectine PA-IL et l'arrangement des complexes observés précédemment par AFM.

D'un point de vue de la structure des glycoclusters, le **sucre1** possède un cœur en couronne avec des bras flexibles. La conformation du calix[4]arène en 1,3-alterné oriente les bras dans deux plans différents de part et d'autre du cœur : du côté upper-rim, les deux bras forment un plan horizontal alors que du côté lower-rim, le plan formé est vertical. Le **sucre2** avec, en son centre, une molécule de porphyrine a une structure plane. Ces bras flexibles peuvent s'adapter pour se lier à la lectine. Enfin, le mannose permet de structurer le cœur du **sucre3** en forme de couronne. La nature des bras espaceurs leur donne une forte rigidité même si le cœur autorise des orientations diverses.

Le **sucre1** et le **sucre3** présentent des structures de cœur similaires, en couronne. La nature des bras espaceurs est la même pour le **sucre1** et le **sucre2**.

L'affinité de ces glycoclusters pour la lectine PA-IL mesurée par SPR et ITC est rappelée dans la Figure III.30 [Cecioni 2009 ; Cecioni 2011a].

Ligand	SPR		ITC		
	IC ₅₀ ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)	β ^[a]	n	K _d ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)	β ^[a]
Bras espaceur EG ₃ + galactose	72	1	1	150	1
Sucre1	0,5	144	0,24	0,176	850
Sucre2	1,4	45	0,46	0,33	450
Sucre3	/ ^[b]	/ ^[c]	0,46	0,194	/ ^[c]

Figure III.30 Tableau récapitulatif des résultats d'affinité avec la lectine PA-IL déterminée par SPR et ITC [Cecioni 2009, Cecioni 2011a]. [a] Rapport entre la valeur de l'IC₅₀ ou du K_d du glycocluster et celle pour l'ensemble monovalent "bras espaceur EG₃ + galactose". [b] Valeur confidentielle. [c] Non applicable.

Ces expériences étant réalisées indépendamment pour chaque sucre, un rapport β est utilisé pour les normaliser par rapport à un composé monovalent pour permettre leur comparaison. Les valeurs d'IC₅₀ donnent les meilleurs résultats pour le **sucre1** pour les mesures par SPR. Pour les analyses par ITC, les valeurs de K_d pour le **sucre1** et le **sucre3** sont proches et indiquent qu'ils ont plus d'affinité avec la lectine que le **sucre2**. La valeur de stœchiométrie est identique pour le **sucre2** et le **sucre3**.

Nous avons regroupé sur la Figure III.31, les images AFM des arrangements des trois complexes formés avec la lectine pour pouvoir les comparer. Nous rappelons que le protocole expérimental a été le même dans chaque expérience :

- 20 μL de CaCl₂ à 0,3 $\mu\text{mol/L}$;
- 10 μL d'une solution aqueuse de lectines PA-IL à 25 pmol/L ;
- 10 μL d'une solution aqueuse de sucre (**sucre1**, **sucre2** ou **sucre3**) à 25 pmol/L .

La solution est laissée une heure à température ambiante pour que les molécules interagissent. 20 μL de solution finale est déposée sur un substrat de mica fraîchement clivé. L'échantillon est ensuite séché toute une nuit dans un dessiccateur. L'analyse des échantillons par AFM a été effectuée à l'air avec des pointes triangulaires de rayon de courbure de l'ordre de 10 nm et de constante de raideur comprise entre 0,5 et 1,5 N/m. Les images ont été réalisées en mode contact intermittent avec un rapport d'amplitude allant de 56 à 76 %.

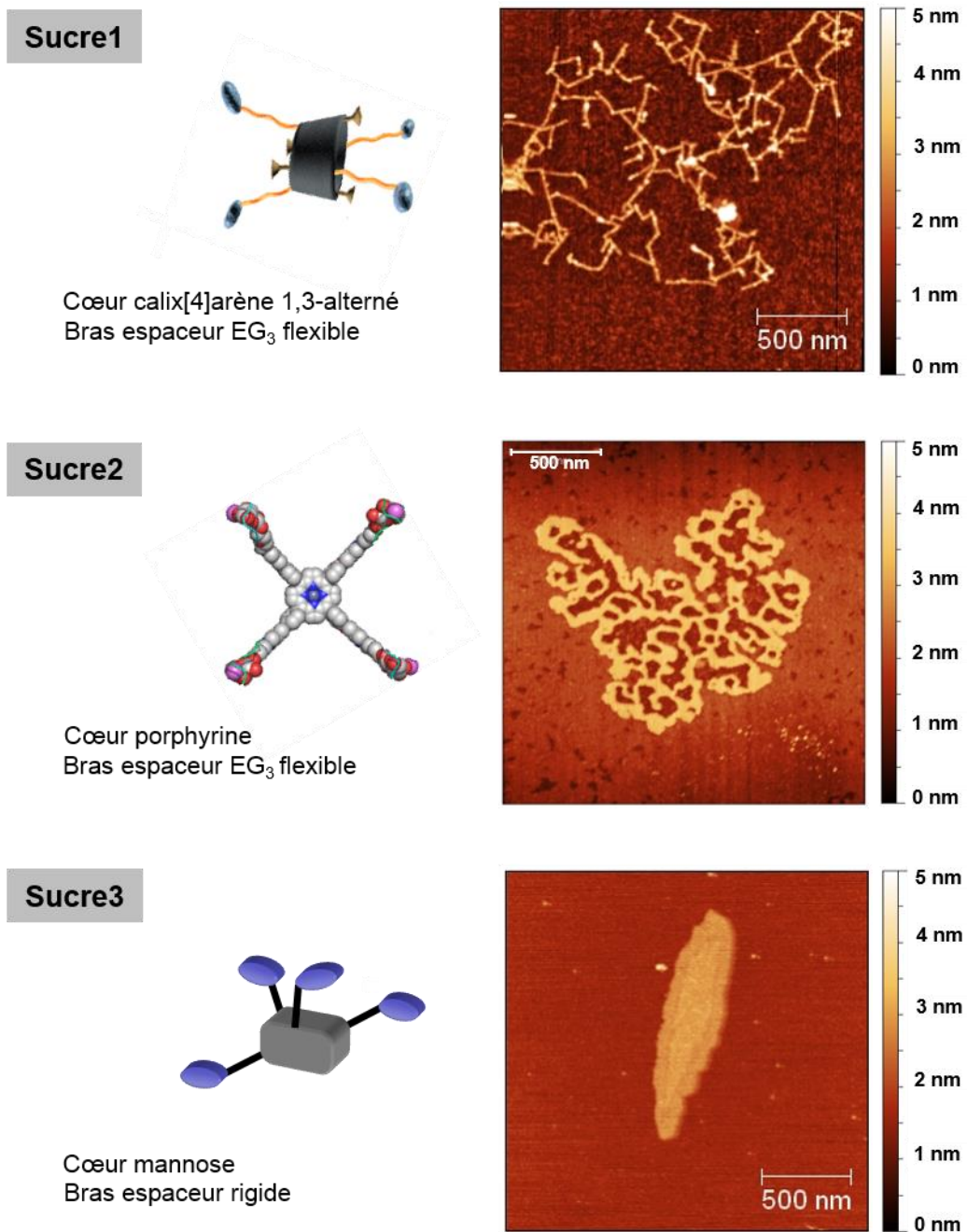


Figure III.31 Récapitulatif des complexes lectine/glycocluster imagés par AFM avec les **sucre1**, **sucre2** et **sucre3**. Taille des images de 2x2 μm .

On remarque que les arrangements sont bien différents suivant le sucre observé. Pour le **sucre1**, la position des bras de part et d'autre du cœur en couronne et la valeur de stœchiométrie à 0,24 impose une structure filaire rigide. Dans quelques exceptions, une interaction du glycocluster avec trois lectines donne des bifurcations dans les filaments. Le positionnement et l'orientation des bras espaceurs semblent induire une alternance dans l'orientation de la lectine. L'arrangement des complexes avec le **sucre2** présente une structure dentelée avec des branches sinueuses et larges. La géométrie planaire du cœur positionne toutes les lectines sur un même côté car la hauteur de l'arrangement ne varie pas. La valeur de stœchiométrie de 0,46 donne une diversité d'association entre la lectine et le sucre que l'on retrouve dans le polymorphisme des branches et dans la largeur des points de branchements.

Le **sucre3** possède des bras espaceurs rigides qui semblent être à l'origine de l'aspect compact de l'arrangement de ces complexes. La structure de cœur assure à la molécule une géométrie en trois dimensions amenant à une grande diversité d'interaction.

Pour les deux premiers sucres, la structuration des lectines à l'intérieur de l'arrangement est observable ou peut être déduite des résultats obtenues par ITC, ce qui n'est pas le cas pour le **sucre3**. La flexibilité des bras semble être à l'origine de cette différence. Ils peuvent s'adapter pour éviter des interactions lectine/lectine qui resserreraient les complexes entre eux. Le cœur et l'orientation des bras qu'il impose peuvent aussi être impliqués. Pour les **sucre1** et **sucre2**, les épitopes sont dirigés de part et d'autre du cœur, deux d'un côté et deux de l'autre. Si une interaction double doit se faire (deux galactoses d'un glycocluster avec deux monomères d'une même lectine), elle n'est possible que sur un des côtés du glycocluster.

En conclusion dans cette étude, nous avons pu montrer que la microscopie à force atomique permettait la visualisation de l'arrangement des complexes lectine PA-IL/glycocluster, à l'air, grâce à l'application d'un protocole expérimental utilisant de faibles concentrations de lectine et de sucre. Pour deux sucres, l'allure des structures sur les images AFM renseignent sur le mode d'association possible dans la liaison lectine/glycocluster. Ces résultats complètent les valeurs de stœchiométrie évaluées par ITC. Les travaux comparatifs réalisés avec trois glycoclusters différents confirment visuellement que l'interaction lectine PA-IL/glycocluster diffère selon la nature du cœur et des bras espaceurs du glycocluster.

III.4 Étude de la lectine PA-IL en milieu liquide

Jusqu'à maintenant, toutes nos images AFM ont été réalisées à l'air pour nous affranchir de certaines contraintes et problématiques expérimentales. Cependant, l'environnement naturel des lectines reste le milieu liquide. Nous avons donc souhaité réaliser l'observation des lectines PA-IL dans ce milieu.

L'étude d'objets biologiques par AFM en milieu liquide demande une attention particulière dans le choix du milieu d'observation et dans la méthode de fixation des objets sur le substrat. Müller et Engel donnent l'exemple de la membrane pourpre dont la valeur de la hauteur varie suivant la quantité et la nature du sel présent dans la solution [Müller 1997b].

Nous avons donc cherché dans un premier temps la solution la plus favorable à l'observation des lectines *in situ*. Nous avons ensuite travaillé sur le moyen de les immobiliser sur le substrat de mica sans les dénaturer. Les résultats de ces deux études seront présentés à la suite de ce paragraphe.

III.4.1 Détermination du milieu d'observation

Les substrats de mica utilisés dans nos expériences présentent à leur surface une forte charge électrostatique répulsive qui nous empêche d'imager directement la surface. En se référant aux travaux de Müller et Engel, nous avons noté que des solutions ioniques pouvaient écranter les forces électrostatiques de la surface [Müller 1997b]. Le pH et la valence des ions choisis pour la solution ionique ont aussi une influence sur la grandeur et le signe de la densité

de charge ainsi que sur la longueur de Debye λ_D [Israelachvili 1991]. Nous avons donc cherché des solutions ioniques et les conditions expérimentales susceptibles de compenser ou de diminuer fortement cette force électrostatique répulsive indésirable du substrat de mica. Il faut aussi que ces solutions permettent l'observation des lectines puisque c'est la finalité de cette étude.

La solution ionique doit, tout d'abord, être un environnement viable pour les lectines. La solution tampon Tris-HCl (Trishydroxyméthylaminométhane), utilisée généralement dans la conservation des protéines, remplit ce critère. Ce milieu évite un changement structural des lectines et fixe le pH de la solution. Dans notre cas, nous avons choisi de travailler à une concentration de Tris-HCl à 0,1 mM, pour un pH de 7,2. Dans ces conditions, la charge de la lectine est négative puisque son point isoélectrique est de 4,94. Le mica étant aussi chargé négativement, il faut s'assurer que les cations présents dans la solution ionique pourront assurer la fixation des objets biologiques au substrat.

En solution, le Tris-HCl se dissocie en ions monovalents Tris-H⁺ et Cl⁻ [Klein 1980]. Par définition, la longueur de Debye est dépendante de la valence des ions en solution [Israelachvili 1991]. Pour faire décroître plus rapidement cette longueur de Debye, une solution saline avec des ions divalents peut être ajoutée à la solution de Tris-HCl. Pour rester dans des conditions proches d'un environnement biologique viable, nous nous sommes tournés vers les solutions de chlorure de magnésium MgCl₂ et de chlorure de calcium CaCl₂.

Le mica possède à sa surface des cavités d'environ 0,5 nm, du à l'arrangement de ses groupes hydroxyles [Hansma 1996]. Des petits cations peuvent s'adsorber dans ces interstices [Nishimura 1995]. Le cation Mg²⁺ a un rayon ionique plus petit (0,072 nm) que le Ca²⁺ (0,1 nm). Il a donc plus de probabilité de s'adsorber sur la surface.

Quatre milieux observationnels sont ainsi à l'étude :

- solution de Tris-HCl à 0,1 mM, à pH 7,2 ;
- solution de Tris-HCl à 0,1 mM et de CaCl₂ avec des concentrations allant de 0,6 μ M à 100 mM, à pH 7,2 ;
- solution de Tris-HCl à 0,1 mM et de MgCl₂ avec des concentrations allant de 1 à 50 mM, à pH 7,2 ;
- eau ultrapure, témoin négatif de l'expérience.

Des courbes de force ont été réalisées sur un substrat de mica fraîchement clivé dans tous les milieux observationnels énoncés ci-dessus afin de voir si la répulsion électrostatique présente entre la pointe et la surface diminue ou s'annule dans un milieu particulier et/ou à une certaine concentration ionique. L'influence de la concentration en MgCl₂ et CaCl₂ a été étudiée en partant des concentrations les plus faibles vers les plus importantes. Pour chaque expérience, 200 μ L de solution sont déposées sur le mica. Dans certains cas, nous avons appliqué un traitement de surface au mica avec des ions Ni²⁺ afin de charger sa surface positivement [Iazykov 2012].

La Figure III.32 présente les courbes expérimentales de force-déplacement du piézo déduites des courbes d'approche-retrait enregistrées sur la surface du mica fraîchement clivé en solution. Seule la courbe d'approche est représentée sur la figure. La sensibilité de la photodiode a été évaluée au préalable par des mesures de spectroscopie de force sur un substrat de SiO₂. La constante de raideur a été déterminée numériquement à partir de la méthode de Sader (cf. II.2.1) [Sader 1995]. Nous avons arbitrairement placé le zéro de l'axe

horizontal au changement d'allure de la courbe. Pour éviter que les courbes ne se chevauchent, elles ont été déplacées verticalement.

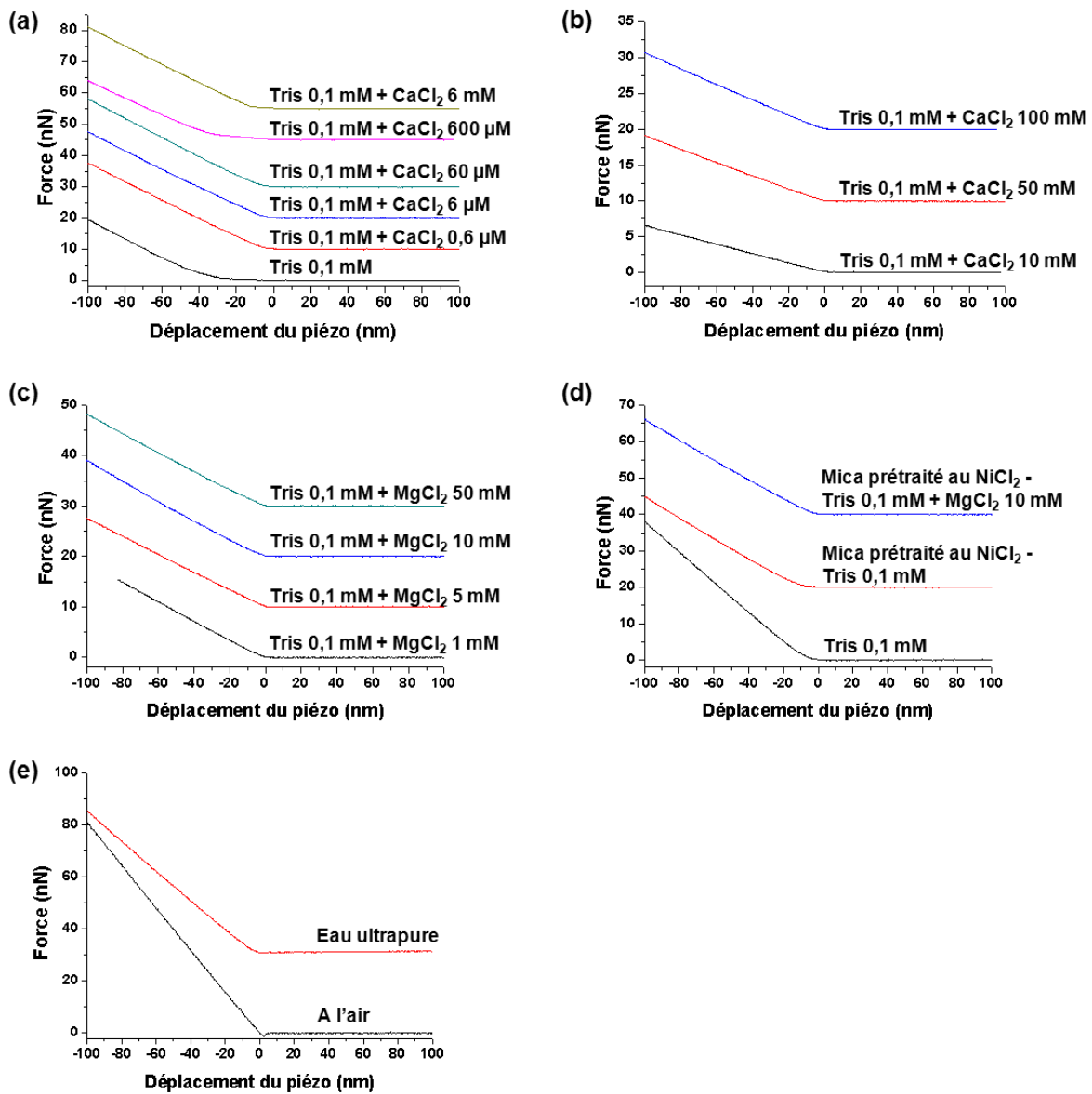


Figure III.32 Courbes de force-déplacement du piézo mesurées sur du mica à l'air (e) et dans plusieurs solutions tampon avec des concentrations ioniques différentes. Chaque courbe est la moyenne de 21 courbes de force.

On peut constater sur la Figure III.32 que, quelle que soit la solution utilisée et la concentration en sel, l'allure des courbes est semblable hormis pour la courbe réalisée à l'air sur le mica (Figure III.32 (e)). Les courbes sont caractéristiques d'une répulsion de la pointe par la surface. Même à de fortes concentrations en CaCl₂ et MgCl₂, nous ne remarquons pas de changement d'allure dans les courbes expérimentales, comme cela peut être le cas dans l'article de Müller et Engel [Müller 1997b]. Il n'apparaît pas non plus de saut au contact, hormis sur la courbe de force prise à l'air (Figure III.32 (e)). La courbe de l'expérience dans l'eau ultrapure, qui est notre témoin négatif dans cette étude, a une allure similaire à celles dans des milieux ioniques (Figure III.32 (e)).

L'influence de la charge de surface du mica a été étudiée. Un traitement sur la surface du substrat avec des ions Ni^{2+} a permis de la charger positivement. Les courbes de force-déplacement du piézo réalisées dans des solutions de Tris-HCl à 0,1 mM et Tris-HCl 0,1 mM et de MgCl_2 à 10 mM sont données dans la Figure III.32 (d). La charge de surface du mica ne semble pas influencer l'allure des courbes. On peut juste noter une modification dans le coefficient directeur de la pente entre un substrat traité et non-traité au NiCl_2 .

A la vue de ces courbes, on peut se poser la question de la présence de cette force électrostatique et de son action sur la pointe dans notre cas expérimental. A partir des travaux de thèse de Marie-Charlotte Audry, la valeur des forces électrostatiques pour notre système expérimental est évaluée par simulation numérique [Audry 2009]. La force d'interaction électrostatique F_{el} entre une sphère de rayon R et un plan est donnée par l'approximation de Derjaguin :

$$F_{el}(D) = 2\pi R W_{//}(D)$$

Avec :

D la distance entre la pointe et la surface ;

$W_{//}$ l'énergie d'interaction par unité de surface, définie par :

$$W_{//}(D) = -N_a 10^3 c_0 k_B T \int_{\infty}^D P_d D d(D)$$

Avec :

N_a le nombre d'Avogadro ;

c_0 la concentration en sel, en mol/L ;

k_B la constante de Boltzmann ;

T la température ;

P_d la pression de disjonction.

La force électrostatique peut être estimée numériquement en définissant des conditions limites. Elle sera alors comprise entre les deux valeurs limites. Dans notre cas, nous nous sommes intéressés uniquement à la limite supérieure en considérant que les charges de surface restaient constantes quelque soit la distance entre la pointe et le plan (ici le substrat de mica). On définit alors la valeur F_{el}^{CC} qui dépend de la distance D .

Dans nos conditions expérimentales, les potentiels de surface du mica et du silicium (pointe) sont égaux à leur potentiel Zéta puisqu'on est dans le cas d'une surface hydrophile. Ils ont pour valeurs respectives 70 et 100 mV [Scales 1988 ; Kirby 2004]. En fixant le rayon de courbure de la pointe à 10 nm et une concentration en sel c_0 de 0,1 mM (dans le cas de la solution de Tris-HCl, en considérant les ions monovalents Tris-H^+ et Cl^-), les valeurs de la force électrostatique à charge constante en fonction de la distance pointe-surface sont présentées sur la Figure III.33. La valeur de la force électrostatique dans notre cas, pour une solution de Tris-HCl 0,1 mM est donc inférieure à 30 pN.

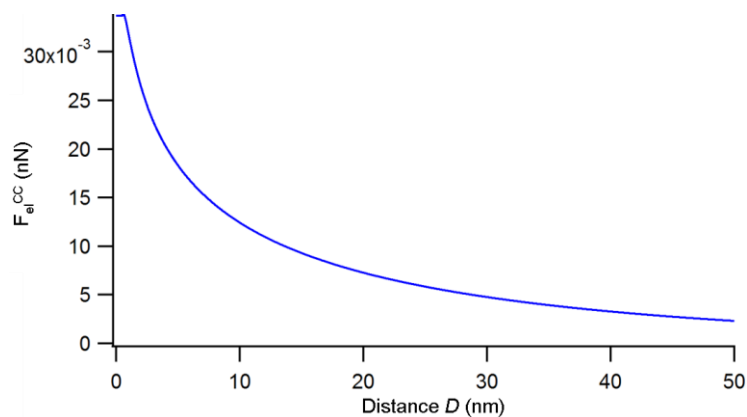


Figure III.33 Représentation graphique de la force électrostatique en considérant les charges constantes en valeurs limites en fonction de la distance D entre la pointe et la surface. On a pour paramètre de calcul les potentiels de surface de la pointe en silicium et du substrat de mica estimés à 70 et 100 mV, un rayon de courbure R de la pointe à 10 nm et une concentration de la solution de Tris-HCl à 0,1 mM.

En reprenant les courbes de force-déplacement du piézo de la Figure III.32 (a) et (e) dans une solution de Tris-HCl 0,1 mM et dans l'eau ultrapure, on note, sur la Figure III.34, que la dispersion de points de mesure est supérieure à la valeur estimée de la force électrostatique. Il est donc impossible de voir l'évolution de la force électrostatique en fonction de la concentration en sel puisque la force électrostatique et les variations qu'elle pourrait subir sont cachées par le bruit de mesure.

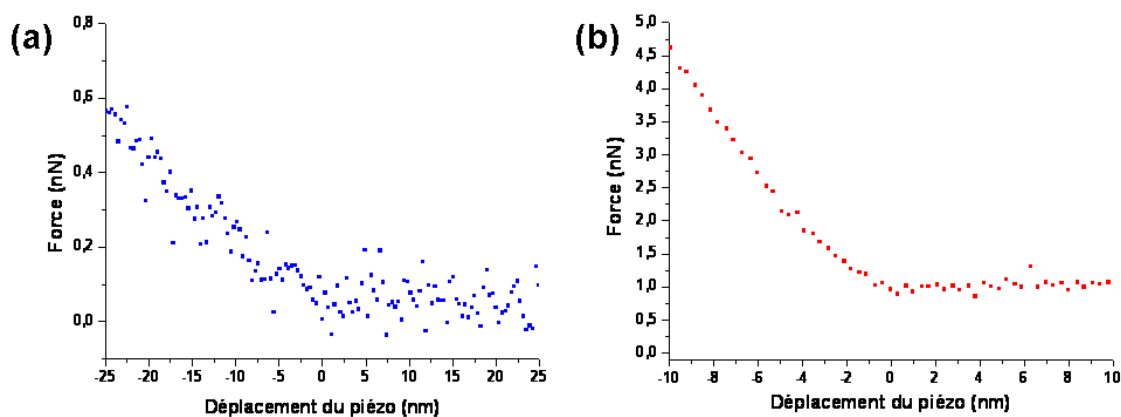


Figure III.34 Courbes de force-déplacement du piézo mesurées sur du mica dans une solution de Tris 0,1 mM (a) et dans l'eau ultrapure (b). Zoom des courbes présentées sur la Figure III.32 (a) et (e).

Quelque soit la solution utilisée, la modification de la force électrostatique répulsive n'est pas visible. Elle est cachée par le bruit de mesure. Dans la suite de notre étude, nous avons choisi d'utiliser l'eau ultrapure comme milieu liquide d'observation. Cette solution assure de plus la viabilité des lectines.

III.4.2 Expériences sur les lectines PA-IL

Pour observer des protéines en liquide, il faut qu'elles soient fortement liées au substrat afin que le balayage de la pointe ou l'ajout de la solution d'observation ne les décrochent pas. Il faut, de plus, que l'adhésion de la pointe à la surface soit minimisée et que la densité de protéines soit telle que l'on puisse les observer individuellement sur la surface [Klein 2003]. L'adsorption sur l'échantillon dépend des forces électrostatiques, de Van der Waals et des interactions hydrophiles-hydrophobes qui sont présentes entre le substrat et les objets biologiques [Al-Shakhshir 1995]. De plus, une fois l'adsorption faite, un changement de conformation de la protéine a lieu pour maximiser ces interactions [Van Oss 1995].

Parfois, des liaisons non-spécifiques peuvent suffire à immobiliser les protéines. L'ajustement du pH de la solution tampon en fonction du point isoélectrique de la protéine permet de lui donner une charge de surface positive [Raab 1999, Riener 2003]. Elle se fixe alors électrostatiquement au substrat de mica, chargé négativement. Cette méthode d'immobilisation est illustrée par la Figure III.35, avec une image AFM dans une solution de PBS de la protéine avidine immobilisée sur du mica fraîchement clivé.

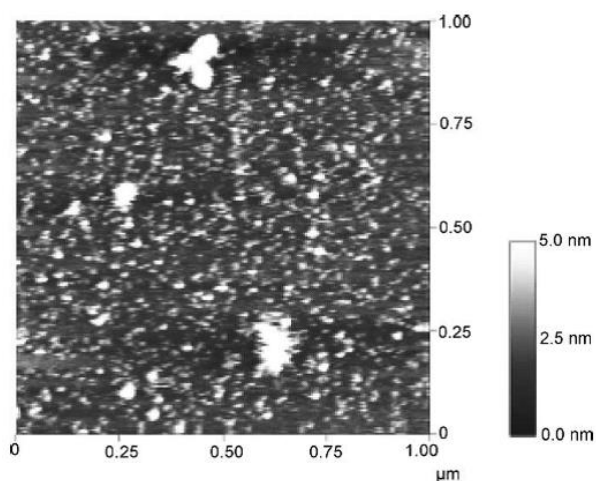


Figure III.35 Avidine (protéine) immobilisée électrostatiquement sur un substrat de mica, imagée dans une solution de PBS avec le mode MACTM [Riener 2003].

Dans le cas où les protéines sont chargées négativement, elles peuvent être immobilisées sur le mica grâce à des cations divalents qui vont agir comme un pont électronique entre le substrat et les biomolécules [Stamouli 2003, Müller 1997a]. Les solutions de cations divalents telles $MgCl_2$ et $NiCl_2$ peuvent être appliquées au mica en prétraitement avant de déposer les biomolécules pour charger sa surface positivement [Hansma 1996]. Enfin la poly-L-lysine, polymère chargé positivement, déposée en fine couche sur le mica, lie les objets biologiques électrostatiquement au support [Müller 1997a].

Si l'adhésion non-spécifique n'est pas efficace pour immobiliser les protéines au substrat, la fonctionnalisation chimique du mica est nécessaire pour créer des liaisons covalentes avec les biomolécules. La silanisation du mica avec de l'APTES (3-aminopropyltriéthoxy silane) permet de fixer les protéines chargées négativement sur le substrat [Lyubchenko 2011]. L'acide aminé lysine contenu dans les protéines peut se lier de façon covalente au groupement NHS qui fonctionnalise la surface du mica [Klein 2003]. Les

images AFM de lectines immobilisées sur le mica modifié avec cette technique sont présentées dans la Figure III.36.

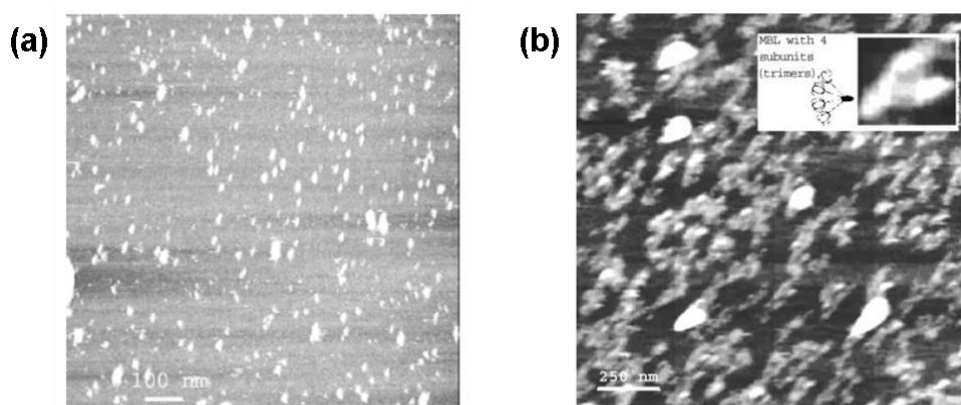


Figure III.36 Immobilisation de façon covalente de (a) la lectine *Pisum sativum* et de (b) une lectine recombinante spécifique au mannose sur du mica fonctionnalisé. Images AFM faites en mode tapping dans une solution de Tris (a) et du TBS (b) [Klein 2003].

Dans notre étude, nous avons immobilisé la lectine PA-IL sur un substrat de mica par trois méthodes :

- Ajout de cations divalents CaCl_2 à la solution de lectines ;
- Prétraitement de la surface du mica avec du NiCl_2 ;
- Fonctionnalisation du mica avec de l'APTES.

Dans le premier cas, une solution de PA-IL à la concentration finale de 200 nmol/L contenant du CaCl_2 à 12 nmol/L est déposée sur du mica fraîchement clivé et laissée pendant 30 min. La préparation est la même que dans le cas de l'observation des lectines à l'air. Ce sont les cations Ca^{2+} qui vont assurer l'immobilisation des lectines. L'observation AFM est réalisée dans de l'eau ultrapure en mode tapping avec un rapport d'amplitude d'environ 55 %. Les images AFM sont présentées sur la Figure III.37.

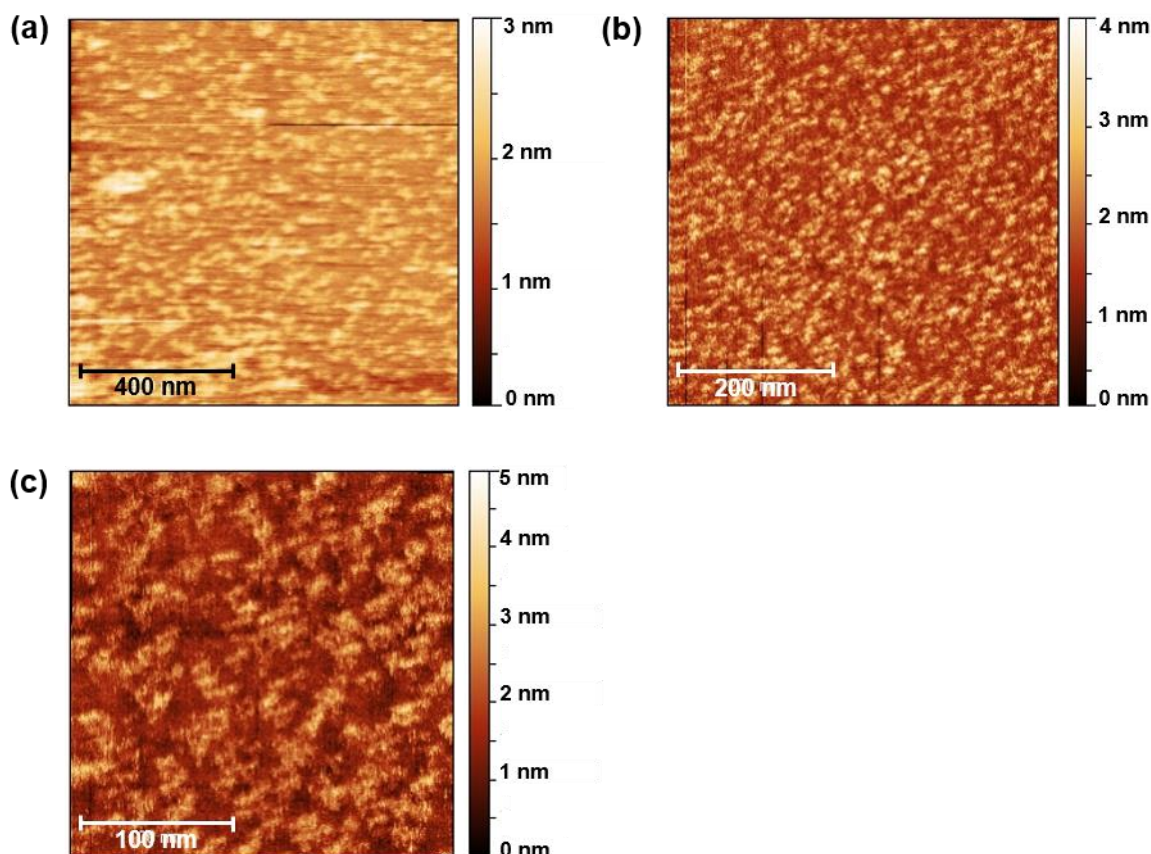


Figure III.37 Lectines PA-IL immobilisées électrostatiquement sur un substrat de mica. Les images ont été prises en mode tapping dans de l'eau ultrapure. Taille des images : $1 \times 1 \mu\text{m}$ pour (a), $500 \times 500 \text{ nm}$ pour (b) et $250 \times 250 \text{ nm}$ pour (c). Les valeurs de rugosité RMS sont respectivement 0,28 nm, 0,63 nm et 0,65 nm.

Nos observations dans l'eau ultrapure révèlent de petits objets sphériques que nous identifions comme étant des lectines isolées et des ensembles de lectines agrégées. La quantité de lectines déposées est telle que les lectines peuvent recouvrir la surface du substrat de mica en totalité avec un rapport "surface totale des lectines" sur "surface du substrat" d'environ 1 (densité de lectines d'environ $50000 \text{ lectines}/\mu\text{m}^2$). Il est cependant fort probable que lors de l'immersion de l'échantillon dans l'eau ultrapure, des protéines se désorbent de la surface.

Des tests de fluorescence ont été réalisés avec de la lectine PA-IL marquée afin de quantifier le nombre de lectines décrochées suite au dépôt de la goutte d'eau ultrapure. Le fluorophore alexa647 utilisé est lié à la protéine d'après le protocole développé par InvitrogenTM. La concentration des lectines déposées sur le mica est de 200 nmol/L avec du CaCl_2 à 12 nmol/L . Les mesures de fluorescence faites avant et après immersion ne peuvent toutefois pas nous renseigner. La fluorescence naturelle du mica et du support d'échantillon est, dans notre cas, supérieure à celle des lectines.

Le prétraitement du mica avec des ions Ni^{2+} est réalisé à partir de $200 \mu\text{L}$ de NiCl_2 à 10 mmol/L déposé pendant 1 min sur du mica fraîchement clivé. La surface du substrat est ensuite rincée à l'eau ultrapure avant d'être séchée à l'azote. $20 \mu\text{L}$ d'une solution contenant des lectines à 200 nmol/L et du CaCl_2 à $0,3 \mu\text{mol/L}$ est déposée juste après et laissée 30 min au repos avant que l'échantillon ne soit recouvert d'eau ultrapure. Ce protocole expérimental

a fait ses preuves en permettant l'immobilisation de brins d'ADN sur un substrat de mica prétraité et leur observation par AFM dans une solution de Tris [Iazykov 2012].

Dans le dernier cas étudié, les lectines sont déposées sur du mica fonctionnalisé avec de l'APTES. Le protocole de silanisation du substrat est le suivant :

- Dans une boîte à gant sous azote, deux capuchons d'ependorf sont placés au centre d'une boîte de Pétri dans un dessiccateur sans sel ;
- Le substrat de mica est clivé plusieurs fois avant d'être placé dans la boîte de Pétri, près des capuchons ;
- 30 μL d'APTES (99 %) sont déposées dans un capuchon et 10 μL de NN-Diisopropyléthylamine (99,5 %) dans l'autre ;
- Le dessiccateur est refermé pour laisser la réaction se réaliser pendant 2h.

Un dépôt de 20 μL de lectines est fait à une concentration de 200 nmol/L avec du CaCl_2 à 0,3 $\mu\text{mol/L}$. L'échantillon est séché toute une nuit dans un dessiccateur avec des sels de silice pour être observer le lendemain dans une solution de Tris à 0,2 mmol/L.

La topographie de la surface de ces deux types d'échantillon de lectines est présentée sur la Figure III.38.

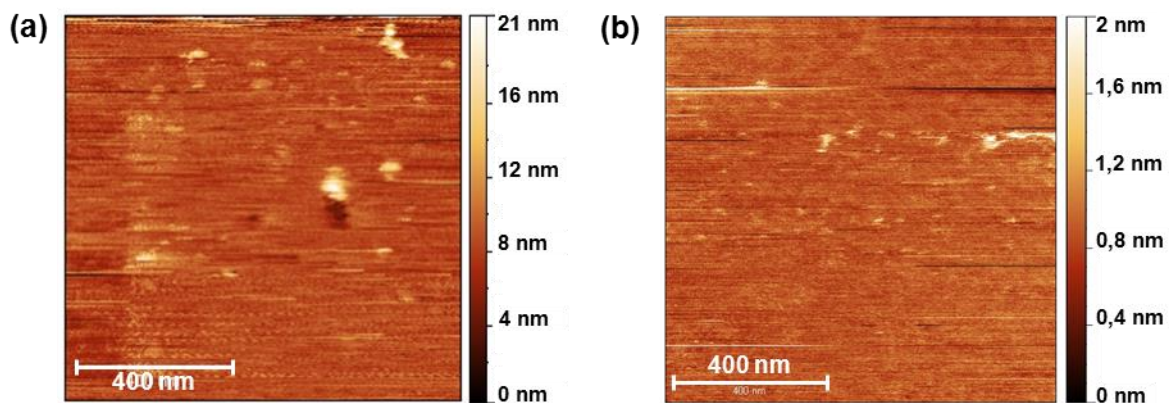


Figure III.38 Images AFM de $1 \times 1 \mu\text{m}$ des lectines PA-IL immobilisées sur la surface du mica (a) prétraitée avec du NiCl_2 dans de l'eau ultrapure et (b) fonctionnalisée avec de l'APTES dans une solution de Tris à 0,2 mM.

Dans les deux cas, aucun objet ou structure clairement identifiable n'est présent sur la surface même si on observe de la matière sur le substrat. La rugosité des images (a) et (b) est respectivement de 1,61 nm et 0,118 nm. La présence de CaCl_2 dans la solution de lectines peut avoir une influence sur l'immobilisation. Dans nos expériences, les conditions d'imagerie pour des images AFM de qualité acceptable demandent des rapports d'amplitude faibles, autour de 40 %. L'action de la pointe semble dégrader la surface.

On remarque, dans certains cas, pour les échantillons utilisant une immobilisation électrostatique des lectines ou avec prétraitement du mica par des ions Ni^{2+} , la présence sur les images de grande taille, de carré à l'emplacement des images réalisées précédemment (Figure III.39). Sur l'image AFM de $2 \mu\text{m}$ de côté, dans le cas d'une immobilisation électrostatique, on distingue deux carrés, l'un au centre de l'image et le début d'un autre en haut à gauche en plus de nombreux sauts de ligne.

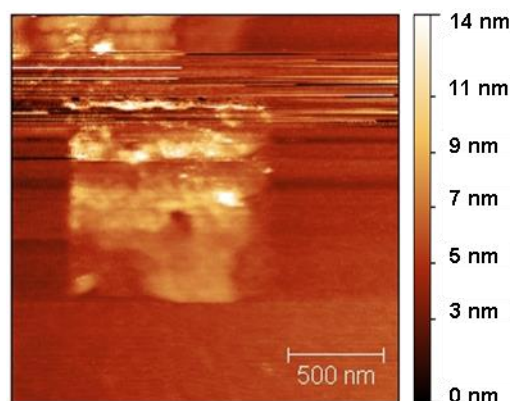


Figure III.39 Image AFM dans de l'eau ultrapure de lectines immobilisées électrostatiquement sur un substrat de mica non traité. Présence de carrés au centre et en haut à gauche provenant d'images précédentes.

Avec la quantité de lectine déposées sur la surface, il est possible que la pointe en accroche une ou plusieurs à son extrémité. Les images faites à de petites échelles sont réalisées à une vitesse plus faible que celle à grande échelle. La pointe passe plus de temps en chaque point. A chaque mouvement oscillant de la pointe vers la surface, la lectine accrochée à la pointe a une probabilité de se lier à la surface ou aux lectines immobilisées.

Les conditions expérimentales d'imagerie peuvent être aussi en cause. L'application de faibles amplitudes de travail par rapport à l'amplitude libre peut conduire à un phénomène de grattage de la surface. De la matière se dépose alors sur les extrémités du carré de balayage. Lors d'un scan de la surface à plus grande échelle, cette matière peut être déplacée à nouveau par la pointe (saut de ligne). Cependant, il semble que la pointe, lors du balayage, agisse aussi en positionnant les lectines sur la surface. Si elle les déplaçait seulement, les lectines seraient uniquement sur les contours de l'image AFM précédente. Or, dans le cas présent, les lectines sont dans toute la zone de balayage. Ce phénomène n'est pas compris à ce jour mais il met en évidence toute la difficulté d'observer des objets biologiques en solution.

Pour conclure sur cette étude, on peut dire que la détermination du milieu d'observation et la méthode d'immobilisation sont des choix importants dans l'observation de biomolécules par AFM en milieu liquide. L'ajout de solutions ioniques dans le milieu d'observation permet de diminuer la charge de surface du mica et ainsi favorise l'imagerie. Dans notre cas, l'eau ultrapure a été choisie comme solution d'observation, puisque les solutions ioniques testées ne montraient pas un avantage particulier, ni pour les lectines, ni pour la charge du mica.

Nous avons essayé d'immobiliser les lectines PA-IL sur le mica par trois méthodes différentes. Une seule, utilisant les cations Ca^{2+} présents dans la solution de lectines semble convenir à la fixation. Cependant, la concentration des lectines déposées sur la surface reste trop importante pour permettre une observation des objets individuels. Des expériences avec une concentration plus faible sont à envisager. Cette étude sur l'observation des lectines démontre qu'il ne suffit pas seulement de transposer les méthodes d'immobilisation et d'observation développées dans la littérature sur d'autres systèmes pour parvenir à imager les lectines en solution.

En conclusion dans ce chapitre, nous avons vu en étude préliminaire que les lectines PA-IL avaient une forte tendance à interagir entre elles. L'interaction lectine/lectine est tout d'abord longitudinale puis latérale. Quand l'arrangement spatial en deux dimensions n'est possible, les lectines s'organisent en multicouches. Les ions Ca^{2+} , généralement utilisés pour favoriser l'interaction lectine/sucre, renforcent cette structuration. Il semble toutefois que ce type d'arrangement des lectines demande du temps pour s'établir.

Dans l'interaction avec le sucre, il apparaît que, même en faible quantité par rapport aux lectines, le sucre influence leur arrangement avec une réorganisation des couches supérieures autour des complexes lectine/sucre formés.

Pour nous intéresser plus particulièrement à l'interaction lectine/sucre, nous avons du faire évoluer notre protocole expérimental vers de faibles concentrations en lectine et en sucre afin de se soustraire à l'interaction lectine/lectine. A partir de trois glycoclusters différents, nous avons montré que l'arrangement de leur complexes formés avec la lectine PA-IL était influencé par le cœur et la nature des bras espaceurs du sucre. Pour le **sucre1**, les complexes s'associent en chélate agrégatif pour former des filaments. L'arrangement de la lectine avec le **sucre2** présente une large structure dentelée avec des branches sinueuses. Enfin, avec le **sucre3**, la structuration des complexes semble compacte avec un large ensemble allongé sur la surface du substrat.

Pour terminer, nous avons souhaité observer les lectines PA-IL en milieu liquide. Nous avons appliqué plusieurs méthodes d'immobilisation décrites dans la littérature pour fixer les lectines à notre substrat de mica. Notre système biologique semble toutefois être trop complexe pour transposer les techniques d'immobilisation usuelles.

Références

- Al-Shakhshir R. H., Regnier F. E., White J. L. et Hem S. L., Contribution of electrostatic and hydrophobic interactions to the absorption of proteins by aluminium-containing adjuvants, *Vaccine*, 1995, **13**, 1, 41-44.
- Audry, M.-C., Etude par AFM à sonde colloïdale de l'adhésion entre surfaces rugueuses en milieu aqueux et de l'amplification du transport électrocinétique par le glissement interfacial, Thèse, 2009, Université de Lyon, Lyon, France.
- Avichezer D., Katcoff D. J., Garber N. C. et Gilboa-Garber N., Analysis of the amino acid sequence of the *Pseudomonas aeruginosa* galactophilic PA-I lectin, *J. Biol. Chem.*, 1992, **267**, 32, 23023-23027.
- Bustamante C., Rivetti C. et Keller D. J., Scanning force microscopy under aqueous solutions, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 1997, **7**, 709-716.
- Cecioni S., Lalor R., Blanchard B., Praly J.-P., Imberty A., Matthews S. E. et Vidal S., Achieving high affinity towards a bacterial lectin through multivalent topological isomers of calix[4]arene glycoconjugates, *Chem. Eur. J.*, 2009, **15**, 13232-13240.
- Cecioni S., Faure S., Darbost U., Bonnamour I., Parrot-Lopez H., Roy O., Taillefumier C., Wimmerová M., Praly J.-P., Imberty A. et Vidal S., Selectivity among two lectins: probing the effect of topology, multivalency and flexibility of "cliked" multivalent glycoclusters, *Chem. Eur. J.*, 2011a, **17**, 2146-2159.
- Cecioni S., Oerthel V., Iehl J., Holler M., Goyard D., Praly J.-P., Imberty A., Nierengarten J.-F. et Vidal S., Synthesis of dodecavalent fullerene-based glycoclusters and evaluation of their binding properties towards a bacterial lectin, *Chem. Eur. J.*, 2011b, **17**, 3252-3261.
- Cecioni S., Praly J.-P., Matthews S. E., Wimmerová M., Imberty A. et Vidal S., Rational design and synthesis of optimized glycoclusters for multivalent lectin-carbohydrate interactions: influence of the linker arm, *Chem. Eur. J.*, 2012, **18**, 6250-6263.
- Dam T. K., Roy R., Das S. K., Oscarson S. et Brewer C. F., Binding of multivalent carbohydrates to Concanavalin A and *Dioclea grandiflora* lectin, *J. Biol. Chem.*, 2000, **275**, 19, 14223-14230.
- Davies E., Teng K. S., Conlan R. S. et Wilks S. P., Ultra-high resolution imaging of DNA and nucleosomes using non-contact atomic force microscopy, *FEBS Lett.*, 2005, **579**, 1702-1706.
- Dong M., Xu S., Oliviera C. L. P., Pedersen J. S., Thiel S., Besenbacher F. et Vorup-Jensen T., Conformational changes in mannan-binding lectin bound to ligand surfaces, *J. Immunol.*, 2007, **178**, 3016-3022.
- Gilboa-Garber N., *Pseudomonas aeruginosa* lectins, *Method. Enzymol.*, 1982, **83**, 378-385.
- Gour N. et Verma S., Synthesis and AFM studies of lectin-carbohydrate self-assemblies, *Tetrahedron*, 2008, **64**, 7331-7337.
- Hansma H. G. et Laney D. E., DNA binding to mica correlates with cationic radius: assay by atomic force microscopy, *Biophys. J.*, 1996, **70**, 1933-1939.
- Imberty A., Wimmerová M., Mitchell E. P. et Gilboa-Garber N., Structures of the lectins from *Pseudomonas aeruginosa*: insights into the molecular basis for host recognition, *Microbes Infect.*, 2004, **6**, 221-228.
- Iazykov M., Sicard D., Chevolut Y., Souteyrand E., Skryshevsky V. A., Pourceau G., Vasseur J. J., Morvan F. et Phaner-Goutorbe M., Self-assembly architectures of new DNA-based structures in air and in liquids analyzed by atomic force microscopy, *Int. J. Nanosci.*, 2012, **11**, 4, 1240017.
- Israelachvili, J., Intermolecular & surface force, *Academic Press*, 2nd edition, 1991.

- Kimura T., Imai Y. et Irimura T., Calcium-dependent conformation of a mouse macrophage calcium-type lectin, *J. Biol. Chem.*, 1995, **270**, 27, 16056-16062.
- Kirby B. J. et Hasselbrink E. F., Zeta potential of microfluidic substrates: 1. Theory, experimental techniques, and effects on separations, *Electrophoresis*, 2004, **25**, 187-202.
- Klein D. C. G., Stroh C. M., Jensenius H., Van Es M., Kamruzzahan A. S. M., Stamouli A., Gruber H. J., Oosterkamp T. H. et Hinterdorfer P., Covalent immobilization of single proteins on mica for molecular recognition force microscopy, *ChemPhysChem*, 2003, **4**, 1367-1371.
- Klein S. D. et Bates R. G., Conductance of Tris(hydroxymethyl)-aminomethane Hydrochloride (Tris-HCl) in water at 25 and 37°C, *J. Solution Chem.*, 1980, **9**, 4, 289-292.
- Lameignere E., Shiao T. C., Roy R., Wimmerová M., Dubreuil F., Varrot A. et Imberty A., Structural basis of the affinity for oligomannosides and analogs displayed by BC2L-A, a *Burkholderia cenocepacia* soluble lectin, *Glycobiology*, 2010, **20**, 1, 87-98.
- Lyubchenko Y. L., Preparation of DNA and nucleoprotein samples for AFM imaging, *Micron*, 2011, **42**, 196-206.
- Maciel J. S., Kosaka P. M., de Paula R. C. M., Feitosa J. P. A. et Petri D. F. S., Formation of cashew gum thin films onto silicon wafers or amino-terminated surfaces and the immobilization of Concanavalin A on them, *Carbohydr. Polym.*, 2007, **69**, 522-529.
- Mori O. et Imae T., AFM investigation of the adsorption process of bovine serum albumin on mica, *Colloid Surface B*, 1997, **9**, 31-36.
- Müller D. J., Engel A. et Amrein M., Preparation techniques for the observation of native biological systems with the atomic force microscope, *Biosens. Bioelectron.*, 1997a, **12**, 8, 867-877.
- Müller D. J. et Engel A., The height of biomolecules measured with the atomic force microscope depends on electrostatic interactions, *Biophys. J.*, 1997b, **73**, 1633-1644.
- Murray P. A., Kern D. G. et Winkler J. R., Identification of galactose-binding lectin on *Fusobacterium nucleatum* FN-2, *Infect. Immun.*, 1988, **56**, 5, 1314-1319.
- Nagahori N., Niikura K., Sadamoto R., Taniguchi M., Yamagishi A., Monde K. et Nishimura S.-I., Glycosyltransferase microarray displayed on the glycolipid LB membrane, *Adv. Synth. Catal.*, 2003, **345**, 729-734.
- Nishimura S., Scales P. J., Tateyama H., Tsunematsu K. et Healy T. W., Cationic modification of muscovite mica: an electrokinetic study, *Langmuir*, 1995, **11**, 291-295.
- Pourceau, G., Mise au point de nouvelles méthodes de conjugaison oligonucléotide/sucre et développement d'un microsystème d'analyse des interactions lectine/sucre, Thèse, 2010, Université Montpellier 2, Montpellier, France.
- Raab A., Han W., Badt D., Smith-Gill S. J., Lindsay S. M., Schindler H. et Hinterdorfer P., Antibody recognition imaging by force microscopy, *Nat. Biotechnol.*, 1999, **17**, 902-905.
- Riener C. K., Stroh C. M., Ebner A., Klampfl C., Gall A. A., Romanin C., Lyubchenko Y. L., Hinterdorfer P. et Gruber H. J., Simple test system for single molecule recognition force microscopy, *Anal. Chim. Acta*, 2003, **479**, 59-75.
- Sacchettini J. C., Baum L. G. et Brewer C. F., Multivalent protein-carbohydrate interactions. A new paradigm for supermolecular assembly and signal transduction, *Biochemistry*, 2001, **40**, 10, 3009-3015.
- Sader J. E., Parallel beam approximation for V-shaped atomic force microscope cantilevers, *Rev. Sci. Instrum.*, 1995, **66**, 9, 4583-4587.

Scales P. J., Healy T. W. et Evans D. F., The Zeta potential of muscovite mica : counterion complexation by a macrocyclic ligand, *J. Colloid Interf. Sci.*, 1988, **124**, 2, 391-395.

Schabert F. A. et Engel A., Reproducible acquisition of *Escherichia coli* porin surface topographs by atomic force microscopy, *Biophys. J.*, 1994, **67**, 2394-2403.

Sicard D., Cecioni S., Iazykov M., Chevotot Y., Matthews S., Praly J.-P., Souteyrand E., Imbert A., Vidal S. et Phaner-Goutorbe M., AFM investigation of *Pseudomonas aeruginosa* lectin LecA (PA-IL) filaments induced by multivalent glycoclusters, *Chem. Commun.*, 2011, **47**, 9483-9485.

Sides P. J., Faruqui D. et Gellman A. J., Dynamics of charging of muscovite mica: measurement and modeling, *Langmuir*, 2009, **25**, 1475-1481.

Stadelmann T. O., Antidot superlattices in InAs–GaSb double heterostructures: transport studies, Thèse, 2006, Trinity Term, University College, Oxford, UK.

Van Oss C. J., Wu W. et Giese R. F., Proteins at interfaces II, Fundamentals and applications, Horbett, T. A. et Brash, J. L., *ACS Symp. Ser.*, **602**, American Chemical Society, 1995, Chap 6, 81-90.

Waner M. J., Gilchrist M., Schindler M. et Dantus M., Imaging the molecular dimensions and oligomerization of proteins at liquid/solid interfaces, *J. Phys. Chem. B*, 1998, **102**, 1649-1657.

Weisenhorn A. L., Khorsandi M., Kasas S., Gotzos V. et Butt H.-J., Deformation and height anomaly of soft surfaces studied with an AFM, *Nanotechnology*, 1993, **4**, 106-113.

Conclusion générale et perspectives

Pour lutter contre les infections persistantes de la bactérie *Pseudomonas aeruginosa* chez les patients immunodéprimés, une nouvelle approche thérapeutique est en cours de développement basée sur l'inhibition de l'interaction lectine/glycoconjugué des cellules épithéliales. Notre équipe de recherche, en collaboration avec les équipes de Jean-Pierre Praly (Institut de Chimie et Biochimie Moléculaire, Université de Lyon) et de Jean Jacques Vasseur (Institut des Biomolécules Max Mousseron, Université de Montpellier) a travaillé sur l'élaboration de glycoclusters et sur la caractérisation de leur interaction avec la lectine PA-IL.

Dans ce contexte, il nous a paru que les méthodes de caractérisation employées généralement pour caractériser l'interaction lectine/sucre ne permettaient pas de visualiser directement les complexes formés. Nous avons donc souhaité étudier la formation de ces complexes et leur arrangement à l'aide de la microscopie à force atomique. Toutes nos images ont été réalisées en mode AM-AFM pour ne pas dégrader les systèmes biologiques étudiés.

Dans ce travail de thèse, nous avons, dans un premier temps, observé la lectine PA-IL seule, sans l'interaction avec le sucre. Les images AFM de cette étude préliminaire ont permis de mettre en évidence un phénomène d'interaction lectine/lectine. Dans la littérature, ce phénomène est évoqué sans pour autant être expliqué ou caractérisé. A travers une étude à deux concentrations différentes de lectines, nous avons pu établir un schéma-type pour l'interaction lectine-lectine. Les lectines semblent s'assembler tout d'abord par une interaction longitudinale puis latérale. Enfin, quand l'arrangement en deux dimensions n'est plus possible spatialement, les lectines se structurent en forme de couches auto-organisées.

En recherchant les conditions expérimentales adéquates à l'observation des complexes lectine/glycocluster, il nous a paru que, même en très faible proportion par rapport à la quantité de lectine, le sucre avait une influence sur l'interaction lectine/lectine observée dans l'étude préliminaire. Nous avons expliqué ce phénomène par la réorganisation des lectines autour des complexes lectine/sucre formés.

A partir de trois glycoclusters différents, nous avons pu démontrer que l'allure de l'arrangement des complexes formés avec la lectine PA-IL était directement influencée par la structure du cœur du glycocluster et par la nature de ses bras espaceurs. Le **sucre1** permet de créer des structures 1D en filament avec la formation de complexe en chélate agrégatif. L'arrangement avec le **sucre2** donne une large structure dentelée avec des branches sinueuses. Enfin, les bras espaceurs rigides du **sucre3** semblent être à l'origine d'un assemblage compact des complexes. En nous appuyant sur les valeurs de stœchiométrie estimées par ITC pour chaque interaction, nous avons présenté plusieurs types d'association moléculaire susceptibles d'intervenir dans la formation des complexes lectine/glycocluster. La modélisation

moléculaire de ces associations nous permettrait toutefois de réduire le nombre d'associations proposées.

La microscopie à force atomique semble être une technique d'analyse adaptée si on contrôle les conditions d'imagerie. Nous avons réalisé nos images en mode contact intermittent à modulation d'amplitude en choisissant l'amplitude de travail la mieux adaptée, le rapport amplitude de travail sur amplitude libre le plus élevé pour que la pointe ait une interaction faible avec les objets biologiques fragiles et déformables. Dans ces conditions, nous avons réussi à atteindre une très bonne résolution en particulier sur les arrangements filaires où il a été possible de distinguer la position des lectines à l'intérieur même des filaments.

En dernière étude, nous avons souhaité observer en milieu liquide la lectine PA-IL. Nous avons appliqué à notre système biologique les méthodes d'immobilisation et les conditions expérimentales décrites dans la littérature pour l'observation en milieu liquide d'objets biologiques tels que l'ADN ou les protéines. Les résultats expérimentaux semblent indiquer que notre système est beaucoup trop complexe pour nous permettre de transposer directement les méthodes développées dans la littérature. Cette étude mériterait d'être approfondie afin de développer un protocole expérimental adapté pour parvenir, à terme, à imager les complexes lectine/glycocluster en milieu liquide.

Notre étude sur l'arrangement des complexes lectine/sucre par AFM présente un large choix de perspectives. Tout d'abord, l'étude peut être complétée avec l'observation d'autres sucres tétravalents. Dans le cas du glycocluster avec un cœur en calix[4]arène par exemple, seule la conformation 1,3-alterné a été étudiée. L'observation des autres conformations peut être envisagée. L'influence de la nature des bras espaceurs peut être ensuite plus spécifiquement analysé en comparant deux sucres de même cœur mais ayant des bras espaceurs différentes. Dans cette thèse, nous n'avons pas abordé l'influence de la valence sur les arrangements. Cela peut être un sujet d'étude intéressant.

On peut envisager aussi des expériences plus complexes où les trois sucres sont introduits dans une solution puis mis en interaction avec la lectine. On peut se poser la question de l'influence de la structuration des sucres et surtout de leur affinité respectivement avec la lectine sur l'arrangement des complexes.

Au delà de l'imagerie, la microscopie à force atomique permet de caractériser l'interaction lectine/sucre en mesurant la force d'interaction entre les deux entités par spectroscopie. Cette étude apporterait alors une nouvelle méthode de caractérisation de l'interaction.

Pour revenir au contexte scientifique dans lequel s'inscrit ce travail de thèse, des glycomimétiques sont actuellement en cours d'analyse *in vivo* pour valider leur potentiel thérapeutique. Il faut toutefois prendre en compte que la lectine PA-IL n'est qu'un des facteurs de virulence impliqués dans le processus d'adhésion de *P. aeruginosa* aux cellules épithéliales. Un travail doit être effectué à la fois pour déterminer les autres facteurs de virulence et aussi pour élaborer, caractériser et valider *in vivo* les molécules susceptibles d'inhiber leurs actions. Un projet de recherche est déjà en cours pour le cas de la lectine PA-IIL de la bactérie. Le chemin est toutefois encore bien long pour parvenir à la molécule ou à l'ensemble de molécules susceptibles d'agir sur l'adhésion de la bactérie aux cellules épithéliales.

Notre étude par AFM sur les arrangements des complexes lectine/sucre ne permet pas d'agir directement sur l'élaboration de ces molécules médicamenteuses mais elle permet toutefois apporter un point de vue fondamental innovant sur la compréhension de la formation des complexes.

Caractérisation par microscopie à force atomique des arrangements protéine/sucre impliquant la lectine PA-IL de la bactérie *Pseudomonas aeruginosa*

Résumé

La bactérie *Pseudomonas aeruginosa* est un pathogène opportuniste responsable de graves infections chez les personnes affaiblies immunitairement. Présentant des souches résistantes aux antibiotiques, une nouvelle approche thérapeutique est en cours de développement avec pour objectif l'inhibition des facteurs de virulence de la bactérie. Lors de son processus d'infection, le pathogène utilise les lectines pour reconnaître et se lier de manière spécifique aux glycoconjugués des cellules-hôtes en formant une interaction lectine/glycoconjugué. Plus particulièrement, la lectine PA-IL, spécifique du galactose, a été étudiée. A l'aide de glycomimétique, il semble possible de bloquer l'action de la lectine en créant une interaction lectine/glycomimétique. Pour développer cette approche, de nombreux glycoclusters ont donc été élaborés et leur affinité avec la lectine PA-IL a été évaluée par plusieurs méthodes de caractérisation (SPR, HIA, ELLA, puce à sucre,...).

Dans ce projet de thèse, nous avons cherché à visualiser par microscopie à force atomique (AFM) l'arrangement des complexes lectine PA-IL/glycocluster formés pour trois glycoclusters différents. Nous avons ainsi pu montrer l'influence du cœur du glycocluster et des bras-espaceurs sur l'arrangement des complexes. Suivant le glycocluster, l'arrangement prend la forme de filaments 1D, de structures dentelées avec des bras sinueux ou encore de larges structures compactes. Dans le cas des filaments, la résolution de nos images AFM nous a permis d'identifier les lectines à l'intérieur même de la structure filaire. Nous avons aussi démontré, en observant les lectines seules, l'existence d'une interaction lectine/lectine. De plus, des expériences ont été menées pour déterminer les conditions expérimentales appropriées à leur observation à l'air et en milieu liquide.

Mots clé : Microscopie à Force Atomique, Modulation en Amplitude, Lectine PA-IL, *Pseudomonas aeruginosa*, Glycocluster, Complexe Lectine/Sucre, Arrangement Moléculaire, Interaction Lectine/Lectine

Characterisation by atomic force microscopy of protein/glycocluster arrangement involving lectin PA-IL of *Pseudomonas aeruginosa* bacteria

Abstract

The bacterium *P. aeruginosa* is an opportunistic pathogen responsible for serious infections in immunocompromised patients. It also develops some strains resistant to antibiotics. A new approach is developed to inhibit virulence factors of the bacterium. During the process of infection, the pathogen uses lectins to recognize and bind specifically to glycoconjugates of the host cells forming a lectin/glycoconjugate complex. Particularly, the lectin PA-IL, specific to galactose, was studied. Using glycomimetics, it seems possible to block the action of the lectin by creating lectin/glycomimetic interaction. To develop this approach, many glycoclusters were designed and their affinity with lectin PA-IL was evaluated by various characterization techniques (SPR, HIA, ELLA, microarrays,...).

In this thesis project, we have tried to visualize by Atomic Force Microscopy (AFM) the arrangement of lectin PA-IL/glycocluster complexes with three different glycoclusters. Our results show the influence of the glycocluster core and the linker on the arrangement of complexes. Depending on glycocluster, the arrangement takes the form of 1D filaments, 2D "pinked" structures with sinuous branches or large compact structures. In the case of filaments, the resolution of AFM images allows us to identify lectins along the filament. We also demonstrated the existence of lectin/lectin interactions at high concentration of lectin. In addition, some experiments were performed to determine sample preparation techniques to observe lectins in air and in liquid.

Keywords: Atomic Force Microscopy, Amplitude Modulation-AFM, Lectin PA-IL, *Pseudomonas aeruginosa*, Glycocluster, Lectin/Glycocluster Complex, Molecular Arrangement, Lectin/Lectin Interaction
