

Petite Classe n° 5
Vendredi 14 Octobre 2016

Caractérisation de complexes d'adhésion : rupture sous traction contrôlée

1 Contexte

Au sein de milieux biologiques de nombreuses fonctions d'adhésion entre objets sont assurées de façon spécifique par des couples de molécules présentant chacune une extrémité capable de s'associer avec celle de l'autre. On parle parfois de couple ligand-récepteur (Figure 1).

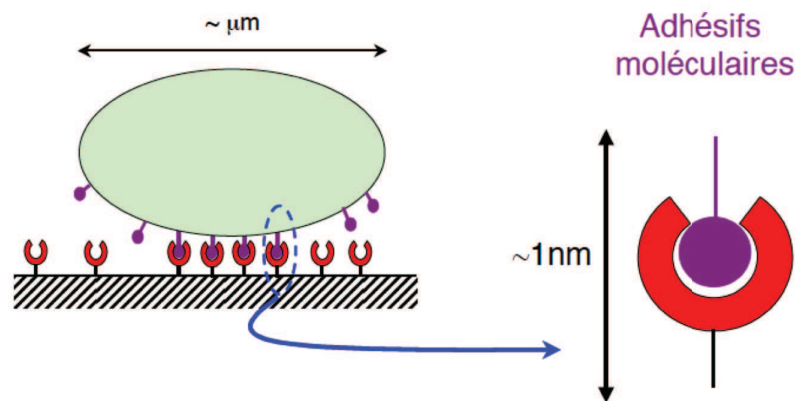


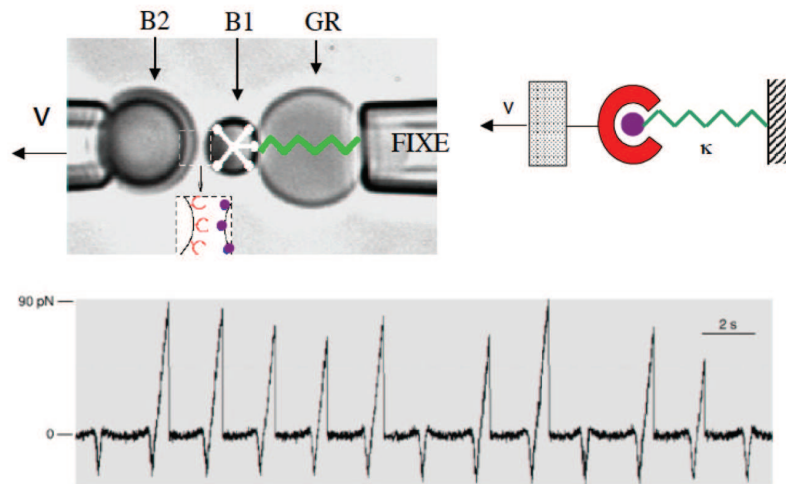
FIGURE 1 – Description schématique à droite d'un "adhésif moléculaire" constitué par un couple récepteur-ligand (ligand représenté par la boule, récepteur représenté par la cavité sphérique). Les interactions spécifiques entre ces deux molécules permettent à ces couples d'assurer des fonctions d'adhésion entre objets beaucoup plus gros, par exemple d'une cellule sur une surface (schématisé à gauche).

1. A votre avis quel est un ordre de grandeur raisonnable pour l'énergie d'interaction attractive entre le ligand et le récepteur ? Pourquoi ?

2 Expériences

Différents types d'expériences de type "molécule unique" ont été développées pour mesurer la "force" de ce type de complexes d'adhésion ligand-récepteur. L'une d'entre elles est décrite sur la figure 2 : à température ambiante, on tire avec un objet mou (ici un globule rouge) sur une liaison unique et en observant la déformation de cet objet au cours du temps, on peut mesurer la force à laquelle la liaison ligand-récepteur cède.

2. A votre avis quelle précaution faut-il prendre pour mesurer l'effet d'une liaison unique ? Pourquoi certains des essais ne donnent-ils aucune force positive ?



* R. Merkel, P. Nassoy, A. Leung, K. Ritchie, and E. Evans, Nature 397, 50 (1999).

FIGURE 2 – Principe de l'expérience : une bille colloïdale B1 (diamètre typique $1 \mu\text{m}$) couverte de ligand est attachée à un globule rouge élastique GR (schématisé par un ressort à droite, de rigidité typique 0.5 pN/nm). La bille opposée B2 porte des récepteurs et peut être déplacée de façon contrôlée. Notez que les billes sont beaucoup plus grandes que les molécules étudiées. En bas : exemple d'une série d'expériences de traction successives. On mesure la position de la bille B1, qui donne une indication de l'extension du globule rouge et donc de la force exercée sur la liaison. Cette force est ici reportée en ordonnée, en fonction du temps en abscisse. Le protocole expérimental est le suivant : on approche d'abord B2 de B1 en déplaçant B2 vers la droite. On observe le contact par le fait que B1 se déplace vers la droite (force négative, compression du globule rouge). Ensuite on tire B2 vers la gauche à une vitesse constante V . B1 est alors entraînée vers la gauche (forces positives, le GR est étendu), jusqu'à l'évènement de rupture où B1 revient rapidement à sa position de repos (force nulle, GR au repos). Ce protocole est répété 13 fois sur cette figure.

3. Après rupture la bille B1 semble revenir presque instantanément à sa position d'équilibre, bien que l'expérience soit conduite dans un milieu visqueux : l'eau. Estimez le temps de retour pour justifier cette observation ?
4. La valeur de la force à la rupture varie d'une expérience à l'autre (Figure 2 bas). A votre avis pourquoi ? L'ordre de grandeur des forces mesurées sur cette figure vous paraît-il raisonnable ?
Du fait de cette variabilité, on répète l'expérience un grand nombre de fois et on collecte ainsi la distribution (ou l'histogramme) des forces de rupture, pour une vitesse de traction V donnée. Un des intérêts de cette expérience est de montrer que le résultat obtenu dépend très fortement de V .

3 Modèle

Pour interpréter les données recueillies, on décrit le système par la distance x entre le récepteur et le ligand. En l'absence de force, le ligand voit un potentiel $E(x)$ schématisé sur la Figure 3 à gauche. La position énergétiquement la plus favorable (le puits de potentiel) correspond au ligand lié au récepteur. Pour le détacher il faut franchir une barrière de hauteur ΔE dont le maximum est situé à une distance δ du minimum. Ensuite le potentiel retombe à zéro.

5. Comment k_0 , le taux spontané de dépiégeage par unité de temps d'un couple ligand- récepteur, dépend-il de la barrière énergétique ΔE ?
6. Si on applique une force de traction f sur le couple ligand-récepteur, comment cela modifie-t-il le potentiel $E(x)$ de la figure 3 ? Quel est le taux de dépiégeage $k(f)$ pour des forces pas trop grandes ?

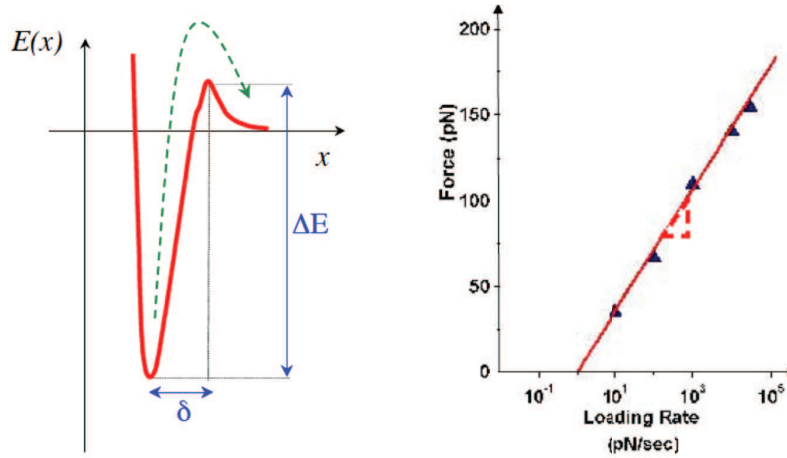


FIGURE 3 – A gauche : potentiel modèle en fonction de la position x du ligand par rapport au récepteur fixe. A droite : données expérimentales pour le ligand P-sélectine (triangles). La force typique de rupture (pic de la distribution des forces mesurées) est tracée en fonction du logarithme de la vitesse de traction, $\log_{10} r$ (la séquence de force est $f(t) = rt$). La ligne continue est un guide pour l'oeil.

Dans une expérience où on a un ligand attaché à l'instant $t = 0$, on applique sur celui-ci une séquence de force $f(t)$, et on cherche à calculer la probabilité $P(t)$ que ce ligand soit encore attaché à l'instant t .

7. Ecrire l'équation d'évolution de $P(t)$, et la condition initiale correspondante.

On définit maintenant $\Pi(t)$ la densité de probabilité de détachement, c'est à dire par définition : $\Pi(t)dt$ est la probabilité que le ligand se détache entre t et $t + dt$.

8. Quelle est la relation entre $\Pi(t)$ et $P(t)$? Comment obtenir à partir de $\Pi(t)$ le temps moyen de dépiégeage $\langle t \rangle$? Comment obtenir à partir de $\Pi(t)$ le temps de dépiégeage le plus probable t^* ?
9. Si on applique une force constante $f > 0$ pour $t > 0$, quel est le temps de dépiégeage moyen $\langle t \rangle$ et quel est le temps de dépiégeage le plus probable t^* ?

On suppose maintenant, plus conformément à l'expérience décrite sur la figure 3, que la séquence de force est fixée en déplaçant à une vitesse relative V un des éléments relié au ligand par un élément élastique de raideur κ (le globule rouge). La force imposée au ligand suit ainsi une rampe linéaire de force $f(t) = \kappa Vt = rt$, où l'on a introduit la notation $r = \kappa V$.

10. Calculer la distribution $\Pi(t)$ des temps de détachement. Vous pourrez utiliser la notation $\tau = (k_B T)/(r\delta)$; Montrez que τ a bien les dimensions d'un temps.
11. Montrez que si la rampe de force est lente, c'est à dire pour r plus petit qu'une valeur r_c que vous déterminerez, le temps de détachement le plus probable est $t^* = 0$. Montrez que pour des rampes plus rapides $r > r_c$, ce temps de détachement le plus probable a une valeur finie $t^* = \tau \log(\frac{r\delta}{k_0 k_B T})$.

A partir de mesures comme celles décrite en Figure 2, on peut obtenir pour chaque valeur de r la distribution des forces de détachement, et donc déterminer la force de détachement la plus probable f^* en fonction de r . Un résultat typique (pour un couple ligand récepteur donné) est tracé sur la figure 3 à droite, sous la forme f^* en fonction du logarithme de r .

12. Montrez que le résultat expérimental (les triangles sur le graphique) est en accord avec le modèle développé ci-dessus. Montrez que l'on peut en conséquence déterminer à partir de cette expérience les paramètres δ et k_0 .
13. Calculez ces deux paramètres pour les données de la figure 3 droite. Commentaire sur les valeurs obtenues?