

Études des forces d'interaction entre *Staphylococcus aureus* et fibrinogène par microscopie à force atomique

Etudiant

Olivier Thorens

Tuteur

Dr. Sandor Kasas
LPMV, EPFL

Co-tuteur

Giovanni Longo
LPMV, EPFL

Lausanne, décembre 2011

Table des matières

1.0	Introduction.....	3
1.1	Le microscope à force atomique.....	3
	(Atomic Force Microscope, AFM).....	3
1.1.1	Généralités et principes de fonctionnement.	3
1.1.2	Force spectroscopy (spectroscopie de force) et autres modes d'utilisation de l'AFM.....	4
1.2	Staphylococcus aureus (S. aureus)	7
1.2.1	Généralités.....	7
1.2.2	MSCRAMM's et ClfA.....	7
1.3	But du projet de recherche.....	7
2.0	Méthode.....	8
2.1	Tests d'adhérence en phase solide.....	8
2.1.1	Matériel.....	9
2.1.2	Marche-à-suivre.....	9
2.2	Force spectroscopy.....	10
2.2.1	Matériel.....	10
2.2.2	Marche-à-suivre.....	10
2.3	Mise en culture des bactéries.....	11
3.0	Résultats.....	12
3.1	Résultats des tests d'adhérence.....	12
3.2	Résultats de la Force spectroscopy	13
3.2.1	Fixation des bactéries vivantes au support de l'échantillon.....	13
3.2.2	Expériences préliminaires.....	13
3.2.3	Forces d'interaction entre fibrinogène et bactéries.....	15
4.0	Commentaires et discussion.....	15
5.0	Conclusions.....	15
	Bibliographie.....	16

1.0 Introduction

1.1 Le microscope à force atomique (Atomic Force Microscope, AFM)

1.1.1 Généralités et principe de fonctionnement¹

L'AFM est un microscope développé en 1986² à partir du microscope à effet tunnel (Scanning tunneling microscope), inventé, lui, en 1981 par des chercheurs d'IBM.³

L'AFM est un type de microscope comportant une sonde scannant un échantillon en s'approchant ou en entrant en contact direct ou indirect avec cet échantillon. L'AFM permet, selon son mode d'utilisation, de faire une topographie de l'échantillon ainsi que de mesurer des forces d'interaction entre la sonde et l'échantillon.

La sonde de l'AFM consiste en un levier cantique au bout duquel se trouve une pointe très fine (Fig. 1.1) de forme pyramidale dont la base fait environ 4 μm de coté et le sommet environ 50nm de rayon de courbure (sur l'exemple). La constante de raideur des leviers cantiques varie de 1 à 0.01 N/m.

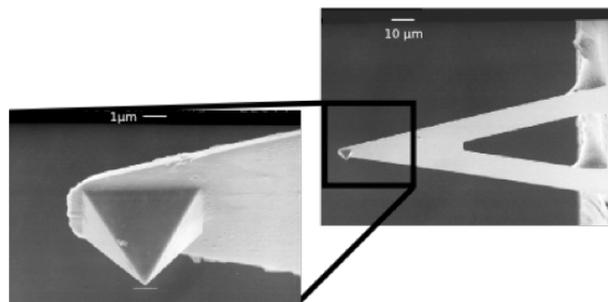


Figure 1.1 : L'image de droite montre un levier quantique. L'image de gauche est un grossissement montrant la pointe du levier qui entre en contact avec l'échantillon. Image tirée de la thèse de Charles Roduit.⁴

Au contact de l'échantillon, la pointe de l'AFM exerce une force sur celui-ci qui est déterminée en contrôlant l'inflexion du levier. Le système le plus couramment utilisé pour contrôler l'inflexion est basé sur un laser pointant le bout du levier dont le faisceau se réfléchit sur une photodiode comportant 2 ou 4 segments (Fig. 1.2). Lorsque le levier est dans une position neutre, le faisceau du laser frappe le centre de la photodiode. Lorsque le levier s'infléchit (vers le haut ou le bas) l'angle de réflexion du laser se modifie et le faisceau frappe une position différente de la photodiode, un segment plus qu'un autre. Le système informatique de l'AFM en déduit la déviation du faisceau laser et donc le

mouvement d'inflexion du levier. L'AFM est sensible à des mouvements d'inflexion du levier de moins de 0.1 Angström.

Le mouvement du levier est contrôlé par un scanner piézo-électrique qui modifie la position horizontale et verticale soit du levier ou de l'échantillon. Le mode de contrôle est dépendant du type d'AFM.

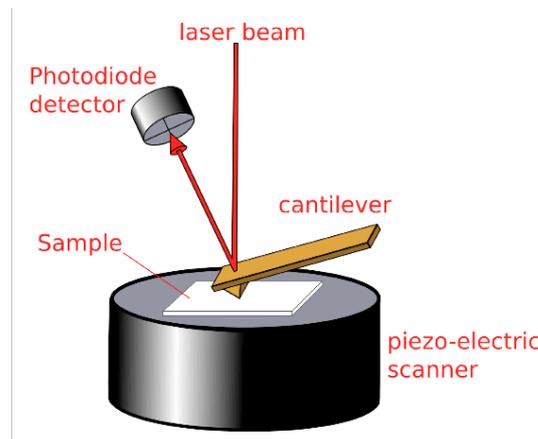


Figure 1.2 : Schéma du fonctionnement de l'AFM. Ici, le scanner piézo-électrique contrôle la position de l'échantillon qui est ainsi le seul élément mobile du système. Cantilever : levier quantique ; Sample : échantillon ; laser beam : rayon laser. Schéma crée par Charles Roduit. ⁴

1.1.2 Force spectroscopy (spectroscopie de force) et autres modes d'utilisation de l'AFM¹

Il existe différents modes d'utilisation de l'AFM.

Dans le « contact mode » le microscope maintient une force constante entre la pointe et la surface en ajustant la hauteur de l'échantillon (ou de la pointe selon l'AFM) avec le cristal piézo-électrique. En parallèle, les mouvements du piézo-électrique sont enregistrés et ces données permettent de reconstruire une topographie de l'échantillon.

Le « tapping mode » consiste à faire osciller la pointe près de la surface à examiner et à maintenir une amplitude d'oscillation du levier constante en agissant sur le piézo-électrique. Comme pour le « contact mode », les mouvements du piézo-électrique sont utilisés pour reconstruire la topographie de l'échantillon.

Le mode « Force spectroscopy » (ou force volume) est celui qui a été utilisé pour ce travail. Il a pour but de mesurer les forces d'interactions entre la et l'échantillon.

Le principe de fonctionnement est le suivant (Fig. 1.3): (1) la pointe est rapprochée de l'échantillon (2) et entre en contact avec celui-ci avec une force déterminée, (3) le levier s'infléchit alors vers le haut. Ceci constitue la phase d'approche. (4,5) La pointe est ensuite retirée et si elle colle à l'échantillon le levier s'infléchit vers le bas. (6) Dans un tel cas de figure, lorsque la force de

rétraction du levier dépasse la force d'adhésion entre la pointe et la surface de l'échantillon, la liaison casse, et le levier revient à sa position de repos. Ceci constitue la phase de rétraction. Les phases d'approche et de rétraction forment un cycle qui est répété de manière à scanner l'échantillon.

À chaque cycle, une courbe représentant l'inflexion du levier en fonction de l'extension du scanner (courbe force-distance) est enregistrée pour la phase d'approche et de rétraction. La courbe représente une force (l'inflexion du levier) en fonction d'une distance (l'extension ou la rétraction du piézo-électrique). En enregistrant des courbes force-distance successives sur l'échantillon, on obtient une cartographie des forces d'interaction entre la pointe et l'échantillon.

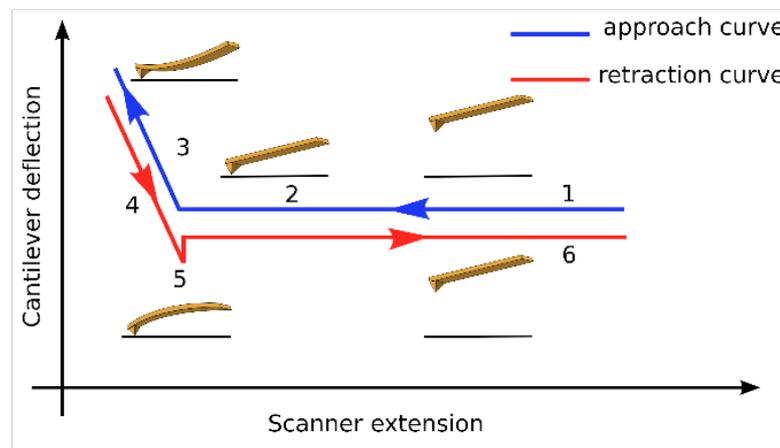


Figure 1.3 : Courbes d'approches et de rétraction de la pointe de l'AFM représentant l'inflexion du levier (et donc la force appliquée au levier) en fonction de la position verticale du scanner piézo-électrique (il s'agit donc d'une distance). Schéma crée et mis à disposition par Charles Roduit.⁴

Avec cette méthode il est possible de « fonctionnaliser » la pointe en lui fixant une protéine d'intérêt afin de tester sa force d'interaction avec l'échantillon, ou une protéine se trouvant sur l'échantillon (Fig. 1.4).

Prenons le cas où un ligand serait fixé à la pointe et un récepteur se trouverait sur l'échantillon. Lors de l'approche, le ligand se fixera au récepteur. La pointe est rapprochée à l'échantillon jusqu'à ce que le levier, de manière déterminée, marque une inflexion vers le haut. La pointe est ensuite rétractée et l'inflexion du levier diminue jusqu'à retrouver sa position de repos. Durant la rétraction de la pointe, le ligand et le récepteur, toujours liés, se déplient. Lorsque les protéines sont complètement dépliées, le levier, retenu par l'interaction entre le ligand et le récepteur, marquera une inflexion vers le bas. Lorsque la force de rétraction de la pointe dépasse la force d'interaction entre le ligand et son récepteur, ceux-ci se détachent et le levier revient à sa position de repos.

Afin de mesurer la force d'interaction entre la pointe et l'échantillon, la loi de Hooke est appliquée. Elle stipule que la force F [N] de traction ou de compression exercée sur un objet est égale à la déformation de l'objet Δl [m] multiplié par une constante d'élasticité k [N/m] qui est spécifique à chaque levier.

$$F = \Delta l \times k$$

En mesurant la distance verticale entre la position du levier juste avant le détachement entre la pointe et l'échantillon (lorsqu'il est encore en position neutre) et la position juste après le détachement (lorsqu'il est infléchi vers le bas), on obtient la déformation Δl (ou d sur la figure) du levier. Connaissant la constante d'élasticité k du levier, on peut ainsi savoir quelle était la force d'interaction entre la pointe et l'échantillon.

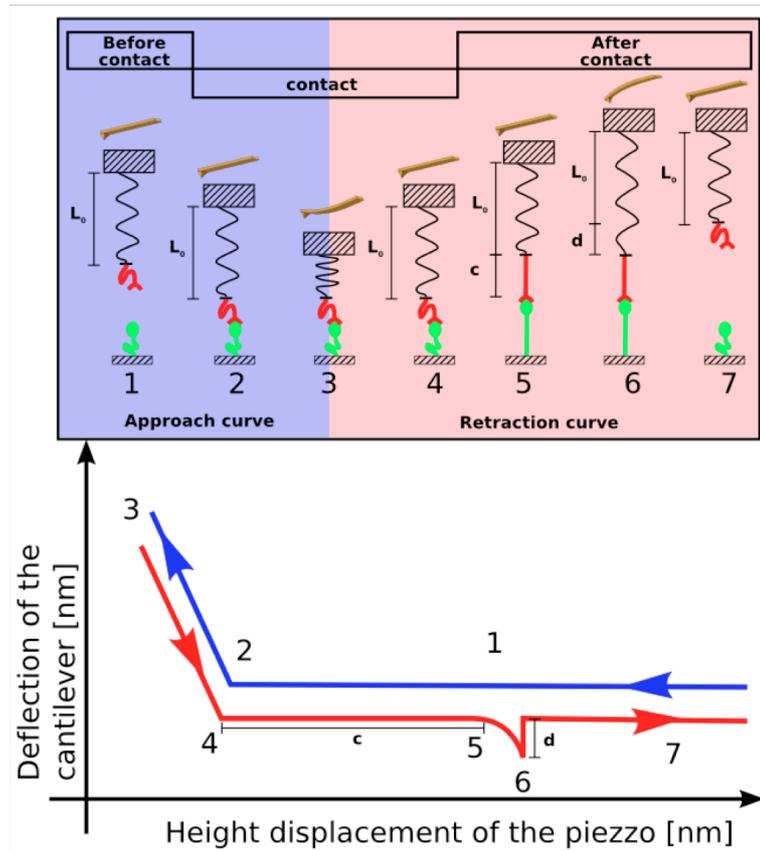


Figure 1.4 : Dans l'image du haut, le levier est représenté par un ressort de longueur L_0 au bout duquel est fixé un ligand (en rouge). Son récepteur (en vert) est fixé sur l'échantillon. La partie bleue de l'image représente la phase d'approche du cycle, la partie rouge la phase de rétraction. L'image est également séparée en trois parties, une première (à gauche) avant le contact entre la pointe et l'échantillon, une deuxième (au centre) pendant le contact et une troisième (à droite) après le contact.

L'image du bas représente la courbe force-distance résultante. La courbe bleue est la courbe d'approche et la rouge celle de rétraction.

(1) Pendant la phase d'approche, la pointe ne touche pas l'échantillon, le levier est dans sa position neutre. (2,3) Dès que la pointe entre en contact avec l'échantillon, le levier s'infléchit vers le haut et les protéines peuvent interagir entre elles. (3, 4) Pendant la phase de rétraction, l'inflexion du levier diminue. (5) Si le ligand et le récepteur interagissent entre eux, ils se déplient d'une certaine distance (c). (6) Le levier qui continue à se rétracter subit une force de traction croissante et s'infléchit donc vers le bas due à la force d'interaction entre le ligand et son récepteur. (7) Lorsque la force de rétraction du levier dépasse celle d'interaction entre le ligand et son récepteur, ces derniers se détachent et le levier retrouve alors sa position initiale. Schéma crée et mis à disposition par Charles Roduit.⁴

1.2 Staphylococcus aureus (S.aureus)

1.2.1 Généralités

S. aureus est une bactérie Gram positive pathogène opportuniste pour l'être humain.

Environ 20% de la population a une colonisation nasale permanente de S.aureus, environ 30% de manière transitoire. D'autres sites du corps peuvent être colonisés tels que l'aisselle, les creux axillaires, le tractus digestif, etc. Une colonisation constitue un réservoir qui, en cas de brèche des défenses de l'hôte, favorise l'apparition d'une infection.⁵ S. aureus est responsable de divers types d'infections tels qu'infections cutanées (impétigo, abcès sous-cutanés, cellulite, folliculite, infection de plaie, etc.), ostéomyélite, pneumonie, sepsis ou encore endocardite.⁶⁷

Le développement croissant de souches de S. aureus résistantes aux antibiotiques (bêta-lactames, vancomycine, etc.) rend le traitement des infections provoquée par S. aureus toujours plus difficile et l'intérêt pour de nouveaux traitements grandissant.³⁸

1.2.2 MSCRAMM's et ClfA

S. aureus possède une multitude de facteurs permettant son invasion dans l'hôte. Les MSCRAMMs (microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules) font partie de l'arsenal d'attaque de S. aureus. Ils permettent à S. aureus d'adhérer à différents composants de la matrice extracellulaire dont le fibrinogène, la fibronectine et différents types de collagène.⁹

Le Clumping factor A (ClfA) est une adhésine liant le fibrinogène présente à la surface des S. aureus et faisant partie des MSCRAMM's.¹⁰¹¹ Le ClfA possède un rôle important dans la pathogenèse des infections à S. aureus, en particulier dans les endocardites infectieuses. Il est donc une cible potentiellement intéressante et importante dans le développement de thérapie contre les infections à S. aureus.¹²¹³

1.3 But du projet de recherche

Ce travail s'inscrit dans le cadre d'un projet dont l'objectif est d'étudier les propriétés d'adhésion du ClfA au fibrinogène à l'aide de l'AFM. Plus précisément, le mode « Force spectroscopy » de l'AFM sera utilisé afin de mesurer les forces d'interactions entre le fibrinogène et le ClfA cloné à des bactéries ne comportant pas de MSCRAMMs et n'étant pas pathogène pour l'homme. Puis les forces d'interactions seront mesurées entre le fibrinogène et la surface des S. aureus.

Une meilleure connaissance des propriétés d'adhésion des S. aureus au ClfA contribuerait ainsi au développement de la recherche dans ce domaine et à de potentielle future thérapie contre les infections à S. aureus.

2. Méthode

Dans une première phase du travail, des tests *in vitro* d'adhérence en phase solide au fibrinogène de *S. aureus* Newman et de souches de *Lactococcus lactis* (*L.lactis*) comportant ClfA et ne comportant pas ClfA ont été effectués. *L.lactis* est une bactérie peu pathogène pour l'homme et ne comportant pas de MSCRAMMs. Le clonage du ClfA sur *L.lactis* permet ainsi d'étudier les propriétés d'adhésion et d'interaction du ClfA au fibrinogène de manière individuelle, sans entrer en conflit avec les autres MSCRAMMs que comporte *S. aureus*.^{12 14} Ces tests d'adhérence *in vitro* étant bien maîtrisés, ils permettent aussi de vérifier que les souches utilisées pour la deuxième phase de l'expérience avec l'AFM avaient les propriétés d'adhésion et d'interaction au fibrinogène attendues.

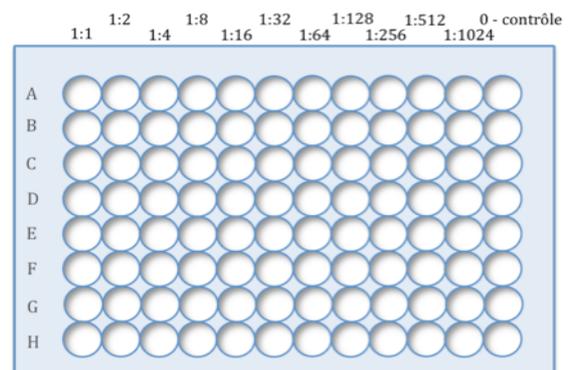
Dans la deuxième phase utilisant l'AFM, le but a été de mesurer les forces d'interaction entre du fibrinogène fixé sur la pointe de l'AFM et le ClfA à la surface de *L. lactis* ClfA, de *S. aureus* et de *L. lactis* sans ClfA servant de contrôle (appelé plus tard *L. lactis* Pil). L'AFM permet également de quantifier la densité du ClfA à la surface des bactéries.

2.1 Tests d'adhérence en phase solide

L'adhérence entre *L. lactis* ClfA, *L. lactis* Pil, *S. aureus* Newman et le fibrinogène a été mesurée par une méthode utilisant une plaque de 96 puits (Fig. 2.1) dans lesquels ont été fixé du fibrinogène à une concentration de rapport 1 : 2 à chaque colonne. La dernière colonne servant de contrôle ne comporte pas de fibrinogène. Les bactéries (une souche par ligne) sont ensuite laissées à incuber dans chaque puits. Les puits sont finalement rincés et les bactéries restantes ayant adhéré au puits sont colorées. La concentration des bactéries dans chaque puits est mesurée à l'aide d'un lecteur de plaque ELISA.

Afin de contrôler que les bonnes bactéries ont bien été mises dans les puits, qu'elle ne sont pas mortes, qu'il n'y a pas eu de contamination et de vérifier leur concentration, les suspensions bactériennes utilisées pour l'expérience sont diluées puis incubées sur milieu de culture.

Figure 2.1 : schéma d'une plaque 96 puits. Les dilutions du fibrinogène sont indiquées en-dessus de chaque colonne.



2.1.1 Matériel

Plaque 96 puits : NUNC immuno plate 96 wells CERT. MAXISORB milian
Gentian violet 1x 2.5 L Medion Diagnostic
Citrate buffer pH : 4.5-4.8 (dihydrated sodium citrate 18.4g, anhydride citric acid 9.2g, distilled water ad 1000 mL).
Fibrinogène 1mg/ml (human plasma type 1 1g Sigma F-3879)
Bovine Serum Albumine (BSA)

2.1.2 Marche-à-suivre

a) Préparation du ligand coaté

Ajouter 100 µl de PBS dans tous les puits de la plaque
Ajouter 100 µl de ligand (à 1mg/ml) dans la 1^{ère} colonne puis faire une dilution en série 2 en 2 sans ajouter de ligand dans la dernière colonne (colonne contrôle)
Incuber à 4°C overnight
Faire trois lavages au PBS (1x)

b) Blocage des sites de fixation non spécifiques

Ajouter 200 µl de PBS (1x) à 2% de BSA dans chaque puits
Incuber à T° ambiante pendant 1h30
Faire trois lavages au PBS (1x)

c) Ajout des bactéries

Ajouter 50 µl de suspension bactérienne par puits
Incuber à 37° pendant 2h
Faire trois lavages au PBS (1x)
Fixer à l'air chaud dans une étuve à 55°C pendant 30 à 45 minutes

d) Révélation de la concentration des bactéries par puits

Ajouter 95 µl de cristal violet par puits
Laisser 45 min. à T° ambiante
Faire six lavages au PBS (1x)
Ajouter 200 µl de tampon citrate (pH 4.3)
Lire l'OD (Optical density) sur un lecteur de plaque ELISA : 570 nm.

e) Contrôle des mises en culture des suspensions bactériennes

Procéder aux dilutions des suspensions bactériennes
Ajouter 50 µl de suspension bactérienne dans 5ml de NaCl 0.9% (1^{ère} dilution)
Ajouter 50 µl de la 1^{ère} dilution dans 5ml de NaCl 0.9% (2^e dilution)
Répéter le processus pour faire quatre dilutions.

Ajouter et étaler 100µl de chacune des dilutions sur milieu de culture (GM17 agar + érythromycine à 5µg/ml pour L.lactis et TSA pour S. aureus Newman).
Laisser incubé overnight à 30°C pour L.lactis et 37°C pour S. aureus Newman.

2.2 Force spectroscopy

Avant de pouvoir commencer les expériences de force d'interaction entre fibrinogène et surface des bactéries, un certain nombre de préalables doivent être remplis. Il est premièrement nécessaire de trouver un moyen de faire adhérer les bactéries vivantes à un support pour pouvoir les observer à l'AFM. Deuxièmement, des expériences préliminaires sont faites avec une pointe non fonctionnalisée, c'est-à-dire sans fibrinogène, pour vérifier que les bactéries se trouvent bien sur notre échantillon, voir comment elles se comportent lorsqu'elles sont soumises à la force spectroscopy, mesurer leurs propriétés mécaniques (dureté) et voir s'il y a une interaction entre la pointe non fonctionnalisée et la surface de la bactérie.

C'est ensuite seulement que l'on peut procéder aux mesures de force d'interaction avec le fibrinogène.

2.2.1 Matériel

Bioscope I Brucker (USA, Santa-Barbara)
Nanoscope III Brucker (USA, Santa-Barbara)
Pointes : Tip 0.06 Brucker, DMP 10, elastic constant : 0.06 [N/m]
PDMS (Polydimethylsiloxane)
APTES (3-aminopropyltriéthoxysilane)
Glutaraldéhyde
Phosphate Buffer Saline (PBS)
Fibrinogène 1mg/ml (human plasma type 1 1g Sigma F-3879)
Tampon pour Fibrinogène : Tris-base 50 mM, NaCl 0.1 M, pH 7.2-7.4

2.2.2 Marche-à-suivre

a) Préparation des échantillons

Passer le PDMS 3-5min au Plasma, air, 1000 mTorr
Fixer le PDMS au support de l'échantillon
Déposer de l'APTES 0.1% sur toute la surface du PDMS
Après 1'30", rincer avec 3 mL d'H₂O puis sécher
Déposer les bactéries sur le PDMS
Après 15 minutes, rincer à 3 mL H₂O, puis déposer du PBS sur l'échantillon

b) Préparation de la pointe fonctionnalisée

Laisser la pointe 15 minutes sous UV
Déposer du Glutaraldéhyde 0.5% sur la pointe

Après 15 min., rincer à H₂O et sécher
Déposer le Fibrinogène (à 20-100 nM dans le tampon pour fibrinogène)
Après 15 min., rincer au TBS et en déposer sur la pointe
Après 15 min., rincer au PBS et laisser la pointe dans du PBS.

2.3 Mise en culture des bactéries

a) L.lactis

À partir de L.lactis conservés cryogéniquement, prendre un inoculum et le placer dans un bouillon M17 avec de l'érythromycine à 5 µg/ml
Laisser incuber à 30°C overnight
Centrifuger la suspension pendant 10 min. à 5000 tours/min. à 4°C
Concentrer les bactéries de 10x dans du PBS

b) S.aureus Newman

À partir de S. aureus Newman conservés cryogéniquement, prendre un inoculum et le placer dans un bouillon TSB (Tryptic Soy Broth)
Laisser incuber à 37°C overnight
Centrifuger la suspension pendant 10 min. à 5000 tours/min. à 4°C
Concentrer les bactéries de 10x dans du PBS

Remarque importante (cf. 4.0 Discussion)

Les suspensions bactériennes mises en Eppendorf utilisées pour l'AFM doivent être rincées au PBS puis centrifugées pendant 10 min. à 4000-5000 tours/min. à 4°C, le tout 3x afin de retirer le restant de milieu de culture.

3.0 Résultats

3.1 Résultats des tests d'adhérence

Les tests d'adhérence ont été répétés trois fois. Les résultats des tests ont montré que la souche *L. lactis* ClfA adhère fortement au fibrinogène en comparaison avec *L. lactis* Pil (Fig. 3.1.1) qu'on retrouve qu'en très petite quantité dans les puits des plaques. Les résultats montrent aussi que l'adhérence de *L.lactis* ClfA n'est pas fonction de la concentration de fibrinogène puisque même à une concentration basse, la bactérie adhère fortement.

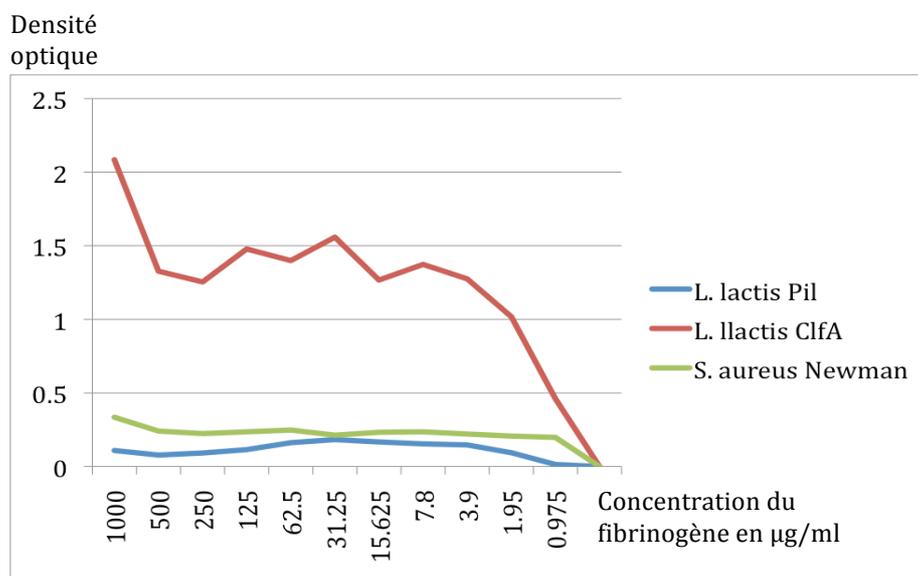


Figure 3.1.1: le graphique montre la densité optique (correspondant à la densité bactérienne) mesurée à chaque puits en fonction de la concentration du fibrinogène du puits.

Ce résultat confirme premièrement la fonction de récepteur au fibrinogène du ClfA. Deuxièmement, il nous assure que nous pourrions utiliser ces deux souches pour les expériences avec l'AFM puisque leurs propriétés d'adhésion au fibrinogène respectives ont été confirmées. Ces souches pourront être utilisées comme contrôle positif et négatif lorsque nous ferons les expériences de spectroscopie de force avec *S. aureus*.

Les résultats montrent aussi, contrairement à ce que nous nous attendions, que *S.aureus* Newman a eu une adhérence très faible au fibrinogène, de manière presque similaire à *L.lactis* Pil, et que cette adhérence n'est pas en relation avec la concentration de fibrinogène, alors que l'on sait par expériences que l'adhérence augmente jusqu'à atteindre un plateau à une concentration de fibrinogène de 10-50 µg/ml.

Plusieurs raisons pourraient expliquer cela. Une contamination de la suspension bactérienne de *S.aureus* Newman pourrait en être la cause. Mais cela semble peu probable car les cultures des suspensions

bactériennes des deux premiers tests d'adhérence n'ont pas montré de contamination. Et celle du troisième test a montré une contamination de champignons qui semble être intervenue lors de la mise en culture de la suspension bactérienne, c'est-à-dire après avoir mis *S. aureus* Newman dans les puits.¹ La souche utilisée pourrait peut-être effectivement avoir un profil d'adhérence au fibrinogène bas pour des raisons peu claires. Les expériences devraient donc être répétées afin de clarifier cette situation.

3.2 Résultats de la Force spectroscopy

3.2.1 Fixation des bactéries vivantes au support de l'échantillon

La méthode pour faire adhérer les bactéries sur un support d'échantillon a été trouvée après de nombreux essais et correspond à celle indiquée plus haut (2.2.2 a). Il a été remarqué qu'un reste de milieu de culture dans les suspensions bactériennes utilisées empêchait une adhésion des bactéries au support d'échantillon. Un lavage des suspensions bactériennes au PBS permet de retirer le reste du milieu de culture et règle ce problème d'adhérence.

3.2.2 Expériences préliminaires

Les mesures faites par force spectroscopy pour *S. aureus* ont démontré la présence des bactéries sur l'échantillon (Fig. 3.2.2.1).

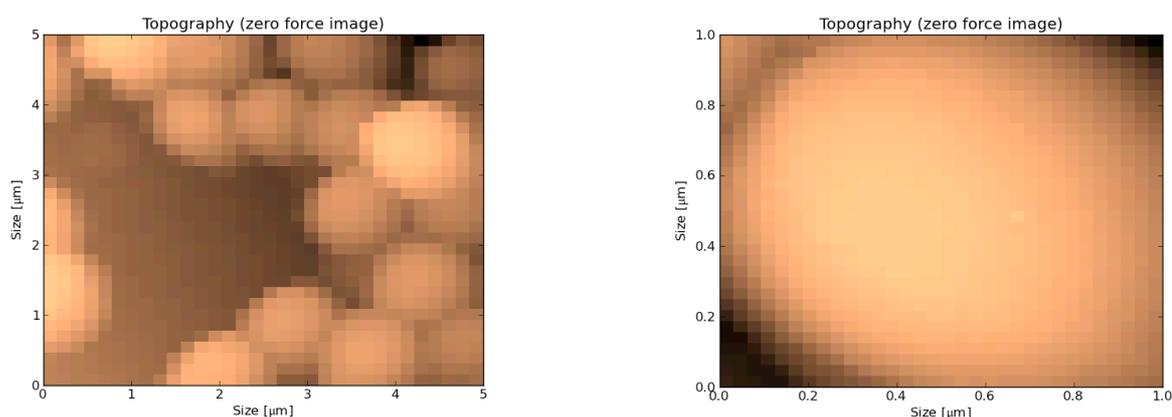


Figure 3.2.2.1 : Sur l'image de gauche, on voit la topographie d'une surface de l'échantillon de 5 x 5 μm montrant une grappe de « boules » d'une taille identique à celle de *S. aureus* confirmant ainsi leur présence. L'image de droite est un agrandissement centré sur une bactérie. Ces deux images sont des « zero force images » obtenues par force spectroscopy. Le microscope est paramétré pour que la pointe n'applique pas de force au contact de la surface et il enregistre les mouvements du cristal piézo-électrique pour recréer la topographie de surface.

¹ Il semblerait que la baguette ayant servi à étaler la suspension bactérienne sur la mise en culture n'ait pas été stérile.

Une cartographie de la dureté des bactéries a également été réalisée (Fig. 3.2.2.2). Les courbes force-distance ont montré qu'il n'y avait pas de force d'interaction significative entre la pointe du levier et la surface de *S. aureus*. En comparant les courbes force-distance réalisées à la surface de *S. aureus* et d'un support dur (verre) on peut également évaluer le profil de dureté de la surface de la bactérie (Fig. 3.2.2.3).

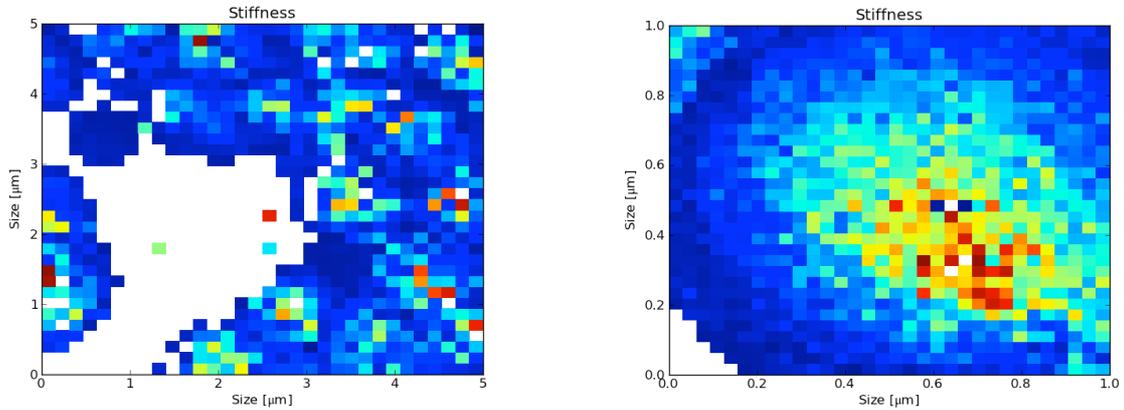


Figure 3.2.2.2 : L'image de gauche montre le profil de dureté de la même surface que celle de l'image de gauche de la Fig. 3.2.2.1. L'image de droite montre le profil de dureté correspondant à l'image de droite de la Fig. 3.2.2.1. En bleu : surface molle ; en rouge : surface dure.

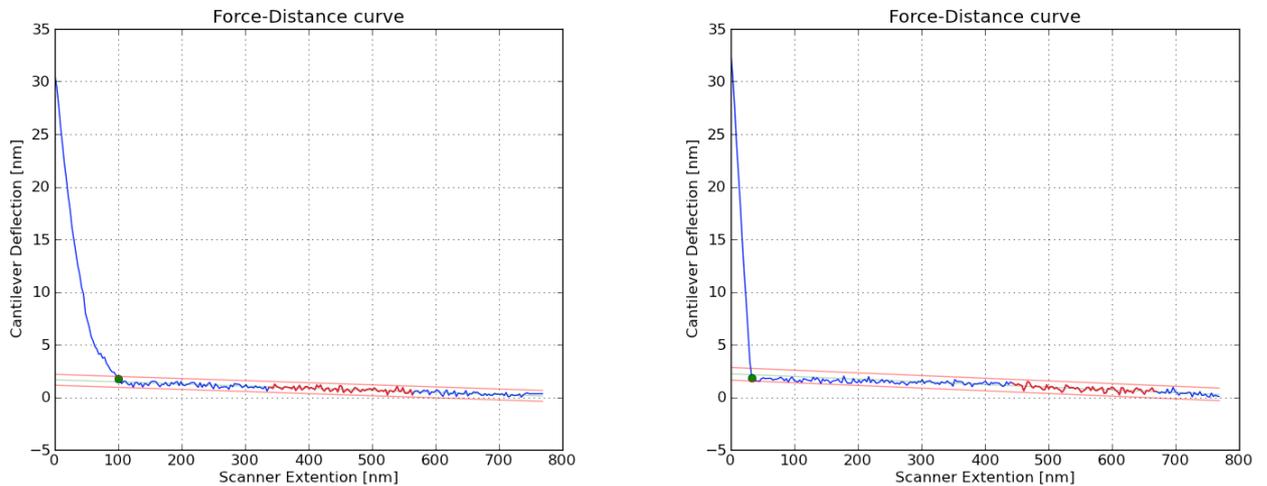


Figure 3.2.2.3 : L'image de gauche montre une courbe force-distance réalisée à la surface d'un *S. aureus* avec une pointe non fonctionnalisée. On ne voit pas d'événement compatible avec une force d'interaction sur la courbe. Le point vert représente le point d'inflexion de la courbe. À gauche, la courbe après le point d'inflexion est non linéaire montrant que la surface (la membrane de *S.aureus* Newman) est molle. En comparaison, la courbe force-distance de droite a été réalisée sur une surface d'un matériau dur, on voit que la courbe après le point d'inflexion est linéaire.

3.2.3 Forces d'interaction entre fibrinogène et bactéries

En raison du manque de temps à disposition pour ce travail, cette partie n'a malheureusement pas pu être réalisée. Les quelques expériences qui ont toutefois été faites avec une pointe fonctionnalisée n'ont pas été concluantes en raison de problèmes de manipulation durant la préparation de la pointe ou de petits problèmes techniques survenant aux cours des expériences.

4.0 Commentaire et discussion

Un des objets de satisfaction de ce travail est d'avoir trouvé le moyen de faire adhérer des bactéries vivantes à un échantillon. En effet, tester des forces d'interaction entre une protéine et une bactérie vivante était quelque chose de nouveau puisque habituellement les bactéries utilisées sont mortes et ainsi plus facile à manipuler. Il a été en particulier laborieux de faire adhérer *L. lactis*. C'est seulement après avoir testé différents supports (verre, plastique, PDMS) pour les bactéries et différents processus de collage de ces bactéries qu'il a été remarqué que le restant de milieu de culture qui se trouvait dans les suspensions bactériennes empêchait une adhésion optimale. C'est seulement après avoir remarqué cela que le protocole de collage des bactéries pu être déterminé.

Ce travail présente plusieurs limites dont la première est de n'avoir pu remplir tous ses objectifs. Le temps pour mettre en place une expérience de force d'interaction protéine-protéine est long et fastidieux, particulièrement lorsque le travail se fait avec des cellules vivantes. Et le temps à disposition pour ce travail est ce qui a fait défaut pour réaliser les expériences de forces d'interaction ainsi que pour confirmer les résultats des tests d'adhérence.

5.0 Conclusions

Ce travail a contribué à trouver une technique pour faire adhérer des bactéries vivantes à un support pour faire de la spectroscopie de force par AFM ce qui n'était pas bien maîtrisé auparavant. Ceci constitue un apport intéressant puisque travailler avec des bactéries vivantes plutôt que mortes permet de se rapprocher des conditions physiologiques de fonctionnement cellulaire.

Les contraintes de temps n'ont pas permis de réaliser ce travail dans son entier et il serait intéressant de prolonger les expériences de force d'interaction entre ClfA et fibrinogène, débutées dans ce travail, afin d'en retirer des résultats significatifs.

Sur un plus long terme, des expériences impliquant d'autres protéines entrant en interaction avec les MSCRAMMs de *S.aureus* ou d'autres bactéries pourraient être envisagées afin de croître les connaissances dans ce domaine, avec l'idée de développer de nouvelles thérapies antibactériennes.

Bibliographie

- ¹ Roduit, C.. Membrane elastic heterogeneity studied at nanometrical scale on living cells. Thèse EPFL, no 3985 (2007). Dir.: Stefan Catsicas, Sandor Kasas.
- ² Binnig, G., Quate, C., and Gerber, C. (1986). Atomic force microscope. *Physical review letters*, 56(9):930–933.
- ³ Binnig, G., Rohrer, H., Gerber, C., and Weibel, E. (1982). Tunneling through a controllable vacuum gap. *Applied Physics Letters*, 40(2):178–180
- ⁴ Roduit, C.. Membrane elastic heterogeneity studied at nanometrical scale on living cells. Thèse EPFL, no 3985 (2007). Dir.: Stefan Catsicas, Sandor Kasas.
- ⁵ 1. Wertheim HFL, Melles DC, Vos MC, van Leeuwen W, van Belkum A, Verbrugh HA, et al. The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. *Lancet Infect Dis*. 2005 déc;5(12):751–62.
- ⁶ 1. Krishna S, Miller LS. Host-pathogen interactions between the skin and *Staphylococcus aureus*. *Current Opinion in Microbiology* [Internet]. 2011 déc 1 [cité 2011 déc 10];Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22137885>
- ⁷ 1. Lowy FD. *Staphylococcus aureus* infections. *N. Engl. J. Med*. 1998 août 20;339(8):520–32.
- ⁸ 1. Sakoulas G, Moellering RC Jr. Increasing antibiotic resistance among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *Clin. Infect. Dis*. 2008 juin 1;46 Suppl 5:S360–7.
- ⁹ 1. Patti JM, Allen BL, McGavin MJ, Höök M. MSCRAMM-mediated adherence of microorganisms to host tissues. *Annu. Rev. Microbiol*. 1994;48:585–617.
- ¹⁰ 1. Bodén MK, Flock JI. Fibrinogen-binding protein/clumping factor from *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun*. 1989 août;57(8):2358–63.
- ¹¹ 1. McDevitt D, Francois P, Vaudaux P, Foster TJ. Molecular characterization of the clumping factor (fibrinogen receptor) of *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol*. 1994 janv;11(2):237–48.
- ¹² 1. Que YA, François P, Haefliger JA, Entenza JM, Vaudaux P, Moreillon P. Reassessing the role of *Staphylococcus aureus* clumping factor and fibronectin-binding protein by expression in *Lactococcus lactis*. *Infect. Immun*. 2001 oct;69(10):6296–302.
- ¹³ 1. Archer GL. *Staphylococcus aureus*: a well-armed pathogen. *Clin. Infect. Dis*. 1998 mai;26(5):1179–81.
- ¹⁴ 1. Que YA, Haefliger JA, Francioli P, Moreillon P. Expression of *Staphylococcus aureus* clumping factor A in *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* using a new shuttle vector. *Infect. Immun*. 2000 juin;68(6):3516–22.