



Développement et étude d'objets biomimétiques stimulables : Vésicules géantes encapsulant des systèmes visco-élastiques de poly(NIPAM)

Clément Campillo

► To cite this version:

Clément Campillo. Développement et étude d'objets biomimétiques stimulables : Vésicules géantes encapsulant des systèmes visco-élastiques de poly(NIPAM). Analyse de données, Statistiques et Probabilités [physics.data-an]. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2008. Français. <tel-00432264>

HAL Id: tel-00432264

<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00432264>

Submitted on 15 Nov 2009

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

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

*THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE JOSEPH FOURIER —
GRENOBLE I*

Spécialité : physique pour les Sciences du Vivant

présentée par :

Clément Campillo

**Développement et étude d'objets biomimétiques stimulables :
Vésicules géantes encapsulant des systèmes visco-élastiques de
poly(NIPAM)**

Soutenue publiquement le 11 décembre 2007 devant le jury composé de :

M.	Georg MARET	Président du jury
Mme.	Patricia BASSEREAU	Rapporteur
M.	Loïc AUVRAY	Rapporteur
M.	Bertrand FOURCADE	
M.	Carlos MARQUES	
M.	André SCHRÖDER	
Mme.	Brigitte PEPIN-DONAT	Directrice de thèse

Remerciements

Tout d'abord je tiens à remercier chaleureusement les membres du jury qui m'ont fait l'honneur de juger mon travail : Patricia Bassereau et Loïc Auvray qui ont eu la patience de rapporter mon manuscrit avec tant de pertinence, Georg Maret qui a accepté de présider le jury et Bertrand Fourcade qui a représenté l'université Joseph Fourier de Grenoble dont je suis un pur produit, et dont les cours ont contribué à me faire choisir cette thématique.

Ensuite je voudrais témoigner de ma grande gratitude envers Brigitte Pépin-Donat pour son encadrement, particulièrement lors de cette dernière année. Merci de s'être autant investie dans mon travail, de m'avoir toujours soutenu et encouragé et de m'avoir permis de terminer ma thèse à temps. Merci aussi de m'avoir inculqué beaucoup de tes valeurs scientifiques et humaines.

Un très grand merci également à Carlos Marques et André Schröder, j'ai énormément appris en travaillant avec vous et j'ai toujours pris beaucoup de plaisir même lors des semaines intenses où je vivais à l'ICS...

Merci à Annie Viallat pour son encadrement et ses conseils au début de ce travail, ainsi que pour m'avoir introduit dans le monde des membranes.

Cette thèse a été effectuée dans le cadre de l'International Research Training Group Grenoble-Strasbourg-Konstanz dont je tiens à remercier les responsables : Brigitte Pépin-Donat, Joerg Baschnagel et Georg Maret. En plus de donner aux étudiants comme moi l'opportunité de se rencontrer, de suivre des cours de haute qualité et de présenter régulièrement leur travail, les membres de l'IRTG ont fortement contribué au bon déroulement de ma thèse en me permettant de travailler à Strasbourg et en me prodiguant des conseils avisés. Merci aussi à Sabine Lucas pour sa gentillesse.

Comme cette thèse s'est déroulé dans plusieurs laboratoires, j'ai pu faire de nombreuses rencontres auxquelles j'ai pris beaucoup de plaisir. D'abord merci aux (ex-)membres du LSP de Grenoble au sein duquel j'ai effectué ma première année de thèse : Jacques Derouard et Antoine Delon (mon stage de Maîtrise avec vous a été ma première expérience du travail en laboratoire et le déclencheur de mon envie de continuer dans cette voie), Philippe Moreau, Rodolphe Jaffiol, Yoann Blancquaert, Pauline Ruffiot et Gladys Massiera. Merci aux membres de l'U600 Adhésion et Inflammation et particulièrement aux Luminiens : Pierre Bongrand, Anne-Marie Benoliel, Anne Pierres, Laurent Limozin, Philippe Robert, Zohar Mischal et Joanna Vitte. J'ai beaucoup appris sur la biologie et la biophysique à votre contact. Merci à Marie-Pierre Valignat et Olivier Théodoly pour leur hospitalité et à Pierre-Henri Puech pour les séances de grimpe. Merci aux membres du SPrAm du CEA Grenoble, merci à Roberto Calemczuk et Emmanuel Suraniti pour les expériences de SPR et Loïc Leroy pour les discussions sur les PSF. Merci aussi à Christian Lombard, Catherine Pascal, Mahjoub Fakir, Myriam Protière, Julia Di Girolamo et les autres thésards et post-doc du labo pour leur accueil. Et enfin j'ai passé beaucoup de temps au sein de l'équipe Membranes et Microforces de l'ICS de Strasbourg, merci à Thierry Charitat, Marc Basler, Marie-Laure Hissette, Christopher Haluska et Omar Mertins.

J'ai également pris beaucoup de plaisir à travailler en collaboration avec les chercheurs de l'Institut Curie à Paris, je tiens à remercier Françoise Brochard-Wyart, Pierre Nassoy, Damien Cuvellier et Sebastien Kremer. Je me réjouis de rejoindre votre laboratoire comme post-doc.

Enfin merci à ceux qui ont comme moi fait une thèse entre Grenoble et Marseille (voire plus ...) : Zen-Hong Huang, Magalie Faivre et François Quemeneur, bonne chance à tous pour la suite. Merci beaucoup à Cyrille Vezy de m'avoir supporté pendant une année de cohabitation à Marseille, merci de ta patience et de ton aide.

Enfin ceux qui me connaissent savent que j'ai toujours eu besoin d'oublier par moments la science pour entretenir ma motivation. Pour cela je n'ai pas trouvé mieux que la musique, alors je voudrais remercier les Peaks, mon groupe et mes meilleurs amis. Les concerts, enregistrement et répétitions avec vous ces dernières années ont toujours été ma bouffée d'oxygène. Merci à Arnaud pour un projet musical trop éphémère, et surtout parce qu'on ne s'est jamais éloignés depuis les bancs du collège, on se voit à Paris ! J'ai aussi toujours pu compter sur ma famille, merci à ma mon père (qui m'a appris beaucoup de physique, mais pas seulement !), à ma mère (qui ne m'a jamais appris de physique, bien heureusement !), mes frères et mes grands-parents. Merci également aux Guillot et aux Roche. Et surtout merci Béa pour ta patience, ton soutien, d'avoir supporté la vie un peu compliquée de ces deux dernières années, mais surtout merci d'être avec moi chaque jour.

Table des matières

1	Introduction	9
2	Partie théorique	11
2.1	Les vésicules	11
2.1.1	Les phospholipides	12
2.1.2	Les membranes	14
2.1.3	Vésicules dégonflées : morphologie	21
2.2	Systèmes polymères	24
2.2.1	Les chaînes en solution	24
2.2.2	Les gels de polymères	27
2.2.3	Le poly(N-isopropylacrylamide)	30
2.3	Interaction polymère/membrane : effet sur les propriétés de courbure	33
2.3.1	Polymères greffés	33
2.3.2	Polymères adsorbés	36
2.4	Aspiration par micropipettes	37
2.4.1	Mesure de modules de courbure	38
2.4.2	Mesure de modules d'élasticité de membrane	40
2.4.3	Mesure de module d'Young	42
2.5	Extrusion hydrodynamique de nanotubes membranaires sur des GUVs	45
3	Un état de l'art des vésicules composites	47
3.1	Les vésicules microcompartiments de réaction	47
3.2	Les vésicules vecteurs de substances	51
3.3	Les vésicules modèles de cellule amélioré	53
3.3.1	Modification du milieu interne	53
3.3.2	Modification de la membrane	56
4	Méthodes expérimentales générales	61
4.1	Protocole de fabrication des vésicules composites	61
4.1.1	Problèmes liés à la préparation des vésicules de milieu interne modifié	61
4.1.2	Produits utilisés pour la préparation des vésicules composites	62
4.1.3	Electroformation de GUVs contenant un milieu pré-gel ou présol	64
4.1.4	Polymérisation du milieu interne	66
4.2	Traitements de surfaces : substrats et micropipettes	69
4.3	Techniques d'observation	71

4.3.1	Microscopie DIC (Differential Intensity Contrast)	71
4.3.2	Microscopie à contraste de phase	71
4.3.3	Microscopie RICM (Reflexion Interference Contrast Microscopy)	72
4.3.4	Microscopie de fluorescence	72
4.3.5	Mesures quantitatives de fluorescence	75
4.4	Aspiration par micropipettes	77
4.4.1	Fabrication des micropipettes	77
4.4.2	Dispositif expérimental	77
4.5	Dispositif d'extrusion de tubes membranaires	78
5	Caractérisation du marquage fluorescent de la membrane	81
5.1	Influence de la réaction de polymérisation sur le marquage fluorescent	81
5.1.1	Stabilité des marqueurs lors de l'irradiation UV	81
5.1.2	Stabilité des marqueurs vis-à-vis des chaînes de poly(Nipam)	82
5.1.3	Influence de la phase de photopolymérisation : irradiation en présence de Nipam et de DEAP	82
5.2	Hétérogénéités spatiales du marquage fluorescent	84
5.3	Mesure du temps caractéristique de blanchiment	86
5.4	Formes des profils de fluorescence	87
6	Stimulabilité	91
6.1	Gel-GUVs : caractérisation de la transition volumique	91
6.1.1	Devenir de la membrane pendant la transition	92
6.1.2	Transition de volume : approche quantitative	95
6.1.3	Modulation de la température de transition par la concentration en sucre	97
6.2	Sol-GUVs : comportements lors de la transition	98
6.2.1	Influence de la modification de la concentration interne lors de la préparation	98
6.2.2	Influence de la modification de la concentration interne par dégonflement	99
7	Effets des milieux interne et externe sur les propriétés de membrane des vésicules composites	105
7.1	Module de courbure des sol-GUVs	105
7.1.1	Aspiration par micropipettes	105
7.1.2	Extrusion hydrodynamique de nanotubes membranaires	109
7.1.3	Etudes en SPR : apport à la compréhension du mécanisme d'interaction poly(Nipam)-membrane	109
7.2	Comportement des membranes de gel-GUVs sondé par extrusion hydrodynamique de nanotubes membranaires	111
7.2.1	Résultats	112
7.2.2	Discussion	112
7.3	Interaction membrane-cyclodextrines sur les sol-GUVs et gel-GUVs	114
7.3.1	Protocole expérimental	115
7.3.2	Résultats	116

8 Propriétés mécaniques du milieu interne des systèmes composites	119
8.1 Viscosité des sol-GUVs	119
8.2 Elasticité des gel-GUVs	121
8.2.1 Aspiration par micropipettes de gel-GUVs	121
8.2.2 Aspiration de gels macroscopiques	127
9 Etude du comportement des vésicules composites sous contrainte : résultats préliminaires	131
9.1 Adhésion	131
9.2 Dégonflement	136
10 Conclusions et perspectives	139

Chapitre 1

Introduction

Les cellules sont des objets extrêmement complexes constitués, dans une vision très simplifiée, d'un milieu interne visco-élastique entouré par une membrane lipidique en interaction d'une part avec le milieu interne et d'autre part avec un grand nombre de macromolécules constituant la matrice extracellulaire. Elles associent une activité biologique à des propriétés mécaniques qui s'influencent mutuellement.

Ces propriétés mécaniques jouent un rôle important dans la mesure où elles semblent être à l'origine du comportement cellulaire dans les premières étapes de nombreux processus biologiques.

En parallèle de l'étude directe du comportement des cellules, il semble donc intéressant d'étudier des objets modèles "mécaniques passifs" permettant d'isoler un à un les paramètres visco-élastiques pertinents gouvernant la réponse des cellules à diverses contraintes externes.

Les vésicules sont des assemblages de molécules amphiphiles (phospholipides) en solution. Elles couvrent une large gamme de tailles allant du nanomètre à la centaine de micromètres. Les vésicules géantes, dont le diamètre est compris entre 0,5 et 100 micromètres, peuvent être vues comme des modèles passifs tout à fait basiques de cellules dans la mesure où leur structure est similaire à celle de la membrane cellulaire et leur taille proche de celle des cellules.

Les vésicules de taille nanométrique sont particulièrement intéressantes comme vecteurs de substances et largement utilisées industriellement pour leurs applications dans des domaines comme par exemple la pharmacologie ou celui des cosmétiques.

Ces raisons expliquent l'intérêt que les vésicules ont déclenché dans la communauté scientifique.

La pertinence des vésicules en tant que modèles de cellules est limitée par le fait qu'elles présentent des propriétés mécaniques particulièrement élémentaires. De plus elles sont très fragiles et difficiles à manipuler. Le but de ce travail est donc de partir de vésicules et de leur conférer pas-à-pas des propriétés mécaniques si possible stimulables par un paramètre externe ; notre but ultime étant d'étudier le rôle de chacun de ces paramètres sur le comportement de ces vésicules composites sous contrainte externe et de comparer leur réponse avec celle des cellules.

Ce manuscrit est organisé de la façon suivante : au chapitre 2 nous présentons les vésicules et nous introduisons les concepts physiques nécessaires à la compréhension de cette étude. Le chapitre 3 donne un aperçu de la bibliographie concernant la formation d'objets composites

à base de vésicules couplées à d'autres constituants. Les techniques expérimentales que nous utilisons ainsi que le protocole de fabrication de nos vésicules composites sont détaillés au chapitre 4. Au chapitre 5 nous caractérisons le marquage fluorescent de la membrane de ces objets. Le chapitre 6 est consacré à l'étude de la thermostimulabilité des vésicules composites, le chapitre 7 à l'étude des propriétés de leur membrane et enfin le chapitre 8 à l'étude de celles de leur milieu interne. Nous terminerons par un bilan des résultats obtenus et certaines perspectives ouvertes par ce travail.

Chapitre 2

Partie théorique

2.1 Les vésicules

Dans ce chapitre nous ne cherchons pas à être exhaustifs sur ce vaste sujet mais nous rassemblons les idées nécessaires à la compréhension de la suite de cette étude. L'ouvrage de Lipowski et Sackmann [[Lipowsky and Sackmann, 1995](#)] est la référence sur le sujet.

Une vésicule est un auto-assemblage de molécules amphiphiles

Les molécules amphiphiles sont des molécules comportant une tête hydrophile et une queue hydrophobe, ceci est à l'origine d'un comportement singulier en solution. En effet ces molécules ont tendance à s'auto-assembler afin de limiter l'exposition de leurs parties hydrophobes à l'eau. Cette auto-organisation peut se faire dans des géométries et des topologies très variées allant de la micelle à la phase éponge, nous allons voir qu'elle dépend des caractéristiques géométriques des molécules amphiphiles (cf. section [2.1.1](#)). Nous nous intéresserons ici à un cas précis d'auto-assemblage pour un type particulier de molécules amphiphiles, les vésicules de phospholipides. Les phospholipides sont constitués d'une tête polaire et d'une ou plusieurs queues constituées de chaînes hydrocarbonées dont nous détaillerons la structure dans la section [2.1.1](#). Une vésicule unilamellaire est constituée d'une bicouche de phospholipides, c'est-à-dire de deux couches parallèles dans lesquelles chaque phospholipide se place de façon à exposer sa tête hydrophile à l'eau et à protéger sa queue hydrophobe à l'intérieur de la bicouche. Dans le cas des vésicules, la bicouche est refermée sur elle-même comme indiqué sur la figure [2.1](#).

On classe les vésicules unilamellaires selon leur taille :

- de 2 à 100 nm : Small Unilamellar Vesicles (SUVs) couramment appelées liposomes
- de 100 à 500 nm : Large Unilamellar Vesicles (LUVs)
- de 0,5 à 100 μm : Giant Unilamellar Vesicles (GUVs)

Nous ne nous intéresserons dans cette étude qu'aux GUVs, car leur taille se rapproche de celle des cellules vivantes. Elle présentent de plus le grand avantage d'être observables en microscopie optique, alors que l'observation de SUVs et de LUVs implique la mise en oeuvre de techniques plus lourdes. Il existe des vésicules multilamellaires mais elles ne seront pas étudiées

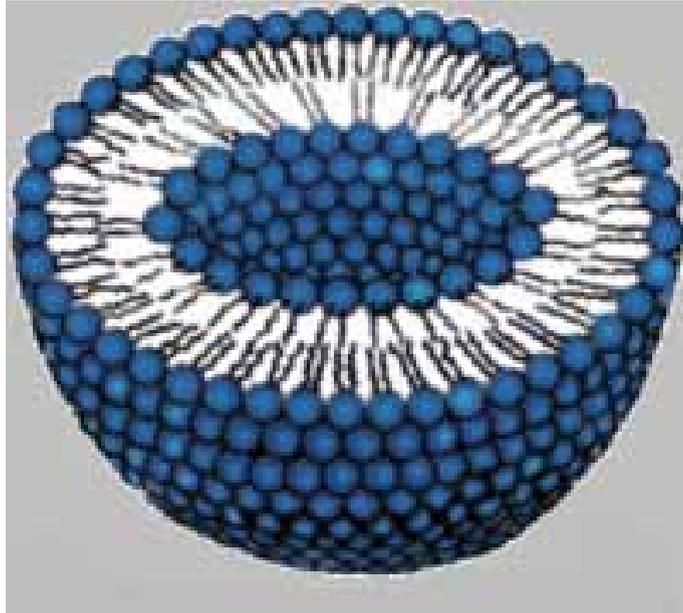


FIG. 2.1: Schéma en coupe d'une vésicule phospholipidique : mise en évidence de la structure en bicouche

ici.

2.1.1 Les phospholipides

Nous rappelons ici quelques éléments concernant la structure, la nomenclature et les propriétés d'auto-assemblage des lipides.

Structure

Les membranes cellulaires sont composées de différents types de lipides (en plus des nombreuses protéines incluses dans la bicouche) dont les proportions varient selon le type cellulaire considéré. Ils sont classés en plusieurs familles comme les glycolipides, les sphingolipides ou les stérols mais nous nous limiterons ici à la description des phospholipides car ce sont les seuls lipides que nous utiliserons dans ce travail. Les structures chimiques des différentes familles de lipides sont représentées sur la figure 2.2.

Les phospholipides résultent de l'estérification du glycérol par un dérivé de l'acide phosphorique et par deux acides gras. Ce dérivé phosphoré comme les acides gras peuvent être très divers, ce qui détermine le type du phospholipide obtenu. La figure 2.2 (a) représente la structure d'une molécule de phospholipide : la molécule de glycérol au centre, la tête hydrophile dont le radical X peut varier (choline (PC), éthanolamine (PE), sérine (PS) ou glycérol (PG)) et enfin les deux chaînes carbonées qui peuvent avoir des longueurs différentes et présenter un nombre d'insaturations variable. Les chaînes sont notées C n :m où n est le nombre de carbones

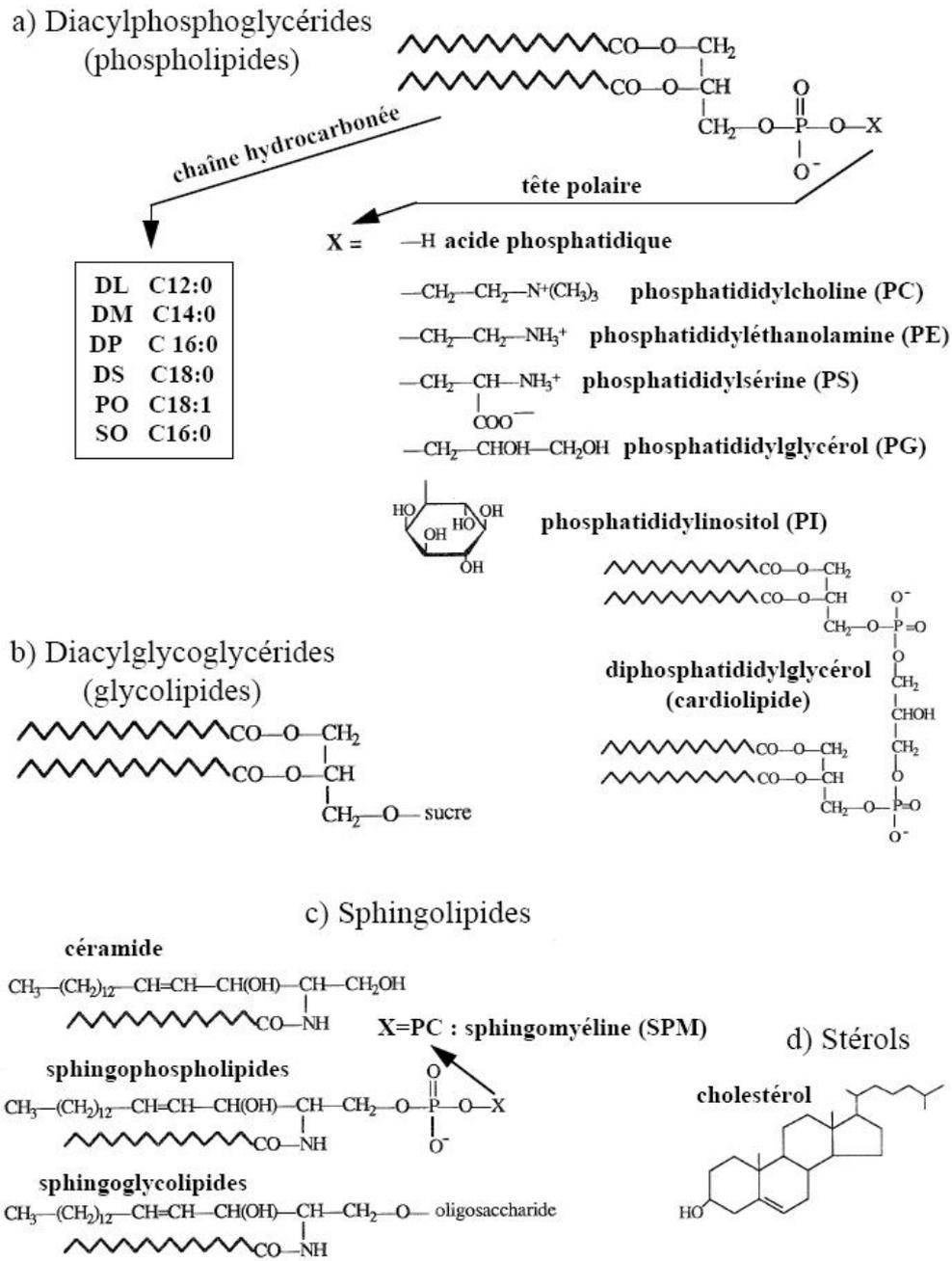


FIG. 2.2: Structures chimiques des principales familles de lipides a) Phospholipides b) Glycolipides c) Sphingolipides d) Stérols, extrait de [Manneville, 1999]

dans la chaîne et m le nombre d'insaturations ; les chaînes les plus couramment utilisées sont représentées sur le tableau 2.1.

lauréoyl	C 12 :0
myristoyl	C 14 :0
palmitoyl	C 16 :0
stéaroyl	C 18 :0
oléoyl	C 18 :1

TAB. 2.1: Noms et nomenclature de chaînes carbonées pour différents nombres de carbones et d'insaturations

Auto-assemblages

Les lipides présentent des propriétés d'auto-assemblage spécifiques dues à leur caractère amphiphile. S'il existe une interface air/eau ou eau/huile, c'est là que se concentreront les lipides. En revanche, en solution dans l'eau, les lipides ont tendance à s'auto-assembler pour minimiser leur énergie globale. La structure des auto-assemblages est déterminée par les volumes relatifs des parties hydrophobes et hydrophiles, ce qui donne lieu à une grande variété de systèmes allant des micelles aux bicouches plus ou moins flexibles refermées sur elles-mêmes que sont les vésicules comme indiqué sur la figure 2.3. En fait la structure de la molécule influence la courbure locale de la membrane, nous reviendrons sur cette notion dans la section 2.1.2.

2.1.2 Les membranes

Nous présentons dans cette section les propriétés physiques des membranes de vésicules. La taille des vésicules dans les expériences qui nous intéressent est toujours très grande devant l'épaisseur de la bicouche lipidique, et les membranes sont donc considérées comme des objets bidimensionnels. Nous introduirons des quantités physiques qui permettent de décrire le comportement des membranes sans faire intervenir les caractéristiques des molécules qui les composent.

Fluidité

La membrane d'une vésicule est fluide au-dessus d'une certaine température T_m , elle même déterminée par la nature chimique des phospholipides. En dessous de T_m , la membrane est en phase gel. Nous présentons sur le tableau 2.2 quelques exemples de températures de transition pour des lipides comportant des chaînes carbonées différentes. La longueur de la chaîne ainsi que la présence éventuelle d'insaturations affecte la température de transition, car ces caractéristiques de la chaîne rendent les lipides plus ou moins faciles à cristalliser.

Dans une membrane en phase fluide, les lipides d'une couche diffusent au sein de leur monocouche, qui constitue alors un liquide 2D. Les coefficients de diffusion latérale typiques des

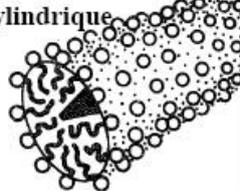
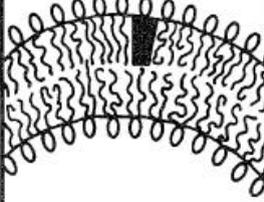
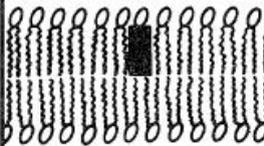
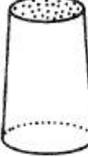
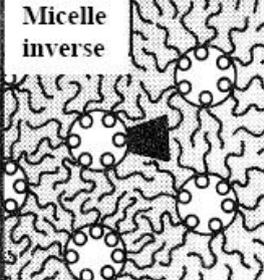
Forme géométrique	Structures formées
Cone 	Micelle sphérique 
Cone tronqué 	Micelle cylindrique 
Cone tronqué 	Bicouche flexible, vésicules 
Cylindre 	Planar bilayers 
Cone inversé 	Micelle inverse 

FIG. 2.3: Effet de la géométrie des molécules amphiphiles sur la structure de leurs auto-assemblages dans l'eau (d'après [Manneville, 1999])

lipides dans leur monocouche sont d'environ 10^{-7} à 10^{-8} cm^2/s (mesurés par Fluorescence Recovery After Photobleaching [Lipowsky and Sackmann, 1995]), ce qui entraîne qu'un lipide au sein d'une vésicule de rayon $10 \mu\text{m}$ met environ 1 s pour explorer toute la surface de la vésicule. Les lipides peuvent également présenter un mouvement de rotation et donc être caractérisés par un temps caractéristique de diffusion rotationnelle (10^{-9} à 10^{-11} s). Ils peuvent enfin passer d'un feuillet à l'autre mais ce phénomène est très lent, le temps caractéristique de "flip-flop" est de l'ordre de plusieurs heures et son influence est souvent négligée dans les expériences. Nous ne nous intéressons dans ce travail qu'à des membranes dans une phase fluide, les expériences seront donc menées à des températures bien supérieures à la température de transition sol-gel du lipide étudié.

Nom du lipide	T_m [°C]
C12 :0 (DPLC)	-1.8
diC14 :0 (DMPC)	24.5
diC16 :0 (DPPC)	41.5
C16 :0 - C18 :1 (POPC)	11
C18 :0 - C18 :1 (SOPC)	6
C18 :1 - C18 :0	9
diC18 :1 (c9) (DOPC)	-22
diC18 :1 (c6)	1
C18 :0 - C18 :2	-15
diC18 :2	-53
diC18 :3	-60

TAB. 2.2: Températures de transition sol :gel T_m pour différents phospholipides

Perméabilité

Les membranes de phospholipides sont perméables aux petites molécules neutres et notamment à l'eau. La perméabilité est mesurée par un coefficient P exprimé en $\mu\text{m}/\text{s}$ qui dépend de la nature des phospholipides de la membrane considérée et de celle de la molécule dont on étudie la diffusion. Ce coefficient P mesure le volume de molécules qui peut passer à travers une unité de surface de membrane par unité de temps, ce qui explique que sa dimension soit une longueur divisée par un temps. Ce coefficient peut être mesuré lors d'expériences de micropipettes [Olbrich et al., 2000],[Rawicz et al., 2000] ou de dégonflement osmotique [Boroske et al., 1981].

Le fait que les molécules de glucose et de sucrose, notamment, ne puissent pas traverser les membranes de phospholipides sera souvent mis à profit dans le présent travail pour appliquer une pression osmotique sur la membrane. En effet, si deux espèces chimiques sont en concentrations différentes d'un côté et de l'autre de la membrane, ces espèces ont des potentiels chimiques différents. Les molécules d'eau ont donc tendance à traverser la membrane pour équilibrer les potentiels chimiques, ce qui résulte en une pression osmotique sur la membrane qui s'écrit :

$$\Pi = RT \ln\left(\frac{N_{int}}{N_{ext}}\right) \quad (2.1)$$

où R est la constante des gaz parfaits, T la température et N_{int} et N_{ext} sont les nombres de molécules de l'espèce considérée à l'intérieur et à l'extérieur de la membrane. Il est donc possible d'ajuster la pression exercée sur la membrane d'une vésicule en jouant sur les concentrations internes et externes des composants qui ne peuvent pas traverser la membrane.

Tension

Dans le cas où les pressions sont différentes à l'intérieur et à l'extérieur d'une vésicule, sa membrane est soumise à une tension qui s'exprime grâce à la loi de Laplace :

$$P_{ext} - P_{int} = 2\frac{\sigma}{R} \quad (2.2)$$

où P_{ext} et P_{int} sont les pressions respectivement à l'extérieur et à l'intérieur de la vésicule, σ est la tension de membrane (quantité intensive exprimée en N/m) et R est le rayon de la vésicule. Les vésicules sont des objets fragiles ; leur membrane ne peut pas supporter de fortes tensions donc une vésicule soumise à une différence de pression rompt facilement. On peut définir une tension de lyse pour un type de lipides, dont les valeurs caractéristiques sont de l'ordre de $\sigma_{lyse} = 10$ mN/m [Olbrich et al., 2000]. Nous pouvons donc calculer que l'ordre de grandeur de la différence $P_{ext} - P_{int}$ maximale que peut supporter une vésicule de $20 \mu m$ et de 100 Pa. Cette valeur est à comparer avec les valeurs des pressions osmotiques du sucrose et du glucose aux concentrations que nous utilisons qui sont de l'ordre de 10^5 Pa [Lide, 2001].

Déformation

La forme au repos d'une membrane dépend de sa composition mais dans le cas où celle-ci est identique dans les deux feuillets, la membrane est plate. Une asymétrie de composition entre les deux feuillets entraîne une courbure spontanée c_0 . Si la membrane subit des forces extérieures, elle peut se déformer, et cette déformation peut se décomposer selon trois modes de déformation indépendants [Lipowsky and Sackmann, 1995] qui sont représentés sur la figure 2.4.

- Déformation en **extension** : dans ce cas l'aire par lipide est modifiée. L'énergie d'interaction entre phospholipides est très nettement minimisée pour une distance intermoléculaire d'environ 1 nm, et s'écarter de cette valeur est très coûteux en énergie. De plus la solubilité des phospholipides dans l'eau est très faible (concentration micellaire critique $\approx 10^{-10}$ M) donc à l'équilibre il n'y a pas d'échange entre la bicouche et le milieu externe, et le nombre de lipides dans la membrane est fixé. Dans la limite des déformations élastiques, la densité d'énergie est quadratique avec le taux de déformation et la densité d'énergie associée à une déformation d'extension s'écrit :

$$e_{ext} = \frac{1}{2}K \left(\frac{A - A_0}{A_0}\right)^2 \quad (2.3)$$

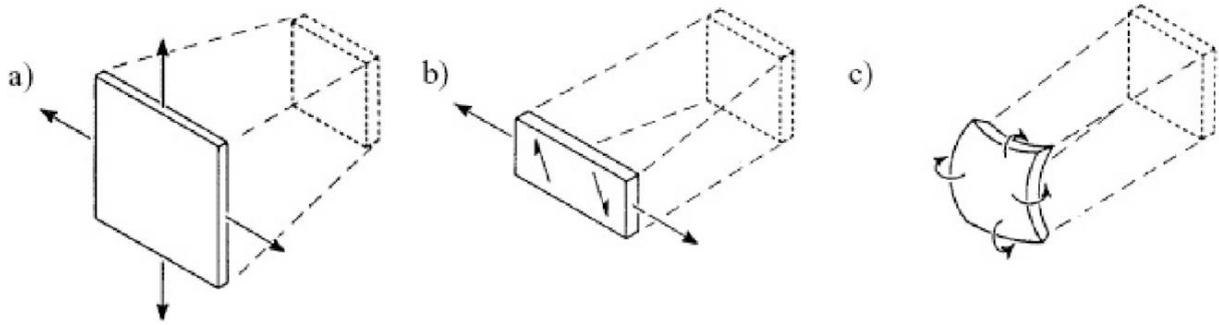


FIG. 2.4: Représentation des trois modes indépendants de déformation d'une surface : (a) extension, (b) cisaillement et (c) courbure.

où A_0 est l'aire de la membrane au repos, A l'aire de la membrane déformée et K son module de compressibilité. Nous montrerons par la suite que cette formule permet de mesurer le module élastique K lors des expériences de micropipettes. K est d'environ $0,2 \text{ J.m}^{-2}$ pour les vésicules lipidiques [Evans and Rawicz, 1990], or nous connaissons la tension de lyse d'une membrane de phospholipides [Olbrich et al., 2000] donc nous pouvons calculer que l'extension maximale $(A - A_0)/A_0$ que peut subir une membrane de phospholipides est de 4%.

- Déformation par **cisaillement** : il s'agit d'un réarrangement de matière au sein d'un même feuillet qui conserve l'aire par lipide et ne change pas la courbure de la membrane. Les mouvements de cisaillement dans le plan de la membrane ne coûtent pas d'énergie dans le cas de nos membranes car les lipides se déplacent librement au sein de leur feuillet. Nous précisons que cela ne veut pas dire que l'on ne puisse pas définir une viscosité de membrane, mais un réarrangement de matière à vitesse nulle ne coûterait pas d'énergie.

- Déformation par **courbure** : la déformation se fait à aire constante mais implique néanmoins l'apparition d'une densité d'énergie qui s'écrit :

$$e_c = \frac{1}{2}k_C(c_1 + c_2 - 2c_0)^2 + k_G c_1 c_2 \quad (2.4)$$

où k_C est le module de courbure et k_G la constante de rigidité gaussienne, et c_1 et c_2 sont les courbures principales de la surface. Les courbures principales en un point sont définies comme étant les inverses des deux principaux rayons de courbure R_1 et R_2 (comptés algébriquement) de la surface en ce point, comme indiqué sur la figure 2.5. La somme de c_1 et c_2 définit la courbure moyenne de la surface, mais cette quantité n'est pas suffisante pour décrire complètement son énergie de courbure. En effet on voit bien sur la figure 2.5 que les points où manifestement la courbure est la plus importante présentent une courbure moyenne $c_1 + c_2$ nulle. Il est donc nécessaire d'introduire la courbure gaussienne $c_1 c_2$ pour décrire complètement l'état de courbure en un point. Ceci explique la présence du second terme dans l'équation précédente. On peut noter que le module de courbure k_c pour les membranes auxquelles nous nous intéressons est de l'ordre de $10 - 20 k_B T$ et que les valeurs mesurées dans la littérature varient souvent du simple au double selon la technique utilisée pour la mesure (micropipettes, analyse de contours,

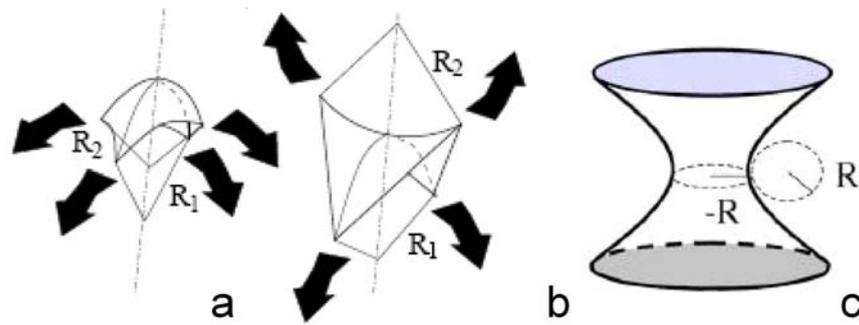


FIG. 2.5: Exemples de surfaces courbes : (a) avec une courbure gaussienne $c_1c_2 = 1/R_1R_2 > 0$, (b) avec une courbure gaussienne $c_1c_2 = 1/R_1R_2 < 0$ (c) avec des courbures opposées $1/R$ et $-1/R$, la courbure moyenne est nulle mais la courbure gaussienne est $1/R^2$ d'après [Abkarian, 2002]

extrusion de tubes [Pécrcéaux, 2004]).

D'après le théorème de Gauss-Bonnet, l'intégrale du terme $k_g c_1 c_2$ sur la surface de la membrane est constante pour une surface de topologie donnée donc la contribution de la courbure gaussienne de la surface ($c_1 c_2$) ne varie que si les vésicules changent de topologie (apparition d'une anse) ; en pratique dans les expériences présentées ici, cela n'arrive jamais.

Les modules de courbure k_C et de compressibilité K des membranes sont influencés par la taille des queues et le nombre d'insaturations des molécules de lipides [Rawicz et al., 2000] [Olbrich et al., 2000]. Nous résumons dans le tableau 2.3 les différents paramètres des membranes mesurés par micropipettes ([Rawicz et al., 2000], technique présentée en détail à la section 2.4.1) : les modules de courbure sont exprimés en Joules ainsi qu'en unités de $k_B T$. Cela permet d'avoir une idée immédiate de l'ordre de grandeur des énergies mises en jeu dans les phénomènes et de les comparer à l'énergie d'agitation thermique de la solution.

	(a)	(b)	(c)
phospholipide	k_C (10^{-19}J)	k_C ($k_B T$)	K (mN/m)
diC13 :0	0.56 ± 0.07	14 ± 1.75	239 ± 15
diC14 :0	0.56 ± 0.06	14 ± 1.5	234 ± 23
C18 :0/1	0.9 ± 0.06	22.5 ± 1.5	235 ± 15
diC18 :1 c9	0.85 ± 0.1	21.25 ± 2.5	265 ± 18
diC18 :9 t9	1.03 ± 0.11	25.75 ± 2.75	229 ± 12
diC20 :4	0.44 ± 0.05	11 ± 1.25	250 ± 10

TAB. 2.3: Modules de courbure k_C (a) en Joules (b) en unités de $k_B T$, (c) Modules d'élasticité K (mN/m) mesurés par micropipettes sur des membranes constituées de différents lipides [Rawicz et al., 2000]

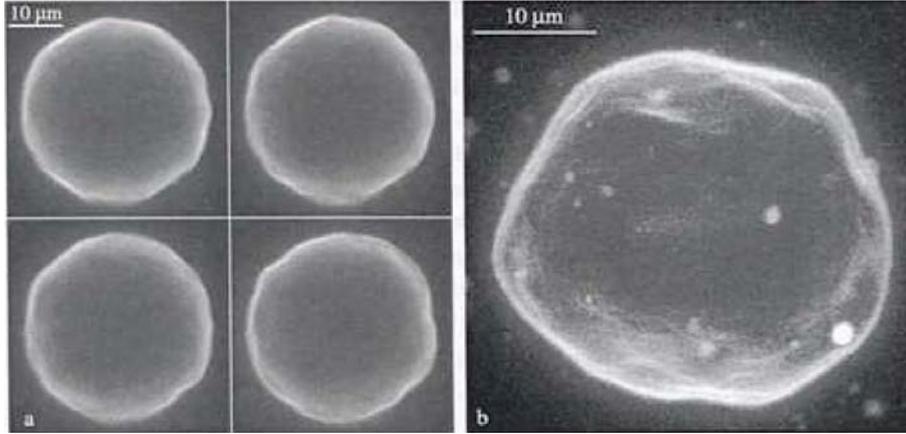


FIG. 2.6: Observation par microscopie de fluorescence des fluctuations de la membrane d'une vésicule a : dans un même plan à différents instants, b : projection des images de plusieurs plans, d'après [Sandre, 2000]

Fluctuations d'une membrane

L'énergie caractéristique de l'agitation des molécules dans un liquide est $k_B T$ et le module de courbure de la membrane est de l'ordre de $10 k_B T$; par conséquent la membrane est sujette à des fluctuations d'origine thermique [Brochard and Lennon, 1975]. Les molécules de solvant frappent la membrane de façon aléatoire sous l'effet du mouvement brownien. Ces fluctuations ont été mises en évidence expérimentalement comme le montre la figure 2.6.

Pour décrire les fluctuations d'une membrane, sa surface est définie comme une fonction $h(x, y)$, c'est-à-dire que chaque point de la surface est repéré par ses coordonnées $(x, y, h(x, y))$. Cette description est connue comme la représentation de Monge. L'énergie libre de la surface s'écrit alors :

$$F = \frac{k_c}{2} \int \left(\frac{\partial^2 h}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 h}{\partial y^2} \right)^2 dx dy + \frac{\sigma}{2} \int \left(\frac{\partial h}{\partial x} + \frac{\partial h}{\partial y} \right) dx dy \quad (2.5)$$

Cette énergie est la somme d'un terme de courbure et d'un terme de tension. Il est commode de passer dans l'espace de Fourier pour intégrer F et par définition de la Transformée de Fourier, les modes de déformation s'écrivent en fonction du vecteur d'onde q :

$$h_q = \int \int e^{i(q_x x + q_y y)} h(x, y) dx dy \quad (2.6)$$

et on peut donc écrire l'énergie F comme :

$$F_q = \frac{k_c}{2} \int \int \frac{dq_x dq_y}{2\pi^2} (k_c q^4 + \sigma q^2) h_q h_{-q} \quad (2.7)$$

Comme le bruit thermique est aléatoire, d'après le théorème d'équipartition de l'énergie, tous les modes de déformations sont sollicités avec la même probabilité. Nous pouvons utiliser cette propriété pour exprimer le spectre des fluctuations :

$$\langle h_q h_{-q} \rangle = A_0 \frac{k_B T}{k_c q^4 + \sigma q^2} \quad (2.8)$$

Jusqu'ici nous avons considéré que des fluctuations existaient à toutes les échelles de tailles, néanmoins il est clair que le plus grand vecteur d'onde des fluctuations correspond à la taille des molécules, et le plus petit correspond à celle de l'échantillon. On introduit donc deux vecteurs d'onde de coupure q_{min} et q_{max} . Si A_0 est l'aire apparente de la membrane, on peut exprimer la portion d'aire "cachée" dans les fluctuations thermiques de la membrane $(A - A_0)/A_0$ où A est l'aire réelle de la membrane. Pour ce faire, nous devons intégrer la quantité $\langle h_q h_{-q} \rangle$ pour tous les vecteurs d'onde, donc entre q_{min} et q_{max} :

$$\frac{A - A_0}{A_0} = \frac{1}{2} \int_{q_{min}}^{q_{max}} \frac{q dq}{2\pi} \frac{k_B T}{k_c q^4 + \sigma q^2} = \frac{k_B T}{8\pi k_c} \ln \frac{\sigma_{max} + \sigma}{\sigma_{min} + \sigma} \quad (2.9)$$

Dans les cas expérimentaux, on a $\sigma_{min} \ll \sigma \ll \sigma_{max}$ et on peut donc écrire la relation qui relie la tension de membrane à l'aire consommée par les fluctuations :

$$\frac{A - A_0}{A_0} = \frac{k_B T}{8\pi k_c} \ln \frac{\sigma_{max}}{\sigma} \quad (2.10)$$

qui est connue comme la relation d'Helfrich. Nous verrons au paragraphe 2.4.1 que cette relation va nous permettre de mesurer k_c lors des expériences de micropipettes.

2.1.3 Vésicules dégonflées : morphologie

Comme un ballon de baudruche, une vésicule gonflée (nous verrons comment se mesure son état de gonflement) est sphérique, mais elle peut être dégonflée et atteindre des formes différentes de la sphère. Ces formes dégonflées (volume variable à surface constante) sont très variées et ont été mises en évidence expérimentalement depuis longtemps [Lipowsky and Sackmann, 1995]. Parallèlement beaucoup de travaux théoriques traitent de la prédiction des formes dégonflées (par exemple [Seifert and Lipowsky, 1990], [Mui et al., 1995]) ; nous donnons un aperçu de ces travaux dans cette section.

Détermination des formes dégonflées à partir du hamiltonien d'Helfrich

Le taux de dégonflement des vésicules est mesuré par un paramètre ν défini comme le rapport du volume de la vésicule sur le volume de la sphère de même aire :

$$\nu = \frac{V}{\frac{4}{3}\pi \left(\sqrt{\frac{A}{4\pi}}\right)^3} \quad (2.11)$$

Ce paramètre vaut 1 pour une vésicule sphérique et décroît quand on dégonfle la vésicule.

La première approche pour prévoir les formes de vésicules dégonflées est d'obtenir l'énergie du système via le hamiltonien d'Helfrich 2.4 et de rechercher les formes pour lesquelles il est minimisé. Nous devons faire plusieurs hypothèses :

- la bicouche est fluide et il n'y a pas d'asymétrie entre les deux feuilletts ;

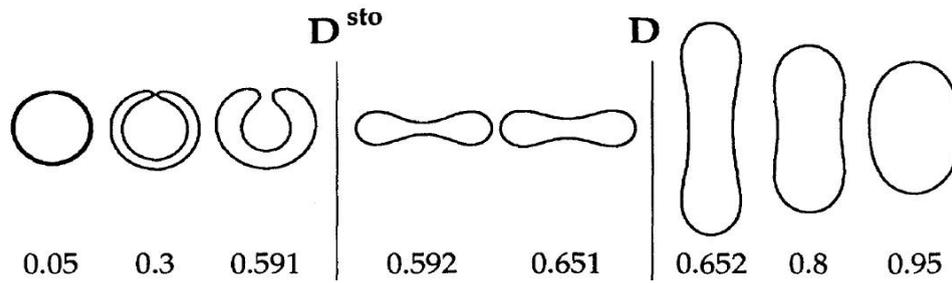


FIG. 2.7: Formes de vésicules calculées à partir du hamiltonien d'Helfrich pour différents taux de dégonflement des vésicules, extrait de [Seifert and Lipowsky, 1990]

- la topologie de la vésicule ne peut pas changer (d'une sphère à un tore par exemple) donc le terme de courbure gaussienne est constant ;
- l'aire et le volume de la vésicule sont fixés (le calcul se fait donc à taux de dégonflement constant).

En minimisant l'énergie libre de la bicouche pour différentes valeurs du taux de dégonflement, on obtient les formes axisymétriques présentées sur la figure 2.7. On peut voir sur la figure que quand on dégonfle la vésicule celle-ci passe d'une sphère ($\nu = 1$) à un ellipsoïde puis à une forme de cacahuète, puis on observe une transition prolate/oblate. Quand ν décroît encore, on a une seconde transition vers des formes de discoïdes biconcaves [Seifert and Lipowsky, 1990].

Néanmoins ce modèle ne rend pas compte de toutes les formes de vésicules observées expérimentalement, notamment les formes non-axisymétriques de type étoile de mer [Wintz et al., 1996], il faut donc un modèle plus complexe que celui-ci pour rendre compte de la totalité des résultats expérimentaux.

Détermination des formes dégonflées via le modèle ADE

Dans la première modélisation utilisant seulement l'hamiltonien d'Helfrich, la structure en double feuillet de la membrane n'est pas prise en compte. Or ces deux feuillets ne contiennent pas forcément le même nombre de lipides. Les nombres respectifs de lipides par feuillet interne (N_{int}) et externe (N_{ext}) sont fixés au moment de la formation de la vésicule. Or la probabilité pour un lipide de passer d'un feuillet à l'autre (flip-flop) est très faible, on peut donc définir une différence d'aire intrinsèque entre les deux feuillets δA_0 :

$$\delta A_0 = N_{int}a_{int} + N_{ext}a_{ext} \quad (2.12)$$

où a_{int} et a_{ext} sont les aires moyennes par lipide dans les feuillets internes et externes.

Il y a une seconde raison pour avoir une différence d'aire entre les deux feuillets, c'est la courbure de la vésicule. Prenons l'exemple d'une sphère de rayon R formée par une membrane d'épaisseur d fermée sur elle-même. La face interne de la membrane a une aire légèrement inférieure à celle de la face externe. Cette différence d'aire δA vaut $8\pi r dr$, donc pour une vésicule de rayon $10 \mu m$ et d'épaisseur $d=6 \text{ nm}$, la différence de surface est de l'ordre du millièème. En règle générale δA s'écrit :

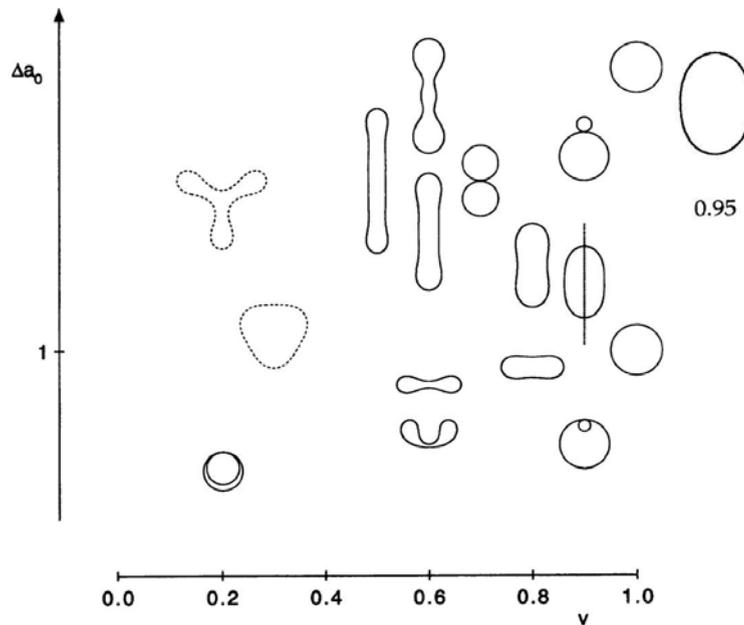


FIG. 2.8: Diagramme de phase des formes de vésicules calculées avec le modèle ADE : les formes dépendent du taux de dégonflement des vésicules et de l'asymétrie entre les bicouches de phospholipides, les tracés en pointillés correspondent aux formes non-axisymétriques, extrait de [Mui et al., 1995]

$$\delta A = d \int (c_1 + c_2) dA \quad (2.13)$$

où $c_1 + c_2$ est la courbure moyenne de la surface en chaque point.

Cette différence d'aire est à l'origine d'un terme d'énergie élastique qui traduit le fait que si la différence d'aire entre les deux feuillet de la membrane s'éloigne de δA_0 , cela coûte de l'énergie avec une certaine échelle d'énergie \bar{k} :

$$\frac{\bar{k}}{2} (\delta A - \delta A_0)^2 = \frac{\bar{k}}{2} (d \int (c_1 + c_2) dA - \delta A_0)^2 \quad (2.14)$$

Cette correction qui s'ajoute à l'énergie d'Helfrich 2.4 constitue le modèle ADE (Area Difference Elasticity). Nous voyons sur la figure 2.8 que les formes des vésicules calculées grâce au modèle ADE sont beaucoup plus riches que celles obtenues via le hamiltonien de Helfrich et que le modèle permet notamment de prévoir des formes non-axisymétriques [Miao et al., 1994] [Mui et al., 1995].

Vésicules dégonflées et décorées : morphologie

Les modèles que nous venons de présenter prédisent les formes des GUVs dans le cas de vésicules simples, mais de nombreuses études sont consacrées à des vésicules dont la membrane est modifiée par des protéines insérées dans la bicouche ou de polymères greffés sur la membrane (cf. chapitre 3). Les formes de vésicules dans ces cas-là peuvent être très différentes

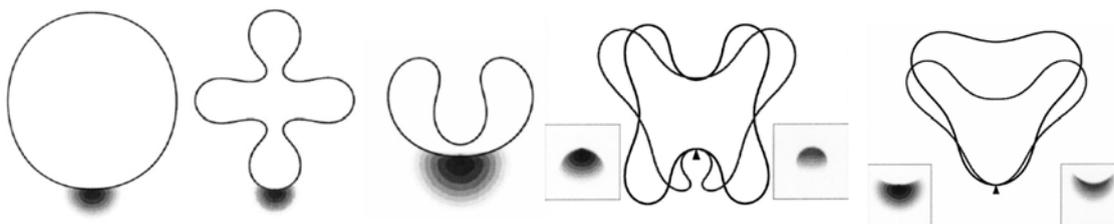


FIG. 2.9: Simulations numériques des formes d'équilibre de vésicules en interaction avec un polymère greffé, extraits de [Wang et al., 2005]. Les distributions des probabilités de présence du polymère sont indiquées en niveaux de gris sur les figures. Sur les deux figures de droite, le polymère a une interaction de deux intensités différentes avec la membrane

de celles prévues par les modèles simples : en effet un polymère greffé modifie les propriétés de la membrane (nous y reviendrons à la section 2.3) et donne lieu à des formes de vésicules différentes de celles prédites par les modèles simples.

Nous citerons les formes prédites numériquement dans [Wang et al., 2005] grâce à des simulations de vésicules axysymétriques en interaction avec un polymère greffé. La figure 2.9 montre des exemples extraits de ces simulations, les distributions des probabilités de présence du polymère sont indiquées en niveaux de gris. Les formes des vésicules dans ce cas ne sont pas prévues par les modèles que nous avons présenté précédemment.

Nous nous arrêtons ici pour la description de la physique des vésicules. Le but du présent travail étant de décrire les propriétés de systèmes composites à base de vésicules phospholipidiques et de polymères, nous allons dans la section suivante rappeler quelques points concernant les polymères et les gels polymères.

2.2 Systèmes polymères

2.2.1 Les chaînes en solution

"poly"- "mère" veut dire "plusieurs"- "parties", un polymère est une macromolécule composée d'un nombre N de monomères élémentaires attachés les uns aux autres. Il existe une très grande variété de polymères naturels (caoutchouc, ADN ...) et artificiels (polystyrène, nylon ...). Leur étude, tant au niveau physique que chimique, représente un très large champ d'investigation. Nous tentons ici de rappeler quelques points nécessaires à la compréhension de cette étude tirés de la littérature [de Gennes, 1979].

Chaîne idéale

L'approche la plus simple pour modéliser un polymère composé de N monomères de longueur a est de le traiter comme une chaîne idéale. La macromolécule correspond à une marche aléatoire de N pas sur un réseau de maille a , d'un point défini comme l'origine du réseau à un

point caractérisé par un vecteur position \vec{r} . Il y a un nombre de chemins distincts $R_N(\vec{r})$ définis par ces paramètres. Par conséquent on peut associer une entropie à ces différentes conformations possibles, qui s'écrit :

$$S(\vec{r}) = \ln [R_N(\vec{r})] \quad (2.15)$$

Cette contribution entropique joue un rôle important dans le comportement des polymères. Revenons à la marche aléatoire : si un point du réseau a z voisins, à chaque point du réseau la chaîne a z possibilités pour choisir la direction du pas suivant, et donc on peut écrire que le nombre total de chemins possibles à N pas est :

$$\sum_{\vec{r}} R_N(\vec{r}) = z^N \quad (2.16)$$

Ensuite on peut écrire le vecteur \vec{r} comme la somme des vecteurs correspondant aux pas élémentaires de la chaîne sur le réseau :

$$\vec{r} = \sum_N \vec{a}_N \quad (2.17)$$

où les vecteurs \vec{a}_N sont des vecteurs de longueur a avec z orientations possibles et dont les orientations sont totalement indépendantes. Cela permet d'exprimer facilement la longueur carrée moyenne de la chaîne d'une extrémité à l'autre :

$$\langle \vec{r}^2 \rangle = Na^2 = R_0^2 \quad (2.18)$$

Et de montrer que la taille caractéristique de la marche aléatoire R_0 varie comme $N^{1/2}$. Par ailleurs, une autre conséquence du caractère aléatoire des orientations successives des \vec{a}_N est que dans le cas des grands N , la distribution de probabilité que l'extrémité de la chaîne se trouve à une distance r de l'origine est une gaussienne qui s'écrit :

$$p(\vec{r}) = \frac{R_N(\vec{r})}{\sum_{\vec{r}} R_N(\vec{r})} \cong N^{3/2} \exp\left(\frac{-3r^2}{2Na^2}\right) \quad (2.19)$$

Ceci nous permet de donner une expression de l'entropie conformationnelle de la chaîne :

$$S(\vec{r}) = S(0) - \frac{3}{2} \frac{r^2}{R_0^2} \quad (2.20)$$

Ce résultat exprime le fait que si on étire la chaîne, le nombre de configurations qu'elle peut atteindre diminue, et par conséquent son entropie également. L'énergie libre de la chaîne s'écrit :

$$F(\vec{r}) = E - TS = F(0) - \frac{3}{2} \frac{Tr^2}{R_0^2} \quad (2.21)$$

Ceci montre que la chaîne se comporte comme un ressort entropique de raideur $\frac{3}{2} \frac{T}{R_0^2}$. Le modèle de la chaîne idéale permet d'obtenir des résultats fondamentaux sur la physique des polymères ainsi que de comprendre certaines de leurs propriétés de façon simple. Néanmoins

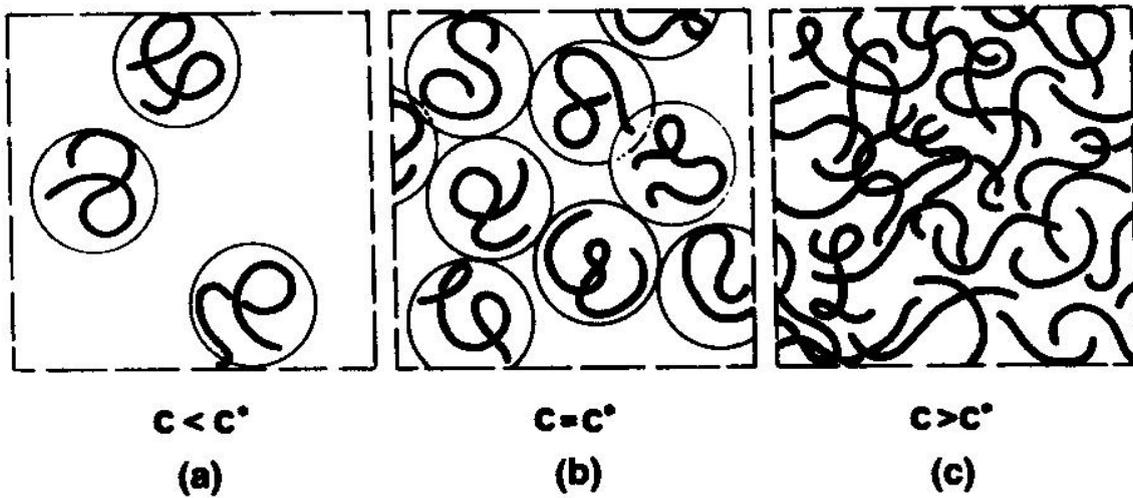


FIG. 2.10: Définition des solutions de polymères diluées $c < c^*$, de la concentration de recouvrement des chaînes $c = c^*$ et des solutions semidiluées $c > c^*$, extrait de [de Gennes, 1979]

nous allons devoir introduire une description moins idéalisée des chaînes de polymères. Historiquement cela a été fait d'abord parce que les expériences réalisées sur les chaînes en solution ont montré que celles-ci ne se comportaient pas comme des chaînes idéales.

Chaîne "réelle" en bon solvant

Dans le but d'améliorer la description des polymères, la chaîne est toujours considérée comme une marche aléatoire mais avec la contrainte de s'auto-éviter, ce qui est physiquement pertinent puisque les monomères ne peuvent s'interpénétrer. Dans ce cas, en bon solvant, la taille caractéristique de la marche aléatoire varie comme :

$$R_O \propto N^\nu \text{ avec } \nu = 3/5 \quad (2.22)$$

Concentration de recouvrement des chaînes c^*

On peut distinguer les solutions de polymères en fonction de leur concentration en chaînes. Il existe une concentration c^* pour laquelle les chaînes se recouvrent : c'est-à-dire que la concentration de la solution est exactement égale à la concentration de polymère dans le volume correspondant à une chaîne, elle s'écrit donc en bon solvant :

$$c^* \propto \frac{N}{R_O^3} = \frac{N^{1-3\nu}}{a^{-3}} = \frac{N^{-4/5}}{a^{-3}} \quad (2.23)$$

D'une façon simple, on peut dire que pour $c < c^*$ une solution de polymère est diluée, et il n'y a pas d'interaction entre les chaînes. Pour $c > c^*$ il faut prendre en compte les interactions entre chaînes.

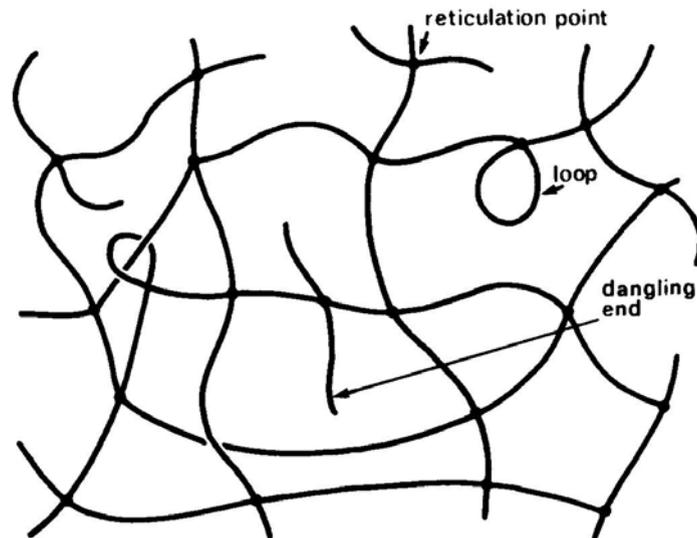


FIG. 2.11: Structure typique d'un gel : un ensemble de chaînes reliées par des points de réticulation, avec des irrégularités comme des boucles ou des chaînes non réticulées, extrait de [de Gennes, 1979]

2.2.2 Les gels de polymères

Définition

Un gel est un réseau tridimensionnel de chaînes de polymères reliées par un certain nombre de connections, comme représenté sur la figure 2.11. La nature de ces connections détermine le type du gel :

- **Gels temporaires** : résultants de l'enchevêtrement de longues chaînes. Par exemple une solution de polymère pour $c > c^*$ sollicitée avec un temps caractéristique inférieur au temps de vie des enchevêtrements se comportera comme un gel. Le type de comportement (liquide ou solide) dépendra donc du temps caractéristique de sollicitation.
- **Gels physiques** : la cohésion est due à des interactions physiques (liaisons H, interactions électrostatiques ...)
- **Gels chimiques** : obtenus par la polymérisation covalente d'unités monomères dont une fraction est de fonctionnalité supérieure à 2 ou par réticulation covalente de chaînes linéaires.

Les gels sont des objets importants parce que leurs applications sont pléthoriques : de l'agroalimentaire aux matériaux, nous rencontrons des gels couramment dans notre vie quotidienne.

Propriétés mécaniques : gonflement et élasticité des gels

Nous donnons ici quelques généralités concernant les propriétés thermodynamiques des gels [Cohen-Addad, 1996]. Ces modèles considèrent les gels comme des "caoutchoucs gonflables".

- Gonflement

La description de l'état de gonflement d'un gel polymère est basée sur l'hypothèse d'un équilibre entre les interactions "osmotiques" (chaînes-solvant) et les effets d'élasticité "entropiques" des chaînes. Ces effets ne sont pas complètement indépendants, par exemple une déformation élastique du réseau devrait modifier les interactions osmotiques entre les chaînes. Néanmoins dans le cadre des théories classiques (qui seront suffisantes pour comprendre les phénomènes mis en jeu dans cette étude), ces couplages sont négligés et on peut écrire en première approximation l'énergie libre du réseau comme une somme de 2 termes indépendants :

$$F = F_{mix}(\Phi) + F_{el}(\lambda_x, \lambda_y, \lambda_z) \quad (2.24)$$

où Φ est la fraction volumique de polymère et $\lambda_x, \lambda_y, \lambda_z$ les rapports des tailles du gel dans les directions x, y, z entre l'état de référence et l'état étudié. $F_{mix}(\Phi)$ est la partie osmotique de l'énergie et $F_{el}(\lambda_x, \lambda_y, \lambda_z)$ sa partie élastique.

Cette équation reflète le fait que les monomères ont une affinité plus ou moins grande avec les molécules de solvant, donc tendent à faire entrer du solvant dans le gel. Mais si trop de molécules de solvant entrent, le gel change de volume et les chaînes de polymères sont dilatées. Comme les chaînes sont des ressorts, la dilatation du gel fait apparaître de l'énergie élastique. Nous avons donc deux raisons pour le gel de gagner de l'énergie, et donc F s'écrit bien comme la somme d'un terme osmotique et d'un terme élastique.

Concernant la détermination des expressions analytiques de $F_{mix}(\Phi)$ et $F_{el}(\lambda_x, \lambda_y, \lambda_z)$, si le gel est considéré comme une solution semi-diluée de chaînes de polymère dans un solvant, on peut calculer $F_{mix}(\Phi)$ avec un modèle de Flory-Huggins [de Gennes, 1979] :

$$\frac{F_{mix}(\Phi)}{k_B T} = \frac{\Phi}{N} \ln \Phi + (1 - \Phi) \ln(1 - \Phi) + \chi \Phi(1 - \Phi) \quad (2.25)$$

où χ est un paramètre qui mesure l'interaction monomère-solvant et N désigne l'indice de polymérisation de la chaîne. De façon très simplifiée, on peut dire que le premier terme correspond à l'entropie translationnelle des chaînes (Φ/N étant la concentration en chaînes) et le second à celle des molécules de solvant (de concentration $(1 - \Phi)$). Le dernier terme exprime l'énergie d'interaction entre monomères et solvant. Nous avons exprimé $F_{mix}(\Phi)$ comme une énergie libre par site. Pour un gel $N \mapsto \infty$ et donc :

$$F_{mix}(\Phi) = k_B T [(1 - \Phi) \ln(1 - \Phi) + \chi \Phi(1 - \Phi)] \quad (2.26)$$

Pour des raisons de cohérence nous exprimerons également le terme d'élasticité F_{el} comme une énergie libre par site. Dans ce cadre, on obtient pour la densité d'énergie libre élastique :

$$F_{el}(\lambda_x, \lambda_y, \lambda_z) = A \frac{k_B T}{2} \frac{\Phi^{\frac{1}{3}}}{N_c} \Phi_0^{\frac{2}{3}} (\lambda_x^2 + \lambda_y^2 + \lambda_z^2) \quad (2.27)$$

Dans les cadres théoriques les plus simples $A=1$ et le terme précédent représente simplement l'énergie élastique d'une assemblée de chaînes dont la taille est dilatée d'un facteur λ . Selon la fonctionnalité des points de réticulation, la valeur de A varie.

Pour une description plus réaliste, il faudrait introduire un terme rendant compte de la localisation spatiale des points de réticulation et de l'entropie liée à leur mouvement. Nous donnons

donc ici une expression simplifiée de F_{el} car le calcul de ce terme a donné lieu à de nombreuses controverses. N_c est le nombre moyen de monomères entre deux points de réticulation et Φ_0 est la fraction volumique de polymère dans l'état de référence. Nous avons donc maintenant une expression de la densité d'énergie libre pour un gel baigné dans un solvant, celle-ci s'écrit :

$$F = (1 - \Phi) \ln(1 - \Phi) + \chi \Phi(1 - \Phi) + A \frac{k_B T}{2} \frac{\Phi^{\frac{1}{3}}}{N_c} \Phi_0^{\frac{2}{3}} (\lambda_x^2 + \lambda_y^2 + \lambda_z^2) \quad (2.28)$$

Le potentiel chimique des molécules de solvant dans le gel est égal à :

$$\Delta\mu = \left(\frac{\partial F}{\partial n} \right)_T \quad (2.29)$$

où n est le nombre de molécules de solvant dans le gel. Dans notre cas, ce potentiel chimique sera donc la somme d'un terme osmotique et d'un terme élastique :

$$\Pi^{gel} = \Pi_{os}^{gel} + \Pi_l^{gel} = \Delta\mu \frac{k_B T}{\nu} \quad (2.30)$$

où ν est le volume moléculaire du solvant. En dérivant l'énergie libre F on obtient :

$$\Delta\mu = k_B T \left[- \left(\frac{1}{2} - \chi \right) \Phi^2 + \frac{A}{N_c} \Phi^{\frac{1}{3}} \Phi_0^{\frac{2}{3}} \right] \quad (2.31)$$

Nous pouvons facilement calculer la fraction volumique d'équilibre du gel à partir de l'expression de ce potentiel chimique. En effet le gel est à l'équilibre quand son énergie libre est minimum ou, ce qui est équivalent, quand le potentiel des molécules de solvant est nul. La fraction volumique d'équilibre Φ_{eq} s'écrit donc :

$$\Phi_{eq} = \frac{A^{\frac{3}{5}}}{\frac{1}{2} - \chi} \Phi_0^{\frac{3}{5}} N_c^{\frac{3}{5}} \quad (2.32)$$

Cette fraction correspond à l'équilibre entre la tendance osmotique du gel à être gonflé par les molécules de solvant et la résistance élastique des chaînes à la dilatation.

- Propriétés mécaniques

Nous allons utiliser l'expression de l'énergie libre du gel pour exprimer ses propriétés élastiques. Par définition la force de rappel du gel s'écrit :

$$f_x = \frac{1}{L_x^i} \left(\frac{\partial F}{\partial \lambda_x} \right)_T \quad (2.33)$$

où L_x^i est la taille de l'échantillon dans la direction x . Par conséquent la contrainte nominale, force par unité de surface non déformée, s'écrit :

$$\sigma_0 = \frac{1}{S_0^i L_x^i} \left(\frac{\partial F}{\partial \lambda_x} \right)_T \quad (2.34)$$

où S_0^i est la surface orthogonale à la direction d'application de la force. En dérivant l'expression de l'énergie libre 2.28, il vient :

$$\sigma_0 = A \frac{k_B T}{\nu} \frac{\Phi_0^{\frac{1}{3}}}{N_c} \Phi_0^{\frac{2}{3}} \left(\lambda_x - \frac{1}{\lambda_x} \right) \quad (2.35)$$

Nous obtenons une relation entre la contrainte et la déformation que subit le gel. Dans la limite des petites déformations, nous négligerons le terme en $1/\lambda_x$, ce qui ramène l'équation précédente à une relation linéaire (type loi de Hooke $\sigma_0 = G\lambda_x$) entre la contrainte et la déformation et qui permet de définir le module élastique du gel G :

$$G = A \frac{k_B T}{\nu} \frac{\Phi_0^{\frac{1}{3}}}{N_c} \Phi_0^{\frac{2}{3}} \quad (2.36)$$

On peut constater que G varie comme la fraction volumique du gel à la puissance $1/3$ et avec l'inverse de N_c (donc linéairement avec le taux de réticulation). On peut également écrire le potentiel chimique du gel comme :

$$\Pi^{gel} = \left(\frac{1}{2} - \chi \right) \Phi^2 - G \quad (2.37)$$

Précisons que cette description classique implique que les chaînes se comportent de manière gaussienne, ce qui n'est pas le cas dans la réalité. De plus les mécanismes de déformation élastiques des chaînes manquent également de réalisme. Néanmoins cette description a le mérite de permettre de comprendre au moins qualitativement le comportement des gels ; c'est la raison pour laquelle nous nous en contenterons ici.

2.2.3 Le poly(N-isopropylacrylamide)

Le poly(N-isopropylacrylamide) (poly(Nipam)) est cité dans la littérature avec une fréquence croissante depuis 1956 [Schild, 1992]. L'intérêt qu'il suscite est largement dû à son caractère thermosensible. En effet, comme certains autres polymères hydrosolubles, le polyoxyde d'éthylène (POE) par exemple, le poly(Nipam) présente une transition volumique qui se manifeste par un effondrement des chaînes de polymère quand la température passe une certaine température critique T_C . De plus celle-ci est proche de la température du corps humain. Grâce à cette propriété, le poly(Nipam) est utilisé d'une part pour de nombreuses applications techniques, d'autre part comme un système modèle d'étude de la transition pelote-globule.

Thermostimulabilité

L'article le plus fréquemment cité (bien qu'il ne soit pas historiquement le premier) mettant en évidence la transition volumique du polyNipam en solution est [Heskins and Guillet, 1968]. Les auteurs étudient d'abord la transition volumique par une technique on ne peut plus simple appelée "cloud point" : des solutions de polyNipam sont chauffées très lentement jusqu'à l'observation de la transition. Celle-ci est très nette car l'effondrement des chaînes entraîne une démixion de la solution qui devient opaque. Cette transition est réversible.

Par la suite, cette mesure a été améliorée par l'utilisation de spectrophotomètres mais l'idée est la même. Le résultat de ces expériences est montré dans la figure 2.13 : on peut constater que la température de transition varie peu pour une gamme assez large de fractions volumiques

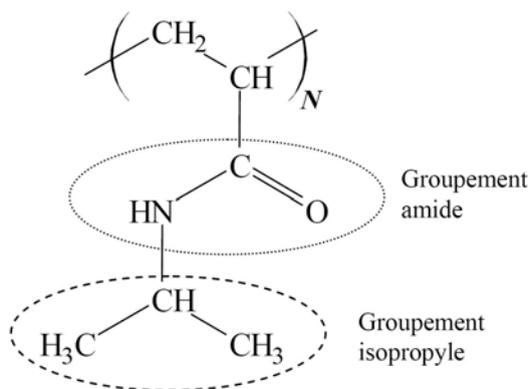


FIG. 2.12: Structure chimique du poly(N-isopropylacrylamide) (poly(Nipam), extrait de [Balu, 2005]

de polymère. Des expériences de DSC montrent par ailleurs que la transition est un processus endothermique [Otake et al., 1990], enfin des expériences de viscosimétrie et de sédimentation mettent en évidence la réduction de taille des chaînes [Schild, 1992].

La transition pelote-globule pour les chaînes individuelles a été mise en évidence par diffusion de lumière dans [Kubota et al., 1990] et [Fujishige et al., 1989] où les auteurs mesurent la réduction du rayon de giration des chaînes avant et après la transition.

Le comportement d'une chaîne de polymère dans un solvant est déterminé par un équilibre entre les interactions monomère-monomère, monomère-solvant et solvant-solvant ; l'énergie globale de la chaîne doit être minimale. Aux températures inférieures à la température de transition, les parties amide des monomères forment des liaisons hydrogène avec les molécules d'eau, alors que les groupes isopropyl apolaires sont entourés de molécules d'eau formant une cage hydrophobe (figure) 2.12. Cet effet entraîne une baisse de l'entropie de mélange mais aux températures inférieures à la température de transition, c'est l'enthalpie de mélange due aux liaisons hydrogènes qui l'emporte. Quand la température dépasse la température de transition, d'une part la fragilisation des liaisons hydrogènes entre les molécules d'eau et les groupements amide et d'autre part l'ouverture des cages hydrophobes autour des groupements isopropyl (qui s'assemblent alors par interaction hydrophobe) entraînent une augmentation de l'entropie. Ces deux effets aboutissent à une séparation de phases entre les macromolécules et les molécules de solvant.

Certains travaux ([Wang et al., 1998]) discutent du mécanisme précis de la transition et montrent qu'elle se produit en deux étapes. Tout d'abord les chaînes individuelles s'effondrent puis les différents globules s'agrègent pour former de grosses particules colloïdales métastables, ce qui explique la démixion visible des solutions de polyNipam.

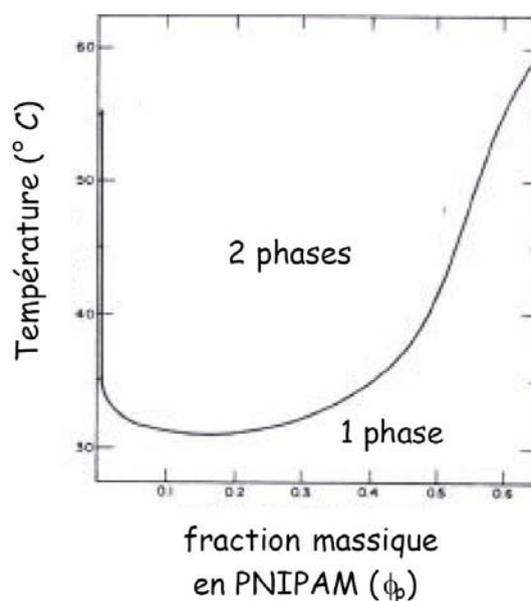


FIG. 2.13: Température de transition de solutions aqueuses de poly(Nipam) en fonction de leur fraction volumique, diagramme de phases extrait de [Jean, 2000]

Le poly(Nipam) est un tensio-actif

L'étude du comportement du poly(Nipam) à l'interface eau-air en présence de détergent [Jean, 2000], a permis de déterminer la tension de surface de solutions aqueuses de poly(Nipam) et d'autres polymères neutres. La figure 2.14 montre les résultats de ces expériences, et donc le comportement fortement tensio-actif du poly(Nipam) qui réduit la tension de surface de l'eau de 70 à environ 40 mM/m . Son influence est nettement plus grande que celle des autres polymères testés.

Gels de poly(Nipam)

L'étude des gels réticulés de poly(Nipam), comme le précise [Schild, 1992], évolue de façon relativement indépendante à celle du poly(Nipam) en solution. En effet il faut attendre 1984 pour que soit publiée l'observation de la transition volumique caractéristique des gels de poly(Nipam) déclenchée par la température [Hirokawa and Tanaka, 1984]. Cet article est le premier à présenter une transition volumique discontinue pour un gel non-ionique. La mesure du degré de gonflement V/V_0 (volume de l'échantillon sur volume des chaînes) des gels de poly(Nipam) en fonction de la température est représentée sur la figure 2.15, qui montre la transition volumique très abrupte que subissent les gels à environ 32°C. Bien sûr, la cause de la transition volumique pour les gels de poly(Nipam) est la même que pour les chaînes individuelles.

Après avoir présenté les propriétés des membranes de vésicules puis celles des polymères, nous allons nous intéresser à l'effet de l'interaction entre un polymère et une membrane.

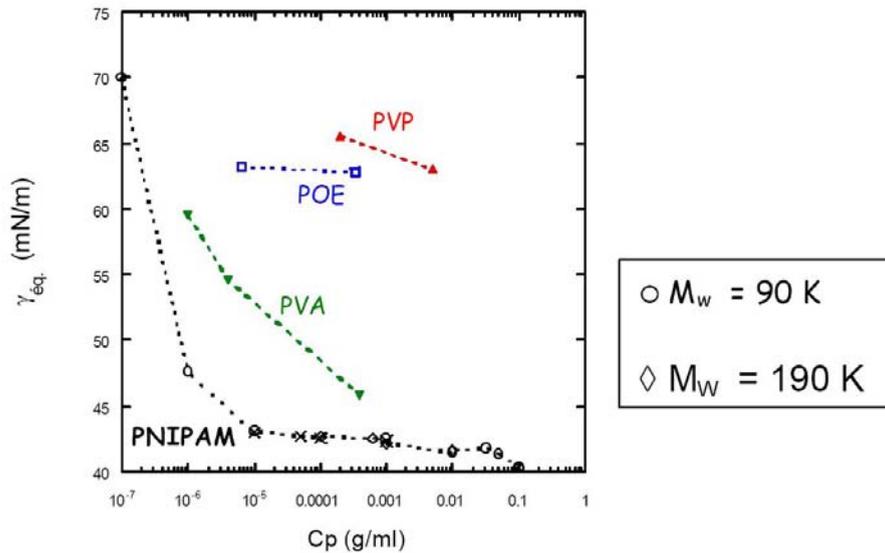


FIG. 2.14: Tension de surface à l'interface eau/air en fonction de la concentration en polymère pour des solutions aqueuses de différents polymères neutres (poly(Nipam), alcool polyvinylique (PVA), poly(vinylpyrrolidone) (PVP) et polyoxyde d'éthylène (POE)) en fonction de leur concentration, extrait de [Jean, 2000]

2.3 Interaction polymère/membrane : effet sur les propriétés de courbure

L'effet d'un polymère en interaction avec une membrane flexible a été abondamment décrit dans de nombreux travaux théoriques dont nous présenterons ici un aperçu. Nous ne rentrerons pas dans la description des techniques que les auteurs ont utilisées, mais nous rappellerons les résultats obtenus sur les modifications des propriétés de membrane dues au polymère.

2.3.1 Polymères greffés

Le premier cas à étudier est celui où la chaîne de polymère est attachée ponctuellement à la membrane. On va distinguer deux régimes à partir de la densité de polymères greffés : si la distance d entre les points d'ancrage est plus grande que le rayon de giration des polymères R_g , alors les chaînes ne sont pas influencées par la présence de leurs voisins, ce régime est appelé "champignon". Si la distance entre les points d'ancrage est inférieure à la taille des chaînes, les chaînes sont étirées et on est dans un régime "brosse". Ces deux régimes sont illustrés par la figure 2.16. On définit donc une densité de greffage γ des chaînes sur la surface.

Polymères greffés isolés

Un polymère isolé déforme la membrane sur laquelle il est greffé, car il gagne de l'entropie conformationnelle si la membrane se courbe en s'éloignant de la chaîne. On peut calculer ce gain d'entropie à partir des fonctions de partition de la chaîne dans une géométrie plane d'une part

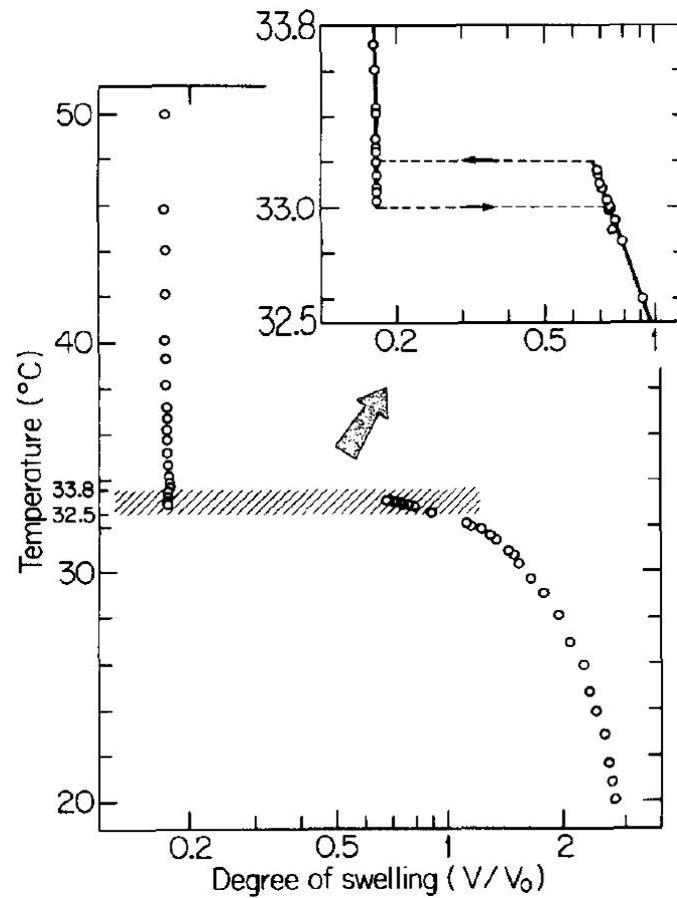


FIG. 2.15: Taux de gonflement V/V_0 de gels de poly(Nipam) en fonction de la température, extrait de [Hirokawa and Tanaka, 1984], en encart : zoom sur la région de la transition

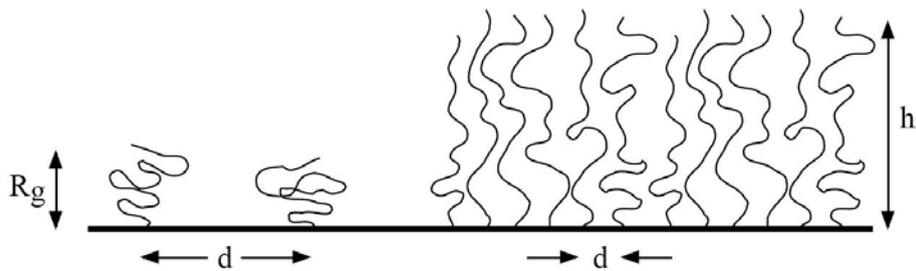


FIG. 2.16: Régimes de greffage d'un polymère sur une surface : si $d > R_g$ on est en régime "champignon", si $d < R_g$ on est en régime "brosse" et les chaînes ont une longueur $h > R_g$, extrait de [Bickel, 2001]

et sphérique et cylindrique d'autre part [Hiergeist and Lipowsky, 1996]. Le calcul explicite de la forme de la membrane déformée par un polymère greffé est donné dans [Bickel et al., 2000]. Le détail du calcul des constantes élastiques effectives de la membrane est présenté dans [Bickel, 2001], on obtient ¹ :

$$\Delta k_C = k_B T \frac{\pi + 2}{2} \gamma R_g^2 \quad (2.38)$$

$$\Delta k_G = -2k_B T \gamma R_g^2 \quad (2.39)$$

Δk_C est positif et Δk_G négatif. Il a été également montré que l'effet de la mobilité des lipides de la membrane pouvait aboutir à des séparations de phases et même à un bourgeonnement de la membrane si on prenait en compte le couplage entre la diffusion des lipides et la courbure induite par les chaînes greffées [Nicolas and Fourcade, 2003].

Brosses de polymères greffés

Le profil de concentration en monomères dans une brosse a une forme parabolique [Milner et al., 1988], ce qui permet de calculer la contribution d'une brosse à l'énergie interfaciale dans des géométries sphériques et cylindriques. L'excès d'énergie libre de la membrane couplée à la brosse de polymère revient à augmenter effectivement son module de courbure et à diminuer son module de courbure gaussienne. On peut obtenir à partir cet excès d'énergie et de l'énergie d'Helfrich la modification effective des constantes élastiques de la membrane :

$$\Delta k_C = k_B T \frac{9}{64} \frac{12^{1/3}}{\pi} N^3 (\gamma a^2)^{7/3} \quad (2.40)$$

$$\Delta k_G = -k_B T \frac{3}{35} \frac{12^{1/3}}{\pi} N^3 (\gamma a^2)^{7/3} \quad (2.41)$$

[Hiergeist and Lipowsky, 1996] trouvent des exposants différents avec un calcul en loi d'échelle. Néanmoins le signe des contributions Δk_C et Δk_G est le même. Il est également identique au cas des polymères en régime champignon.

Ces théories ont été validées expérimentalement dans [Endo et al., 2000] (effet de copolymères sur des systèmes ternaires eau/huile/surfactant étudiés par diffusion de neutrons), [Evans and Rawicz, 1998] (aspiration en micropipettes sur des vésicules décorées de PEG greffé sur les têtes des lipides) et [Yang et al., 1998] (phases lamellaires de "polysoaps" étudiées par diffusion de rayons X et de neutrons). Néanmoins [Warriner et al., 1998] (phases lamellaires à base de lipides PEG étudiées par diffusion de rayons X) et [Joannic et al., 1997] (vésicules formées à partir d'un système ternaire surfactant/octanol/eau salée en interaction avec un copolymère PEG-Stéarate étudiées par diffusion de lumière et de neutrons) ne mesurent pas d'effet important de la décoration sur le module de courbure.

¹Nous nous limitons au cas où la chaîne est greffée par une extrémité, mais elle peut être greffée de plusieurs façons et donc présenter des configurations "cheveux", "boucle", "siamois" ou "géméau", pour une revue de l'effet de ces différentes configurations, cf. [Bickel, 2001] et [Lipowsky et al., 1998]

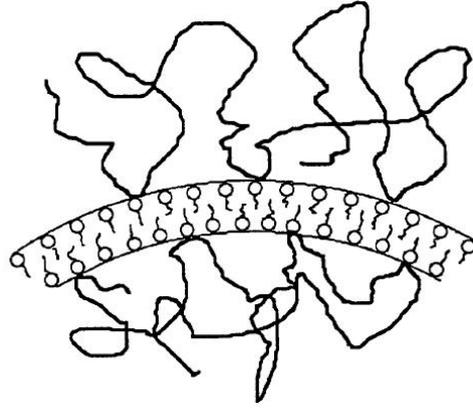


FIG. 2.17: Polymères adsorbés sur une membrane lipidique, extrait de [Brooks et al., 1991a]

2.3.2 Polymères adsorbés

Un polymère adsorbé sur une membrane modifie ses modules de courbure et de courbure gaussienne k_C et k_G [Brooks et al., 1991a]. Nous allons donner ici un aperçu de la démarche suivie dans cet article mais nous ne rentrerons pas dans le détail des calculs. Les auteurs se limitent au cas d'un polymère qui s'adsorbe de façon homogène et réversible sur une bicouche sans la pénétrer, comme indiqué sur la figure 2.17.

Tout d'abord on peut évaluer la densité d'énergie interfaciale F entre une solution de polymère de concentration locale ϕ constituant un réservoir de molécules et un substrat sur lequel le polymère peut s'adsorber avec une densité d'énergie d'adsorption γ [de Gennes, 1979] :

$$F = -\gamma \int \phi dS + \frac{k_B T}{a^3} \int \frac{a^3}{24\phi} (\nabla\phi)^2 + \frac{1}{2} \nu (\phi - \phi_b)^2 dV \quad (2.42)$$

où a est la taille d'un monomère, $\nu = 1 - 2\chi$ où χ est le paramètre d'interaction de Flory et ϕ_b est la concentration de la solution loin du substrat. En parallèle les auteurs calculent le profil de concentration de la solution au voisinage du substrat pour des géométries sphériques et cylindriques. Ce profil est obtenu en résolvant l'équation :

$$\frac{a^2}{6} \nabla^2 \Psi - \nu \Psi^3 + \nu \Psi_b \Psi = 0 \text{ avec } \left[\frac{1}{\Psi} \frac{\partial \Psi}{\partial n} \right] = -\frac{1}{2D} \quad (2.43)$$

Avec $\Psi = \phi^2$ et n est la normale à la surface. Ceci permet d'introduire une longueur caractéristique $D = a/12\gamma$ qui donne une mesure de l'intensité de l'interaction polymère/substrat. Donc si $D > \zeta_b = \frac{a}{(3\nu\phi_b)^{1/2}}$ qui est la longueur de corrélation de la solution, alors l'interaction monomère-monomère domine l'attraction par le substrat, et donc on est dans un régime d'adsorption faible, en revanche dans le cas $D < \zeta_b$ on a une adsorption forte.

A partir du profil de concentration ϕ , les auteurs calculent l'énergie interfaciale F dans les géométries sphériques et cylindriques et en utilisant l'équation d'Helfrich 2.4, ils peuvent exprimer les variations des modules de courbure et de courbure gaussienne de la surface dues au polymères :

$$\Delta k_C = -\frac{3}{64} \frac{k_B T}{6a} \phi_b \zeta_b \left(\frac{\zeta_b}{D}\right)^2 \quad (2.44)$$

$$\Delta k_G = \frac{1}{32} \frac{k_B T}{6a} \phi_b \zeta_b \left(\frac{\zeta_b}{D}\right)^2 \quad (2.45)$$

On remarquera qu'à l'inverse du cas des polymères greffés, le module de courbure k_C est abaissé à cause de l'interaction avec le polymère. Rappelons que dans cet article les auteurs ne traitent analytiquement que le cas de l'adsorption faible. Le cas de l'adsorption forte est traité numériquement dans la suite de l'article [Brooks et al., 1991a] et dans un article proche [Brooks et al., 1991b], ces simulations donnent :

$$\Delta k_C = -O,43\alpha k_B T \sqrt{\frac{\alpha}{6\beta}} \ln\left(\frac{0.86\zeta_b}{D}\right) \quad (2.46)$$

$$\Delta k_G = -1,41\alpha k_B T \sqrt{\frac{\alpha}{6\beta}} \ln\left(\frac{0.20\zeta_b}{D}\right) \quad (2.47)$$

La dépendance en ζ_b change, mais le signe des contributions Δk_C et Δk_G est conservé. Le calcul analytique correspondant au cas de l'adsorption forte est présenté dans [Clément and Joanny, 1997], qui donne pour les modifications des modules :

$$\Delta k_C = -\frac{8}{9} \frac{k_B T}{a^2} \phi_b \zeta_b^2 \quad (2.48)$$

$$\Delta k_G = \frac{4}{3} \frac{k_B T}{a^2} \phi_b \zeta_b^2 \quad (2.49)$$

Donc, que l'adsorption soit faible ou forte, on a une décroissance du module de courbure et une augmentation du module de courbure gaussienne.

Nous nous arrêtons ici pour cet aperçu de la littérature sur les interactions polymère-membrane et nous abordons maintenant les bases de l'aspiration par micropipettes.

2.4 Aspiration par micropipettes

La technique d'aspiration dans une micropipette a été inventée en 1964 par Rand et Burton puis améliorée par Evans en 1977, qui a depuis lors utilisé cette technique sur différents objets : vésicules, globules rouges et globules blancs ainsi que divers types de cellules (figure 2.23). Une revue des travaux d'aspiration par micropipettes de cellules vivantes est présentée dans l'article [Hochmuth, 2000], nous exposerons dans la section suivante quelques-uns des principaux résultats d'expériences de micropipettes sur différents types d'objets, afin de mettre en évidence les quantités physiques que cette technique permet de mesurer. Nous présenterons ici comment calculer le module de courbure k_c et le module de compressibilité K . Nous nous intéressons également à la détermination du module d'Young d'un objet élastique homogène. Nous ne parlerons pas ici des mesures de perméabilité de membrane [Olbrich et al., 2000].

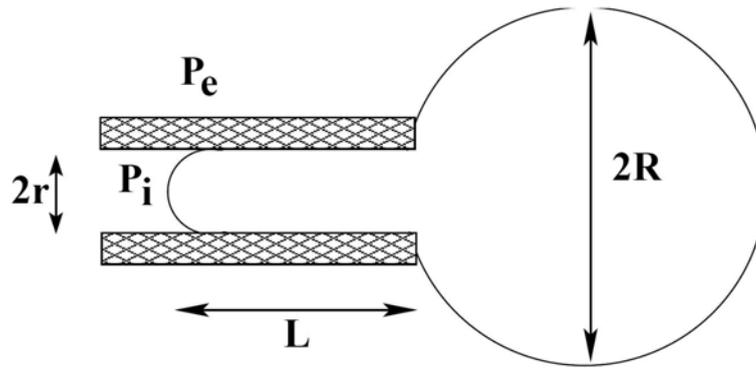


FIG. 2.18: Schéma d'une GUV unilamellaire partiellement aspirée dans une micropipette avec les différents paramètres mesurés lors des expériences, extrait de [Fa, 2003]

2.4.1 Mesure de modules de courbure

La mesure du module de courbure repose sur l'expérience suivante : une vésicule unilamellaire dont le diamètre est de l'ordre de $50 \mu\text{m}$ est aspirée dans un capillaire de verre de diamètre $10 \mu\text{m}$; on suit la partie de la vésicule aspirée dans le capillaire en fonction de la pression d'aspiration. Tout d'abord nous présentons sur la figure 2.18 les différentes quantités qui sont mesurées lors de l'expérience. Tous les calculs sont faits à partir de r , R , L et $P_e - P_i$. Nous nous baserons sur l'analyse développée par E. Evans ([Kwok and Evans, 1981] par exemple) dont une synthèse est présentée dans la thèse [Fa, 2003].

L'analyse des données que nous allons présenter est basée sur quelques hypothèses de départ :

- La déformation de la vésicule se fait à volume constant : les variations de volume pour des raisons osmotiques coûtent beaucoup plus d'énergie que les déformations de la membrane.
- L'aire de la vésicule est constante également : la vésicule est isolée d'un éventuel réservoir de lipides.
- Il n'y a pas d'adhésion entre le verre de la pipette et la vésicule.

Tout d'abord on peut mesurer la tension de la membrane, car la loi de Laplace qui relie la différence de pression de part et d'autre d'une interface et sa tension s'applique en tout point de la vésicule aspirée dans la pipette. On peut donc l'appliquer à la portion de la vésicule dans la pipette :

$$p - p_i = \frac{2\sigma}{r} \quad (2.50)$$

Ainsi qu'à la portion de vésicule à l'extérieur de la pipette :

$$p - p_e = \frac{2\sigma}{R} \quad (2.51)$$

Ce qu'on définit comme la pression d'aspiration ΔP est $p_e - p_i$ et comme la tension est la même en tout point de la vésicule, on a :

$$\sigma = \frac{\Delta P}{2} \frac{r}{1 - \frac{r}{R}} \quad (2.52)$$

Cette expression permet donc de calculer la tension de membrane à partir de la pression d'aspiration et des paramètres géométriques mesurés sur les images.

Nous avons établi plus haut la relation d'Helfrich 2.10, qui relie la quantité d'aire stockée dans les fluctuations de la membrane et sa tension par l'intermédiaire de son module de courbure. Pour mesurer le module de courbure avec cette relation, il nous faudrait connaître l'aire exacte de la membrane, ce qui nous est impossible. En effet pour déplier complètement les fluctuations thermiques, il faut une énergie comparable aux énergies de déformations élastiques de la membrane. Pour contourner cette difficulté, l'incrément de surface est exprimé par rapport à un état de référence et k_C peut être mesuré avec une bonne précision.

L'aire apparente d'une vésicule aspirée dans une micropipette (situation représentée sur la figure 2.18) est calculée en supposant une symétrie sphérique autour de l'axe de la pipette. L'aire apparente A^a de la vésicule s'écrit comme la somme de l'aire de la partie à l'extérieur de la pipette (une sphère de rayon R tronquée d'une calotte sphérique de rayon r) et de l'aire la partie à l'intérieur de la pipette (un cylindre de rayon r et de longueur L et un hémisphère de rayon r), soit :

$$A^a = 2\pi R^2 \left[1 + \left(1 - \left(\frac{r}{R} \right)^2 \right)^{1/2} \right] + 2\pi r (L - r) + 2\pi r^2 \quad (2.53)$$

ou :

$$A^a = 2\pi R^2 \left[1 + \left(1 - \left(\frac{r}{R} \right)^2 \right)^{1/2} \right] + 2\pi r L \quad (2.54)$$

Lors des expériences, nous choisissons des vésicules dont le rayon est de l'ordre de $4r$, donc les termes du deuxième ordre en r/R dans l'expression précédente peuvent être négligés, et on obtient :

$$A^a = 4\pi R^2 [1 + 2\pi r L - \pi r^2] \quad (2.55)$$

On définit alors l'incrément relatif de surface entre deux états d'aspiration donnés A_2^a et A_1^a :

$$\alpha = \frac{A_2^a - A_1^a}{A_1^a} \quad (2.56)$$

En multipliant au numérateur et au dénominateur par $A/(A_1^a A_2^a)$ on obtient :

$$\alpha = \frac{\frac{A}{A_1^a} - \frac{A}{A_2^a}}{\frac{A}{A_2^a}} \quad (2.57)$$

Ce qui permet, via la relation d'Helfrich 2.10, d'écrire :

$$\alpha = \frac{\frac{k_B T}{8\pi k_c} \ln \frac{\sigma_2}{\sigma_1}}{1 + 8\pi k_c \ln \frac{\sigma_{max}}{\sigma_2}} \quad (2.58)$$

Cette relation peut être simplifiée car le dénominateur est très proche de 1. Si l'on définit un état d'aspiration de référence dans lequel la longueur de la langue de vésicule aspirée est L_0 la plus petite possible, on obtient :

$$\alpha = \frac{A^a - A_{L_0}^a}{A_{L_0}^a} = \frac{k_B T}{8\pi k_c} \ln \frac{\sigma}{\sigma_{L_0}} \quad (2.59)$$

Il existe donc une relation linéaire entre $\ln \sigma$ et α qui permet d'accéder à k_c dans le régime de dépliement des fluctuations thermiques. Nous devons maintenant exprimer α en fonction des paramètres géométriques auxquels l'expérimentateur a accès pendant une expérience d'aspiration (R , R_{L_0} , r , L et L_0) :

$$\alpha = \frac{4\pi (R^2 - R_{L_0}^2) + 2\pi r (L - L_0)}{4\pi R_{L_0}^2} = \left(\frac{R}{R_{L_0}} \right)^2 - 1 + \frac{1}{2} \frac{r}{R_{L_0}^2} \Delta L \quad (2.60)$$

On peut aisément établir que :

$$(R^3 - R_{L_0}^3) = \frac{3}{4} r^2 \Delta L \quad (2.61)$$

Donc on peut écrire l'incrément d'aire (en ne conservant que les termes du premier ordre en ΔL) :

$$\alpha = \frac{1}{2} \frac{r}{R_{L_0}^2} \Delta L \left(1 - \frac{r}{R_{L_0}} \right) \quad (2.62)$$

Evans rapporte un calcul légèrement différent, qui aboutit à écrire l'incrément d'aire comme :

$$\alpha = \frac{1}{2} \frac{r}{R_{L_0}^2} \Delta L \left(1 - \frac{r}{R} \right) \quad (2.63)$$

En réalité les deux démarches sont équivalentes [Fa, 2003] car le rayon de la partie extérieure de la vésicule varie très peu lors d'une expérience d'aspiration ; l'utilisation des deux formules 2.62 et 2.63 mène à des résultats identiques sur les mesures de k_C .

La figure 2.19 extraite de [Rawicz et al., 2000] montre une mesure du module de courbure pour des vésicules de SOPC et de dilinoleoyl-sn-phosphatidilcholine. On voit bien sur cette courbe le régime correspondant au dépliement des fluctuations pour lequel $\ln \sigma$ est linéaire avec α .

2.4.2 Mesure de modules d'élasticité de membrane

A partir d'une expérience d'aspiration de vésicule, on peut également mesurer le module d'élasticité de la membrane K que nous avons défini à la section 2.1.2. Quand la vésicule est aspirée dans la micropipette, on observe sur la courbe 2.20 extraite de [Rawicz et al., 2000] qu'après le régime de dépliement des fluctuations, on atteint un régime où σ est proportionnel à α ce qui correspond bien à une déformation élastique de la membrane. En effet l'équation 2.3 de la section 2.1.2 est équivalente à écrire :

$$\sigma = \sigma_0 + K\alpha \quad (2.64)$$

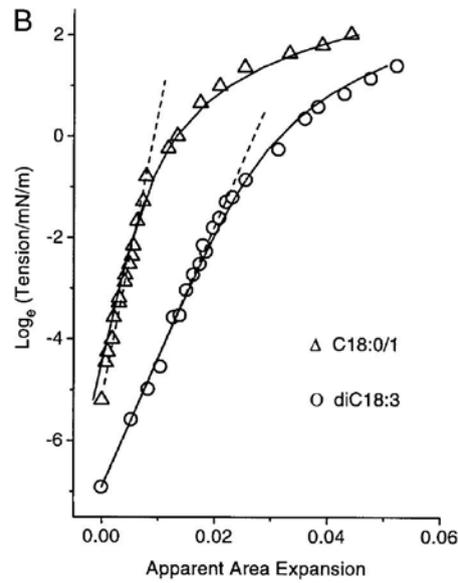


FIG. 2.19: $\ln\sigma$ en fonction de α correspondant à l'aspiration d'une vésicule de SOPC (C 18 :0/1) et de dilinoleoyl-sn-phosphatidilcholine (diC 18 :3), extrait de [Rawicz et al., 2000]. On obtient pour le (C 18 :0/1) $k_C = 0,90 \cdot 10^{-19}$ J ($22,5 k_B T$) et pour le (diC 18 :3) $k_C = 0,56 \cdot 10^{-19}$ J ($14 k_B T$)

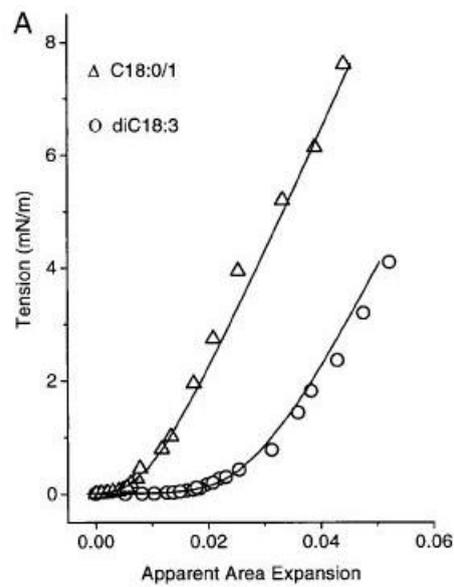


FIG. 2.20: σ en fonction de α correspondant à l'aspiration d'une vésicule de SOPC (C 18 :0/1) et de dilinoleoyl-sn-phosphatidilcholine (diC 18 :3) correspondant aux mêmes expériences que la courbe précédente, extrait de [Rawicz et al., 2000]. On obtient pour le (C 18 :0/1) $K = 0,235$ N/m et pour le (diC 18 :3) $K = 0,239$ N/m

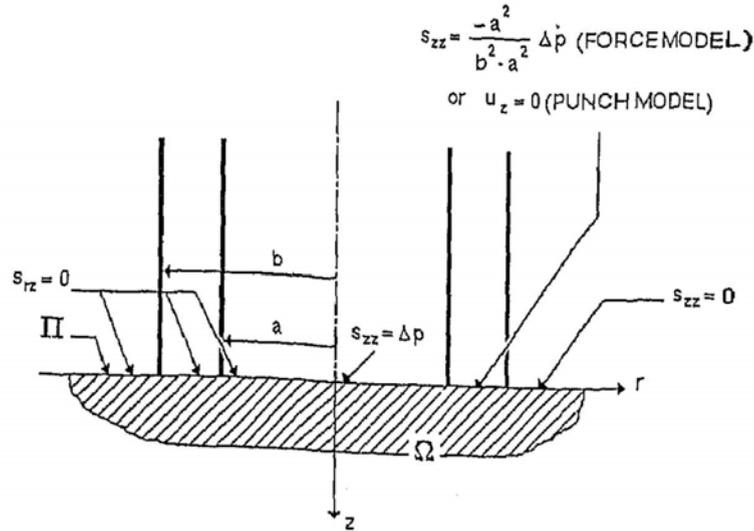


FIG. 2.21: Aspiration d'un demi-plan élastique dans une micropipette, définition des quantités pertinentes pour le modèle de [Théret et al., 1988] notamment a, b et Δp

Nous constatons donc qu'à partir d'une courbe comme celle présentée sur la figure 2.20, il est possible de mesurer le module d'élasticité de la membrane. [Fournier et al., 2001] présente une approche qui conduit à une description simultanée des régimes de dépliement des fluctuations et d'extension élastique.

Après avoir présenté l'utilité de la technique d'aspiration dans une micropipette pour mesurer les modules de courbure et d'élasticité d'une membrane, nous allons montrer qu'il est également possible de mesurer le module d'Young d'un milieu élastique homogène grâce à cette technique.

2.4.3 Mesure de module d'Young

Le modèle que nous présentons ici a été développé pour mesurer le module d'Young de corps élastiques afin d'étudier l'influence d'un écoulement de cisaillement sur les propriétés mécaniques de cellules endothéliales [Théret et al., 1988]. C'est pourquoi les auteurs développent un modèle traitant l'aspiration dans une micropipette d'un milieu élastique.

La figure 2.21 montre la position du problème. Un semi-plan infini de module d'Young E est aspiré dans une micropipette orthogonale à son interface Π . La direction de la pipette définit l'axe z tandis que a et b sont les diamètres respectivement interne et externe de la pipette. La première étape est d'établir des conditions aux limites pour les grandeurs tensorielles de contrainte \mathbf{s} et de déplacement \mathbf{u} . Les auteurs proposent deux modèles :

- "**force model**" : le champ de contraintes en z entre la paroi de la pipette et le milieu élastique est constant, et il s'écrit facilement :

$$s_{zz} = \frac{a^2}{b^2 - a^2} \Delta p \text{ avec } a \leq r \leq b \quad (2.65)$$

- "**punch model**" : on impose simplement que le déplacement en z est nul entre la pipette et le demi-plan :

$$\mathbf{u}_{z(r,0)} = 0 \text{ avec } a \leq r \leq b \quad (2.66)$$

Ce modèle correspond mieux à la réalité physique du problème.

Le calcul du champ de déplacement, et particulièrement de $-\mathbf{u}_{z(0,0)}$ qui correspond à la longueur de la partie du milieu élastique aspirée dans la pipette, est basé sur les équations constitutives :

$$\text{divs} = 0; \mathbf{e} = \frac{1}{2} [\text{gradu} + \text{grad}\mathbf{u}^T]; \text{div}\mathbf{u} = 0; s = -\mathbf{p} + 2G\mathbf{e}; \quad (2.67)$$

où \mathbf{e} est le tenseur des déplacements et \mathbf{p} la contrainte moyenne. Le module élastique de cisaillement G est simplement $E/3$. Nous ne détaillons pas ici le calcul des différentes grandeurs. Dans les deux cas, le calcul aboutit à la formule [Théret et al., 1988] :

$$L = \frac{3a\Delta p}{2\pi E} \Phi_\eta \quad (2.68)$$

Cette expression relie la longueur maximale de la partie du milieu élastique aspirée dans la pipette L et la pression d'aspiration Δp par l'intermédiaire du module élastique E et du rayon interne a de la pipette. C'est donc la relation qui nous utiliserons en pratique lors des expériences de micropipettes. Φ_η est une constante qui dépend toujours du rapport :

$$\eta = \frac{b - a}{a} \quad (2.69)$$

que les auteurs nomment de façon parlante "wall parameter". La dépendance de Φ_η est différente selon les conditions aux limites utilisées pour la calculer, la figure 2.22 montre la variation de ce paramètre.

Les auteurs soulignent le fait que le choix des conditions aux limites dans leur cas influence les mesures de modules élastiques. Ceci est très compréhensible dans la mesure où leurs expériences correspondent à des cas où η est de l'ordre de 0.5, on voit bien sur la figure 2.22 que dans ce cas les valeurs de Φ sont très différentes selon le modèle utilisé. Nous pouvons constater sur la figure que les valeurs de Φ convergent vers 2.2 pour les petites valeurs de η , nous verrons que c'est notre cas dans la section dédiée aux expériences utilisant ce modèle, par conséquent nous n'irons pas plus loin dans la discussion sur la valeur de Φ dans nos expériences.

En guise de conclusion de cette section, nous présentons la figure 2.23 qui montre un aperçu des expériences d'aspiration par micropipettes sur différents types d'objets. Nous n'avons pas présenté ici l'abondante bibliographie sur l'aspiration des globules blancs et le traitement de ces expériences avec des modèles viscoélastiques continus [Evans and Yeung, 1989], ni celle concernant l'aspiration de globules rouges et de la mesure du module de cisaillement de leur membrane rendue élastique par son interaction avec un cortex bidimensionnel de spectrine [Evans, 1983].

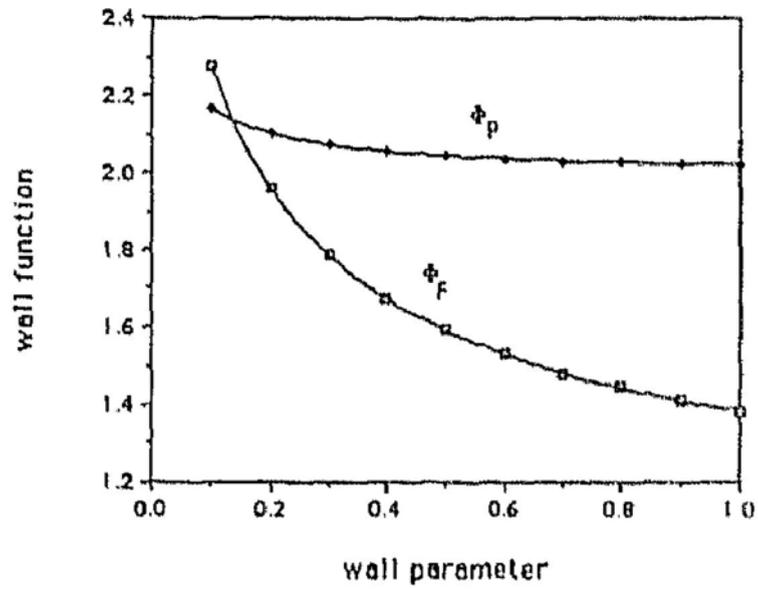


FIG. 2.22: Φ , "wall function" en fonction de η , "wall parameter", pour les deux types de conditions aux limites ("force model" et "punch model"), extrait de [Théret et al., 1988]

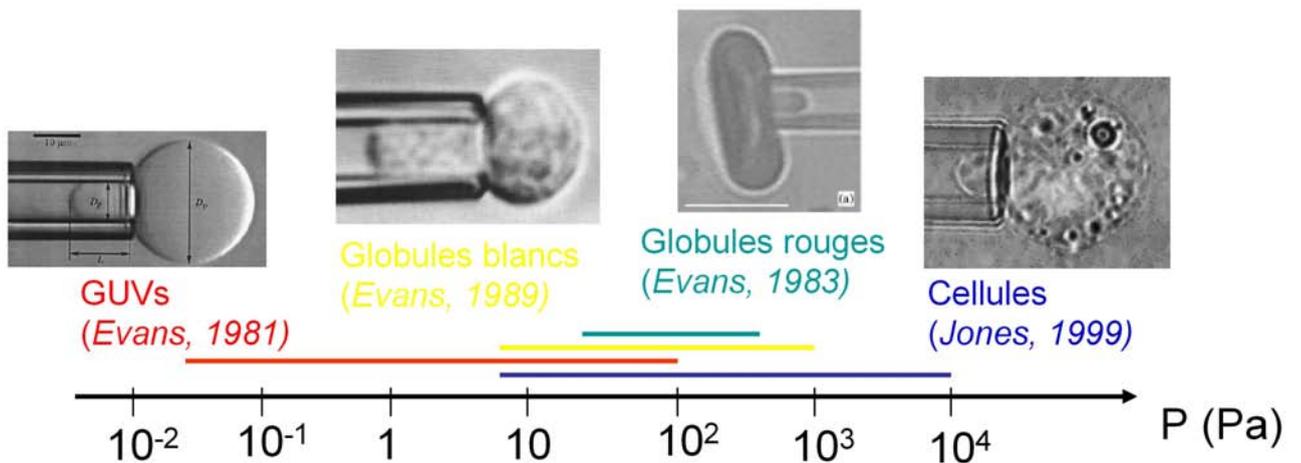


FIG. 2.23: Pressions caractéristiques d'aspiration pour des expériences sur différents types d'objets dont l'étude est rapportée dans [Kwok and Evans, 1981], [Evans and Yeung, 1989], [Evans, 1983], [Jones et al., 1999]

2.5 Extrusion hydrodynamique de nanotubes membranaires sur des GUVs

L'étude de l'extrusion de tubes de membrane sur des GUVs permet de mesurer certains paramètres physiques des membranes par l'intermédiaire de modèles physiques pertinents [Rossier et al., 2003]. Nous présentons très brièvement dans cette section quelques éléments théoriques sur la physique de l'extrusion hydrodynamique de tubes sur des GUVs [Borghi, 2006]. Le principe de la technique est d'entraîner la vésicule fixée ponctuellement (sur la pointe d'une aiguille traitée à la polyLysine) dans un flux à la vitesse U (cf. sections 4.5 et 7.2). L'extrusion d'un tube de membrane peut être vue comme une transition du premier ordre lorsqu'une force seuil f_c ponctuelle est appliquée sur une membrane, f_c s'écrit :

$$f_c = 2\pi(2k_c\sigma)^{\frac{1}{2}} = 2\pi\frac{k_c}{r} \quad (2.70)$$

avec $r = (\frac{k_c}{\sigma})^{\frac{1}{2}}$ est le rayon du tube. Avec un flux de vitesse U , la force de Stokes sur une vésicule de rayon R est $f_v = 6\pi\eta RU$, η étant la viscosité du solvant. A l'équilibre $f_c = f_v$, on peut donc écrire la vitesse seuil d'extrusion :

$$U_c = \frac{(2k_c\sigma)^{\frac{1}{2}}}{3\eta R} = \frac{k_c}{3\eta Rr} \quad (2.71)$$

La tension initiale σ_0 de la vésicule n'est pas connue, mais σ_0 fixe d'après 2.71 la vitesse seuil d'extrusion U_{c0} . Si $U > U_{c0}$, un tube est extrudé à la vitesse $\dot{L} = dL/dt$ qui est déterminée par l'équilibre des forces qui s'exercent sur la vésicule :

$$U - \dot{L} = U_c \quad (2.72)$$

A mesure que le tube croît, la tension de membrane σ augmente et donc, d'après la relation d'Helfrich 2.10 l'excès d'aire de la membrane diminue. Pour un tube de longueur L et de rayon r , l'aire du tube s'écrit $\Delta A = 2\pi Lr$ et l'aire la vésicule $A = 4\pi R^2$. D'après 2.71, quand L croît au cours de l'extrusion, σ augmente et donc U_c augmente jusqu'à atteindre $U_c = U$ ce qui fixe une tension de membrane σ_∞ . On peut donc écrire :

$$L_\infty = \tau_0 U \ln \frac{U}{U_{c0}} \quad (2.73)$$

$$\frac{L}{L_\infty} \approx 1 - \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right) \quad (2.74)$$

où le temps caractéristique $\tau_0 = \frac{3k_B T R^3 \eta}{2\pi k_c^2}$ dépend fortement de R et de k_c et $\tau \approx \tau_0(1 + \ln(U/U_{c0}))$ dépend faiblement de U . Cette technique permet donc, entre autre, une mesure du module de courbure.

Quand le flux est stoppé, l'équilibre des forces devient $L = -U_c$, donc d'après 2.74 on a :

$$L \approx \tau U \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right) - \tau U_{c0} \quad (2.75)$$

Cette solution approchée décrit convenablement la dynamique de rétraction avec un temps $\tau_{ret} \approx \tau \ln(U/U_{co})$. Les expériences présentées dans [Borghi, 2006] ont confirmé la validité de cette approche pour les dynamiques d'extrusion et de rétraction de vésicules de DOPC.

Dans le cas de cellules ou de vésicules composites, ce type d'approche permet d'obtenir des informations sur les interactions entre milieu interne et membrane et éventuellement de remonter à des informations structurales.

Nous nous arrêtons ici pour cette partie théorique et nous passons dans le chapitre suivant à la présentation de la bibliographie concernant la préparation de vésicules composites.

Chapitre 3

Un état de l'art des vésicules composites

Nous présentons dans ce chapitre les travaux consistant à préparer des systèmes composites en couplant des vésicules lipidiques à d'autres constituants. Les vésicules composites sont préparées dans trois buts principaux :

- l'utilisation des GUVs comme **microréacteurs**
- l'obtention de **vecteurs de substances** dans le corps humain optimisés en terme de résistance et de relargage contrôlé.
- la fabrication de **systèmes modèles** minimalistes de cellules

C'est cette distinction que nous utiliserons pour classer les différents travaux que nous présentons. Cette classification pourrait d'ailleurs paraître très artificielle dans la mesure où certains travaux peuvent facilement être classés dans plusieurs catégories, néanmoins il nous a semblé nécessaire de fractionner la bibliographie en différentes parties pour faciliter la lecture de ce chapitre.

3.1 Les vésicules microcompartiments de réaction

Une vésicule forme un réservoir fermé dont le volume est de l'ordre du pL et l'expérimentateur peut encapsuler pratiquement tout type de solution dans une GUV (en choisissant bien sûr la technique de formation la plus adaptée). Elle peut donc être utilisée comme micro-réacteurs pour réaliser des réactions chimiques dans un environnement confiné ou dans le but de constituer un système cellulaire minimal. Nous illustrerons ci-dessous ces types d'utilisations par quelques exemples tirés de la littérature.

Le travail du groupe d'O. Orwar est un exemple d'utilisation du petit volume de liquide interne d'une vésicule comme un réacteur pour réaliser des réactions chimiques en milieu confiné. Précisons qu'à ces échelles micrométriques se produisent des phénomènes originaux dus aux dimensions des réservoirs et à des rapports surface/volume très différents de ceux impliqués lors de réactions chimiques réalisées dans des réservoirs macroscopiques. La production du groupe de O. Orwar est abondante et comporte des études sur des sujets qui s'éloignent de ce qui nous préoccupe, nous citerons donc à titre d'exemples quelques publications sélectionnées.

Un exemple caractéristique de l'utilisation des vésicules comme microcompartiments est

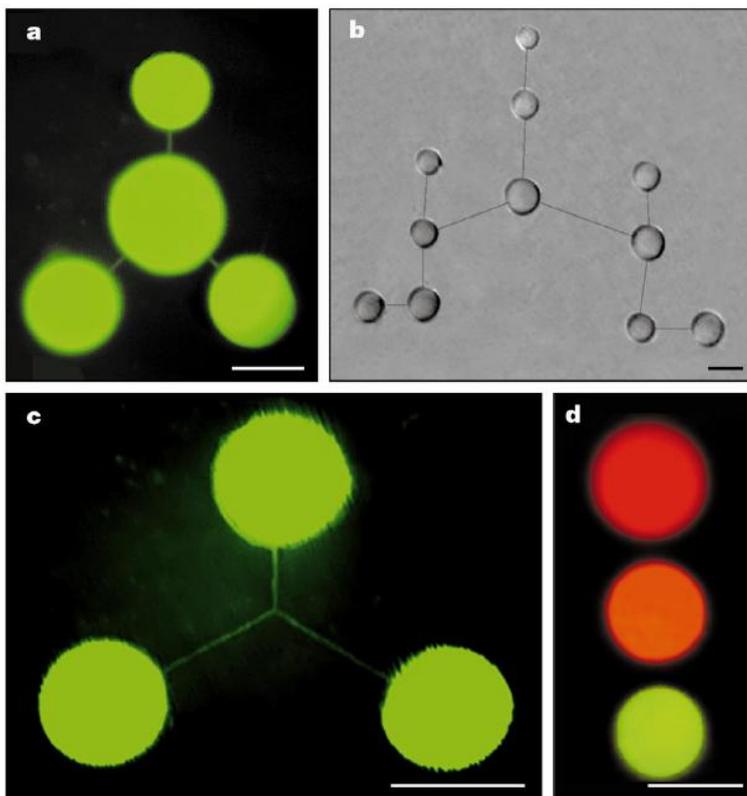


FIG. 3.1: Réseaux de vésicules et nanotubes : (a) Image de fluorescence d'un réseau de vésicules multilamellaires connectées par des nanotubes, (b) réseau de 11 vésicules connectées, les nanotubes ont été dessinés pour faciliter l'observation (c) Image de fluorescence d'une jonction en Y entre trois vésicules (d) Réseau de 3 vésicules différenciées de façon photochimique créé par la division d'une vésicule mère remplie de deux fluorophores : Dil (1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate) et de Fluorescéine, on "éteint" la fluorescence du Dil dans la vésicule du bas avec un laser He-Ne (633 nm) et celle de la Fluorescéine dans celle du haut avec un laser Ar^+ (488 nm), celle du milieu est intacte ; extrait de [Karlsson et al., 2001]

donné dans l'article [Karlsson et al., 2005] dans lequel les auteurs étudient une réaction enzymatique en milieu confiné. Cet article illustre aussi la finesse des techniques de micromanipulation mises en oeuvre dans ces études. Tout d'abord on part d'une vésicule lipidique, une micropipette est approchée de cette vésicule et insérée dans sa membrane. Ensuite la pipette est retirée de façon à former un tube de membrane d'environ $15 \mu\text{m}$ puis on injecte dans la micropipette un composé A, ce qui fait naître du filament lipidique une vésicule remplie de la solution A. On fabrique une vésicule en la gonflant, ce qui rappelle les jouets d'enfants pour fabriquer des bulles de savon, mais à l'échelle du micromètre ! L'opération est répétée avec une seconde micropipette contenant un composé B, et on aboutit à un réseau constitué de la vésicule mère et des deux vésicules filles contenant les produits A et B toutes les deux reliées à la vésicule mère par un nanotube lipidique. Comme les membranes et les nanotubes sont fluides, on peut facilement faire coalescer les deux tubes de membrane pour obtenir une jonction en Y [Cuvelier et al., 2005] puis relier les deux vésicules filles par un nanotube. Ensuite ces deux vésicules sont rapprochées jusqu'à ce que le nanotube qui les relie soit trop court et que les vésicules fusionnent, occasionnant le mélange à un instant précis des composés A et B. La synthèse du produit de cette réaction est ensuite suivie par fluorescence dans la vésicule formée. Ceci est une très belle illustration de l'utilisation des vésicules et des nanotubes lipidiques comme nanoréservoirs et nanocompartiments (figure 3.1) utilisés pour contrôler des réactions chimiques à l'échelle microscopique.

Nous citerons également un autre article du même groupe qui illustre les propriétés de GUVs dans lesquelles on micro-injecte une solution de chaînes de poly(NIPAM) et de Dextran (un polysaccharide) fluorescent [Jesorka et al., 2005], article qui nous intéresse particulièrement et qui a été publié après le début de ce travail. Tout d'abord les auteurs observent la transition de phase des chaînes de poly(NIPAM) quand la température est élevée au dessus de la LCST, puis étudient ce phénomène dans les GUVs remplies de poly(NIPAM) et de Dextran. Quand on chauffe ces GUVs, le poly(NIPAM) forme des domaines hydrophobes de haute densité, ce qui résulte en une séparation de zones hydrophobes correspondant aux chaînes de poly(NIPAM) démixées et de zones hydrophiles dans lesquelles le Dextran se localise. L'utilisation de Dextran fluorescent rend possible l'observation directe de cette séparation. Nous verrons au chapitre 6 que nous avons mis en évidence des phénomènes de compartimentation similaires pour des GUVs encapsulant seulement une solution de poly(NIPAM).

Il est également possible d'encapsuler dans une GUVs les composés nécessaires à la formation d'un gel, ce qui nous intéresse particulièrement pour le présent travail. En particulier [Kazakov et al., 2002] et [Kazakov et al., 2003] rapportent l'utilisation de liposomes comme réacteurs pour fabriquer des nanogels de différents polymères (poly(acrylamide), poly(N-isopropylacrylamide), et poly(N-isopropylacrylamideco-1-vinylimidazole). Après polymérisation, la membrane des liposomes peut être dissoute avec un détergent pour récupérer les gels. Par diffusion de lumière, les auteurs mettent en évidence les distributions de tailles des liposomes contenant du gel et des nanogels ainsi que leurs propriétés de stimulabilité (via la température pour le poly(Nipam) et via la composition du solvant pour le poly(Aam)).

Nous mentionnerons aussi un article assez proche de [Karlsson et al., 2005] dans les techniques mises en oeuvre, [Evans et al., 1996], dans lequel des réseaux nanotubes/GUVs sont créés et

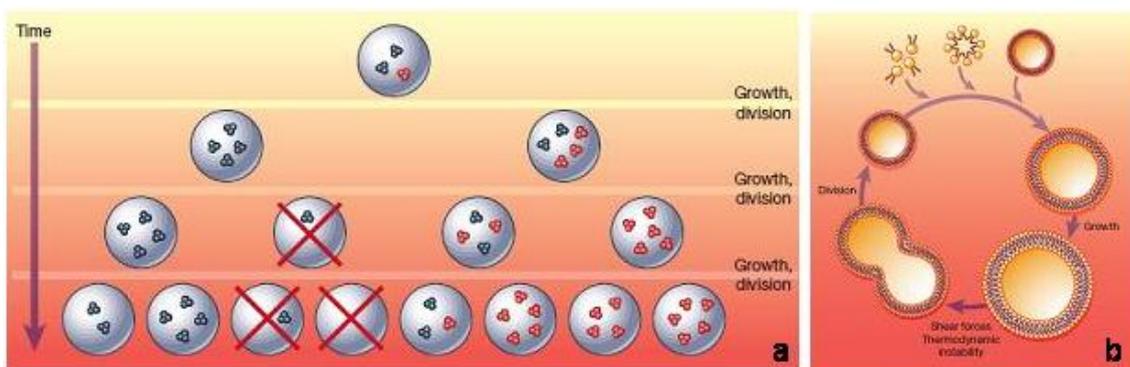


FIG. 3.2: Illustration d'une expérience de pensée : (a) auto-réplication de systèmes composés de RNS-replicases et systèmes lipidiques capables de se diviser (b). En (a), deux types de RNAreplicases avec un taux de reproduction élevé (rouges) et faible (noirs) montre comment les systèmes contenant des répliques à haut taux de répliation deviennent majoritaires, extraits de [Szostak et al., 2001]

remplis de solution d'acrylamide. Les auteurs modulent la taille des nanotubes en contrôlant la tension de membrane de la *GUV* dont ils sont extraits (cf. section 2.5). Une photopolymérisation UV de l'ensemble permet la fabrication de nano-objets de gel d'acrylamide de géométries variables.

Par ailleurs, la compartimentation est une caractéristique déterminante des systèmes vivants, en effet une cellule possède une membrane plasmique qui définit un intérieur et un extérieur à cette cellule. De plus les vésicules d'endo- et d'exocytose sont un moyen bien connu pour les cellules de transporter du matériel. Les membranes de phospholipides étant un modèle simple des membranes biologiques, les vésicules apparaissent dès lors comme un outil privilégié pour l'étude de la microcompartimentation et la formation d'une cellule minimale par une approche de complexité croissante.

En effet [Szostak et al., 2001] proposent une stratégie pour former des systèmes "vivants" à partir de membranes lipidiques qui encapsulent des RNS-replicases. Les auteurs prennent comme définition d'un système vivant sa capacité à se diviser et à subir une évolution darwinienne et montrent que ces deux aspects pourraient être reproduits par des systèmes lipidiques capables de se reproduire contenant des RNS-replicases (protéines capables de s'auto-reproduire) comme le montre la figure 3.2 (a). Le mécanisme de reproduction des systèmes lipidiques est illustré sur la figure 3.2 (b). En dépit du caractère très prospectif et des énormes difficultés inhérentes à la réalisation concrète de cette expérience, cet article met en avant l'importance de la compartimentation dans l'émergence de structures vivantes. Il existe néanmoins des travaux expérimentaux allant dans le sens de cette stratégie [Walde et al., 1994]. Nous évoquerons également la possibilité d'encapsulation dans une *GUV* d'extraits cellulaires qui induisent la synthèse de protéines, notamment celle de pores membranaires qui permettent de réaliser des échanges avec le milieu extérieur au système [Noireaux and Libchaber, 2004].

La membrane d'une vésicule est un modèle de la membrane plasmique qui délimite l'intérieur et l'extérieur d'une cellule, mais la compartimentation existe également à l'intérieur

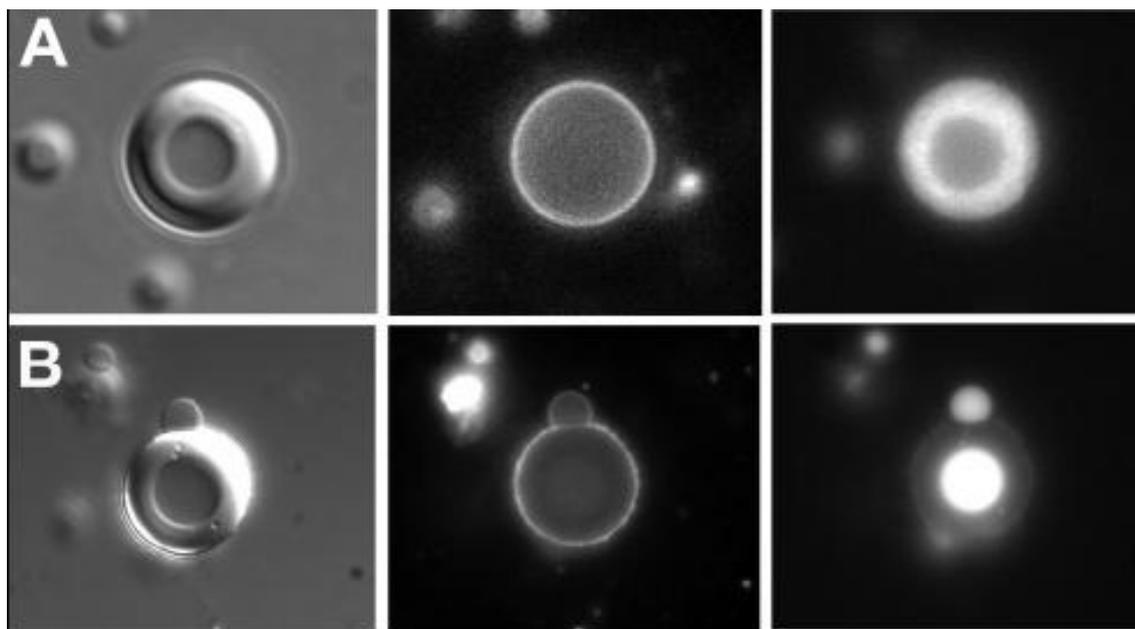


FIG. 3.3: Vésicules encapsulant un milieu aqueux biphasique : (A) de gauche à droite : observation de l'objet en microscopie DIC, observation en fluorescence de la membrane et observation en fluorescence de la phase Dextran (B) de gauche à droite : observation de l'objet en microscopie DIC, observation en fluorescence de la membrane et observation en fluorescence de la phase PEG, extrait de [Helfrich et al., 2002]

d'une cellule. En effet, les organelles cellulaires constituent des compartiments délimités par des membranes lipidiques, et le cytoplasme, milieu encombré de macromolécules diverses, peut aussi présenter des phases séparées. Dès lors il peut être utile dans une approche biomimétique de fabriquer des vésicules dont l'intérieur comporte des compartiments bien définis.

Nous citerons ici la préparation de vésicules dont le milieu interne comporte deux phases [Helfrich et al., 2002] : les vésicules croissent dans une solution de PEG (PolyEthylène Glycol) et de Dextran à une température élevée, à laquelle les deux polymères sont miscibles. Une fois que les vésicules sont formées, la température est abaissée pour obtenir une séparation des deux polymères à l'intérieur des vésicules (figure 3.3).

Ce même groupe utilise ces propriétés de compartimentation pour obtenir des vésicules encapsulant des protéines en concentrations localement variables [Scott-Long et al., 2005] : avec une vésicule à deux phases PEG biotinylé et Dextran, les auteurs peuvent concentrer de la streptavidine dans la phase PEG. De plus cette partition de l'intérieur de la vésicule est réversible et modulable, donc on peut contrôler la séparation ou non des phases et notamment déclencher leur mélange.

3.2 Les vésicules vecteurs de substances

Les petites vésicules lipidiques (environ 100 nm) sont utilisées comme vecteurs de médicaments car elles peuvent transporter des substances dans la circulation sanguine. Il existe deux

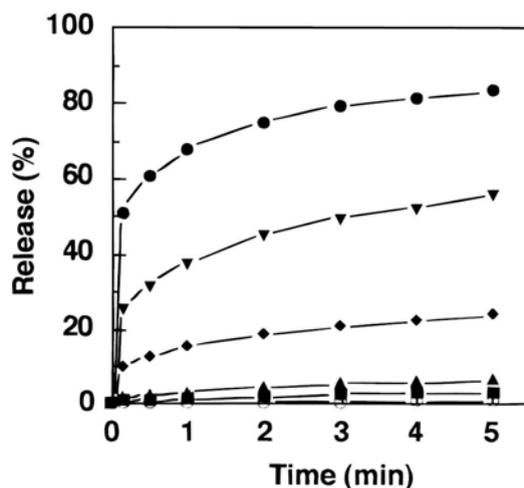


FIG. 3.4: Pourcentage de libération de calcéine en fonction du temps pour des liposomes dont la membrane est décorée de copolymères de Nipam/Acrylamide/N,N'-Didodécylacrylamide à T=20, 30, 35, 40, 45 et 50°C (de bas en haut) extrait de [Hayashi et al., 1999]

stratégies pour améliorer leurs propriétés en tant que transporteurs de médicaments : d'une part limiter leur destruction par le système immunitaire, d'autre part leur donner des propriétés de stimulabilité afin de déclencher la libération des substances qu'elles contiennent.

Le système immunitaire humain élimine les liposomes "classiques" (dont la membrane est composée de phospholipides et de cholestérol typiquement) dans la circulation sanguine en quelques minutes, néanmoins il est possible d'augmenter leur temps de transit en utilisant des membranes décorées. Ces liposomes "furtifs", dont la membrane est protégée stériquement par une chevelure de chaînes de polymères, résistent beaucoup mieux au système immunitaire que les liposomes simples. On peut mesurer que leur temps de transit dans la circulation est très important [Papahadjopoulos et al., 1991], ce qui leur permet de se concentrer dans les zones à traiter.

La seconde stratégie pour améliorer les propriétés de transport de substances par les liposomes est de leur conférer des propriétés de stimulabilité afin de pouvoir libérer de façon contrôlée les substances qu'ils contiennent. Pour ce faire on peut coupler des polymères thermosensibles à la membrane des liposomes : par exemple préparer des liposomes couplés à des copolymères de Nipam/Acrylamide/N,N'-Didodécylacrylamide [Hayashi et al., 1999]. En modifiant le rapport des quantités de Nipam et d'Acrylamide dans les chaînes, on peut ajuster leur température de transition et la présence des chaînes alkylées de N,N'-Didodécylacrylamide permet un ancrage de la chaîne à la membrane. La figure 3.4 montre le taux de libération de calcéine encapsulée à l'intérieur de ces liposomes à différentes températures : on constate bien que ce taux augmente très nettement au dessus de 35°C. Les liposomes libèrent donc de façon contrôlée leur contenu quand leur température est élevée au dessus de la température de transition des chaînes qui recouvrent leur membrane.

On peut également préparer des liposomes à la fois thermosensibles et furtifs avec des li-

posomes dont la membrane est décorée de copolymères poly(Nipam)/poly(Acrylamide) et de PEG [Han et al., 2006]. La libération de Doxorubicine par ces liposomes est contrôlée par la température et leur temps de transit est augmenté par la présence du PEG. Ces travaux sont une synthèse des travaux que nous avons cités précédemment.

Ici nous insistons sur la libération de substances par les liposomes mais pas sur les modifications des propriétés mécaniques de leurs membranes induites par le couplage avec des polymères.

3.3 Les vésicules modèles de cellule amélioré

Comme nous l'avons déjà précisé dans l'introduction de ce travail, les cellules sont des systèmes très complexes combinant activité biologique et propriétés mécaniques. Cependant les premières étapes de la plupart des processus biologiques sont gouvernées par les propriétés mécaniques des cellules, c'est pour cette raison qu'il apparaît intéressant de développer des modèles mécaniques de cellules permettant d'isoler un à un les paramètres pertinents.

3.3.1 Modification du milieu interne

Le cytosquelette des cellules est une structure hautement active dont le rôle est central dans de nombreux processus cellulaires comme la locomotion, la phagocytose, le transport intracellulaire ou l'adhésion. De nombreux groupes s'intéressent à l'étude de la mécanique cellulaire, mais le sujet comporte des difficultés liées à la complexité des objets étudiés. Même si certains travaux présentent des résultats sur une modélisation simple (à peu de paramètres) de certains comportements cellulaires ([Fabry et al., 2001], [Treppe et al., 2007]), il reste difficile de trouver des cadres explicatifs abordables. Par conséquent, dans une approche biomimétique, certains travaux ont été réalisés afin de fabriquer des systèmes modèles des cellules sur le plan mécanique. Ces objets présentent des propriétés visco-élastiques descriptibles avec peu de paramètres, et le présent travail s'inscrit dans cette démarche.

Le cytosquelette est composé de trois types de structures : les filaments d'actine, les microtubules et les filaments intermédiaires. Le rôle dans les processus cellulaires actifs de la polymérisation/dépolymérisation des filaments d'actine a été mis en évidence à de nombreuses reprises. Dès lors il paraît pertinent d'encapsuler des filaments d'actine dans des GUVs dans l'optique de fabriquer des objets biomimétiques ([Limozin and Sackmann, 2002] et [Limozin et al., 2005]).

Tout d'abord, dans [Limozin and Sackmann, 2002] les auteurs observent l'effet du confinement sur la structure de réseaux d'actine formés dans des GUVs, car la taille caractéristique d'une GUV est de l'ordre de la longueur de persistance d'un filament d'actine. Les auteurs utilisent deux réticulants différents de l'actine : l' α -actinine et la filamine dont les structures sont très différentes. Les réseaux réticulés avec l' α -actinine sont sensibles à la température (réseaux homogènes à 25°C et formation d'agrégats à 4°C). De plus il existe une taille seuil des vésicules : en dessous de 12 μm on observe la formation d'anneaux, au dessus les réseaux ressemblent à des toiles d'araignée. Dans le cas de la formation d'anneaux par des réseaux réticulés avec de la filamine (obtenus dans des conditions particulières), les auteurs mettent en évidence

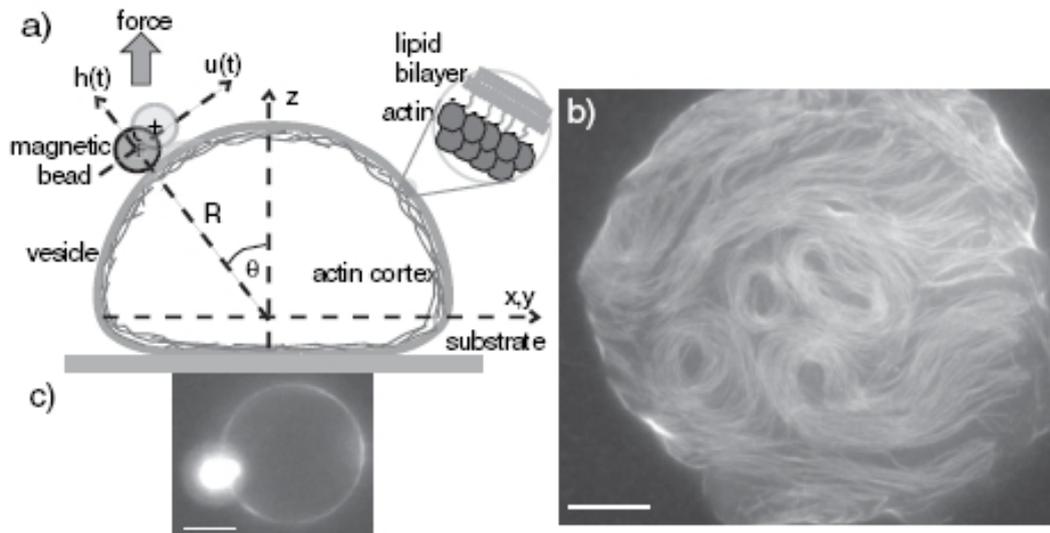


FIG. 3.5: (a) représentation d'une GUV comportant un cortex d'actine à laquelle est attachée une bille magnétique. La force exercée sur la bille est décomposée en deux composantes normale et tangentielle ; (b) et (c) observations en fluorescence d'une vésicule composite respectivement sur la zone d'adhésion et à l'équateur, mettant en évidence le réseau d'actine et la bille magnétique, extrait de [Limozin et al., 2005]

l'enroulement des réseaux en structures hélicoïdales.

Un cortex d'actine bidimensionnel peut également être formé à l'intérieur de GUVs et couplé à leur membrane par une interaction électrostatique entre les phospholipides et les filaments d'actine [Limozin et al., 2005]. Comme le montre la figure 3.5, une bille magnétique fixée sur la vésicule est déplacée grâce à un champ magnétique dans un dispositif de pinces magnétiques. Les déformations dans le plan de la membrane (cisaillement) et normales à la membrane (courbure) sont mesurées à partir des mouvements de la bille et reliées à la force appliquée pour mesurer les caractéristiques mécaniques de la membrane composite. Les auteurs obtiennent un module de courbure $k_C \approx 1000k_B T$ et un module de cisaillement de surface de $4.10^{-7} Pa.m$ (ce qui équivaut, avec l'approximation que le cortex d'actine est une monocouche, à un module d'Young de 50 Pa).

L'utilisation d'actine est très pertinente d'un point de vue du biomimétisme, mais comme nous l'avons montré, elle peut donner lieu à des structures non-homogènes, et la préparation des systèmes composites est complexe. Une approche encore plus simple est d'utiliser des gels de polymère pour mimer un cytosquelette à l'intérieur de GUVs.

Nous citons l'approche rapportée dans [Jin et al., 1996] et [Ng et al., 2004] qui est de fabriquer des objets composites appelés "lipobeads" à base de billes de gel couplées à une monocouche de lipides. Des billes de gel de PVA (poly(Vinyl-Alcool)) sont traitées afin de greffer à la surface du gel des chaînes palmitoyl par une réaction d'estérification, ce qui permet d'obtenir des gels dont la surface est couverte de chaînes lipidiques. L'incubation de ces gels dans une

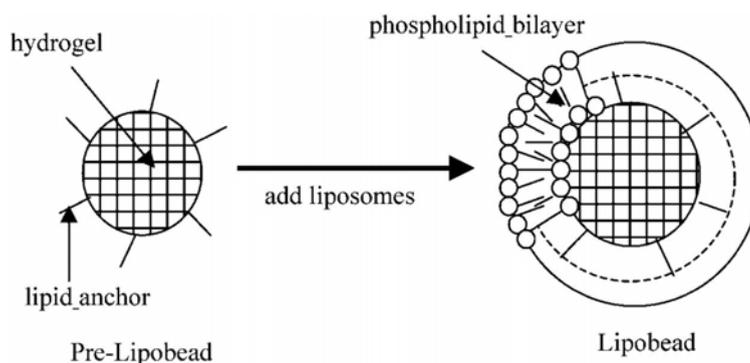


FIG. 3.6: Stratégie de formation des "lipobeads" : des chaînes grasses sont greffées à la surface d'un hydrogel de PVA puis les gels sont incubées avec une solution de liposomes, ce qui aboutit à la formation d'une bicouche hybride chaînes lipidiques/phospholipides, extrait de [Ng et al., 2004]

solution de liposomes de phosphatidylcholine résulte en un couplage spontané de lipides avec les chaînes à la surface des gels et donc à la formation d'une bicouche hybride chaînes lipidiques/phospholipides (figure 3.6). Les propriétés de diffusion de cette bicouche sont étudiées spécifiquement par FRAP [Ng et al., 2004] : les auteurs montrent que la mobilité des lipides est contrôlée par le nombre de chaînes greffées et par le taux de réticulation du gel. Ils soulignent également l'importance d'étudier une membrane couplée à un gel élastique comme modèle de l'interaction cytosquelette-membrane. Ces objets ont une taille contrôlée, une grande stabilité mécanique et présentent la possibilité d'encapsuler des substances dans le gel, ils paraissent donc de bons systèmes pour le transport de substances. Nous mentionnons ces travaux ici car ils constituent une stratégie intéressante pour préparer des vésicules à milieu interne élastique.

Dans [Stauch et al., 2002b] les auteurs présentent un protocole de fabrication de liposomes d'EPC (Egg PhosphatidilCholine)(100 - 1500 nm) contenant un réseau réticulé de copolymères de Nipam et de TEGDM (tetraéthylène glycol diméthacrylate) attaché au feuillet interne de la membrane par une ancre hydrophobe DOGM (1,2-distéaryl-3-octaéthylène glycol éther méthacrylate) incluse dans les chaînes de copolymère. Le DOGM est une molécule qui possède à la fois deux queues hydrophobes qui peuvent s'inclure dans la bicouche lipidique, une chaîne hydrophile qui constitue un espaceur (qui permet d'éviter un contact permanent entre les chaînes de copolymère et la membrane) et une partie qui s'insère dans la chaîne. La polymérisation du gel est initiée par UV en présence de DEAP (cf. section 4.1.2) qui est soit présent dans la vésicule avant polymérisation, soit pénètre à l'intérieur par perméation à travers la membrane, ce qui aboutit à la formation soit de gels qui occupent tout l'intérieur de la vésicule, soit d'un cortex de gel bidimensionnel au voisinage de la membrane. La structure des gels formés est observée par microscopie électronique à transmission et microscopie à force atomique puis étudiée en détail par diffusion de lumière dans [Stauch et al., 2002a]. Nous nous inspirerons fortement de cet article pour notre protocole de fabrication.

Nous citerons également [Gutmayer et al., 2006] dans lequel le même groupe décrit la polymérisation au voisinage de la membrane de liposomes d'EPC d'un copolymère de (N-(3-N,N'-diméthylaminopropyl) méthacrylamide) (DMAPMA) et de TEGDM.

Un autre protocole de fabrication de vésicules contenant un gel est de préparer des vésicules de DOPC encapsulant un gel d'agarose, qui est un gel physique thermoréversible [Viallat et al., 2004]. Les vésicules sont formées à 50°C, température à laquelle une solution d'agarose (au dessus d'une concentration critique de 0.05% en masse) gélifie en 30 min, par conséquent les vésicules sont électroformées pendant ce laps de temps. L'observation des vésicules emplies d'agarose soumis à des chocs osmotiques permet l'observation de formes caractéristiques rappelant celles de globules rouges dégonflés. De plus on voit dans ce cas que la membrane lipidique n'est pas en interaction forte avec le gel interne.

3.3.2 Modification de la membrane

Les membranes cellulaires sont recouvertes d'une zone riche en polysaccharides hydrophiles appelée glycocalix. Elle assure des fonctions de reconnaissance entre les cellules et joue un rôle important sur leurs propriétés d'adhésion [Sabri et al., 2000]. De plus le cytosquelette interne est ancré dans la membrane.

Nous avons décrit dans la section 2.3 les travaux théoriques traitant de l'interaction d'un polymère avec une membrane et dans la section 2.1.3 ceux traitant la prédiction des formes des vésicules décorées, ici nous allons présenter certaines observations expérimentales des effets du greffage de macromolécules sur les membranes. Une partie de ces travaux a été présentée dans la section 3.2 dans laquelle nous avons montré l'intérêt d'utiliser des membranes stabilisées stériquement par des macromolécules (éventuellement de polymères thermostimulables) pour le transport de substances dans le corps humain.

[Ringsdorf et al., 1993] rapportent la préparation de SUVs de DMPC, DSPC et Egg-PA (Phosphatidic Acid, chargé négativement) en interaction avec des chaînes de poly(Nipam-Na-Py) ou HM-PNIPAM (Hydrophobically-Modified Poly(Nipam) : un copolymère de Nipam, de N-[2-(1-naphthyl)ethyl]-N-noctadecylacrylamide et de N-[4-(1-pyrenyl)butyl]-N-noctadecylacrylamide. Le poly(Nipam-Na-Py) est un copolymère présentant un caractère thermostimulable dû aux groupes Nipam, fluorescent grâce aux groupes Pyrène et comportant des ancrs hydrophobes grâce aux chaînes octadecyl. L'interaction des chaînes avec les membranes des vésicules est mise en évidence par spectroscopie de fluorescence NRET (Non-Radiative Energy Transfer), calorimétrie différentielle et diffusion de lumière.

L'étude de l'effet de la thermostimulabilité des chaînes de HM-PNIPAM (légèrement différentes de celles de [Ringsdorf et al., 1993]) est présentée dans [Simon et al., 1995]. Les chaînes incluses dans la membrane présentent un mécanisme d'effondrement comme représenté sur la figure 3.7. Une mesure par FRAP du coefficient de diffusion des chaînes incluses dans une bicouche supportée en fonction de la température montre clairement l'effet de réduction du rayon caractéristique de la chaîne à la transition (figures 3.7 (a) et (b)). Dans le cas des vésicules, le phénomène d'effondrement entraîne des modifications de la forme des objets. En effet le polymère modifie la courbure spontanée de la membrane à cause des inclusions hydrophobes. Or ce genre d'inclusion a tendance à se concentrer dans les zones de fortes courbures, ce qui est facilité à $T > T_C$ par la réduction du coefficient de diffusion des chaînes. Les figures 3.7 (c) et (d) montrent ce schéma de couplage entre modification de la courbure locale et séparation de

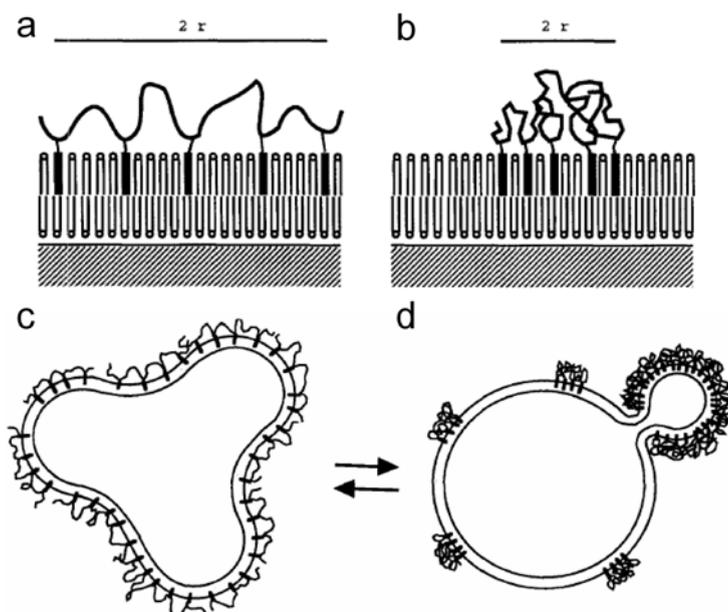


FIG. 3.7: Schéma du mécanisme d'effondrement de chaînes de HM-PNIPAM incluses dans une bicouche supportée de DMPC ((a) à $T < T_C$ (b) à $T > T_C$) et dans une vésicule de DMPC ((c) à $T < T_C$ (d) à $T > T_C$), extrait de [Simon et al., 1995].

phases riches en polymère.

Un effet similaire est rapporté dans [Tsafrir et al., 2003], dans ce cas c'est une vésicule de SOPC en interaction avec du Dextran hydrophobe dont la forme est altérée par l'interaction avec le polymère. On peut voir sur la figure 3.8 l'effet du polymère sur la membrane et la concentration de celui-ci dans les zones de forte courbure. Nous citerons enfin l'effet spectaculaire observé pour des tubes de membranes avec le même système présenté sur la figure 3.9.

Il est également possible de décorer les GUVs avec un poly-électrolyte en utilisant son interaction électrostatique avec la membrane lipidique. L'interaction de Chitosan, un polymère pseudo-naturel dérivé de la Chitine (composant majeur de la carapace des crustacés et des insectes) avec des LUVs de DOPC a été montrée par des mesures de potentiel- ζ dans [Quemeneur et al., 2007]. Cette décoration sur des GUVs les stabilise fortement vis-à-vis des concentrations externes en NaCl et du pH qui aboutiraient à une destruction de simples vésicules de DOPC.

Enfin nous citerons une étude de la décoration de vésicules de DOPC avec des brins d'ADN [Nikolov et al., 2007]. L'utilisation d'ADN pour cette étude est particulièrement pertinente car les brins d'ADN sont monodisperses, ce qui est utile pour pouvoir confronter les résultats aux théories sur les polymères greffés (cf. section 2.3). De plus les chaînes peuvent être marquées en fluorescence, attachées seulement par une extrémité à la membrane et leur charge effective

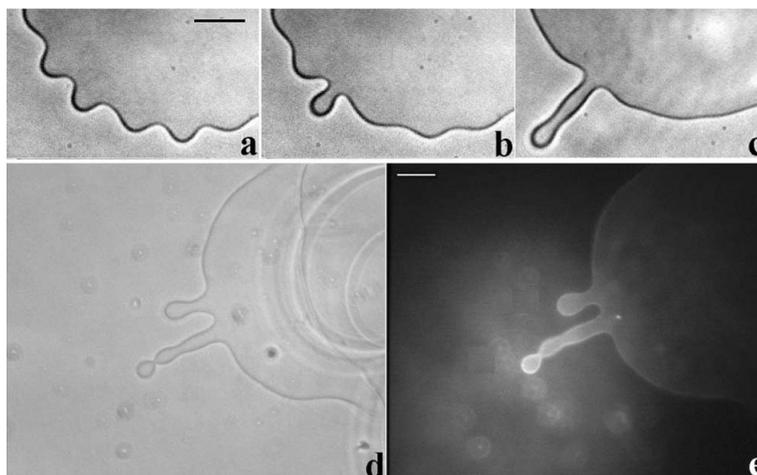


FIG. 3.8: Effet de l'injection d'un polymère fonctionnalisé (Dextran 162000 fonctionnalisé avec des chaînes alkylées Palmitoyl comme ancras hydrophobes) et du NBD (NitroBenzoxaDiazole) fluorescent au voisinage d'une vésicule de SOPC (a,b,c) augmentation des fluctuations jusqu'à la croissance d'un tube ;(d,e) observation en contraste de phase et en fluorescence (mise en évidence de la concentration locale en polymère adsorbé), barre d'échelle 10 μm , extrait de [Tsafirir et al., 2003].

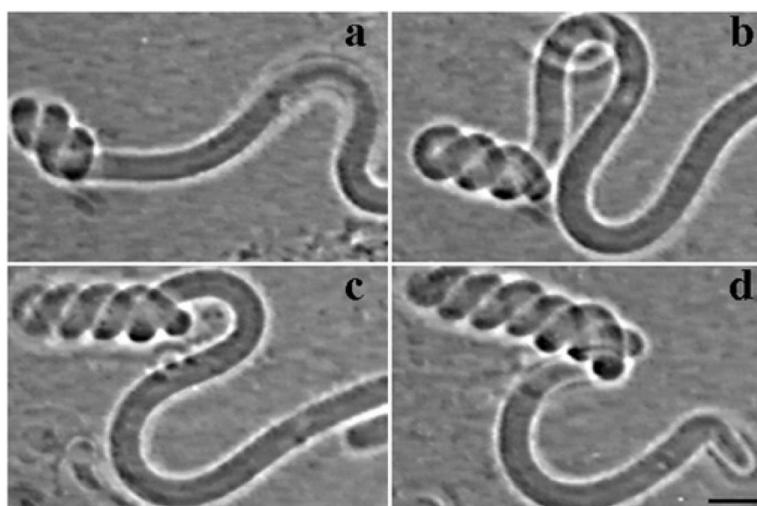


FIG. 3.9: Enroulement d'un tube de membrane de SOPC sur lui-même en présence de Dextran fonctionnalisé (a) 0, (b) 20, (c) 30 et (d) 40 min, barre d'échelle 20 μm , extrait de [Frette et al., 1999]

est modulable. L'attachement des brins d'ADN se fait par une interaction entre une fraction des lipides dont la tête est biotinylée et l'extrémité des brins d'ADN à laquelle est greffée une molécule d'avidine. Le densité surfacique Γ de molécules d'ADN peut donc être contrôlée en jouant sur la fraction de lipides biotinylés au moment de la préparation des GUVs. Pour $0 < \Gamma < 0,12 \Gamma_{ov}$ (où Γ_{ov} ("overlap") est la concentration surfacique à laquelle les chaînes se recouvrent), les auteurs mesurent, à partir de l'analyse des fluctuations des vésicules, une évolution linéaire de la courbure spontanée c_0 de la membrane comme prévu par [Hiergeist and Lipowsky, 1996]. Pour $\Gamma > 0,12 \Gamma_{ov}$, on observe un bourgeonnement des vésicules et une analyse de ce phénomène aboutit à une mesure de c_0 qui est constante pour $0,12 \Gamma_{ov} < \Gamma < 0,6 \Gamma_{ov}$, ce que les auteurs attribuent à une distribution non-homogène des chaînes.

En conclusion de ce chapitre, nous voudrions insister sur les spécificités de notre travail : à la lumière de cette étude bibliographique, les systèmes composites à base de GUVs stimulables ont été peu étudiés. Il paraît pertinent de conférer de la stimulabilité à des GUVs, ce qui permettra sur un échantillon fixé de faire varier un paramètre pertinent via une sollicitation externe et de l'observer, nous rapporterons ces observations au chapitre 6. De plus nous étudierons de près la membrane de GUVs encapsulant du poly(Nipam) en solution ou réticulé. Par ailleurs si les auteurs des différents articles que nous avons repertoriés se sont attachés à modifier le milieu interne des vésicules, peu de travaux rapportent l'étude associée des propriétés mécaniques de ces objets, ce que nous ferons au chapitre 8.

Chapitre 4

Méthodes expérimentales générales

4.1 Protocole de fabrication des vésicules composites

4.1.1 Problèmes liés à la préparation des vésicules de milieu interne modifié

Nous voulons préparer des vésicules de milieu interne modifié contenant soit des solutions de polymère, soit des gels. Pour préparer les vésicules, nous avons choisi l'électroformation, car cette technique est bien adaptée à la préparation de GUVs [[Angelova and Dimitrov, 1986](#)].

¹ Pour obtenir le milieu interne désiré (solution de polymères de viscosité variable ou gel polymère de taux de réticulation ajustable) nous avons dû résoudre différents problèmes.

S'agissant des vésicules contenant une solution de polymères (**sol-GUVs**), il est difficile d'électroformer des vésicules dans une solution visqueuse contenant des macromolécules [[Dominak and Keating, 200](#)]. Nous avons donc choisi de préparer les vésicules dans une solution contenant du monomère (Nipam) et de l'initiateur de polymérisation (DEAP) (milieu "présol") et de procéder à une photopolymérisation ultérieure du milieu interne ainsi encapsulé. Nous obtenons de cette façon des vésicules contenant une solution de polymères suspendues dans une solution identique.

Concernant les vésicules encapsulant un gel covalent (**gel-GUVs**), la situation est plus délicate. Il est bien sûr impossible de faire pousser des GUVs dans un milieu gélifié. Nous aurions pu envisager d'encapsuler comme précédemment le monomère Nipam, le réticulant MBA et l'initiateur de photopolymérisation DEAP (milieu "pré-gel"), mais dans ce cas nous aurions obtenu des vésicules prisonnières d'une gangue de gel après photo-polymérisation. Nous verrons en détail au paragraphe [4.1.4](#) comment nous avons réussi à résoudre ce problème en diluant les vésicules contenant le milieu pré-gel dans un milieu ne contenant pas de réticulant et en jouant sur la différence entre les cinétiques de diffusion et de photopolymérisation.

¹Nous avons choisi d'utiliser l'électroformation, mais il existe d'autres techniques pour fabriquer des vésicules, citons la formation spontanée ou la méthode dite de la double émulsion. Néanmoins, pour les tailles de vésicules qui nous intéressent et les produits que nous utilisons, l'électroformation est la technique la plus appropriée.

4.1.2 Produits utilisés pour la préparation des vésicules composites

Lipides

La première étape de la préparation des vésicules composites est la formation des GUVs encapsulant les produits nécessaires à la polymérisation de chaînes ou d'un gel de polyNipam. Nous avons utilisé différents lipides pour fabriquer les GUVs :

- **DOPC** (1,2-dioléoyl-sn-glycéro-3-phosphocholine) (Sigma). Ce lipide constitue le composant de base de quasiment tous les échantillons utilisés dans cette étude. Les chaînes carbonées qui le composent comportent 18 atomes de carbone avec une insaturation au 9^e carbone (figure 4.1).

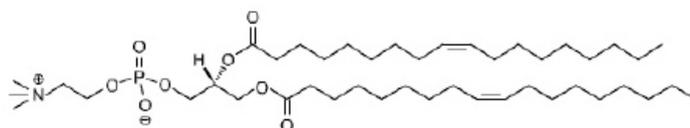


FIG. 4.1: Structure de la molécule de DOPC (1,2-dioléoyl-sn-glycéro-3-phosphocholine)

- **DOGP-biotin** (1,2-dioléoyl-sn-glycéro-3-phosphoéthanolamine-n-(biotinyl)) (Sigma). Une molécule de biotine est greffée sur la tête de ce lipide (figure 4.2), nous verrons par la suite que nous utilisons ces lipides pour obtenir des GUVs comportant une membrane biotinylée. Ceci sera mis à profit pour coller à leur membrane des objets grâce à l'interaction biotine-streptavidine. Afin d'obtenir des membranes biotinylées, les GUVs sont préparées avec un mélange de DOPC et de DOGP-Biotin à 1% en mol.

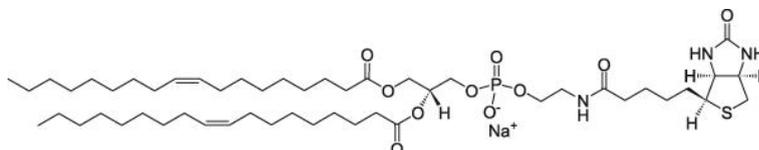


FIG. 4.2: Structure de la molécule de DOGP-Biotin (1,2-dioléoyl-sn-glycéro-3-phosphoéthanolamine-n-(biotinyl))

- **PC-NBD** (1-Oléoyl-2-[12-[(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino]dodécanoyl]-sn-Glycéro-3-Phosphocholine) (Avanti Polar Lipids). Ce lipide est fluorescent (absorption à 460 nm et émission à 534 nm), sa structure est représentée sur la figure 4.3. Un rapport [PC-NBD]/[DOPC] de 1% permet un marquage fluorescent des membranes.

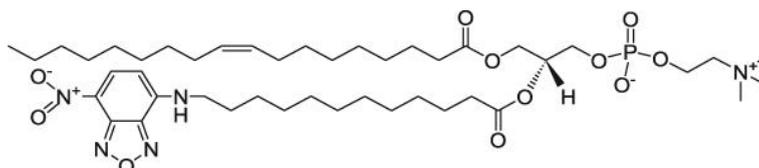


FIG. 4.3: Structure de la molécule de NBD-PC (1-Oléoyl-2-[12-[(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino]dodécanoyl]-sn-Glycéro-3-Phosphocholine)

Les lipides sont dissous dans une solution de chloroforme/méthanol 9/1, on conserve une solution mère à 10 mg/mL que l'on diluera pour préparer les solutions à 2 mg/mL que nous utilisons pour la préparation des vésicules. Toutes ces solutions sont conservées à - 20°C.

Constituants des milieux présol et pré-gel

Pour préparer une solution de polyNipam, il est nécessaire d'utiliser le monomère (Nipam) qui va constituer les chaînes de polymère et un initiateur (DEAP) qui amorce la réaction de polymérisation. Pour obtenir un gel de poly(Nipam) il est nécessaire d'ajouter à ces deux constituants un réticulant (MBA).

Voici les produits que nous avons choisis d'utiliser :

- **Le monomère** : N-isopropyl-acrylamide (NIPAM) (Acros Organics) (figure 4.4). Nous avons choisi ce monomère à cause de la transition thermique que présentent les chaînes de polyNipam (cf. section 2.2.3).

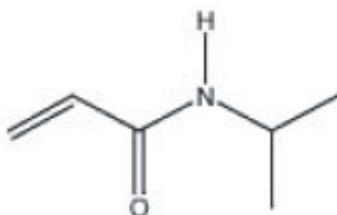


FIG. 4.4: N-isopropyl-acrylamide (NIPAM)

- **Le photo-initiateur** : 2,2-diéthoxyacétophénone (DEAP) (Acros Organics) 4.5. Le DEAP forme un radical lorsqu'il est éclairé par un rayonnement UV, c'est ce radical qui amorce la réaction de polymérisation en attaquant la double liaison des monomères de Nipam. De plus il faut préciser qu'il est soluble dans les membranes de lipides.

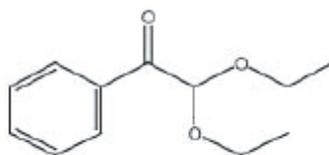


FIG. 4.5: 2,2-diéthoxyacétophénone (DEAP)

- **Le réticulant** : N,N'-méthylène-bis-acrylamide (MBA) (Sigma). On peut constater sur la figure 4.6 que cette molécule ressemble à deux monomères de Nipam liés l'un à l'autre. Pendant la réaction de polymérisation les molécules de MBA peuvent donc être incluses dans deux chaînes à la fois, cette bifonctionnalité est à l'origine de la réticulation du gel.

Les produits commerciaux sont utilisés sans autre purification. Les concentrations des différents produits dans le milieu pré-gel ou présol utilisé lors de la formation des vésicules dépendent de l'échantillon désiré. Le photoinitiateur est toujours utilisé à 1 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de solution et

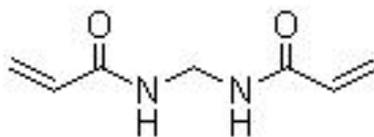


FIG. 4.6: N,N'-méthylène-bis-acrylamide (MBA)

Type d'objets	[Nipam] mM	Φ_{Nipam}	[MBA] mM	[MBA]/[Nipam] (%)
Gel-GUVs	300	3%	3	1
Gel-GUVs	300	3%	9	3
Gel-GUVs	300	3%	18	6
Gel-GUVs	300	3%	27	9
Sol-GUVs	100	1%	0	0
Sol-GUVs	300	3%	0	0
Sol-GUVs	400	4%	0	0
Sol-GUVs	450	4,5%	0	0
Sol-GUVs	500	5%	0	0
Sol-GUVs	600	6%	0	0
Sol-GUVs	700	7%	0	0
Sol-GUVs	900	9%	0	0

TAB. 4.1: Pour les différents échantillons de Gel- et Sol-GUVs utilisés dans cette étude, concentration et fraction volumique du Nipam, concentration du MBA et rapport [MBA]/[Nipam].

les concentrations (et fraction volumiques) des autres composés utilisées dans cette étude sont répertoriées dans le tableau 4.1.

La réaction de polymérisation radicalaire que nous utilisons est inhibée par la présence d'oxygène, c'est pourquoi toutes les solutions utilisées doivent préalablement être désoxygénées. Pour cela on fait passer un flux d'argon (bullage) dans la solution protégée de la lumière pendant 30 min afin de la saturer en argon.

4.1.3 Electroformation de GUVs contenant un milieu pré-gel ou présol

Comme nous l'avons précisé, les vésicules unilamellaires géantes contenant le milieu pré-gel ou présol sont préparées par électroformation. Cette technique consiste à hydrater un film de lipides sec sous un champ électrique alternatif [Angelova and Menger, 1998]. Elle permet d'obtenir un grand nombre de vésicules dont la majorité sont unilamellaires, avec une distribution de tailles comprise entre 10 et 100 μm .

La première étape de cette technique est de réaliser un dépôt de lipides en solution sur deux plaques de verre recouvertes d'ITO (environ 10 μL d'une solution à 2 mg/mL pour une plaque 5x5 cm), comme le montre la figure 4.7. Le dépôt métallique d'ITO rend ces plaques de verre conductrices, toutefois celles-ci sont transparentes à cause de la faible épaisseur de la couche métallique (environ 200 nm). Les plaques sont préalablement lavées à l'eau savonneuse et à

l'éthanol puis séchées à l'argon avant d'être utilisées pour le dépôt de lipides. Après le dépôt de lipides, elles sont ensuite placées sous vide pendant trois heures afin d'évaporer le solvant et d'obtenir un film de lipides sec couvrant le verre.

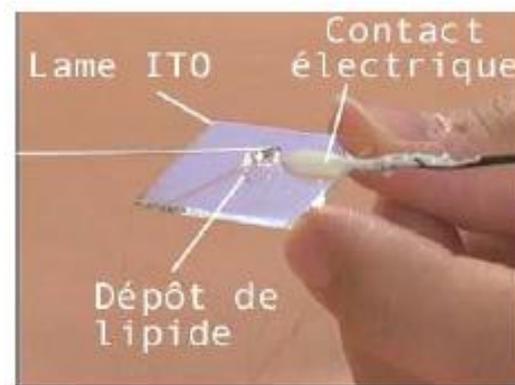


FIG. 4.7: Dépôt de lipides sur une plaque de verre couverte d'ITO, extrait de [Abkarian, 2002]

Ensuite on réalise une cellule d'électroformation en plaçant en regard les deux plaques de verre séparées par un espaceur en Teflon, puis la cellule est hermétiquement colmatée avec une pâte de scellement comme représenté sur la figure 4.8 Dans le cas de la pousse de vésicules contenant un milieu pré-gel ou présol, cette étape est réalisée dans un sac à gants rempli d'argon pour s'assurer que la croissance des vésicules se fait dans un milieu ne contenant pas d'oxygène qui serait un obstacle à la photopolymérisation ultérieure du milieu interne.

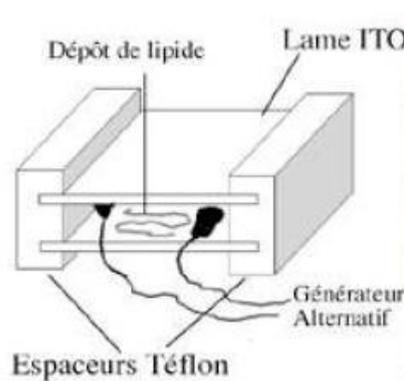


FIG. 4.8: Schéma de la chambre d'électroformation : les deux plaques de verre recouvertes d'ITO sur lesquelles ont été réalisés les dépôts de lipides sont placées en regard, séparées par un espaceur en Teflon, extrait de [Abkarian, 2002]

On remplit la cellule d'électroformation de la solution que l'on souhaite encapsuler dans les vésicules (présol ou pré-gel) avec une seringue puis on établit un courant alternatif entre les deux plaques dont les caractéristiques sont indiquées sur le tableau 4.2.

Tension (V)	Fréquence (Hz)	Temps
0,2	10	30 min
0,4	10	1 h
0,6	10	4 h
0,6	4	1 h

TAB. 4.2: Tension, fréquence et temps pour chaque palier de champ électrique lors de l'électroformation.

La baisse de fréquence à la fin de la rampe de tension a pour effet de décoller les vésicules des plaques de verre. On peut noter que lors du processus d'électroformation, il n'y a pas à proprement parler de croissance des vésicules, ce sont en fait des fusions entre vésicules voisines qui conduisent à l'obtention de vésicules de grandes tailles.

A la fin de ce processus, la chambre d'électroformation est doucement vidée avec une seringue (aiguille de diamètre 1 mm pour ne pas trop cisailer les vésicules). Elles sont ensuite stockées dans un Eppendorf rempli d'argon et protégées de la lumière avant l'étape de photopolymérisation de leur milieu interne.

4.1.4 Polymérisation du milieu interne

Nous utilisons une réaction de polymérisation radicalaire initiée par UV pour polymériser le Nipam. Le photoinitiateur que nous utilisons forme un radical quand il est éclairé à l'UV. Ce radical "attaque" la double liaison C=C du monomère de Nipam (cf. figure 4.4) qui à son tour forme un radical. Celui réagit avec un autre monomère pour former un dimère radicalaire, ce qui entraîne la propagation de la réaction et la formation de chaînes de polyNipam plus ou moins longues. Le MBA joue le rôle de réticulant car il peut être inséré dans deux chaînes à la fois, cette bifonctionnalité est à l'origine de la formation d'un gel réticulé tridimensionnel.

Polymérisation des GUVs encapsulant le milieu pré-gel

La mise au point du protocole pour l'obtention des vésicules contenant un milieu interne gélifié n'a pas été aisée car une photopolymérisation directe de la solution de vésicules obtenue après électroformation dans le milieu pré-gel mènerait à des vésicules prisonnières d'une gangue de gel. Comme nous l'avons dit précédemment nous avons tenté de résoudre ce problème en diluant les vésicules contenant le milieu pré-gel dans une solution externe ne contenant pas de réticulant. La membrane étant perméable au réticulant, il était donc nécessaire de trouver un moyen pour que la photopolymérisation agisse avant que ce dernier n'ait complètement diffusé à l'extérieur des vésicules. La dilution et sa synchronisation avec la réaction de photopolymérisation sont donc deux paramètres importants.

Par ailleurs, la réaction de polymérisation est exothermique, il est donc nécessaire de s'assurer que la température du milieu réactif n'entraîne pas la transition de phase du poly(Nipam).

Le troisième paramètre important est l'oxygène qui est un inhibiteur des réactions radicalaires. Nous détaillons ci-après les études de l'influence de ces différents paramètres.

Ces études s'appuient sur l'observation en parallèle de la polymérisation de témoins constitués par des solutions pré-gel de référence.

Influence de la température

La transition de phase du poly(Nipam) se situe à 32°C et la réaction de polymérisation est exothermique, il est donc facile de passer cette transition lors de la photopolymérisation. Effectivement, une réaction conduite sans contrôle de température conduit dans le puits témoin à un échantillon trouble, à cause des hétérogénéités dans le gel. De nombreuses expériences nous ont permis de fixer le protocole suivant : les solutions que nous utilisons sont conservées à 4°C le plus longtemps possible avant toute expérience et la chambre de polymérisation est placée sur un bloc de glace.

Influence de l'oxygène

Il est bien connu que l'oxygène est un inhibiteur des réactions radicalaires, effectivement nous avons constaté que sans une désoxygénation poussée des solutions et des récipients, il était impossible d'obtenir des gels. C'est pour cette raison que toutes les étapes de la fabrication des gel-GUVs sont faites dans un sac à gants et que la verrerie, les seringues et les cônes de pipettes sont remplis d'argon avant d'être utilisés.

Synchronisation de la dilution et de la photopolymérisation

Nous rappelons que nous suspendons les vésicules dans une solution différente de leur solution interne lors de leur polymérisation. Le réticulant (MBA) est présent à l'intérieur des vésicules mais pas à l'extérieur. Or nous avons vérifié que cette molécule pouvait diffuser à travers les membranes de vésicules donc notre dilution aboutit à une fuite du MBA à l'extérieur des vésicules. Dès lors, nous sommes dans une situation hors équilibre où les cinétiques de la réaction de gélification (qui fixe les molécules de réticulant dans le gel de façon covalente, interdisant toute sortie) et de la diffusion du réticulant entrent en compétition. Nous n'avons pas pu avoir l'estimation des cinétiques de ces deux phénomènes, ce qui nous a forcé à concentrer de façon importante le réticulant dans les vésicules en supposant que la gélification se ferait suffisamment rapidement pour obtenir un gel réticulé. C'est pour cette raison que nous n'attendons pas d'avoir injecté les vésicules pour irradier les puits. Il est également important d'homogénéiser la solution dans le puits, sinon la solution de vésicules et la solution de dilution ne se mélangent pas assez vite par rapport à la réaction de gélification, ce qui entraîne une gélification locale autour des vésicules.

On peut également noter que lorsqu'on injecte les vésicules, qui sont suspendues dans leur solution interne (pré-gel), on injecte dans le puits une quantité de solution qui contient de l'agent réticulant. Avec la dilution que nous opérons (cf. section 4.1.4) et une solution de vésicules à 3% de réticulant, la solution dans le puits est à 0.15% de réticulant. Cette concentration ne devrait pas provoquer la formation d'un gel, mais en réalité dans la mesure où le réticulant est dissout dans une solution de glucose, il est entraîné par elle au fond du puits en une "phase" plus concentrée en réticulant, ce qui provoque souvent la formation de gel au fond des puits. Donc de

fait il y a bien une certaine gélification à l'extérieur des vésicules mais celle ci n'empêche pas de récupérer suffisamment de vésicules libres en solution pour travailler. Il faut néanmoins noter que l'on récupère souvent en même temps que les vésicules des morceaux de gel non gênants.

Suite à ces trois études nous avons défini un protocole final que nous détaillons maintenant.

Protocole final

Nous préparons une solution identique à la solution pré-gel contenue dans les vésicules mais qui ne contient pas de réticulant et dans laquelle le sucrose est remplacé par du glucose, nous l'appellerons solution de dilution. La présence du glucose permet la sédimentation des vésicules, sa concentration est fixée pour assurer l'équilibre osmotique. Cette solution est bien sûr désoxygénée par un bullage à l'argon (30 min) avant d'être utilisée.

La lampe UV que nous utilisons est une UV-B Mid-range 300 nm Sunlight-Erythemat (AH 68-1091 F6T5E, Harvard Apparatus), à laquelle nous avons fixé un filtre qui ne laisse passer que la lumière UV (Thorlabs FGUV 360 ± 40 nm). Nous avons mesuré l'intensité de son éclairement qui est de 19 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ à la distance où sont les échantillons de la source lumineuse.

On remplit 3 puits (chambres de photopolymérisation : cylindres de verre coupés et collés sur une lame de verre) de 1 mL de solution de dilution puis on allume la lampe UV et on injecte ensuite dans chaque puits 50 μL de solution de vésicules. Les solutions de vésicules sont introduites avec une pipette munie d'un cône coupé afin de minimiser le cisaillement qu'elles subissent.

On remue légèrement pour homogénéiser le contenu des puits, puis on les ferme avec une plaque de quartz et on les laisse sous UV pendant 5 min¹. Pendant ces 5 minutes d'éclairement, le gel se forme dans les vésicules simultanément à la diffusion à l'extérieur du réticulant.

La chambre est posée sur un pain réfrigérant (Medicool Coolpack MC-15). Toutes ces opérations sont réalisées dans une atmosphère d'argon, dans des récipients remplis d'argon. Le dispositif expérimental est présenté sur la figure 4.9.

A l'issue de la polymérisation, les puits sont vidés puis rincés avec du glucose 100 mM, le contenu des puits et les produits de rinçage sont conservés à 4°C. C'est dans cette solution que se trouvent les gel-GUVs.

Nous insistons sur le fait qu'avec cette technique de préparation, le taux de réticulation du gel contenu à l'intérieur des vésicules n'est pas connu et que par conséquent nous ne pouvons prévoir son module d'Young qu'il sera nécessaire de mesurer in situ par des expériences de micropipettes (cf chapitre 8).

Polymérisation des GUVs encapsulant le milieu présol

Dans ce cas, la solution de GUVs encapsulant le milieu présol directement issue de l'électroformation est injectée dans un puits et polymérisée sous UV. Les précautions en terme de pré-

¹Nous laissons l'éclairement pendant 2h au début de cette étude mais nous avons constaté que la réaction se terminait beaucoup plus rapidement et donc nous avons réduit le temps d'éclairement. C'est intéressant car nous soupçonnons qu'une exposition trop longue aux UV déstabilise certains composés

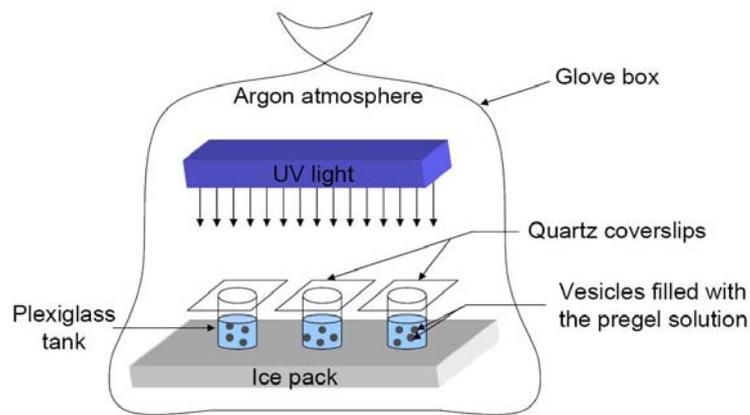


FIG. 4.9: Schéma du dispositif de polymérisation des vésicules sol ou gel : la réaction est effectuée dans un sac à gants rempli d'argon, on peut voir la lampe UV, les chambres de polymérisation fermées par des lames de quartz posées sur un pain de glace, extrait de [Faivre, 2006]

sence d'oxygène et de température sont les mêmes que pour les gel-GUVs. Par contre, comme nous l'avons dit en introduction de cette section, il n'est pas nécessaire d'opérer une dilution de la solution de vésicules : en effet lors de la polymérisation, des chaînes de poly(Nipam) se forment à l'intérieur et à l'extérieur des vésicules mais, dans le cas des sol-GUVs, on peut diluer les vésicules dans un grand volume de glucose 100 mM après polymérisation, ce qui dilue les chaînes de poly(Nipam) à l'extérieur.

Polymérisation de solutions et de gels de poly(Nipam) de référence

La préparation de solutions de poly(Nipam) ou d'échantillons de gels de poly(Nipam) se fait de façon identique à celle utilisée pour les sol ou gel-GUVs. Une solution pré-gel ou présol est bullée à l'argon pendant 30 min puis polymérisée dans des conditions identiques à celles décrites précédemment (irradiation UV, atmosphère d'argon et contrôle de la température).

Nous avons présenté dans cette section la fabrication des vésicules composites à base de poly(Nipam). Cette technique repose sur l'électroformation de vésicules encapsulant les composés nécessaires à la formation de chaînes ou de gel de poly(Nipam) puis la photopolymérisation UV des vésicules. Dans le cas des sol-GUVs, celle-ci est faite directement après l'électroformation, dans le cas des gel-GUVs, une dilution est opérée après l'électroformation pour ne pas fabriquer des vésicules prises dans une matrice de gel.

4.2 Traitements de surfaces : substrats et micropipettes

Nous verrons par la suite que nous avons besoin de contrôler l'adhésion des vésicules sur les surfaces avec lesquelles elles sont en contact. Nous répertorions ici les différents traitements de surfaces qui ont été utilisés dans cette étude.

Traitement polyLysine

La polyLysine est un polymère chargé positivement, qui entraîne donc une interaction électrostatique avec les membranes phospholipidiques qui sont de charge légèrement négative [Pincet et al., 1999]. On traite à la polyLysine des lamelles de microscope standard (épaisseur $0,17 \mu\text{m}$) de la façon suivante :

- lavage eau millipore
- lavage eau millipore + savon
- lavage eau millipore
- lavage éthanol
- lavage eau millipore
- trempage dans une solution de polyLysine (dilution 1% en volume de la solution commerciale) pendant 1h
- séchage à l'argon

Les lames sont ensuite conservées à l'air.

Traitement Silanes aminés

Comme dans le cas de la polyLysine, les Silanes aminés sont chargés et permettent donc de préparer des substrats chargés. On utilise des lamelles de microscope standard qui subissent les nettoyages suivants :

- 30 mn sonication dans l'éthanol
- 30 mn sonication dans l'acétone
- 15 mn sonication dans l'eau millipore
- traitement piranha $H_2SO_4 + H_2O_2$ pendant 1h
- rinçage très abondant à l'eau millipore (5 L)
- rinçage eau ultrapure
- séchage des lames à l'argon
- 1h30 à 150°C
- trempage dans une solution de Silanes (2% en volume)
- rinçage éthanol

Les lames sont ensuite stockées dans l'eau.

Pour ce traitement on utilise deux types de Silanes : un Silane aminé (chargé) et un Silane hydrophobe. En mélangeant les deux types de Silanes, nous pouvons faire varier le taux de charge de la surface. Les proportions de Silanes aminés dans nos expériences ont varié de 1% à 100%.

Traitement Streptavidine

La streptavidine est une protéine présentant une affinité très importante avec la biotine, ce traitement est donc à réaliser sur des lamelles de verre dans le but d'étudier l'adhésion de vésicules à membrane biotinylées.

- silanisation des lames, cf. section précédente
- incubation dans une solution de Glutéraldéhyde pendant 30 min
- 3 rinçages au PBS (Phosphate Buffer Saline, Sigma)

- incubation dans une solution de Streptavidine (Roche) à 0,25 mg/mL pendant 1h
 - 3 rinçages au TBE (Tris-borate-EDTA, Sigma)
- Les lames sont ensuite stockées dans le TBE avant utilisation.

Traitement SurfaSil

Ce traitement est réalisé sur des pipettes étirées préalablement (cf. section 4.4.1), afin d'éviter l'adhésion entre les membranes de vésicules et les pipettes lors d'expériences d'aspiration de vésicules. Chaque pipette subit :

- 3 rinçages à l'éthanol
- trempage dans une solution de SurfaSil/Acétone 1/9 pendant 10s
- 3 rinçages à l'acétone
- 3 rinçages au méthanol
- séchage (12h à l'air)

Pour traiter l'intérieur des pipettes il est nécessaire d'aspirer la solution utilisée pour le rinçage ou le dépôt dans la pipette avec une seringue sur laquelle est montée la pipette. Les rinçages à l'acétone sont importants pour éviter la formation d'agglomérats de SurfaSil dans la pipette.

4.3 Techniques d'observation

Nous répertorions dans cette section les différentes techniques de microscopie optique utilisées dans cette étude.

4.3.1 Microscopie DIC (Differential Intensity Contrast)

L'oeil, comme les caméras, est sensible aux différences d'intensité de la lumière. De nombreux objets modifient son intensité et sont donc visibles, mais ce n'est pas le cas pour les GUVs qui, comme beaucoup d'autres objets biologiques, ne modifient que sa phase. Il est donc nécessaire pour visualiser les GUVs de transformer des différences de phase en différences d'intensité. La microscopie DIC (Differential Intensity Contrast) est une technique basée sur l'interférence entre la lumière déphasée lors de la traversée de l'objet d'étude et la lumière émise par la source. Le dispositif est représenté sur la figure 4.10 sur laquelle on peut suivre le trajet optique de la lumière : elle est d'abord polarisée puis séparée en deux par un prisme. L'un des faisceaux traverse l'échantillon, donc sa phase est modifiée, mais pas le second. Ensuite les deux faisceaux sont rassemblés par un second prisme et traversent un second polariseur, il y a donc interférence entre les deux, c'est ce qui engendre le contraste des images.

4.3.2 Microscopie à contraste de phase

Le principe de la microscopie à contraste de phase repose également sur une interférence entre la lumière qui traverse l'échantillon et une lumière de référence. Le dispositif est représenté sur la figure 4.11 sur laquelle on voit les éléments clés de cette technique : l'anneau de phase introduisant un déphasage de $\pi/2$ entre la lumière dont la phase a été perturbée par

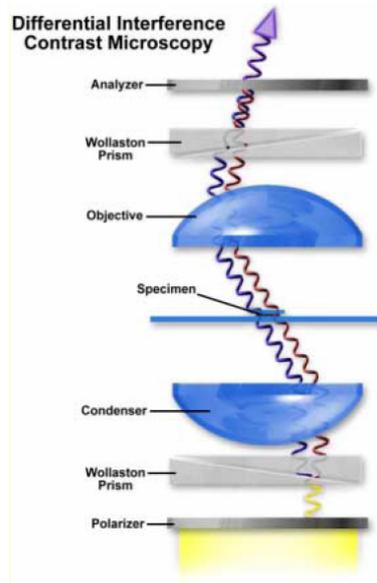


FIG. 4.10: Schéma du dispositif de microscopie DIC.

l'échantillon et la lumière émise par la source ainsi que le diaphragme annulaire conjugué à l'anneau de phase. Le dispositif de microscopie à contraste de phase permet également de transformer les variations de phase de la lumière en variations d'intensité.

Cette technique permet de repérer facilement les vésicules car celles-ci sont souvent remplies de sucrose et immergées dans du glucose qui ont des indices optiques différents, donc la vésicule apparaît sombre sur fond clair. Le problème de cette technique est qu'elle entraîne un halo clair autour des interfaces, ce qui peut être gênant pour les mesures de taille des objets.

4.3.3 Microscopie RICM (Reflexion Interference Contrast Microscopy)

Le principe de cette technique est illustré sur la figure 4.12 qui représente une situation typique dans laquelle l'observation par RICM est utile : une membrane de vésicule au voisinage d'un substrat solide. Lorsqu'une lumière monochromatique est envoyée à travers l'objectif d'un microscope sur l'objet à étudier, elle subit une réflexion sur l'interface verre/eau ainsi qu'une réflexion sur l'interface eau/membrane. Ces deux rayons réfléchis interfèrent en formant des franges dont la distribution d'intensité reflète la distribution des distances substrat/objet dans la zone étudiée. Le RICM est donc une technique privilégiée pour l'étude de des phénomènes d'adhésion ou de mouillage au voisinage d'un substrat.

4.3.4 Microscopie de fluorescence

Pour cette technique nous sortons du champ des microscopies interférentielles. La microscopie de fluorescence consiste à observer sur fond noir des objets spécifiquement marqués par des fluorophores. L'intérêt est justement de n'observer que les objets marqués, ce qui est particulièrement utile notamment en biologie car il est possible par exemple de marquer spécifiquement

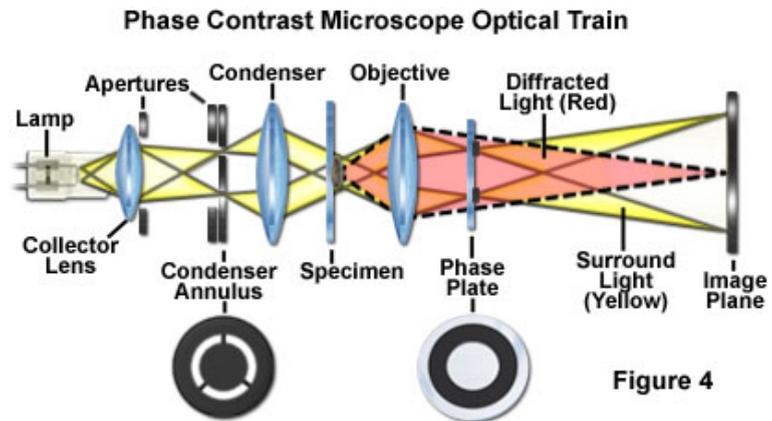


FIG. 4.11: Schéma du dispositif de microscopie à contraste de phase.

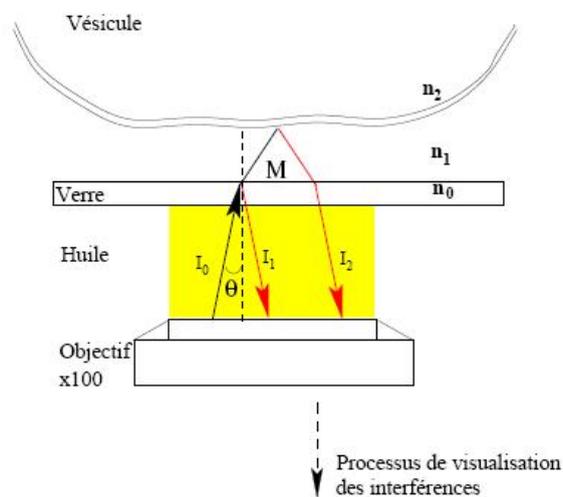


FIG. 4.12: Principe de la technique RICM.

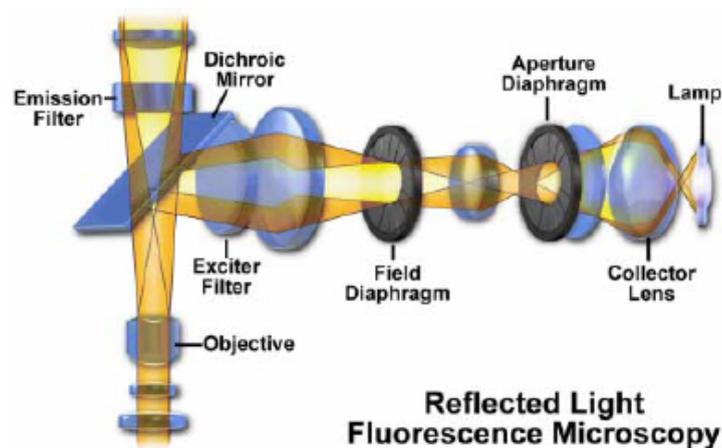


FIG. 4.13: Schéma du dispositif de microscopie de fluorescence.

une protéine et d'observer sa distribution spatiale et temporelle dans une cellule. Le dispositif de microscopie de fluorescence est représenté sur la figure 4.13. Les deux diaphragmes placés après la lampe permettent d'obtenir un éclairage homogène. Le dispositif permet d'exciter l'échantillon à la longueur d'onde d'excitation du fluorophore mais de ne récolter la lumière qu'aux longueurs d'ondes supérieures. Sachant qu'un fluorophore émet à une longueur d'onde supérieure à sa longueur d'onde d'excitation à cause d'une perte d'énergie par réorganisation interne de la molécule fluorescente entre l'absorption et l'émission, le dispositif permet de ne récolter que la lumière d'émission et non la lumière d'excitation diffusée. Pour les observations en microscopie de fluorescence (et en particulier pour les mesures quantitatives), il est nécessaire d'optimiser les paramètres d'observation par des mesures préliminaires. Les valeurs des réglages du microscope conditionnant l'éclairage des objets sont :

- l'ouverture du diaphragme placé devant la source ;
- la valeur de l'atténuation du filtre gris placé devant la source pour limiter l'échauffement des échantillons ;
- les réglages de la caméra qui enregistre les images : gain et temps d'exposition.

Ces paramètres sont optimisés pour avoir d'une part un rapport signal/bruit optimum sur les images et d'autre part ne pas saturer la caméra.

La figure 4.14 montre l'observation d'une gel-GUV respectivement en contraste de phase, DIC et microscopie de fluorescence avec un marquage des lipides de la membrane. Dans la mesure où nous disposons de plusieurs techniques d'observation, nous pouvons dégager les avantages et les inconvénients de chaque technique. De façon très sommaire, la microscopie en contraste de phase permet de repérer très facilement les objets (sombres sur fond clair) mais le halo qui entoure les interfaces peut poser problème (notamment pour la mesure des langues de vésicules aspirées lors des expériences de micropipettes (cf. section 7.1.1)). La microscopie DIC permet une visualisation très précise de la membrane, mais par contre les objets sont parfois plus difficiles à "trouver" dans la chambre d'observation. Enfin la microscopie de fluorescence permet dans notre cas de visualiser spécifiquement les membranes de vésicules, mais le temps

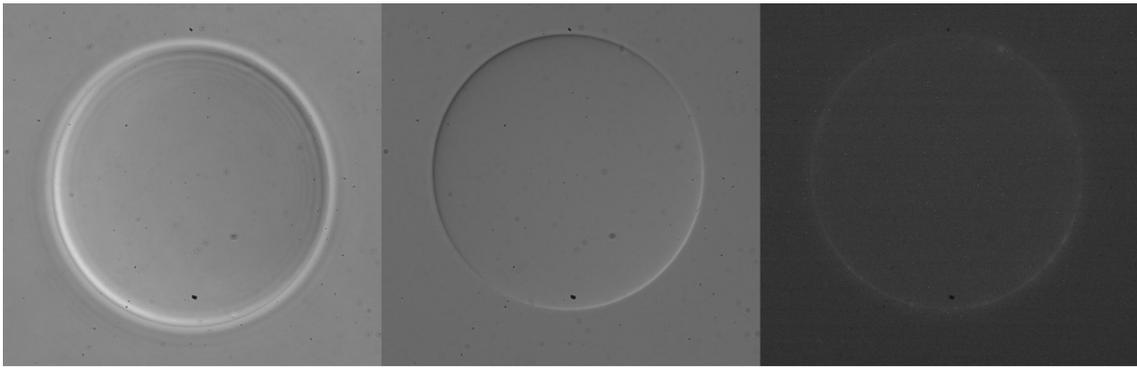


FIG. 4.14: Image de l'observation d'une gel-GUV respectivement en contraste de phase, DIC, et microscopie de fluorescence.

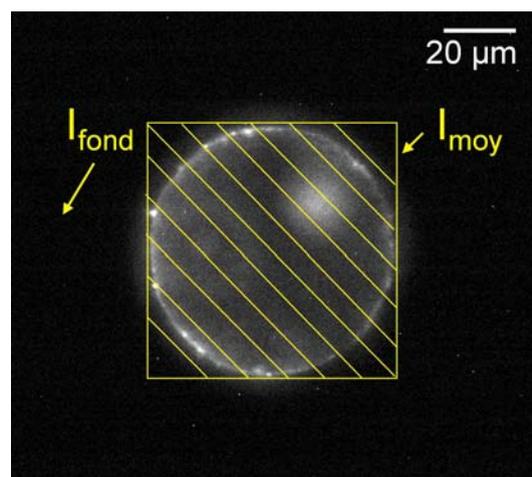


FIG. 4.15: Principe de la mesure de la fluorescence totale émise par une vésicule.

d'expérience est limité par le photo-blanchiment des fluorophores (voir section 5.3).

4.3.5 Mesures quantitatives de fluorescence

Pour certaines études en microscopie de fluorescence, il a été nécessaire de mesurer l'intensité de fluorescence pour quantifier nos résultats (cf. chapitre 5).

Nous avons utilisé deux techniques quantitatives permettant de mesurer d'une part la quantité de fluorescence émise par une vésicule, d'autre part la quantité de fluorescence émise en un point de la membrane.

Nous mesurons la quantité totale de fluorescence émise par une vésicule de la façon suivante : sur une image de fluorescence, nous définissons un carré de côté N qui englobe la vésicule étudiée, comme représenté sur la figure 4.15 puis nous calculons l'intensité moyenne dans ce carré comme :

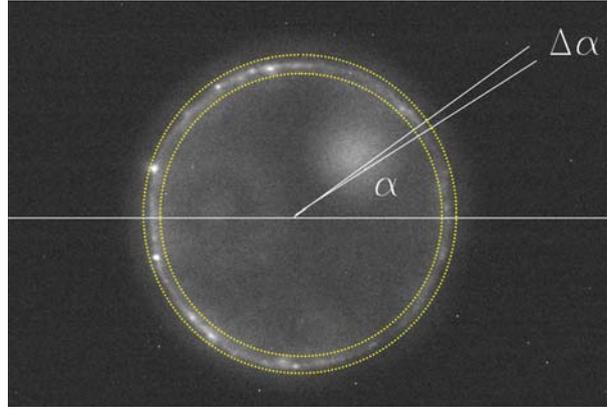


FIG. 4.16: Principe de la mesure de la quantité azimuthale de fluorescence émise par une vésicule : deux cercles concentriques encadrent la membrane de la vésicule, et à chaque azimuth α on mesure la quantité moyenne de fluorescence sur une tranches d'épaisseur $\Delta\alpha$.

$$I_{moy} = \frac{\sum_{i=0}^N \sum_{j=0}^N I_{ij}}{N^2} \quad (4.1)$$

où I_{ij} est l'intensité du pixel de coordonnées (i,j). Ensuite nous mesurons l'intensité moyenne du fond (c'est-à-dire à l'extérieur de la vésicule) I_{fond} , cette intensité est considérée constante en tout point de l'image. La quantité de fluorescence émise par la vésicule est donc définie comme :

$$F = (I_{moy} - I_{fond})N^2 \quad (4.2)$$

où $I_{fond}N^2$ est la correction liée à la fluorescence correspondant au fond. Cette mesure repose sur l'hypothèse que toute la lumière émise par l'objet peut être collectée au plan focal. Nous reviendrons sur la validité de cette approche au paragraphe 5.4.

Nous réalisons également des mesures de fluorescence azimuthale le long de la membrane des vésicules afin de mesurer l'hétérogénéité de la fluorescence émise en différents points de la membrane d'une même vésicule $F_{(\alpha)}$. Pour ce faire nous traitons les images de fluorescence avec un programme qui consiste à encadrer la membrane de la vésicule par deux cercles concentriques, comme indiqué sur la figure 4.16, puis à découper le périmètre en tranches d'épaisseur $\Delta\alpha$ sur lesquelles la fluorescence moyenne est mesurée. Nous obtenons donc une courbe de la quantité de fluorescence en un point de la membrane en fonction de l'angle auquel ce point est situé.

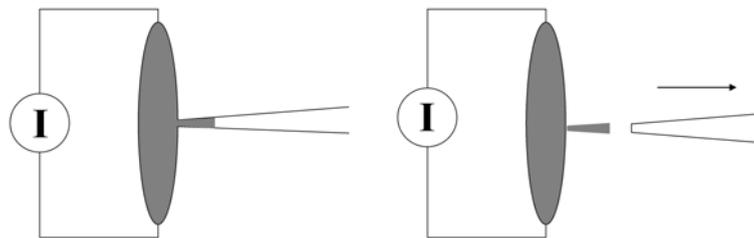


FIG. 4.17: Principe de la fabrication de pipettes grâce à la microforge : après avoir étiré la pipette en forme de pointe, on trempe son extrémité dans une goutte de verre fondu qui pénètre dans la pipette. La solidification du verre induit la rupture contrôlée l'extrémité de la pipette.

4.4 Aspiration par micropipettes

4.4.1 Fabrication des micropipettes

Les micropipettes sont fabriquées à partir de capillaires de verre (Clark Capillaries, GC 100-10, 1mm OD 0.58 mm ID). Les capillaires sont nettoyés dans un bain à ultrasons dans l'éthanol puis séchés. Ensuite ils sont étirés avec une étireuse à filament (Sutter Instruments P97). On obtient des pointes côniques que l'on va "retravailler" à l'aide d'une microforge pour obtenir des pipettes du diamètre désiré et pour supprimer toute aspérité susceptible d'endommager les membranes.

La microforge est un dispositif qui permet d'observer et de déplacer la pipette au voisinage d'un filament recouvert de Borax (Sodium tetraborate decahydrate, Sigma). Le filament est chauffé par le passage d'un courant électrique de forte intensité ce qui entraîne la fusion du Borax, celui-ci rentre dans la pipette par capillarité. La température de fusion du Borax étant inférieure à celle du verre des pipettes, le Borax monte dans la pipette qui reste solide. Quand on éteint le courant dans le filament de la microforge, le Borax refroidit et se rétracte brusquement, ce qui entraîne une rupture très nette de la pipette (figure 4.17). Nous pouvons obtenir de cette façon des pipettes bien adaptées à nos études.

La taille des vésicules impose la taille des pipettes que nous utilisons : leur diamètre est typiquement de l'ordre de 20 μm dans ce cas. Pour les gels macroscopiques, qui sont de taille bien supérieure à celle des vésicules, il est tout à fait possible d'utiliser des diamètres de pipette de 50 μm voire plus afin de mieux visualiser le régime des petites déformations (cf. section 8.2.2).

4.4.2 Dispositif expérimental

Une fois forgée et traitée au SurfaSil pour éviter toute adhésion, la pipette est remplie de la solution dans laquelle les objets d'étude sont suspendus (glucose 100 mM). Pour ce faire on monte la pipette sur un mandrin relié à une seringue et on aspire cette solution dans la pipette. Celle-ci est ensuite fixée sur un dispositif de déplacement tridimensionnel consistant en trois vis micrométriques et plongée dans la chambre d'observation sur la platine du microscope. Les chambres d'observation sont faites en assemblant deux lamelles de microscope par un cylindre de pâte Vitrex en forme de U.

Nous avons vu au chapitre 2.4.1 que, selon les objets étudiés, les pressions appliquées pouvaient varier de 10^{-1} à 10^4 Pa. Pour exercer une aussi large gamme de pressions, il est nécessaire d'utiliser deux dispositifs distincts. Le premier dispositif permettant d'appliquer des pressions faibles, de 0,1 à 100 Pa, consiste en un récipient d'eau relié à la pipette que l'on peut déplacer verticalement avec une vis micrométrique. Un décalage de hauteur d'eau de $10 \mu m$ correspond à une différence de pression de 0,1 Pa. Les pressions d'aspiration croissantes sont obtenues en déplaçant le réservoir de liquide par pas de $10 \mu m$. La valeur de la pression d'aspiration est calculée à partir de la hauteur du réservoir. Il faut également noter que l'évaporation de l'eau dans la chambre d'observation peut fausser la mesure de pression à cette précision, c'est pourquoi la zone de la chambre exposée à l'air est recouverte d'un film de décane.

Pour appliquer des pressions plus élevées (supérieures à 100 Pa), on relie la pipette à une seringue dont le piston est déplacé par un moteur à deux vitesses. La pression est mesurée et acquise par un capteur (Honeywell 26PCCFA6D ± 1 atm.) relié à un PC qui enregistre simultanément les valeurs de la pression et les images de la caméra.

4.5 Dispositif d'extrusion de tubes membranaires

Les expériences d'extrusion de tubes membranaires, dont nous présenterons les résultats à la section 7.2 sont réalisées en collaboration avec l'Institut Curie (Paris) dans l'équipe de Françoise Brochard-Wyart avec un dispositif couramment utilisé dans ce groupe pour extruder des fils membranaires sur des vésicules et des cellules.

La figure 4.18 (a) montre un schéma du dispositif : dans un canal micrométrique imprimé dans un bloc de PDMS on fait circuler un flux à vitesse contrôlée à l'aide d'un pousse seringue. L'observation en microscopie optique se fait à travers le PDMS. Comme le montre l'encart de cette figure, une aiguille recouverte de poly-Lysine est insérée dans le canal. Les vésicules sont injectées et on déplace l'aiguille pour qu'elle se colle à une vésicule par le bout de sa pointe. On impose alors un flux qui entraîne la vésicule conduisant à l'extrusion d'un fil de membrane [Borghi, 2006].

La figure 4.18 (b) montre l'observation en microscopie optique d'une expérience d'extrusion de fil membranaire sur une gel-GUV avec un flux croissant. Le fil entre la vésicule et la pointe n'est pas visible avec le grossissement que nous utilisons, on ne constate sa présence que parce la vésicule n'est pas entraînée hors du champ d'observation par le flux.

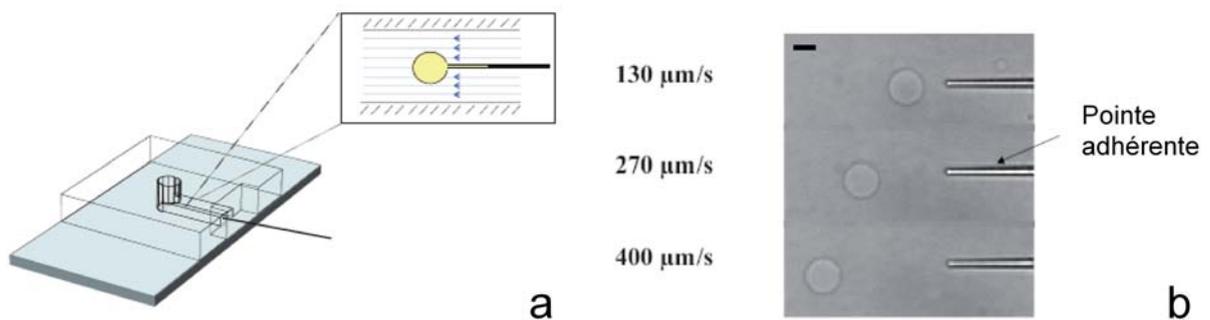


FIG. 4.18: (a) Dispositif expérimental : une chambre consistant en un microcanal imprimé dans un bloc de PDMS. Zoom : une vésicule accrochée à la micro-aiguille recouverte de polyLysine dans le microcanal soumise à un flux U . (b) Images en microscopie optique d'une séquence d'extrusion de fil sur un gel-GUV à 9% sous un flux U croissant pas à pas (130, 270 et 400 $\mu\text{m/s}$). Le tube est attaché à l'extrémité d'une micro-aiguille recouverte de polyLysine (barre d'échelle = 10 μm).

Chapitre 5

Caractérisation du marquage fluorescent de la membrane

Nous nous intéressons maintenant au marquage fluorescent de la membrane des différents systèmes composites dont nous venons de décrire la préparation à la section 4.1. Ce marquage est effectué via l'introduction d'une fraction de lipides fluorescents suffisamment faible (1%) pour ne pas modifier les propriétés des vésicules. Le but de ce marquage est tout d'abord de permettre l'observation spécifique de la membrane des vésicules au cours des différentes déformations qu'elles subissent (transition de volume au chapitre 6 et aspiration en micropipettes au chapitre 8). L'étude rapportée dans ce chapitre concerne la stabilité des fluorophores au cours des différentes étapes de préparation et d'observation des systèmes. Nous rapportons également une étude qualitative des profils de fluorescence en fonction de la distribution spatiale des fluorophores.

5.1 Influence de la réaction de polymérisation sur le marquage fluorescent

5.1.1 Stabilité des marqueurs lors de l'irradiation UV

La première série d'expériences que nous présentons a pour but de déterminer l'influence de l'irradiation UV que nous utilisons pour polymériser le milieu interne des gel- et sol-GUVs. Nous montrons sur la figure 5.1 (a) et 5.1 (b) des vésicules de DOPC remplies d'une solution de sucrose 100 mM respectivement non-irradiée et irradiée dans les mêmes conditions que celles que nous utilisons pour polymériser les vésicules (5 min sous la lampe UV-B). La comparaison des deux figures ne montre pas de différence notable, ce qui est confirmé par les mesures quantitatives de fluorescence présentées dans la figure 5.1 (c). Cette courbe montre que la quantité de fluorescence par unité de surface de membrane est identique pour les vésicules non-irradiées et irradiées. Nous pouvons en conclure que nos conditions d'éclairement dans la plage de longueur d'onde de notre filtre n'induisent pas de photoblanchiment des fluorophores.

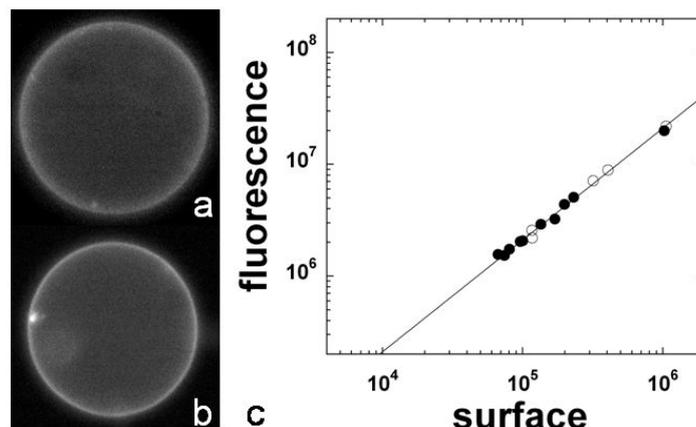


FIG. 5.1: Observation en fluorescence de vésicules de DOPC remplies de sucrose 100 mM sans irradiation (a) et après 5 min d'irradiation sous la lampe UV-B (b) ; (c) quantité de fluorescence pour différentes vésicules en fonction de leur surface pour des vésicules avant et après irradiation à 300 nm : mise en évidence de l'absence de photoblanchiment dû à l'illumination UV.

5.1.2 Stabilité des marqueurs vis-à-vis des chaînes de poly(Nipam)

Nous avons ensuite voulu voir si les chaînes de poly(Nipam) avaient un effet observable en fluorescence sur les membranes, nous avons donc étudié des vésicules de DOPC incubant dans une solution de chaînes de poly(Nipam). Les figures 5.2 (a) et 5.2 (b) montrent respectivement une vésicule de DOPC avec ou sans incubation dans une solution de chaînes de polyNipam à 600 mM. Le graphique de la figure 5.2 (c) montre que la quantité de fluorescence par unité de surface de membrane est identique pour les vésicules incubées et non incubées, donc la présence de chaîne de polyNipam dans le milieu externe des vésicules n'induit pas de changement dans leurs propriétés de fluorescence.

Néanmoins on peut noter que l'apparition de défauts dans la membrane semble légèrement favorisée dans le cas des vésicules incubées avec des chaînes de poly(Nipam).

5.1.3 Influence de la phase de photopolymérisation : irradiation en présence de Nipam et de DEAP

Nous avons observé un comportement radicalement différent à ceux rapportés dans les paragraphes précédents après irradiation dans le cas des vésicules contenant les solutions présol ou pré-gel. En effet dans ces deux cas l'irradiation entraîne une modification nette de la fluorescence émise. Nous observons tout d'abord une forte décroissance de la quantité de fluorescence émise par unité de surface. La figure 5.3 (a) montre une vésicule contenant le milieu présol avant polymérisation et la figure 5.3 (b) une sol-GUV, donc une vésicule qui contenait le milieu présol ayant subi l'irradiation UV. On peut constater sur la figure 5.3 (c) que la quantité de fluo-

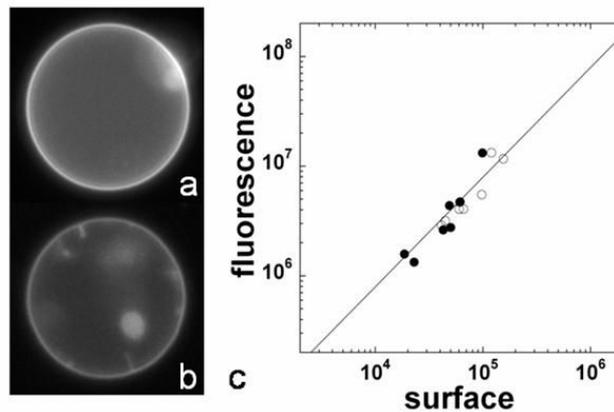


FIG. 5.2: Observation en fluorescence de vésicules de DOPC remplies de sucrose 100 mM (a) et après incubation dans une solution de poly(Nipam) 600mM (b); (c) quantité de fluorescence pour différentes vésicules en fonction de leur surface pour des vésicules avant et après incubation dans le poly(Nipam)

rescence par unité de surface est réduite d'un facteur 6 environ. Un effet similaire est observé dans le cas des vésicules pré-gel et gel (voir les figures 5.4 qui présentent l'observation d'une vésicule encapsulant le milieu pré-gel (a), une gel-GUV (b) et la quantité de fluorescence émise par unité de surface pour les vésicules pré-gel et les gel-GUVs (c)) avec une réduction similaire de la quantité de fluorescence.

Les résultats des expériences réalisées dans les sections précédentes montrent clairement que la réduction de la quantité de fluorescence par unité de surface n'est pas due à un photoblanchiment des lipides fluorescents provoqué par l'irradiation UV, mais qu'elle résulte de l'effet induit par l'illumination en présence de Nipam et de DEAP (le MBA est absent de la solution pré-sol). Nous ne pouvons que formuler des hypothèses sur le mécanisme de cette réduction de fluorescence associée à l'illumination en présence de Nipam et de DEAP. Une destruction photo-induite de lipides est évoquée dans [Karatekin et al., 2003], celle-ci serait due à une photo-oxydation des lipides dont les produits sont solubles et quittent la membrane. Néanmoins dans notre cas, nous avons montré que l'illumination UV des vésicules fluorescentes simples ne conduisait pas à une diminution de leur fluorescence, même en présence d'oxygène. Ensuite [Rodriguez et al., 2005] mentionne la destruction de lipides NBD-PC en présence de dithionite sous illumination, ce qui aboutit également à leur solubilisation. Même si nous utilisons des composés différents, on pourrait penser qu'un effet similaire survienne à cause de la formation d'un radical par le DEAP qui est soluble dans la membrane. Pour vérifier cette hypothèse, il faudrait pouvoir suivre une vésicule pendant le processus de photopolymérisation, ce qui est difficile avec notre dispositif expérimental (sac à gants, milieu sans oxygène).

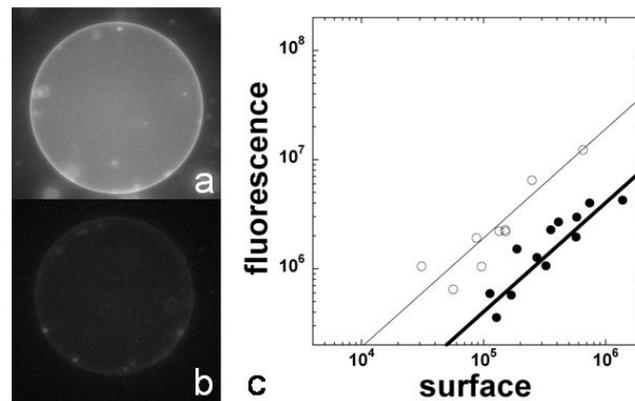


FIG. 5.3: Observation en fluorescence de vésicules contenant le milieu pré-sol (a) et de sol-GUVs (b); (c) quantité de fluorescence pour différentes vésicules en fonction de leur surface pour des vésicules pré-sol et sol-GUVs : nette diminution pour les sol-GUVs

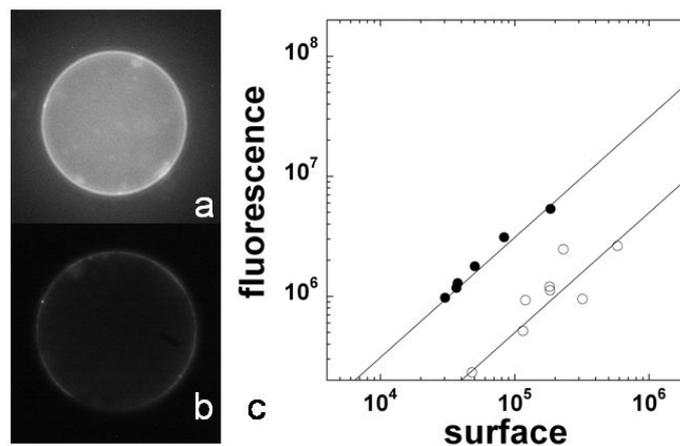


FIG. 5.4: Observation en fluorescence de vésicules contenant le milieu pré-gel (a) et de gel-GUVs (b); (c) quantité de fluorescence pour différentes vésicules en fonction de leur surface pour des vésicules pré-gel et gel-GUVs : nette diminution pour les gel-GUVs

5.2 Hétérogénéités spatiales du marquage fluorescent

Dans le cas des gel-GUVs, on peut noter en observant la figure 5.4 (b) que le marquage fluorescent de la membrane de ces vésicules semble hétérogène. Nous avons donc mesuré l'hé-

térogénéité du marquage fluorescent sur la membrane des vésicules. La figure 5.5 montre la comparaison des profils azimuthaux de fluorescence pour une vésicule de DOPC typique et une gel-GUV. On constate que la déviation par rapport à la valeur moyenne de la fluorescence est plus importante dans le cas de la gel-GUV. Le rapport de la variance sur la valeur moyenne de la quantité de fluorescence constitue une mesure quantitative des hétérogénéités dans le marquage de la membrane des vésicules. La figure 5.5 (b) montre cette quantité, moyennée sur plusieurs vésicules, pour les différents types de vésicules que nous avons étudiés. On peut noter une augmentation significative de l'hétérogénéité dans le cas des gel-GUVs, ce qui montre que cette hétérogénéité est associée à l'effet du rayonnement UV en présence de Nipam, de DEAP et de points de réticulation.

On peut interpréter ce résultat comme une perturbation de la structure de la membrane lors de la polymérisation de gel dans les vésicules.

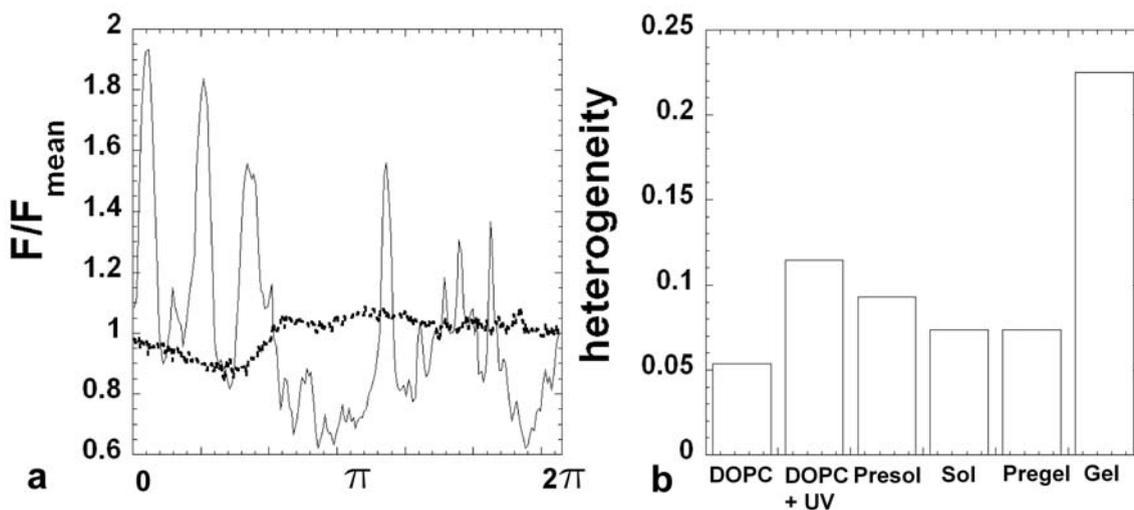


FIG. 5.5: (a) Fluorescence normalisée par sa valeur moyenne en fonction de l'angle à laquelle elle est mesurée sur le contour d'une vésicule : profils azimuthaux de fluorescence pour une vésicule de DOPC remplie de sucrose 100 mM (courbe en pointillés) et pour une gel-GUV (courbe en trait plein) ; (b) Hétérogénéité de la fluorescence pour des vésicules de DOPC remplies de sucrose, des vésicules de DOPC après illumination UV des vésicules présol, des sol-GUVs, des vésicules pré-gel et des gel-GUVs. L'hétérogénéité est définie comme le rapport de la variance des valeurs de la fluorescence en chaque point du profil et de sa valeur moyenne.

Nous pouvons remarquer que nous avons constaté une diminution identique de la quantité de fluorescence à la fois pour les sol-GUVs et les gel-GUVs lors de la réaction de photopolymérisation (cf. figures 5.3 et 5.4), alors qu'ici l'effet d'hétérogénéité ne se manifeste que pour les gel-GUVs. Nous pouvons proposer l'interprétation suivante : la présence du gel stabiliserait spatialement la membrane, en gênant la diffusion des lipides fluorescents, ce qui pourrait entraîner la formation d'hétérogénéités. Dans le cas des vésicules sol on pourrait imaginer que la diffusion des lipides fluorescents tend à éviter la formation de ces hétérogénéités.

5.3 Mesure du temps caractéristique de blanchiment

Le photoblanchiment des fluorophores est un phénomène inévitable à prendre en compte lors des observations de fluorescence. Nous avons donc mesuré le temps caractéristique du photoblanchiment des lipides fluorescents afin de pouvoir le comparer au temps d'observation typique dans nos expériences.

Pour faire cette mesure, nous nous plaçons dans les conditions d'éclairage que nous utilisons lors des expériences de fluorescence et nous filmons une vésicule de DOPC ou une gel-GUV du même échantillon que celles que nous allons étudier. Nous enregistrons des images de fluorescence de cette vésicule au cours du temps sans modifier les conditions d'éclairage ni la focalisation du microscope et nous calculons la quantité de fluorescence émise par la vésicule au cours du temps. Nous obtenons des résultats similaires pour les vésicules de DOPC et les gel-GUVs. Ils sont présentés sur la figure 5.6. Nous observons aux temps courts (< 20 s) une diminution linéaire de la quantité de fluorescence en fonction du temps.

La pente des deux courbes dans ce régime est de 0.02, ce qui veut dire que typiquement un objet éclairé pendant 5 s émet 10% de quantité de fluorescence en moins que le même objet qui n'aurait été exposé à aucun éclairage. Pendant les expériences suivantes nous pourrions donc corriger les intensités de fluorescence mesurées en tenant compte du temps pendant lequel les gel-GUVs ont été éclairés. La présence de gel dans le milieu interne n'affecte pas le temps de blanchiment.

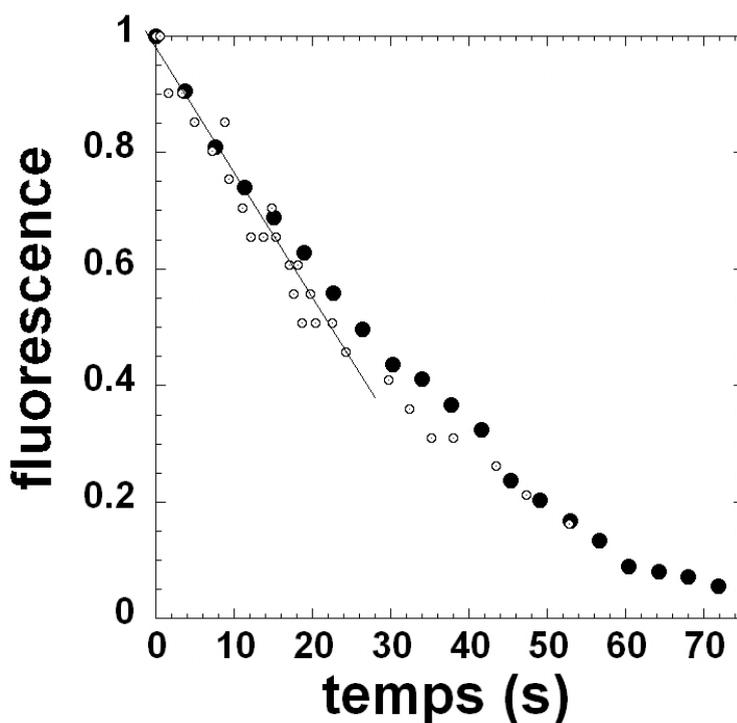


FIG. 5.6: Quantité de fluorescence (normalisée par sa valeur maximale) en fonction du temps pour une vésicule de DOPC (points blancs) et une gel-GUV (points noirs)

5.4 Formes des profils de fluorescence

Nous allons voir dans le chapitre 6 que certaines des vésicules composites que nous étudions peuvent subir, sous l'influence de paramètres externes, des réductions de volume importantes. La question se pose alors du devenir de la membrane pendant ces importantes modifications globales des objets. L'image de l'objet en microscopie de fluorescence après la déformation est une sphère brillante et il est impossible de préciser si la membrane est froissée en surface sur l'objet ou si les lipides ont diffusé en volume dans le milieu interne. L'étude des profils de fluorescence peut donner des informations plus précises sur la distribution spatiale des fluorophores. C'est pourquoi nous étudions dans cette section l'influence de cette distribution sur la forme de ces profils.

Le profil de fluorescence d'une vésicule obtenu par microscopie standard (non confocale) par une coupe équatoriale de la vésicule a une forme complexe due au fait que le microscope standard collecte la lumière qui vient non seulement du plan focal mais également de points situés hors de ce plan. Notre mesure de quantité totale de lumière émise par une vésicule dans la section 4.3.5 le montre bien car la quantité totale de fluorescence que nous mesurons pour une vésicules est effectivement proportionnelle à sa surface et non à son rayon.

Comme nous venons de le dire, nous voulons maintenant étudier l'effet de la distribution spatiale des fluorophores sur ces profils complexes et pour ce faire nous nous proposons de simuler différentes images de fluorescence.

Si on définit un objet par une fonction $O_{(x,y,z)}$, son image dans le plan focal est une fonction $I_{(x,y,0)}$ obtenue par le produit de convolution de $O_{(x,y,z)}$ par la fonction d'étalement du point (Point Spread Function ou PSF) du microscope :

$$I_{(x,y,0)} = \int dx' dy' dz' PSF_{(x-x',y-y',z-z')} O_{(x,y,z)} \quad (5.1)$$

Nous avons donc mesuré la PSF de notre microscope dans les conditions d'observation que nous utiliserons dans la suite de cette étude pour obtenir des images de fluorescence. Pour ce faire, nous avons observé l'image d'une bille fluorescente de taille sub-optique, qui correspond donc à un objet ponctuel pour notre système. L'observation de l'image de la bille permet une mesure de la PSF car cette image $I_{(x,y,z)}$ s'écrit :

$$I_{(x,y,z)} = \int dx' dy' dz' PSF_{(x-x',y-y',z-z')} \delta_{(x-x',y-y',z-z')} = PSF_{(x,y,z)} \quad (5.2)$$

et correspond donc à la PSF du microscope. La fonction de Dirac $\delta_{(x-x',y-y',z-z')}$ représente l'image ponctuelle de la bille fluorescente. On a une symétrie par rapport à l'axe des z, nous donnons donc un aperçu sur la figure 5.7 de l'allure la PSF de notre microscope. La figure 5.7 (a) représente l'évolution de l'intensité maximale de la PSF en z et 5.7 (b) son évolution radiale. Sur les figures (a) et (b), les points expérimentaux sont représentés par des ronds.

En parallèle, nous avons réalisé à l'aide du logiciel libre d'accès ImageJ des simulations de la PSF théorique de notre microscope. Le logiciel DiffractionPSF-3D développé par Bob Dougherty (OptiNav Inc.) permet de simuler une série d'images qui représente la $PSF_{(x,y,z)}$ d'un microscope en utilisant le calcul théorique présenté dans [Gibson and Lanni, 1989] à partir des paramètres du microscope (Indice du milieu de travail n, ouverture numérique de l'objectif

O.N., longueur d'onde de la lumière incidente λ). En utilisant les paramètres de notre microscope ($n=1$, O.N.=0.60 et $\lambda=510$ nm) nous avons généré une fonction $PSF_{(x,y,z)}$ dont l'allure en r et en z est présentée sur les figures 5.7 (a) et (b) en points rouges. On peut constater le bon accord général entre la PSF expérimentale et celle que nous avons simulée.

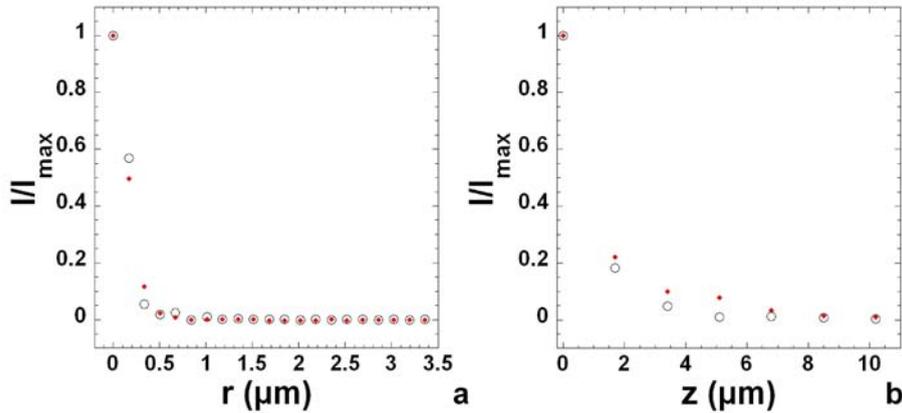


FIG. 5.7: (a) Intensité de fluorescence I en un point du plan (x,y) situé à la distance r du point $(0,0,0)$; (b) Intensité I en un point de l'axe z situé à la distance z du point $(0,0,0)$; les intensités I sont normalisées par $I_{max} = I(0,0,0)$. Ceci représente la PSF mesurée sur notre microscope (ronds) et de la PSF simulée dans les conditions adéquates avec ImageJ (carrés rouges)

Comme nous connaissons maintenant la PSF de notre microscope, nous allons tenter de prédire les images de fluorescence correspondant à des vésicules marquées en fonction de la distribution spatiale des fluorophores.

Nous avons calculé les convolutions de fonctions objets $0_{(x,y,z)}$ par la PSF grâce au Plugin Convolve 3D d'ImageJ. Les fonctions tridimensionnelles sont représentées par des séries de 256 images : le numéro de l'image (entre 0 et 256) représente l'axe des z et chaque image bidimensionnelle représente les axes x et y à l'altitude z . Nous obtenons donc une série d'images pour la fonction image $I_{(x,y,z)}$ et une pour la PSF. Les fonctions images, pour représenter les vésicules fluorescentes, correspondent à des tranches espacées de Δz d'une sphère de rayon connu représentant la vésicule. Nous avons considéré deux cas extrêmes :

- **distribution de fluorophores en surface** : dans ce cas le découpage consiste en une pile de cercles concentriques blancs sur fond noir (cf. figure 5.8).
- **distribution de fluorophores en volume** : dans ce cas nous obtenons une série de disques concentriques blancs sur fond noir.

Une fois l'opération de convolution réalisée par ImageJ, on obtient une série d'images correspondant à $0_{(x,y,z)}$. L'image $0_{(x,y,0)}$ correspond à l'image de l'objet que l'on observerait au point focal du microscope, nous pouvons mesurer le profil d'intensité en x sur cette image. Nous présentons sur la figure 5.9 les profils correspondant à une vésicule dont la membrane est fluorescente (distribution en surface des fluorophores) (a) et une vésicule dont le milieu interne est fluorescent (distribution en volume des fluorophores) (b). On peut voir sur ces images la

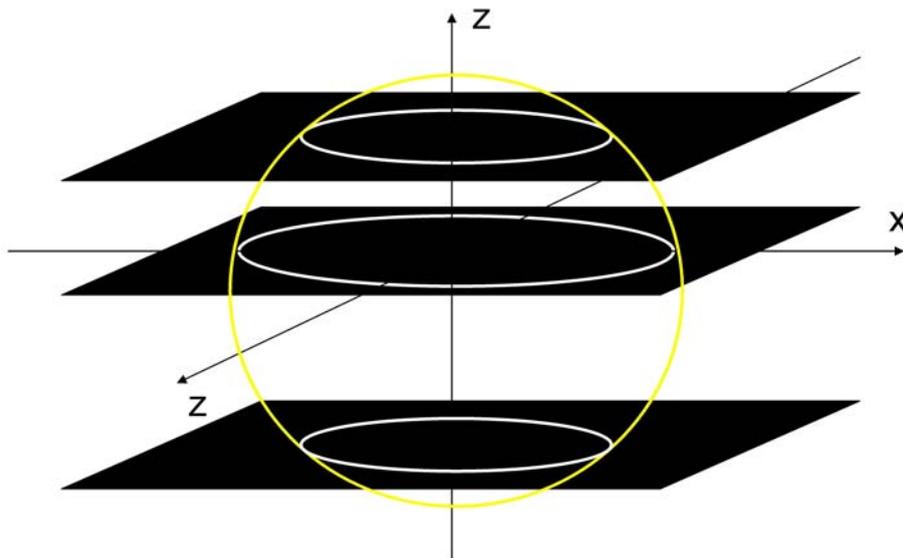


FIG. 5.8: Découpage "en tranches" d'une vésicule à membrane fluorescente pour générer une pile d'images opérables avec ImageJ

différence entre les formes des profils dans ces deux géométries extrêmes. Pour la vésicule à membrane fluorescente, on retrouve une forme de profil avec deux pics à laquelle il est souvent fait allusion dans la littérature ([Rodriguez et al., 2005] [Kiser et al., 1998]). Pour la vésicule pleine, le profil présente une bosse caractéristique et diffère franchement du précédent.

Nous avons simplement voulu montrer que deux cas extrêmes de distribution spatiale de fluorophores conduisent à des profils radicalement différents et qu'une migration importante de fluorophores au sein du milieu interne d'un objet composite devrait donc être observable.

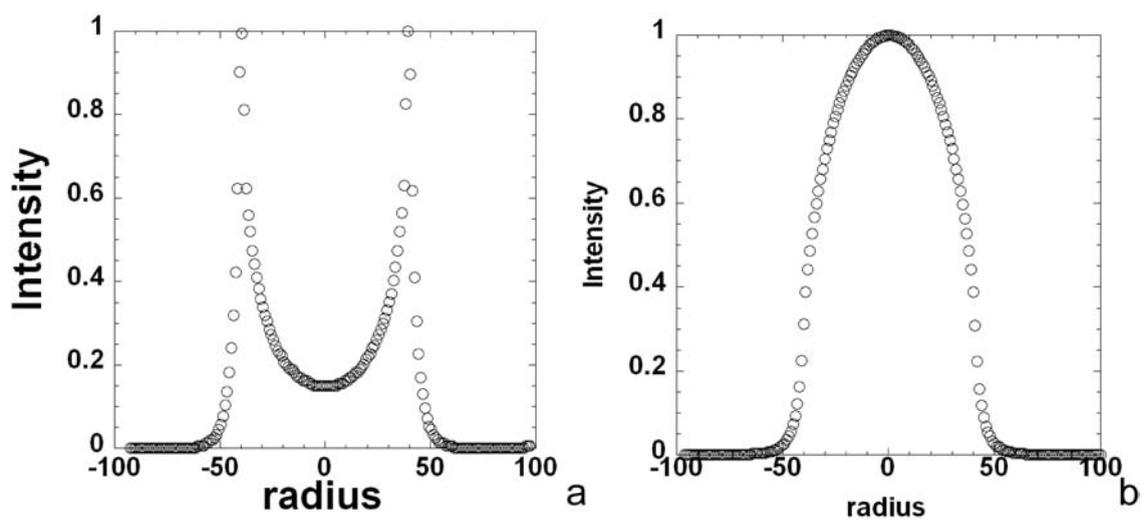


FIG. 5.9: Intensité de fluorescence (normalisée par sa valeur maximale) le long du diamètre d'une vésicule : profils simulés dans le cas d'une vésicule avec une distribution de fluorophores (a) en surface (b) en volume.

Chapitre 6

Stimulabilité

Nous avons présenté dans la section 4.1 le protocole permettant de fabriquer des vésicules encapsulant des gels ou des solutions de poly(Nipam). Le poly(Nipam) présente une transition de phase à 32°C (cf. section 2.2.3), nous allons donc étudier le comportement de différentes vésicules composites lors de cette transition. Concernant les gel-GUVs, nous observons une transition de volume globale de l'objet, nous montrons la présence de la membrane et son devenir au cours de cette transition. Dans un deuxième temps nous caractérisons cette transition de volume. Et enfin nous montrons que la température de transition peut être modulée en jouant sur la concentration interne en sucre.

Concernant les sol-GUVs, nous rapportons l'étude de leur comportement lors de la transition en fonction de la concentration interne en poly(Nipam) et nous montrons que trois types de comportements distincts peuvent survenir.

6.1 Gel-GUVs : caractérisation de la transition volumique

Nous avons souligné dans le chapitre 2.2.3 que les gels réticulés de poly(Nipam) présentaient une transition volumique induite par la température. En réussissant à encapsuler des gels de poly(Nipam) dans des GUVs, nous leur avons conféré la propriété très originale de comporter un milieu interne subissant une transition de volume déclenchée par la température. Effectivement lorsque nous chauffons une gel-GUV (taux de réticulation de 3%) au delà de 32°C, nous observons par microscopie à contraste de phase un effondrement de l'objet, puis, après refroidissement, le retour de l'objet à sa forme et son volume initial (figure 6.1). Ce processus est complètement réversible et même quand plusieurs cycles successifs de chauffage-refroidissement sont effectués, on ne note pas d'endommagement visible des objets.

Deux questions se posent : tout d'abord, l'objet que nous observons est-il recouvert d'une membrane lipidique ? Ensuite, si tel est le cas, quel est le devenir de cette membrane au cours de la transition ? Concernant la première question, une réponse immédiate a été obtenue en observant en microscopie de fluorescence des gel-GUVs préparées avec un faible pourcentage de lipides marqués. Effectivement, comme le montre la figure 6.2 (c), la membrane est présente autour du gel avant la transition. Nous nous intéressons donc maintenant à son devenir lors de la transition.

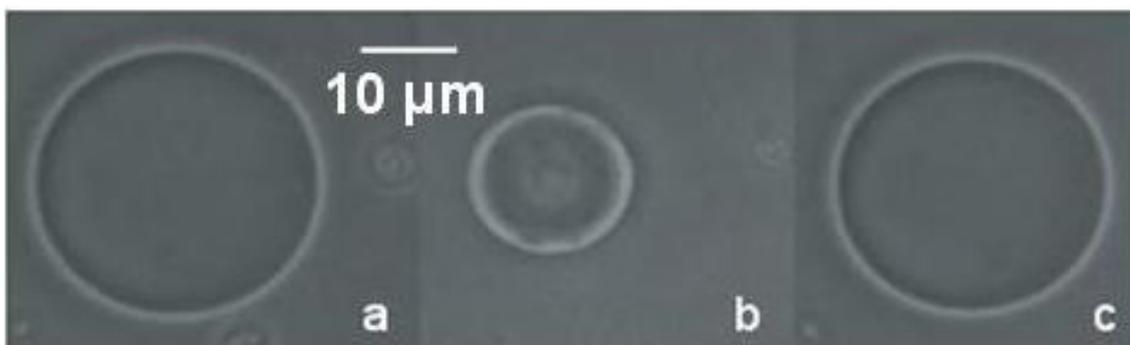


FIG. 6.1: Chauffage d'une gel-GUV (taux de réticulation de 3%) : (a) état initial ; (b) après chauffage, effondrement du gel interne ; (c) après retour à la température ambiante.

6.1.1 Devenir de la membrane pendant la transition

Nous nous intéressons ici au comportement de la membrane lipidique lors de la transition volumique des gel-GUVs : la figure 6.2 (a) montre l'observation en microscopie à fond clair d'une gel-GUV à température ambiante et la figure 6.2 (b) l'observation de la même vésicule à $T > 32^\circ\text{C}$. Une élévation de la température au dessus de 32°C induit une réduction du volume de l'objet avec un rapport $V_C/V_0 = 0.06$ (V_C étant le volume de l'objet dans l'état effondré et V_0 son volume dans l'état initial). Ceci implique une augmentation de la fraction volumique à l'intérieur de l'objet d'un facteur 15 lors de la transition et une réduction de la surface apparente de l'objet d'un facteur 6. Une variation si importante des dimensions de la vésicule doit être accompagnée d'un réarrangement de la membrane lipidique. Plusieurs scénarii sont donc envisageables :

- une simple rupture de la membrane au cours de la transition ;
- la membrane reste inchangée, le milieu interne subit seul la transition (formant une "vésicule à noyau") ;
- la membrane suit le milieu interne en se froissant à sa surface ;
- les lipides diffusent dans le milieu interne devenu hydrophobe.

La vésicule observée sur la figure 6.2 a été préparée avec une petite fraction (1%) de lipides fluorescents ce qui nous a permis de visualiser sa membrane par microscopie de fluorescence avant (figure 6.2 (c)) et après (figure 6.2 (d)) la transition volumique.

Comme l'indiquent ces figures, la membrane ne semble pas perdre sa continuité pendant la transition (du moins pas à l'échelle qui nous est accessible par microscopie optique) et semble se maintenir à la surface du gel interne. Après retour à la température ambiante, nous retrouvons l'objet à sa forme et son volume initial entouré de la membrane fluorescente apparaissant intacte.

La colocalisation de la membrane et du gel interne pendant la transition est également confirmée par la comparaison des profils d'intensité des images en fond clair et en fluorescence (voir figure 6.2 (e) et (f)). Les profils du dessus correspondent aux images en fond clair et ont la forme typique d'une discontinuité d'indice optique à la surface d'une sphère. Les profils du dessous sont ceux des images de fluorescence et ont la forme caractéristique d'une distribution de fluorophores à la surface d'une sphère (voir les profils simulés que nous avons présentés au

chapitre 5.4). La similitude de forme des profils avant et après transition est confirmée par leur superposition par compression et dilatation du profil correspondant à l'état initial, voir figure 6.3.

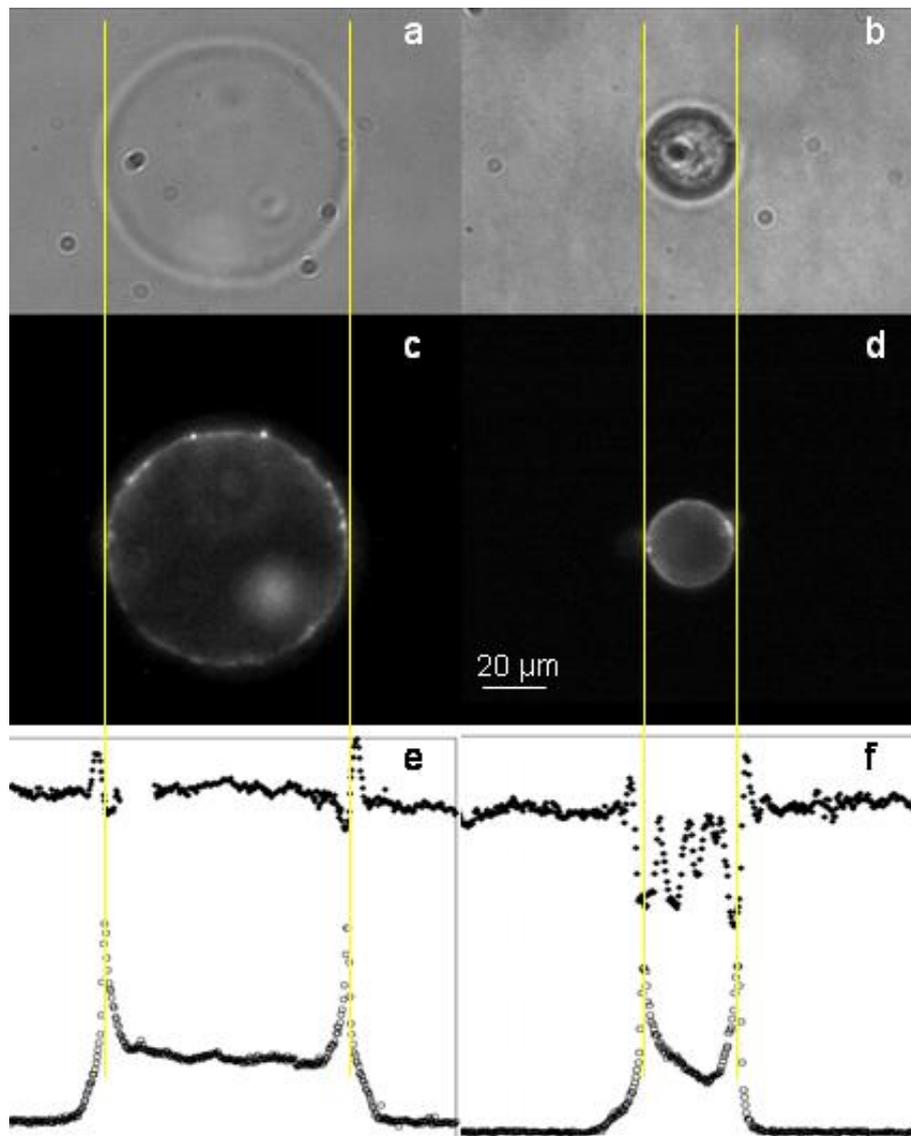


FIG. 6.2: Transition volumique d'une gel-GUV à 3% (a) image en fond clair à température ambiante et (b) au dessus de 32 °C; (c) Observation en fluorescence de la même vésicule à température ambiante et (d) au dessus de 32°C; (e) profils d'intensité en fond clair (dessus) et en fluorescence (dessous) le long du diamètre de la vésicule à température ambiante et (f) au dessus de 32°C.

Ensuite nous nous sommes intéressés à la quantité totale de fluorescence émise par une vésicule avant (F_{init}) et après (F_{shrunk}) la transition volumique. Ces deux quantités ont été mesurées en suivant le protocole décrit dans le paragraphe 4.3.5. Nous constatons que pour toutes les vésicules étudiées ici (voir figure 6.4), en prenant en compte l'erreur sur les mesures, la quantité

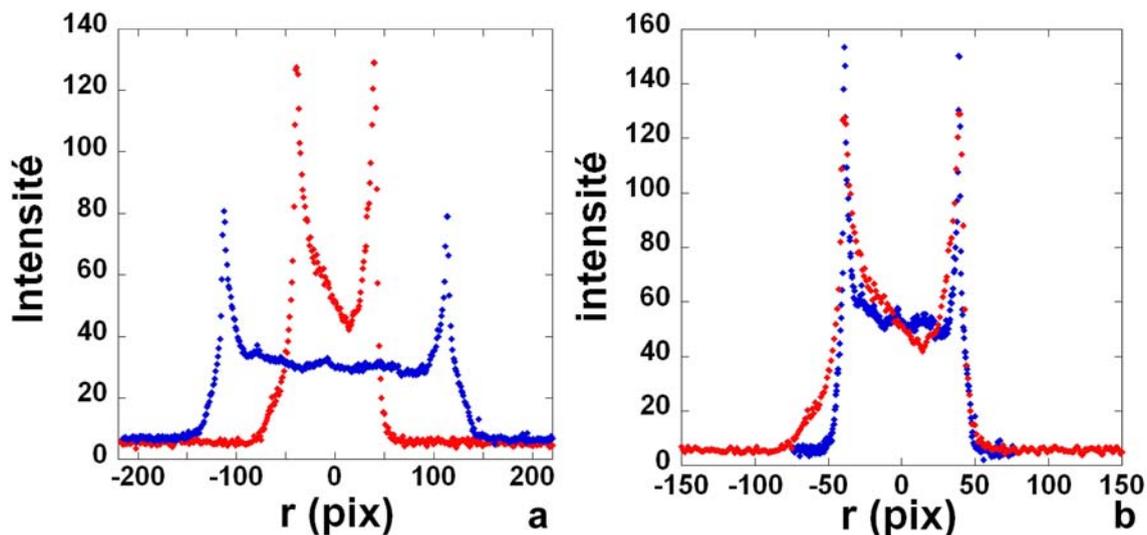


FIG. 6.3: (a) profils de fluorescence d'une gel-GUV à 3% dans son état initial (points bleus) et après la transition volumique (points rouges) ; (b) profils de la figure (a) superposés par compression et dilatation du profil correspondant à l'état initial

de fluorescence est conservée pendant la transition volumique.

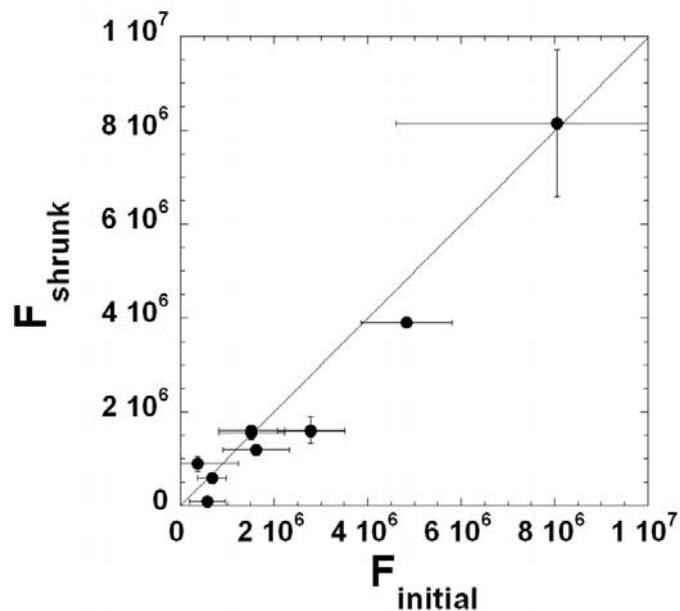


FIG. 6.4: Quantité de fluorescence dans l'état effondré (F_{shrunk}) en fonction de la quantité de fluorescence dans l'état initial ($F_{initial}$) lors de la transition volumique de gel-GUVs à 3%

Nous avons donc montré d'une part que la distribution spatiale des fluorophores est conservée pendant la transition volumique, et d'autre part que la quantité totale de fluorescence l'est également. Donc les résultats décrits dans ce paragraphe montrent qu'à l'échelle optique, la membrane lipidique semble garder son intégrité et rester confinée à la surface du gel après l'effondrement du gel interne à la vésicule. Nous insistons sur le fait que ces résultats ne permettent pas de conclure sur la conformation de la membrane à une échelle sub-optique, nous pensons que la façon la plus probable pour la membrane de se réarranger est de se froisser autour du gel interne pendant la transition.

Nous nous intéressons maintenant à la caractérisation de la transition de volume que nous venons de révéler dans les gel-GUVs.

6.1.2 Transition de volume : approche quantitative

Nous avons tout d'abord voulu vérifier si le gel encapsulé dans une vésicule se comportait comme un gel macroscopique.

Pour cela nous avons chauffé une gel-GUV et mesuré son rayon en fonction du temps (l'évolution temporelle est supposée proportionnelle à celle de la température car nous chauffons de façon constante l'échantillon). Nous calculons ainsi son volume V au cours du temps, et la figure 6.5 montre l'évolution du volume réduit de la vésicule V/V_{max} au cours du temps (V_{max} est le volume de la vésicule dans son état initial). Cette courbe est à rapprocher de celle de [Hirokawa and Tanaka, 1984] présentée au paragraphe 2.2.3 qui représente l'évolution de V/V_{max} en fonction de la température pour un gel de poly(Nipam). Nous observons comme dans l'article d'Hirokawa une diminution douce de la taille de la vésicule puis une chute très abrupte à la transition. Qualitativement il semble que les gels dans nos vésicules se comportent de la même façon que des gels macroscopiques de poly(Nipam). Ceci montre que l'encapsulation des gels ne semble pas modifier leur comportement.

Dans un deuxième temps nous avons souhaité estimer la quantité d'eau expulsée par la vésicule subissant sa transition de volume. Le préalable à cette mesure a été de montrer que la taille de la vésicule ne modifiait pas le rapport entre son volume initial et son volume effondré. Nous constatons que c'est effectivement le cas puisque nous observons une relation linéaire entre diamètres "collapsés" (après transition) D_c et diamètres initiaux (avant la transition) D_0 mesurés pour des vésicules de différentes tailles (cf. figure 6.6).

Intéressons nous maintenant à la quantité d'eau restant dans les vésicules effondrées. Elle peut être estimée à partir des mesures des rayons des vésicules avant et après leur transition volumique. Notons $\phi_{w,0}$ et $\phi_{w,c}$ respectivement la fraction volumique d'eau dans la vésicule dans son état initial de volume V_0 et dans son état effondré de volume V_c . Les quantités $(1 - \phi_{w,0})V_0$ et $(1 - \phi_{w,c})V_c$ correspondent donc aux fractions volumiques occupées par le sucre et le poly(Nipam) dans la vésicule dans son état initial et effondré respectivement. Si nous faisons l'hypothèse que ces quantités sont conservées lors du processus d'effondrement, nous pouvons écrire :

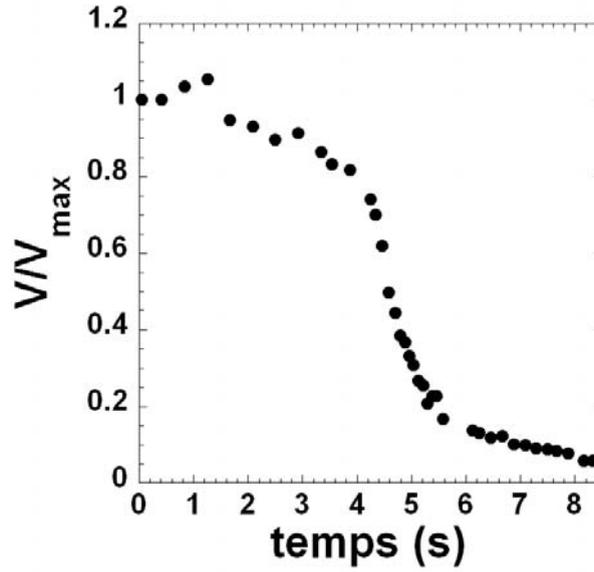


FIG. 6.5: Volume réduit V/V_{max} d'une gel-GUV avec $C_{NIPAM}=300$ mM crosslink 3% en fonction du temps au cours d'une séquence de chauffage. Sur le premier plateau, les points hors de la courbe correspondent à des problèmes de mise au point et ne reflètent pas de phénomène physique.

$$(1 - \phi_{w,0})V_0 = (1 - \phi_{w,c})V_c \quad (6.1)$$

Composé	Densité	Concentration (mM)	Φ
sucrose	1.55	100	2.2 %
Nipam	1.1115	300	3 %

TAB. 6.1: Densité, concentration et fraction volumique Φ du sucrose et du Nipam à l'intérieur d'une gel-GUV avant la transition.

Sur la courbe 6.6, nous trouvons un facteur de proportionnalité 0.368 entre le diamètre des vésicules dans leur état effondré D_C et leur diamètre initial D_0 , par conséquent ce rapport au cube est égal au rapport $(1 - \phi_{w,0})/(1 - \phi_{w,c})$ d'après l'équation précédente. Or nous pouvons calculer les fractions volumiques de sucrose et de Nipam dans les vésicules dans l'état initial à partir des concentrations et de la densité des composés que nous utilisons (indiqués dans le tableau 6.1) en faisant l'hypothèse que tous les monomères ont réagi et qu'aucun composé ne peut fuir des vésicules.

On peut donc calculer $\phi_{w,0}$ et obtenir, à partir de l'équation précédente, que la fraction d'eau dans les vésicules effondrées $\phi_{w,c}$ est environ 0.2 alors qu'elle était de 0.95 dans l'état initial, ce qui montre qu'environ 99% de l'eau contenue dans les vésicules dans leur état initial a été expulsée lors du processus d'effondrement.

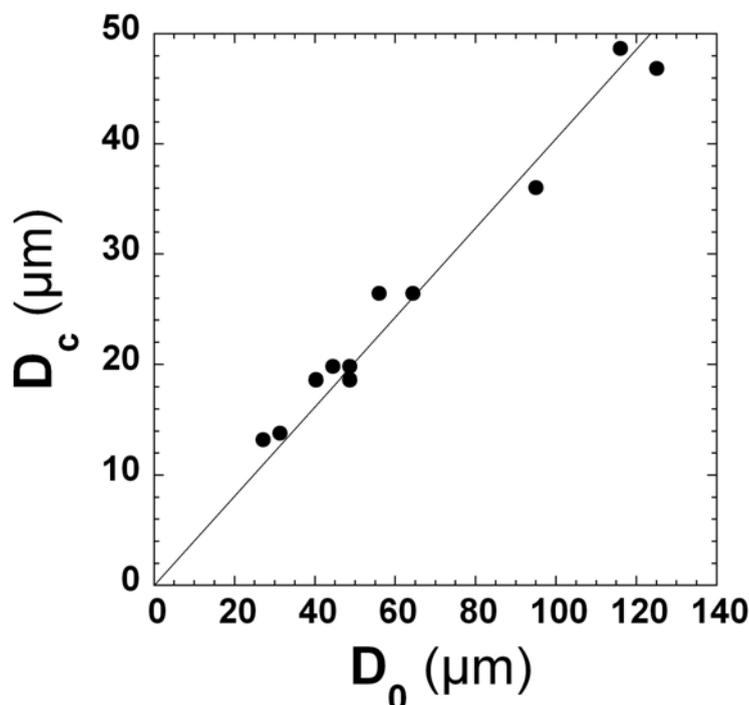


FIG. 6.6: Diamètre après effondrement (D_C) de différentes gel-GUVs avec un taux de réticulation de 3 % en fonction de leur diamètre initial (D_0)

Il nous a semblé intéressant d'essayer de moduler la température de transition en jouant sur la concentration en sucre présente dans le milieu interne de la vésicule.

6.1.3 Modulation de la température de transition par la concentration en sucrose

Effectivement nous montrons que la température de transition des gels de poly(Nipam) peut facilement être abaissée de 32°C dans l'eau pure jusqu'à 20°C en ajustant la concentration en sucrose de la solution dans laquelle le gel est suspendu. En effet, la figure 6.7 montre la décroissance de la température de transition de gels de poly(Nipam) préparés dans des conditions similaires aux gel-GUVs, suspendus dans des solutions de sucrose de concentration croissante entre 0 et 5 M. Nous précisons qu'il est possible de préparer par électroformation des vésicules à des concentrations comparables de sucrose sans problème, ce qui permettrait de préparer des gel-GUVs dont la température serait ajustable entre 20 et 32°C.

Nous ne discuterons pas ici du mécanisme de cette perturbation de la température de transition mais cet effet du sucre comme cosoluté du poly(Nipam) est discuté dans [Kato et al., 2001]. Dans la mesure où la transition du poly(Nipam) est le reflet de l'interaction des monomères avec le solvant, la présence d'autres solutés hydrophiles peut perturber ce phénomène. Nous pouvons évoquer également un effet similaire des sels et des tensioactifs [Jean, 2000], mais ces composés

sont moins intéressants pour nous car peu compatibles avec les GUVs.

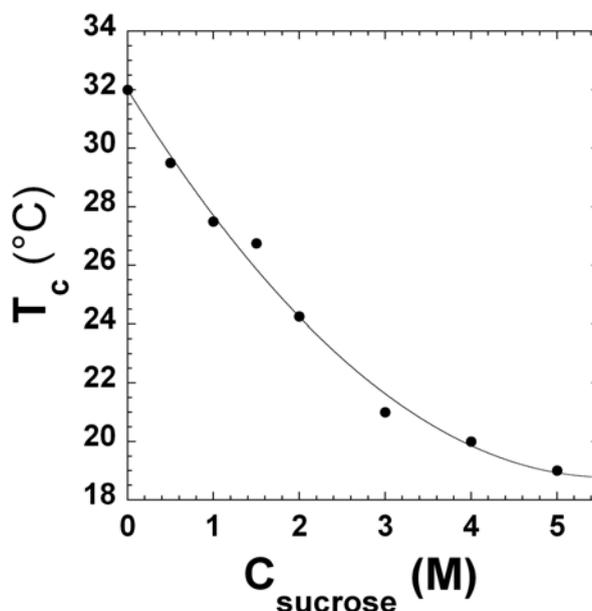


FIG. 6.7: Température de transition de gels de polyNipam en fonction de la concentration en sucrose (de 0 et 5 M) de la solution dans laquelle ils sont suspendus. La ligne pleine n'est qu'un guide pour les yeux.

Après avoir examiné le comportement des gel-GUVs, nous nous intéresserons dans la section suivante aux sol-GUVs.

6.2 Sol-GUVs : comportements lors de la transition

Nous avons observé trois types distincts de comportement en fonction de la fraction volumique de poly(Nipam) et de la façon dont cette concentration est imposée. C'est pourquoi nous avons choisi de rapporter les résultats en les séparant selon les deux sections qui suivent.

6.2.1 Influence de la modification de la concentration interne lors de la préparation

Nous observons deux effets distincts selon les fractions volumiques de Nipam utilisées au moment de la préparation des sol-GUVs :

- **à faible fraction volumique** ($\Phi_{Nipam} \leq 6\%$ ou $C_{Nipam} \leq 600$ mM) : Quand la température de la vésicule est augmentée au dessus de 32°C, les chaînes de poly(Nipam) dans le milieu interne s'effondrent individuellement, conduisant à une démixion locale de la solution (cf. figure 6.8). Optiquement cela se manifeste par un scintillement du milieu interne à cause de la formation d'agrégats de taille sub-optique. Ceci est une preuve de la

présence de chaînes de poly(Nipam) dans les vésicules composites. La vésicule conserve un diamètre constant pendant cette transition contrairement à ce que nous avons reporté dans le cas des gel-GUVs. Une autre illustration de ce type de comportement est montrée figure 6.9 pour des fractions volumiques $\Phi_{Nipam} = 3$ et 6%.

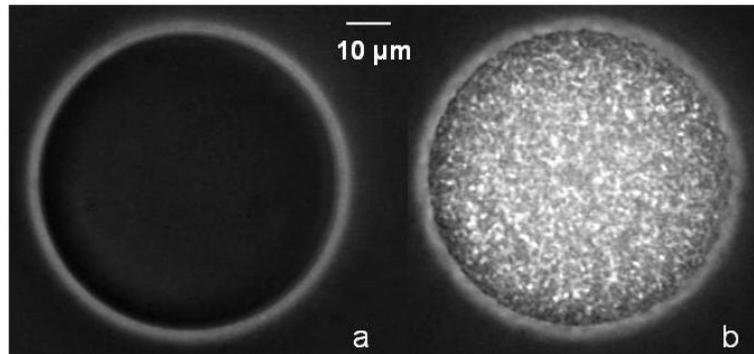


FIG. 6.8: Chauffage d'une sol-GUV avec $C_{NIPAM}=300$ mM, (a) état initial, (b) après chauffage : démixion des chaînes de polyNipam

- **à haute fraction volumique** : ($\Phi_{Nipam} \geq 7\%$ ou $C_{Nipam} \geq 700$ mM) : Le comportement observé pour les vésicules avec $\Phi_{Nipam} = 7$ et 9 % est radicalement différent (figure 6.9). En effet l'ensemble de la vésicule s'effondre d'une façon similaire à celle que nous avons observée pour les vésicules encapsulant des gels réticulés (cf. figure 6.1). Les différences de taille des vésicules ne sont pas significatives et sont le fait de la dispersion habituelle dans les échantillons. Pour effectivement confirmer que la membrane accompagne le gel lorsque celui-ci se contracte pendant la transition comme dans le cas des gel-GUVs, nous avons observé en fluorescence la vésicule à 7% présentée dans la figure 6.9. Le résultat de cette observation est présenté sur la figure 6.10. On constate que comme dans le cas des gel-GUVs, la membrane est couplée au milieu interne et l'accompagne dans son effondrement. Ce comportement inattendu au regard du comportement du poly(Nipam) en solution sera discuté à la fin de ce chapitre.

Cet effet de la concentration en poly(Nipam) sur le comportement des sol-GUVs lors de la transition nous a amenés à imaginer une "double stimulabilité" : pour une même sol-GUV, nous sélectionnons le comportement souhaité à la transition (effondrement ou démixion) via le taux de gonflement (qui bien évidemment modifie la concentration en poly(Nipam)) puis nous induisons la transition choisie en augmentant la température.

C'est pourquoi dans le paragraphe suivant, nous nous intéressons à l'effet du dégonflement sur le comportement des sol-GUVs lors de la transition.

6.2.2 Influence de la modification de la concentration interne par dégonflement

En dégonflant osmotiquement une vésicule remplie de chaînes de poly(Nipam), on réduit le volume de la vésicule et donc on augmente la fraction interne de poly(Nipam). Nous ne présenterons pas ici les effets du dégonflement osmotique sur les vésicules sol, ceci fera l'objet d'une

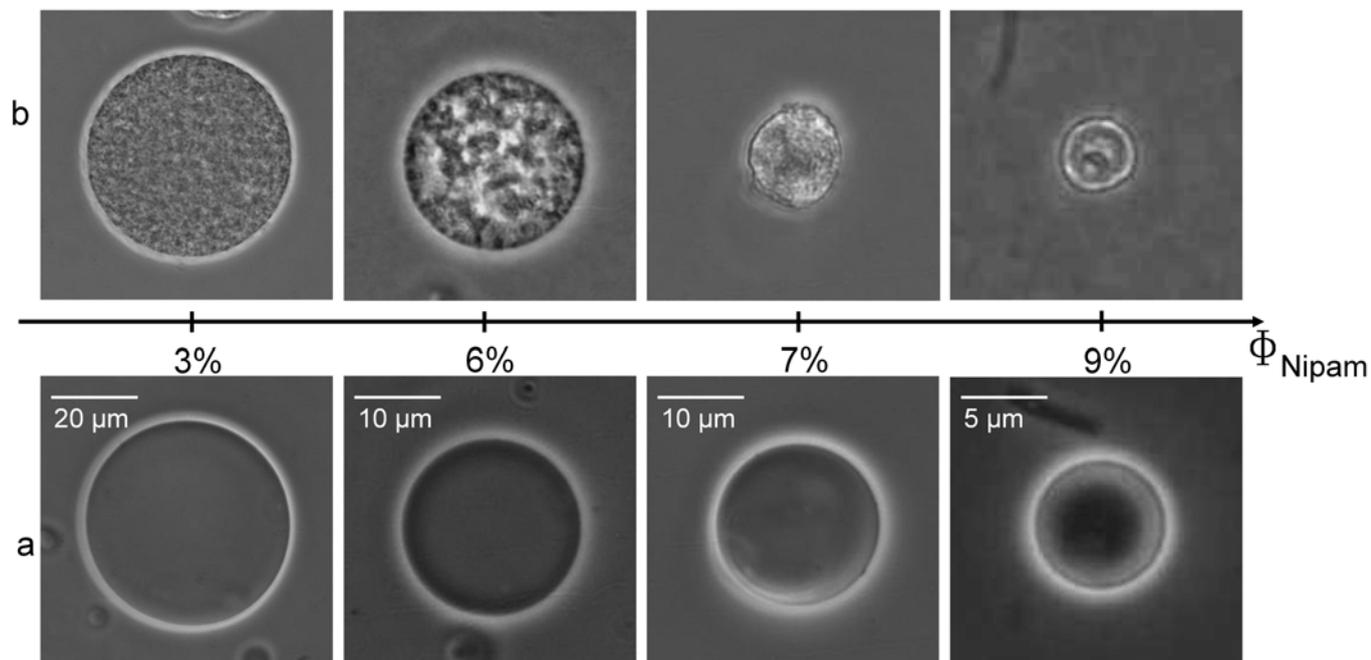


FIG. 6.9: Observation de sol-GUVs préparées à $\Phi_{Nipam} = 3, 6$ et 7% ; Ligne (a) à $T < 32^\circ\text{C}$; Ligne (b) les mêmes vésicules à $T > 32^\circ\text{C}$

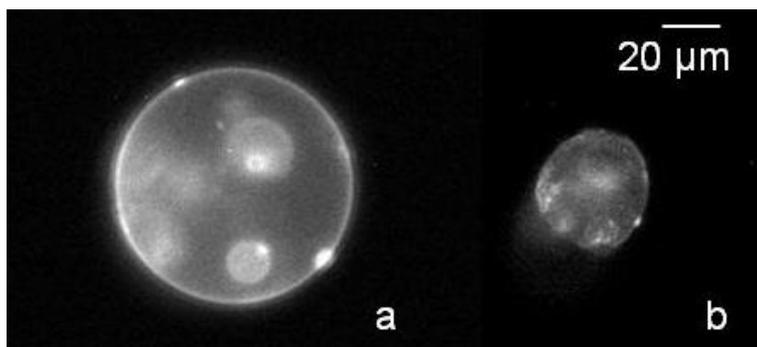


FIG. 6.10: Observation en microscopie de fluorescence de l'effondrement de la sol-GUV avec $\Phi_{Nipam} = 7\%$ présentée sur la figure précédente, (a) à $T < 32^\circ\text{C}$; (b) à $T > 32^\circ\text{C}$, mise en évidence du devenir de la membrane

section dans le chapitre 9.

La figure 6.11 montre une sol-GUV préparée à $\Phi_{Nipam} = 3\%$ à plusieurs états de dégonflement. En mesurant la réduction de volume de la vésicule dans chaque état, nous pouvons calculer la fraction volumique de poly(Nipam) résultante. A chaque étape on chauffe la vésicule pour observer son comportement quand la température dépasse 32°C . On constate que pour $\Phi_{Nipam} = 3$ et 6% , on observe une démixion des chaînes de poly(Nipam) identique à celle que nous avons rapportée pour les sol-GUVs préparées avec des concentrations initiales de 3 et 6%

. Pour ces faibles fractions volumiques, l'obtention des concentrations par préparation initiale ou par dégonflement conduit au même comportement lors de la transition.

Par contre pour $\Phi_{Nipam} = 9\%$ nous observons un comportement différent lors de la transition si Φ_{Nipam} est portée à 9% par dégonflement ou initialement fixée à 9% lors de la préparation. En effet dans le cas où la concentration est établie par dégonflement, en partant d'une fraction initiale de poly(Nipam) de 3%, on observe un "noyau" de chaînes de polyNipam qui s'effondre dans une partie de la vésicule, laquelle conserve son volume et sa forme initiale. La figure 6.12 montre une séquence qui correspond à l'effondrement des chaînes dans la vésicule de la figure 6.11 ; on observe une séparation de phases progressive qui aboutit à la formation d'un noyau de chaînes collapsées dans une partie de la vésicule. Le temps caractéristique de ce phénomène est de l'ordre de la minute, beaucoup plus lent que le mécanisme de transition volumique d'un gel réticulé.

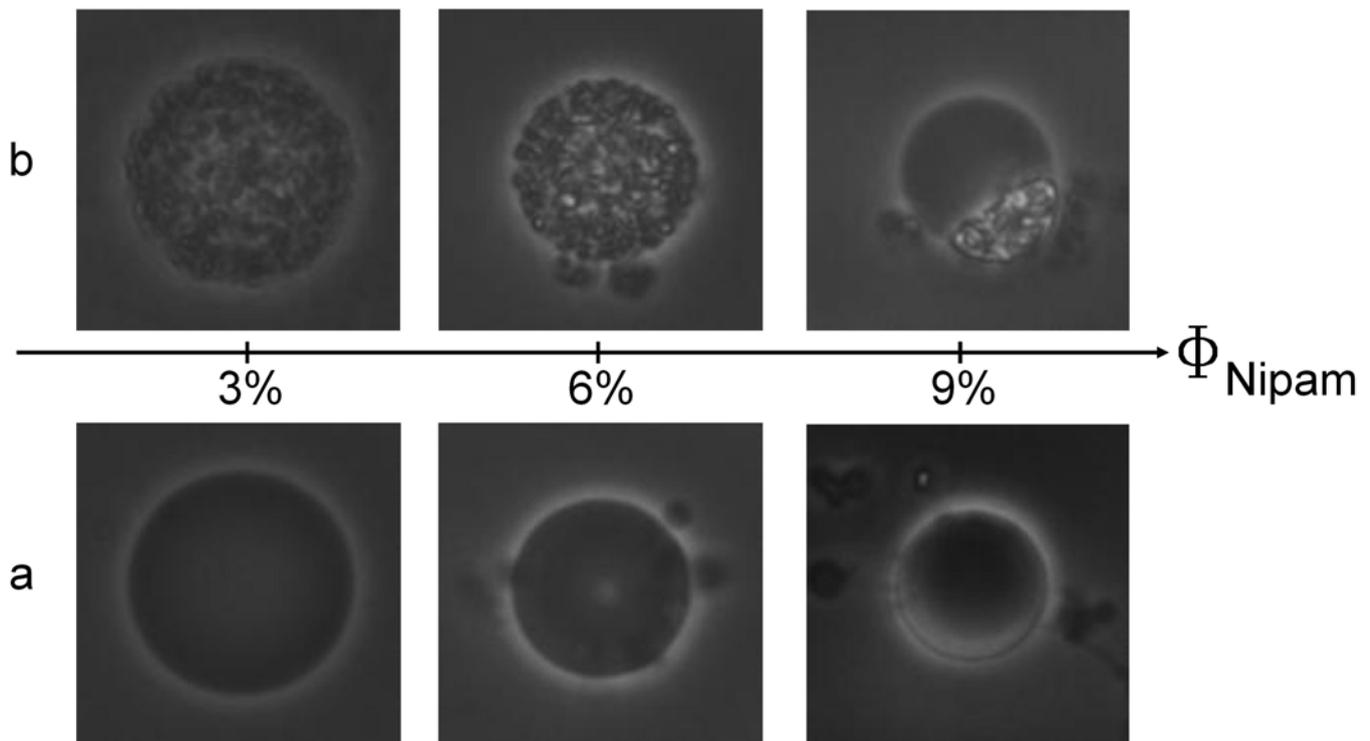


FIG. 6.11: Observation d'une sol-GUV préparée à $\Phi_{Nipam} = 3\%$ et dégonflée pour obtenir $\Phi_{Nipam} = 6$ et 9% ; Ligne (a) à $T < 32^\circ\text{C}$; Ligne (b) la même vésicule à $T > 32^\circ\text{C}$

Discussion

A ce stade du travail, il apparaît important de discuter les deux résultats surprenants concernant :

- le comportement des sol-GUVs encapsulant des solutions de poly(Nipam) obtenues à partir d'une concentration de Nipam supérieure à 600 mM ($\Phi_{Nipam} \geq 6\%$).
- la différence de comportement des sol-GUVs à 900 mM ($\Phi_{Nipam} = 9\%$) dont la concentration en poly(Nipam) dans le milieu interne a été soit fixée lors de la préparation, soit

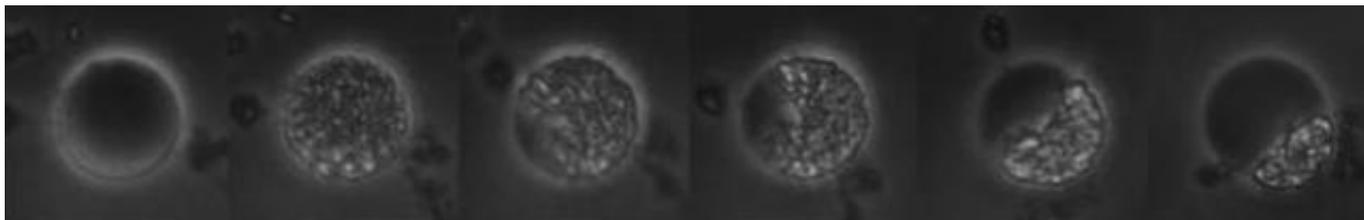


FIG. 6.12: Séquence de la séparation de phases dans une sol-GUV préparées à $\Phi_{Nipam} = 3\%$ et dégonflée pour obtenir $\Phi_{Nipam} = 9\%$

obtenue en dégonflant des vésicules dont la concentration en Nipam initiale était de 300 mM.

S'agissant du premier point, nous avons présenté au chapitre 2.2.3 un aperçu bibliographique concernant la thermostimulabilité des solutions de poly(Nipam). Tous les travaux que nous avons trouvé rapportent une démixion des chaînes de poly(Nipam) et une modification de la turbidité de la solution due à l'agrégation des chaînes en conformation globulaire.

La majorité des travaux sur la transition du poly(Nipam) en solution sont faites à des concentrations faibles, inférieures à 90 mM [Balu, 2005] et bien inférieures à la concentration minimum qui nous intéresse ici qui est de 600 mM. Néanmoins deux articles rapportent ce type de comportement (démixion et agrégation locale des chaînes) à des concentrations très élevées par rapport aux nôtres (1500 mM [de Azevedo et al., 2001] et 5300 mM [Afroze et al., 2000]) sans qu'il soit fait mention de l'observation d'une démixion macroscopique des solutions comparable à celle que nous observons dans les sol-GUVs au dessus de 600 mM de Nipam.

La seule étude rapportant des similitudes avec le comportement que nous avons observé pour des concentrations supérieures à 600 mM est, à notre connaissance, celle de [Balu, 2005] mais les auteurs relatent la formation par les chaînes après la transition de colloïdes de taille sub-micrométriques c'est-à-dire à une échelle caractéristique plus petite que celle du phénomène que nous observons (plusieurs dizaines de micromètres).

A l'heure de la rédaction de ce manuscrit, nous n'avons trouvé aucun travail rapportant un phénomène véritablement similaire à celui observé sur la figure 6.11, c'est-à-dire une séparation de phases à l'échelle de plusieurs dizaines de micromètres en une fraction de haute densité contenant les chaînes de poly(Nipam) et une fraction contenant le solvant.

Le seul phénomène similaire dont nous avons pu trouver trace dans la littérature concerne le cas où des charges sont ajoutées à la solution (LiCl_2 à 10 mM)[Balu, 2005], mais nous ne travaillons pas en milieu chargé.

Afin de vérifier que ce comportement n'était pas un effet du confinement des chaînes dans les vésicules (même s'il paraît très peu probable que des chaînes nanométriques puissent "sentir" l'effet d'un confinement à l'échelle micrométrique), nous avons préparé un échantillon macroscopique de solution de poly(Nipam) à une concentration de 1500 mM et nous l'avons chauffé. Le résultat de cette expérience est présenté sur la figure 6.13. On peut donc constater que pour une concentration de Nipam de 1500 mM, on observe bien une séparation de phases macroscopiques de la solution : les chaînes sont concentrées en un petit objet opaque et solide et le

solvant, qui ne semble pas contenir de chaînes puisqu'il reste translucide, forme une phase distincte à l'échelle de cet échantillon.

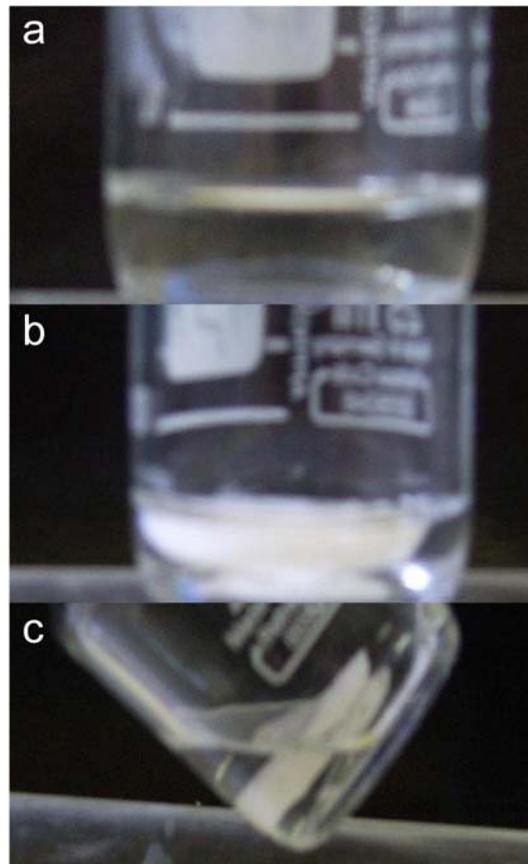


FIG. 6.13: Solution de poly(Nipam) à 1500 mM : (a) à $T < 32^{\circ}\text{C}$ la solution est homogène est transparente, (a) à $T > 32^{\circ}\text{C}$ on observe une séparation de phases macroscopique (c) le flacon est penché pour mettre en évidence la séparation entre le solvant et les chaînes de poly(Nipam).

Dès lors, puisque nous n'avons pas trouvé mention d'un tel résultat dans la littérature en dépit de la quantité énorme d'articles déjà publiés sur le poly(Nipam), nous sommes amenés à proposer une hypothèse pour comprendre ce phénomène : à ces concentrations supérieures à 600 mM, nous serions en présence d'un gel physique dont les points de réticulation seraient les enchevêtrements des chaînes. Lors de la transition, ce gel s'effondrerait sur lui-même pour aboutir à une séparation de phases macroscopiques comme c'est le cas pour les gels covalents de poly(Nipam) que nous avons présentés à la section 2.2.3. Ceci implique que le temps de vie de ces points de réticulation temporaires est supérieur au temps caractéristique de la transition.

Le deuxième point à discuter est l'observation de deux comportements différents pour des sol-GUVs dont la fraction interne de poly(Nipam) de 900 mM est soit fixée lors de leur préparation (figure 6.9), soit obtenue par dégonflement en partant d'une concentration initiale de 300 mM (6.11). Dans le premier cas (concentration fixée lors de la préparation) la vésicule s'ef-

fondre en globalité : le milieu interne se contracte et entraîne la membrane. Dans le deuxième cas (concentration imposée par le dégonflement) les chaînes s'effondrent mais n'entraînent pas la membrane : la vésicule conserve sa forme et son volume. Dans ces deux cas, la fraction volumique au moment de l'observation est identique, mais il faut se rappeler qu'au moment de leur préparation, ces deux vésicules avaient des concentrations en Nipam différentes. Par conséquent on peut penser que l'ancrage des chaînes avec la membrane a été différent dans les deux cas. Donc même si la fraction volumique de Nipam est identique au moment où on observe le comportement des vésicules à la transition thermique, ces objets sont probablement différents en terme d'interaction entre les chaînes et la membrane, ce qui pourrait expliquer le comportement différent observé. Dans les deux cas, le réseau physique interne de chaînes s'effondre, mais dans le cas où la vésicule est préparée avec 9% de Nipam, l'interaction chaînes-membrane est assez forte pour entraîner la membrane. Dans le cas où la vésicule avait été préparée avec $\Phi_{Nipam} = 3\%$, cette interaction ne suffit pas à déformer la membrane lors de la transition. On peut noter que l'amas de chaînes est décroché, mais il reste probablement des chaînes individuelles liées à la membrane.

Ce résultat amène deux conclusions : d'abord, il peut exister des interactions fortes membrane/milieu interne dans les sol-GUVs préparées avec une concentration de Nipam élevée. Ces interactions peuvent avoir 2 origines : soit des interactions hydrophobes poly(Nipam)/membrane, soit une interaction covalente liée à la réaction du Nipam avec la double liaison des lipides lors de la réaction radicalaire, ces deux types d'interaction peuvent d'ailleurs coexister. La deuxième conclusion est que ce résultat ouvre la voie à la préparation de vésicules "à noyau" qui seraient des modèles plus sophistiqués de cellules.

Chapitre 7

Effets des milieux interne et externe sur les propriétés de membrane des vésicules composites

Nous avons montré dans le chapitre 5 par des études quantitatives de fluorescence que notre protocole de préparation des vésicules composites semblait affecter leur membrane. De plus nous avons rapporté dans le chapitre 6 (dans le cas des vésicules remplies de gel de poly(Nipam) et de solution de poly(Nipam) de forte concentration) que lorsque le milieu interne de la vésicule s'effondrait, la membrane lipidique l'accompagnait. Ces expériences ont mis en évidence l'interaction entre les chaînes de poly(Nipam) et les membranes des vésicules. Dans ce chapitre, nous allons présenter plusieurs types d'expériences menées sur nos vésicules composites qui vont nous permettre de pousser plus loin notre description de l'état de leur membrane.

7.1 Module de courbure des sol-GUVs

Nous avons montré dans le chapitre 2.1.2 que le module de courbure k_C , qui mesure l'énergie nécessaire pour courber la membrane, est un paramètre important pour décrire son comportement physique. Nous mesurons ce module sur les sol-GUVs afin de mieux connaître l'état de leur membrane.

7.1.1 Aspiration par micropipettes

Dans le but de caractériser la membrane des sol-GUVs, nous avons réalisé grâce à la technique d'aspiration par micropipettes des mesures de module de courbure sur des sol-GUVs préparées avec différentes concentrations de Nipam.

Nous avons présenté dans la section 2.4.1 le principe de cette technique qui repose sur l'aspiration dans une micropipette avec une pression imposée d'une vésicule et sur la mesure concomitante de l'incrément d'aire de cette vésicule. Dans le régime où les fluctuations de membrane dominant, la relation d'Helfrich 2.10 montre que l'incrément d'aire de la vésicule est proportionnel au logarithme de la tension de membrane σ .

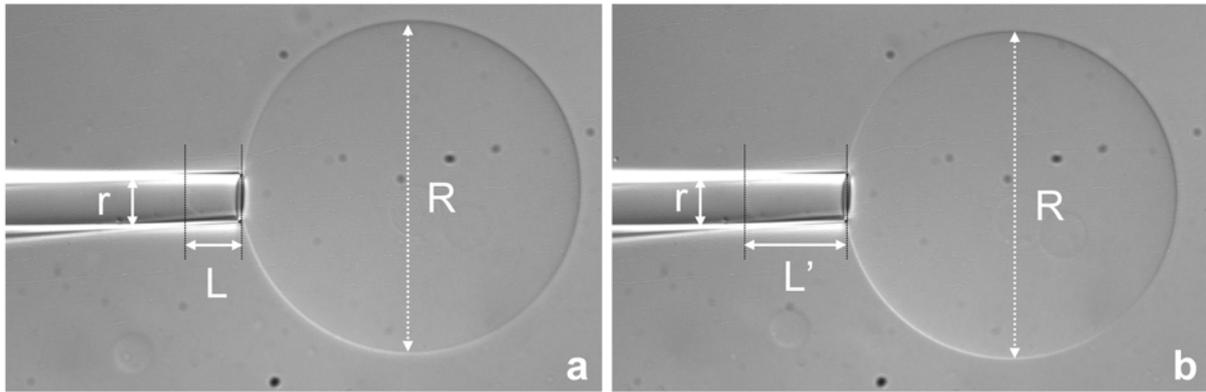


FIG. 7.1: Observations en DIC d'une sol-GUV sous deux pressions d'aspiration différentes correspondant à deux aires apparentes différentes ; $R=60 \mu m$ et $r=8 \mu m$ (a) $\sigma = 0.002 \text{ mN/m}$ (b) $\sigma = 0.03 \text{ mN/m}$ correspondant à un incrément d'aire $\Delta A/A_0$ de 0.5% par rapport à l'état de référence.

Protocole de mesure

Nous avons donc fait des expériences dont le principe est illustré sur la figure 7.1. Les vésicules sont suspendues dans une solution de glucose 100 mM dans une chambre permettant d'insérer une micropipette sous l'objectif du microscope. On laisse s'évaporer un peu du liquide contenu dans la chambre afin de concentrer légèrement cette solution, ce qui a pour effet de dégonfler légèrement les vésicules à étudier, puis toutes les interfaces avec l'air sont recouvertes de décane pour stopper l'évaporation. Si de l'eau s'évaporait de la chambre d'observation, la concentration de la solution contenant les vésicules serait modifiée, donc le volume des vésicules également, ce qui fausserait l'expérience.

- Nous repérons une vésicule et nous l'aspirons le plus légèrement possible dans la micropipette, comme indiqué sur la figure 7.1 (a). Cet état sera l'état de référence pour l'expérience et à partir de la mesure de r , L et R nous définissons l'aire de référence de la vésicule.
- Nous augmentons par pas de 0,1 Pa la pression d'aspiration. A chaque pas nous atteignons un nouvel état d'équilibre comme celui montré sur la figure 7.1 (b).
- Nous calculons l'incrément d'aire apparente $\Delta A/A_0$ de la vésicule grâce à l'équation 2.62 et la tension de membrane à partir de la pression d'aspiration à chaque étape grâce à la formule 2.52.

Résultats et discussion

La figure 7.2 représente des courbes $\ln \sigma$ en fonction de l'incrément d'aire $\Delta A/A_0$ dans le cas de vésicules préparées à différentes concentrations de poly(Nipam). Comme on peut le voir sur la figure 7.1, on peut récupérer de la surface de membrane à partir d'une vésicule optiquement lisse. Ceci montre qu'une partie de l'aire de la membrane est cachée dans des fluctuations de membrane à l'échelle sub-optique [Evans and Rawicz, 1997].

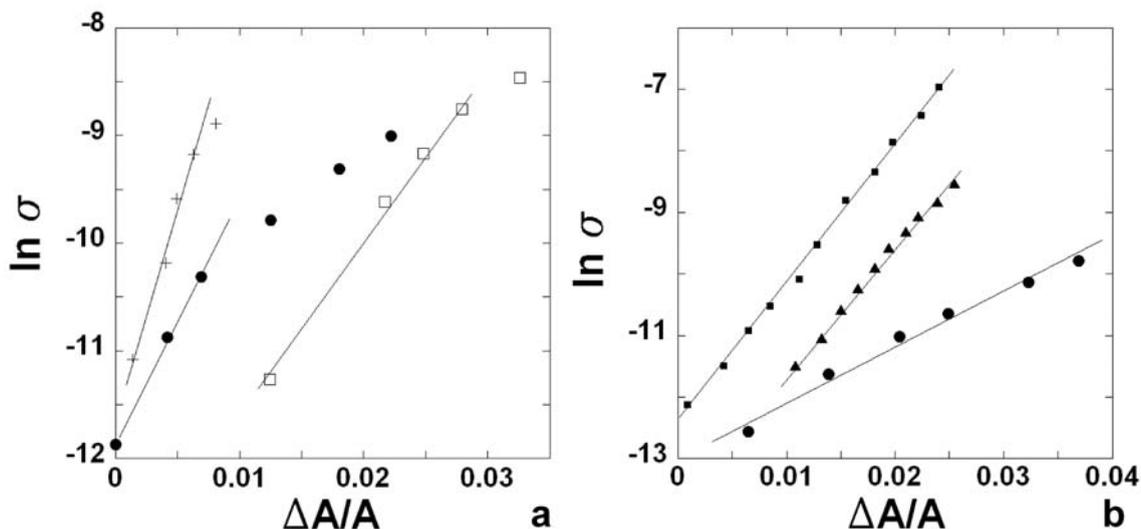


FIG. 7.2: $\ln \sigma$ en fonction de $\Delta A/A_0$ correspondant à l'aspiration de sol-GUVs pour des vésicules tendues (a) (+ : sol-GUV 300 mM, • : sol-GUV 400 mM, carrés : sol-GUV 700 mM) ou dégonflées (b) (carrés : GUV incubée dans une solution à 600 mM de Nipam, triangles : GUV incubée dans une solution à 300 mM de Nipam, ronds : sol-GUV à 700 mM).

Comme nous l'attendions, les courbes sont linéaires dans le régime dominé par les fluctuations de membrane, qui correspond à des valeurs de $\Delta A/A_0$ de quelques %.

- La figure 7.2 (a) présente des courbes correspondant à des vésicules tendues, qui montrent que l'on sort rapidement du régime des fluctuations pour arriver dans un régime d'élasticité de la membrane. Les courbes ne sont plus linéaires à partir d'une certaine tension, et nous ne discuterons pas du régime d'élasticité ici.
- La figure 7.2 (b) représente des expériences réalisées sur des vésicules relativement dégonflées, il est plus facile d'obtenir beaucoup de points dans le régime linéaire et donc une mesure plus précise de k_C .

D'après la relation d'Helfrich 2.10, la pente des courbes $\ln \sigma$ en fonction de l'incrément d'aire $\Delta A/A_0$ est égale à $1/8\pi k_C$. Nous pouvons donc extraire des valeurs de k_C des courbes de la figure 7.2.

La figure 7.3 présente les résultats de mesures de modules de courbures réalisées sur des sol-GUVs préparées avec une concentration de Nipam comprise entre 0 et 700 mM.

Nous avons également effectué cette expérience sur des vésicules de DOPC incubées dans des solutions de polyNipam à différentes concentrations afin de détecter l'effet sur le module de courbure des vésicules d'une éventuelle adsorption des chaînes de polyNipam du milieu externe. Pour cela nous avons laissé incuber pendant 1h des vésicules de DOPC dans des solutions de polyNipam : dans une solution mère préparée à 600 mM, puis dans ses solutions "filles" résultantes de sa dilution 2, 4 et 6 fois. Les résultats sont présentés sur la figure 7.3. Chaque point sur la courbe correspond à la valeur moyenne des mesures faites sur plusieurs vésicules (entre 5 et 10).

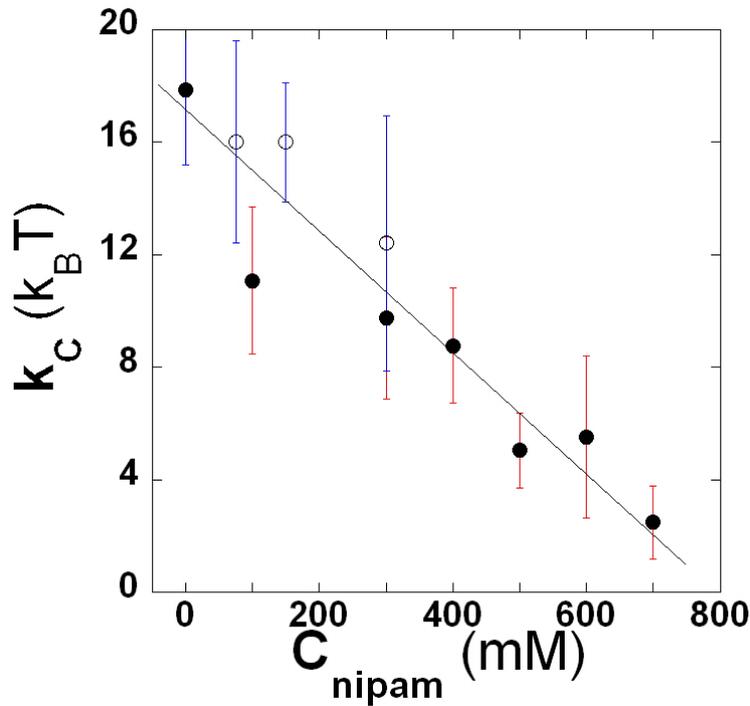


FIG. 7.3: Module de courbure k_C (ronds noirs) de sol-GUVs (en unités de $k_B T$) en fonction de la concentration de Nipam à laquelle elles ont été préparées ; (ronds blancs) de vésicules de DOPC incubées dans des solutions de polyNipam en fonction de la concentration en Nipam (mM) de la solution d'incubation. Chaque point représente une valeur moyenne pour un ensemble d'entre 5 et 10 vésicules, les barres montrent la déviation standard à la valeur moyenne.

Pour les vésicules préparées sans Nipam, on retrouve bien la valeur du module de courbure des membranes de DOPC rapportée dans la littérature [Rawicz et al., 2000]. Dans le cas des sol-GUVs, le module de courbure diminue linéairement avec la concentration de Nipam entre typiquement 20 et 2 $k_B T$.

Même s'il est tentant de penser que les vésicules incubées se comportent d'une façon identique à celle des sol-GUVs par une observation grossière de la courbe 7.3, il est clair que les barres d'erreurs ne nous permettent pas de conclure. Il aurait été tout à fait important de pouvoir obtenir un point à forte concentration de Nipam pour les vésicules incubées mais ceci pose des problèmes expérimentaux difficilement surmontables (la viscosité de la solution d'incubation rend très difficile la récupération de vésicules pour leur étude en micropipettes). Ceci est regrettable car il nous aurait été ainsi possible d'obtenir plus d'informations sur le mécanisme d'interaction poly(Nipam)/membrane.

7.1.2 Extrusion hydrodynamique de nanotubes membranaires

La figure 7.6 présente une séquence d'extrusion et rétraction typique pour une sol-GUV à 600 mM de Nipam (gris)¹. Dans le cas de la sol-GUV, le comportement est similaire à celui d'une vésicule de DOPC simple : un ajustement de la courbe $L(t)$ avec l'équation 2.74 et de $L_{\infty}(U)$ permet d'obtenir $\tau_0 \approx 13s$, $U_{cO} \approx 20\mu m/s$ et donc $k_c = 3 k_B T$. On observe donc que la réduction de k_c mesurée grâce à l'extrusion de tubes membranaires est en bon accord avec les mesures faites par micropipettes que nous avons présentées dans la section 7.1.1.

7.1.3 Etudes en SPR : apport à la compréhension du mécanisme d'interaction poly(Nipam)-membrane

Principe et protocole de l'expérience

Nous venons de voir que le poly(Nipam) perturbe fortement la membranes des sol-GUVs dont il modifie clairement le module de courbure. Pour mettre ces résultats en regard des prédictions théoriques (cf section 2.3), nous devons élucider la façon dont le polyNipam interagit avec les membranes. C'est pourquoi nous avons décidé de suivre par imagerie de Résonance des Plasmons de Surface (SPR) in situ l'interaction de chaînes de poly(Nipam) avec deux différents substrats, l'un hydrophile et l'autre hydrophobe.

La SPR est une technique d'imagerie optique très sensible qui permet de mesurer des modifications de l'indice optique au voisinage d'une interface entre un substrat métallique et un liquide. La résolution en altitude de cette technique est de l'ordre de 1 nm, elle est donc couramment utilisée pour suivre la cinétique de réactions chimiques au voisinage d'un substrat [Steiner, 2004]. Le principe de l'expérience est d'envoyer un faisceau en incidence rasante sur un substrat métallique fin pour exciter les plasmons de surface à l'interface substrat/eau. Le dispositif est décrit sur la figure 7.4 (a) et les expériences ont été réalisées au CREAB/SPrAM/CEA Grenoble sur un appareil Genoptics (Orsay, France).

Nous avons utilisé deux types de substrats :

- le premier est hydrophobe ; il consiste en un dépôt de dodecanethiols sur un substrat d'or (figure 7.4 (b))
- le second est hydrophile ; il consiste en une monocouche de DOPC déposée sur un substrat de dodecanethiols (figure 7.4 (c)).

Le protocole original de fabrication de la monocouche supportée de DOPC est basé sur l'éclatement de liposomes de DOPC au voisinage du substrat thiolé qui aboutit, dans certaines conditions, à la formation d'une monocouche homogène [Suraniti et al., 2007].

Le protocole d'expérience était le suivant :

- injection de glucose 100 mM et mesure du niveau de base de l'indice de la couche au voisinage du substrat ;

¹Nous n'avons pas scindé la figure 7.6 pour faciliter la comparaison entre les comportements des sol- et gel-GUVs que nous présenterons à la section 7.2

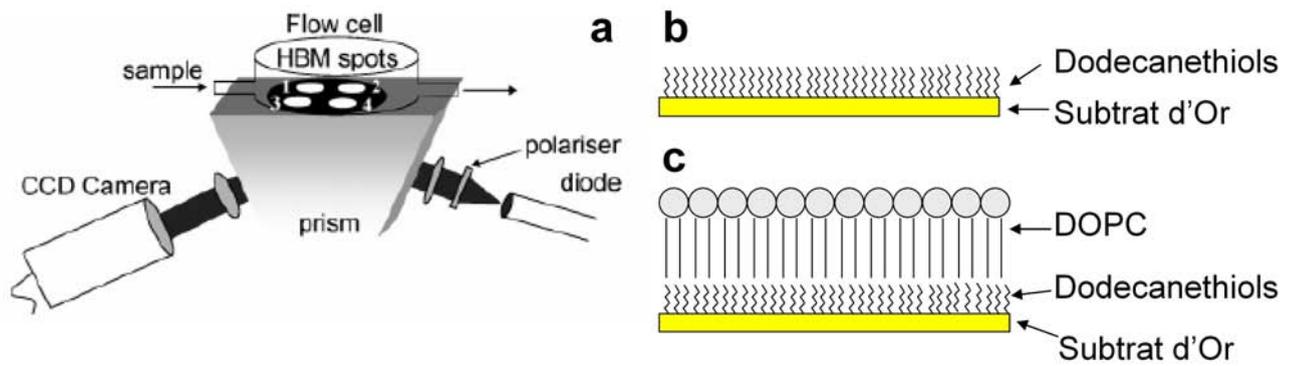


FIG. 7.4: (a) schéma du dispositif de SPR, extrait de [Suraniti et al., 2007] (b) schéma du substrat thiolé (c) schéma de la monocouche supportée

- injection du poly(Nipam) 600 mM, 1h d'incubation ;
- rinçage par un flux doux de glucose 100 mM.

Résultats

Les résultats de ces expériences sont présentés sur la figure 7.5. Avant l'injection de la solution de poly(Nipam), on a un niveau de base qui correspond à l'indice optique du substrat "nu", lors de l'injection du poly(Nipam), l'indice optique augmente énormément. Le plateau correspond au temps d'incubation permettant aux chaînes d'interagir avec le substrat ; on remarquera que pendant l'heure d'incubation il y a peu de variation de l'indice¹, ce qui indique qu'il n'y a plus de modification majeure des interactions poly(Nipam)/surface au cours de cette période d'incubation. Ensuite un flux de glucose 100 mM est établi dans la chambre pour rincer les chaînes de poly(Nipam), ce qui aboutit dans les deux cas à une forte chute du signal SPR. Dans le cas de la monocouche de DOPC, on retrouve le niveau de signal correspondant à celui que l'on mesurait avant l'injection de poly(Nipam), ce qui montre que l'interaction des chaînes avec les têtes lipidiques est soit nulle soit de très faible intensité (non résistante au lavage). Dans le cas du substrat thiolé on observe une nette augmentation du signal qui correspond à une augmentation de l'épaisseur du substrat et donc probablement à une adsorption forte de chaînes de poly(Nipam).

Nous avons montré que les modules de courbure des sol-GUVs présentent une décroissance homogène en fonction de la concentration en Nipam. Nos résultats sont en accord avec les prévisions théoriques de [Brooks et al., 1991a]. Ces résultats semblent aller dans le sens d'une interaction faible poly(Nipam)/membrane, en effet les prédictions théoriques de [Brooks et al., 1991a] sont faites sur la base d'une telle interaction et nos expériences de SPR vont également dans ce sens.

Nous devons préciser que nous ne pouvons pas mesurer de modules de courbure sur des gel-GUVs avec cette technique. En effet, nous verrons à la section 8.2 que, vis-à-vis de l'aspiration

¹dans le cas de la monocouche, la baisse du niveau à t=40 min est due à l'installation accidentelle d'un flux dans la chambre d'observation

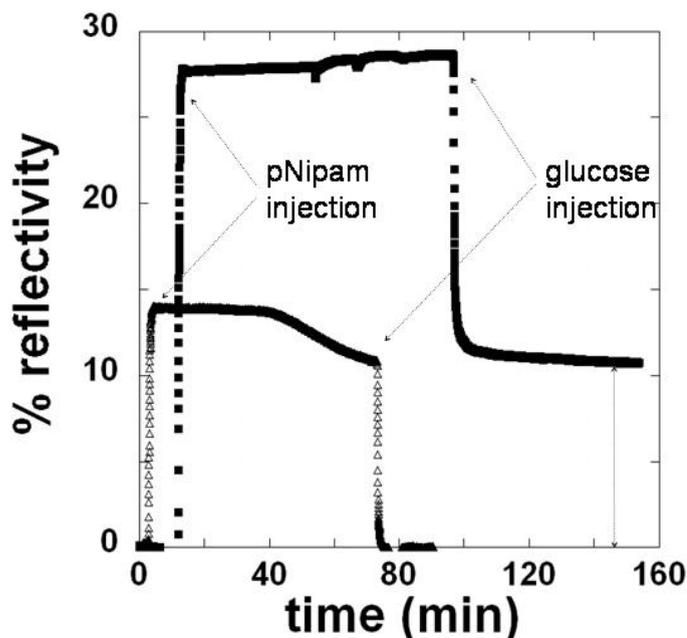


FIG. 7.5: Indice optique SPR en fonction du temps : suivi de l'interaction d'une solution de poly(Nipam) avec un substrat thiolé hydrophobe (carrés) et une monocouche de DOPC (triangles)

dans une micropipette, une gel-GUV se comporte comme une sphère élastique homogène, de ce fait il n'est pas possible d'accéder aux propriétés intrinsèques de sa membrane et notamment à son module de courbure.

Nous allons voir par contre que l'extrusion de tubes de membrane peut donner des informations sur les membranes des gel-GUVs.

7.2 Comportement des membranes de gel-GUVs sondé par extrusion hydrodynamique de nanotubes membranaires

La complexité de la description physique du phénomène d'extrusion de tubes membranaires est croissante depuis l'extrusion de tubes sur des GUVs jusqu'à l'extrusion sur des cellules. En effet sur les cellules, la présence d'un cytosquelette en interaction avec la membrane détermine le comportement des tubes [Brochard-Wyart et al., 2006]. Dès lors il paraît intéressant d'étudier l'extrusion de tubes sur nos vésicules composites car elles semblent être des objets intermédiaires entre GUVs et cellules vis-à-vis de l'extrusion.

De plus nous avons déjà indiqué que les propriétés de membrane des gel-GUVs ne pouvaient pas être sondées par aspiration en micropipette à cause de l'interaction entre la membrane et le gel interne, donc l'extrusion de nanotubes nous permet d'obtenir des informations sur la membrane des gel-GUVs.

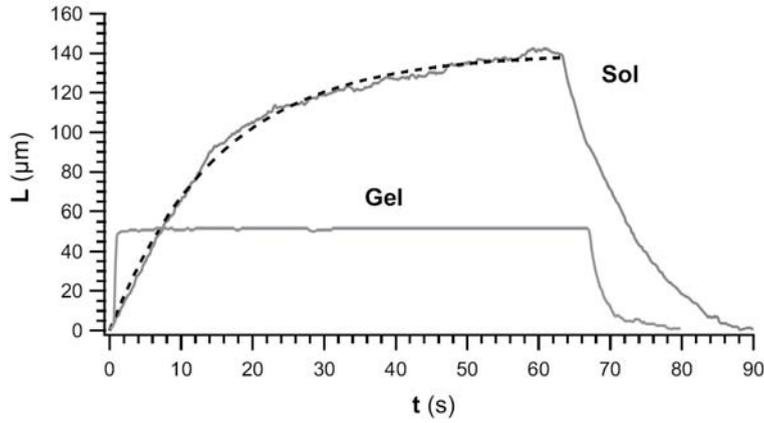


FIG. 7.6: Longueur du tube en fonction du temps pour une sol-GUV ($R=8 \mu m$) à 600 mM de Nipam (gris) (ajustement avec l'équation 2.74 en rouge) et une gel-GUV ($R=19 \mu m$) à 9 % de réticulation soumises à un flux $U \approx 25 \mu m/s$ et $U \approx 130 \mu m/s$ respectivement. L'extrusion et la rétraction sur la sol-GUVs sont ajustées respectivement par les équations 2.74 et 2.75

7.2.1 Résultats

La figure 7.6 présente deux séquences d'extrusion et rétraction typiques pour une sol-GUV (gris) et une gel-GUV (noir). Nous avons indiqué dans la section 7.1.2 que le comportement des sol-GUVs est similaire à celui de vésicules de DOPC simples.

Dans le cas de l'extrusion sur des gel-GUVs, comme on peut le voir sur la figure 7.6, on observe des temps caractéristiques d'extrusion très courts avant l'obtention d'une longueur stationnaire L_∞ comparés à ceux observés sur les sol-GUVs. De plus la longueur stationnaire du tube L_∞ est beaucoup plus petite que celle obtenue pour des sol-GUVs. Néanmoins L_∞ obéit bien à une loi linéaire avec la vitesse du flux : la figure 7.7 (a) montre l'évolution de L_∞ au cours du temps quand la vitesse du flux est augmentée pas à pas, et la figure 7.7 (b) l'évolution correspondante de L_∞ avec U . En ajustant $L(t)$ avec 2.74 on peut mesurer un temps caractéristique $\tau_0 \approx 0,12s$, mais on constate que L_∞ ne varie pas comme $\tau_0 U$ comme prévu par 2.73 pour les vésicules simples.

7.2.2 Discussion

Une vésicule sur laquelle on extrude un fil est un ressort entropique : l'extension maximum L_∞ est proportionnelle à la force appliquée :

$$f_v = 6\pi\eta UR = k_{eff} L_\infty \quad (7.1)$$

où $k_{eff} = \frac{(2\pi k_C)^2}{R^2 k_B T} = \frac{6\pi\eta R}{\tau_0}$ est la constante de raideur effective associée à l'extrusion du tube (en négligeant les termes logarithmiques).

Contrairement aux sol-GUVs, les gel-GUVs présentent un comportement tout à fait original qui n'a jusqu'à maintenant jamais été observé.

Le temps caractéristique τ_0 que nous avons mesuré pour les gel-GUVs est 30 fois inférieur à

7.2. COMPORTEMENT DES MEMBRANES DE GEL-GUVS SONDÉ PAR EXTRUSION HYDRODYNAMIQUE

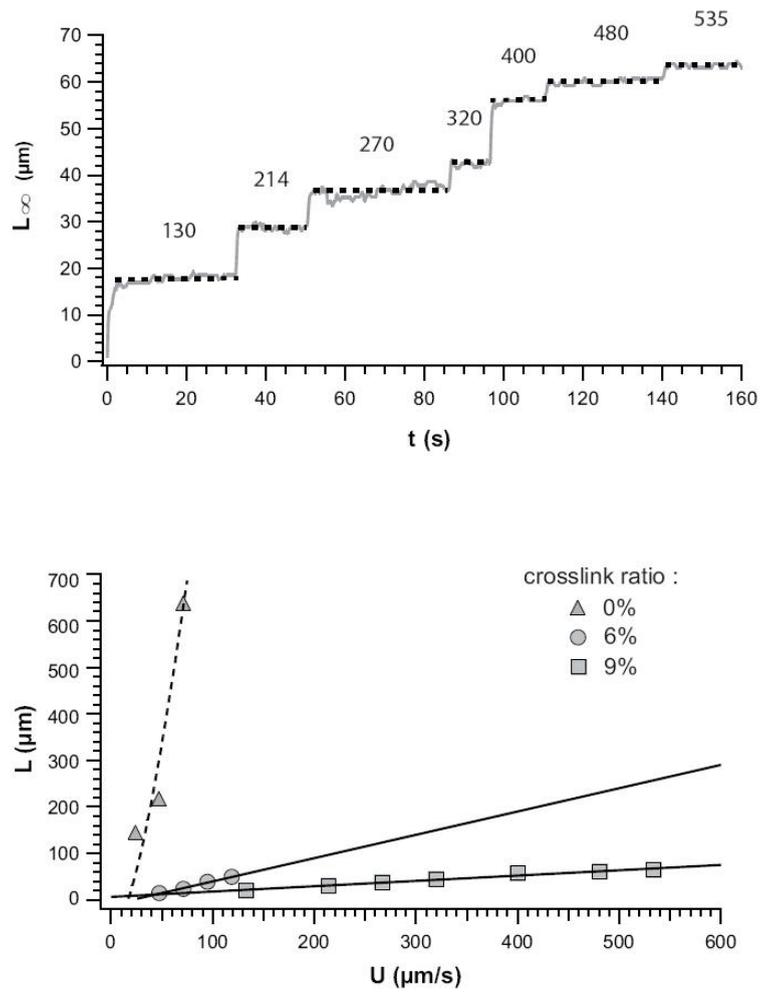


FIG. 7.7: (a) Longueur du tube en fonction du temps pour une gel-GUV 9% pour des vitesses de flux augmentées par pas (les vitesses en $\mu\text{m/s}$ sont indiquées sur chaque palier) (b) Longueurs stationnaires L_{∞} en fonction de la vitesse du flux U pour une gel-GUV à 6% (ronds) ($R = 12 \mu\text{m}$) et une gel-GUV à 9% ($R = 9 \mu\text{m}$), la courbe en pointillés correspond à $L_{\infty} = \tau_0 U$.

celui mesuré pour les sol-GUVs ou les vésicules de DOPC simples. Les gel-GUVs apparaissent comme un ressort dur par rapport aux sol-GUVs : $k_{eff,gel}/k_{eff,sol} \propto 30$.

On peut proposer un modèle en "patches" pour expliquer ce résultat original : seule une fraction de la membrane flue dans le tube. Contrairement au cas des vésicules simples et des sol-GUVs, toute l'aire de la membrane n'est pas "disponible" pour l'extrusion du tube à cause du gel tridimensionnel. Dans le cadre de ce modèle si R_{eff} est le rayon du patch de lipides mobiles (capables de fluer dans le tube), on détermine alors pour une gel-GUV de taux de réticulation de 9% que $R_{eff}^2/R^2 \propto 30$. En d'autres termes, pour une gel-GUV présentant un tel taux de réticulation, seule 33% de la membrane est libre de couler dans le tube.

Toujours dans le cadre de ce modèle, on vérifie que la fraction libre de membrane varie avec le taux de réticulation du gel, ainsi pour des gel-GUVs de taux de réticulation plus faible (6%), on trouve une fraction de lipides disponibles plus grande ($R_{eff}^2/R^2 \propto 15$ ce qui correspond à une fraction de membrane disponible de l'ordre de 66%).

Avec ce cadre d'explication, on trouve que la dynamique d'extrusion des tubes sur les gel-GUVs est différente de celle sur les cellules, car dans le cas des cellules, le cytosquelette est fixé à la membrane par des points d'attaches et les lipides semblent libres de se déplacer autour de ces points. Ici l'attache semble plus forte et confine les lipides.

De plus dans le cas des cellules, la dynamique d'extrusion du tube est dominée par l'énergie de détachement de la membrane du cytosquelette, car cette énergie est supérieure à la tension de membrane, on n'atteint donc pas de plateau dans l'extrusion de nanotubes sur des cellules [Brochard-Wyart et al., 2006]. Ici la dynamique est différente, nous pensions justement que l'extrusion de tubes serait un moyen de mesurer une densité surfacique d'énergie de liaison entre le gel et la membrane mais les expériences que nous présentons ici ne nous permettent pas de conclure dans ce sens.

7.3 Interaction membrane-cyclodextrines sur les sol-GUVs et gel-GUVs

Le but de cette section est d'obtenir des informations structurales sur les membranes des systèmes composites via l'étude de leur interaction avec des cyclodextrines.

Les cyclodextrines sont des molécules "cages" : elles présentent une structure annulaire comportant une zone interne hydrophobe, comme représenté sur la figure 7.8 (a). Ce sont des molécules naturelles issues de la dégradation de l'amidon par la bactérie *Bacillus macerans*. Il en existe plusieurs types mais celle qui nous intéresse est composée de six groupes glucose liés et dont la conformation donne à la molécule sa structure en cône tronqué (cf. figure 7.8 (b)). La capacité des cyclodextrines à former des complexes d'inclusion avec de nombreuses molécules est à la base du grand intérêt qu'elles ont suscité. Une revue des propriétés physico-chimiques des diverses cyclodextrines, des complexes qu'elles forment avec d'autres molécules et parti-

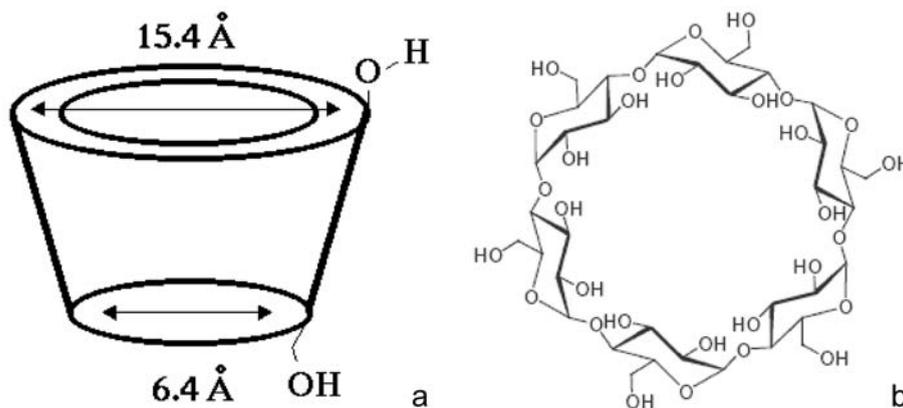


FIG. 7.8: (a) structure schématique (b) structure chimique d'une molécule de α -cyclodextrine.



FIG. 7.9: Sol-GUVs 700 mM dans une solution de α -cyclodextrines à 10 mM : décroissance du rayon au cours du temps.

culièrement avec les lipides est présentée dans [Billot, 2005]. Comme il a été montré dans la référence précédente, les α -cyclodextrines sont capables d'extraire progressivement des lipides de la membrane d'une vésicule de DOPC. Nous avons donc voulu savoir quel serait l'effet de ces molécules sur la membrane de nos vésicules composites.

7.3.1 Protocole expérimental

Dans une chambre d'observation, on mélange $100 \mu\text{L}$ de solution de α -cyclodextrines à 100 mM, $90 \mu\text{L}$ de glucose à 100 mM et $10 \mu\text{L}$ de solution de vésicules. Cette solution est donc à 50 mM de α -cyclodextrines et 50 mM de glucose, ce qui assure l'équilibre osmotique avec la solution à 100 mM de sucrose à l'intérieur des vésicules. Un protocole similaire est utilisé pour travailler avec une concentration de α -cyclodextrines de 10 mM. En travaillant en microscopie à fond clair avec un objectif $\times 10$, on repère une vésicule et on la suit pendant quelques minutes, la figure 7.9 illustre ce type d'expériences. On peut mesurer l'évolution temporelle de son diamètre, et tracer des courbes comme celles représentées sur la figure 7.10.

Dans le cas des gel-GUVs, nous avons constaté que nous n'obtenons pas de variation du diamètre apparent des vésicules, car si les lipides sont extraits par les α -cyclodextrines, le gel interne est intact. On voit donc un objet (dont on ne peut déterminer si c'est une gel-GUV ou une bille de gel) de rayon identique au rayon initial. Par conséquent nous nous sommes intéressés à la fluorescence des gel-GUVs : si les lipides sont extraits, on doit voir la fluorescence diminuer.

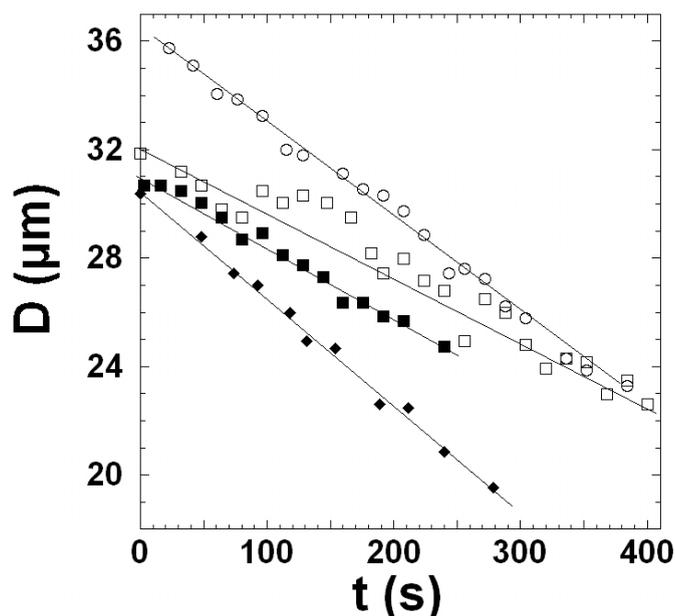


FIG. 7.10: Diamètre de sol-GUVs 700 mM dans une solution de α -cyclodextrines à 10 mM en fonction du temps (4 vésicules de diamètre initial différent)

Cependant, vu les temps caractéristiques d'extraction des lipides (plusieurs minutes), on ne peut pas suivre ce protocole en observant la vésicule en fluorescence de façon continue, sous peine de photoblanchir totalement les lipides (cf. section 5.3). Donc nous avons préparé en parallèle trois échantillons :

- deux chambres contenant 190 μL de glucose 100 mM et 10 μL de solution de gel-GUVs à 3 % que l'on observera à $t=0$ et à $t=20$ min
- une chambre contenant 100 μL de solution de α -cyclodextrines à 100 mM, 90 μL de glucose à 100 mM et 10 μL de solution de gel-GUVs à 3% que l'on observera à $t=20$ min

7.3.2 Résultats

Sol-GUVs

A partir des courbes du diamètre des vésicules en fonction du temps, voir figure 7.10, on peut mesurer un taux de réduction du diamètre des solGUVs dD/dt , ici on trouve 15,84 et 2,22 $\mu m/min$ pour des concentrations en α -cyclodextrines de 50 et 10 mM respectivement. Nous comparons ces valeurs de dD/dt à celles présentées dans [Billot, 2005] pour des membranes de DOPC sur la figure 7.11, on voit que nos mesures donnent des résultats très similaires à ceux obtenus pour du DOPC. Le comportement de dD/dt en loi de puissance de la concentration avec un exposant proche de 2 suggère une complexation d'une molécule de lipides avec 2 molécules de cyclodextrines [Billot, 2005].

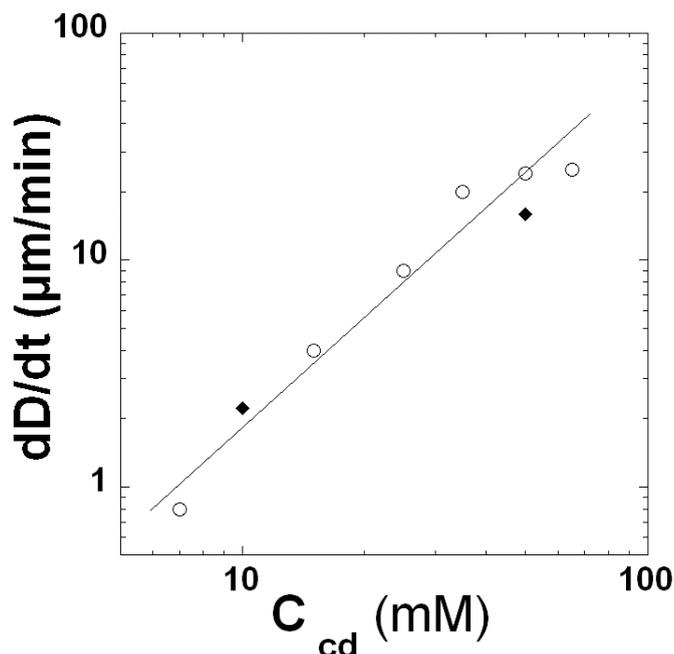


FIG. 7.11: Taux de réduction du diamètre dD/dt pour des vésicules de DOPC (points blancs extraits de [Billot, 2005]) et de sol-GUVs en présence de α -cyclodextrines

Gel-GUVs

Dans le cas des gel-GUVs, nous avons mesuré la quantité totale de fluorescence par vésicule dans les 2 premiers échantillons (gel-GUVs dans sucrose à $t=0$ et $t=20$ min) et nous avons trouvé des résultats comparables à ceux que nous présentons au chapitre 5.1.3. Sur les gel-GUVs du troisième échantillon, nous n'avons pas pu mesurer de fluorescence qui émergeait du bruit de fond des images, nous en avons conclu que les lipides de la membranes avaient bien été extraits par les α -cyclodextrines.

En conclusion de cette section sur l'effet du milieu interne des vésicules composites sur leur membrane, nous insistons sur le fait que nous avons exercé sur ces membranes des sollicitations à des échelles d'espace différentes qui donnent donc des informations complémentaires sur l'état des membranes, nous reviendrons sur cet aspect dans le chapitre 10.

Chapitre 8

Propriétés mécaniques du milieu interne des systèmes composites

L'objectif du présent travail est de préparer des systèmes constituant des modèles mécaniques stimulables des cellules. Nous montrons donc dans cette section que nous pouvons préparer des vésicules dont le milieu interne présente des propriétés mécaniques (viscosité ou élasticité) couvrant une gamme de valeurs pertinente par rapport à celles présentées par certaines cellules.

8.1 Viscosité des sol-GUVs

Nous rappelons que la polymérisation des chaînes de poly(Nipam) non réticulées dans des GUVs se fait à l'équilibre osmotique entre l'intérieur et l'extérieur des vésicules (cf. section 4.1.4). En d'autres termes, lors de la polymérisation, les vésicules sont suspendues dans une solution identique à celle dont elles sont remplies. La polymérisation se fait donc de façon identique à l'intérieur et à l'extérieur des vésicules. Par conséquent pour déterminer la viscosité interne des sol-GUVs nous avons simplement mesuré la viscosité de solutions de poly(Nipam) préparés dans les conditions utilisées pour préparer les sol-GUVs.

Les expériences ont été faites sur un rhéomètre cône-plan Malvern Bohlin Gemini mis à notre disposition par C. Verdier (LSP, Grenoble). Dans le cas de solutions diluées de polyNipam, l'expérience consiste à imposer différentes contraintes Σ comprises entre 0 et 1,2 Pa sur l'échantillon et à mesurer le gradient de vitesse $\dot{\gamma}$. Nous obtenons des courbes telles que celles représentées sur la figure 8.1. On obtient des droites de pentes différentes pour les différentes concentrations de poly(Nipam) utilisées, ce qui permet une mesure de la viscosité des solutions, car pour des solutions newtoniennes, $\Sigma = \eta \dot{\gamma}$. Le caractère newtonien des solutions est confirmé par l'évolution linéaire de Σ avec $\dot{\gamma}$.

Les viscosités des différentes solutions de poly(Nipam) sont représentées sur la figure 8.2. On peut constater que ces viscosités s'étalent sur trois ordres de grandeur ($10^{-3} < \eta < 1$ Pa.s) selon la concentration initiale en Nipam. Dans la mesure où ces viscosités sont représentatives de la viscosité interne des sol-GUVs que nous fabriquons, nous constatons que nous sommes

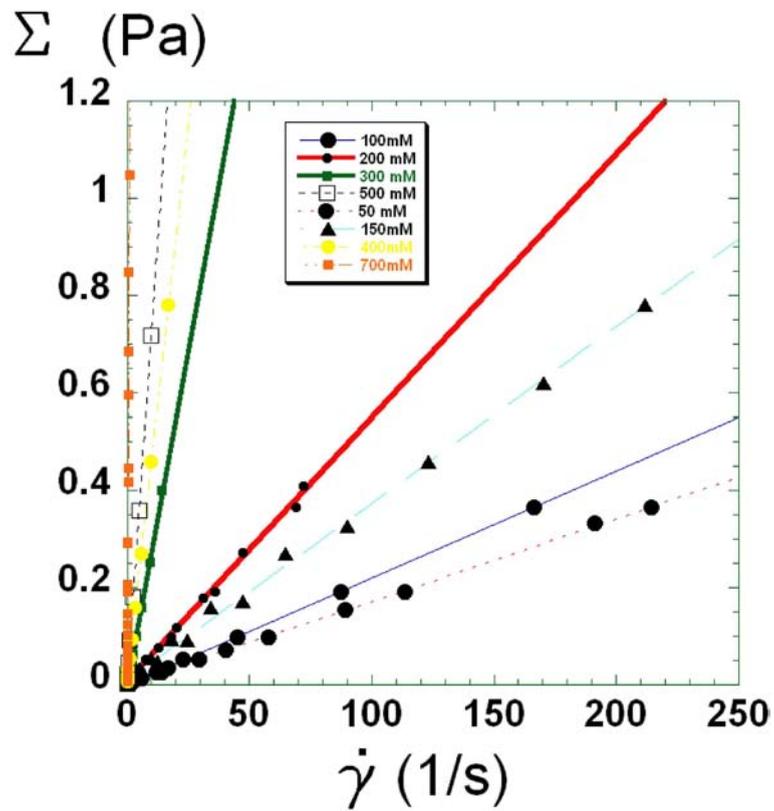


FIG. 8.1: Σ en fonction de $\dot{\gamma}$: courbes de viscosimétrie pour des solutions de poly(Nipam) de concentrations comprises entre 100 et 700 mM

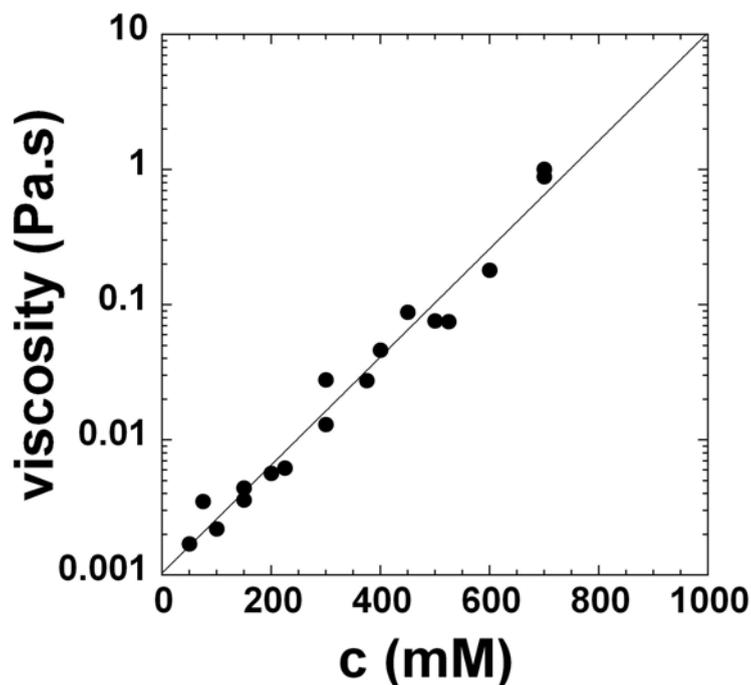


FIG. 8.2: Viscosité de solutions de poly(Nipam) en fonction de leur concentration en Nipam lors de leur préparation.

capables de fabriquer des vésicules comportant une viscosité interne contrôlable sur une large gamme. Nous pouvons comparer cette gamme de viscosité aux valeurs trouvées dans la littérature : 0,01 Pa.s pour le milieu interne des globules rouges [Shiga et al., 1990] ou 1 Pa.s pour le cytoplasme de fibroblastes [Zhu et al., 2000] et 6,5 Pa.s au minimum pour les globules blancs [Bathe et al., 2002]).

8.2 Elasticité des gel-GUVs

Nous avons montré que nous sommes capables d'obtenir des sol-GUVs dont la viscosité interne est comprise entre 10^{-3} et 1 Pa.s, une gamme pertinente en terme de biomimétisme. Nous allons démontrer que nous sommes également en mesure de préparer des gel-GUVs de module d'Young contrôlé couvrant une large gamme par modulation du taux de réticulation du gel interne lors de la préparation. Nous avons montré dans la section 2.4.3 que la technique d'aspiration par micropipettes permet une mesure du module d'Young d'un milieu élastique.

8.2.1 Aspiration par micropipettes de gel-GUVs

Nous rapportons dans cette section les mesures de module d'Young que nous avons effectuées grâce à la technique d'aspiration par micropipettes sur des gel-GUVs préparées à différents taux de réticulation X .

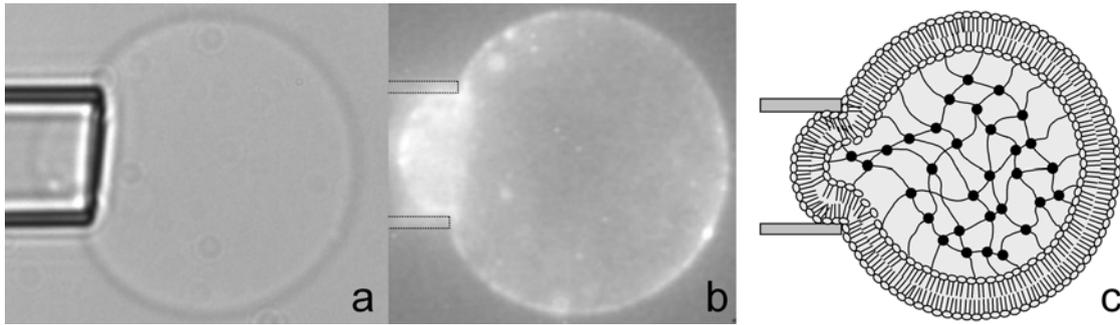


FIG. 8.3: Gel-GUV avec membrane fluorescente aspirée dans une micropipette observée en transmission (a) et en fluorescence (b) pour montrer la colocalisation du gel et de la membrane, représentation schématique de la structure des gel-GUVs révélée par cette expérience (c)

Présence de la membrane et du gel dans la langue aspirée

Dans un premier temps nous avons cherché à montrer l'intégrité de la membrane lors des expériences de micropipette ainsi que la colocalisation du gel et de la membrane. La figure 8.3 (a) montre une image en transmission d'une gel-GUV aspirée dans une micropipette et la figure 8.3 (b) l'image de fluorescence correspondante. Dans ce cas la pression d'aspiration est de l'ordre de 1000 Pa. Comme on le voit clairement sur la figure, la membrane reste attachée au gel et n'est pas rompue de façon macroscopique par la contrainte appliquée, néanmoins l'existence de ruptures à des échelles sub-optiques qui ne seraient pas détectées avec cette technique de visualisation ne peut être exclue.

Dans le cas d'une vésicule de DOPC simple, cette pression d'aspiration induirait une tension de membrane de 15 mN/m, ce qui est supérieur à la tension de rupture que nous avons mesurée pour des vésicules de DOPC et des sol-GUVs. Ceci indique que les deux feuillettes de la membrane semblent être fortement couplés au réseau de polymère interne, ce qui pourrait être rapproché de nos observations de l'interaction hydrophobe poly(Nipam)/substrats thiolés par SPR (cf .7.1.3) sans exclure toutefois la présence éventuelle de liaisons covalentes formées entre les chaînes et les phospholipides durant la réaction de polymérisation. La figure 8.3 (c) montre un schéma de la structure composite des gel-GUVs.

Ayant montré la présence de la membrane dans la langue aspirée dans la micropipette, nous avons alors voulu observer la présence du gel de façon directe. Pour cela nous avons mis à profit la transition volumique des gel-GUVs : la figure 8.4 montre une expérience dans laquelle une gel-GUV aspirée dans une pipette est chauffée à $T > 32^{\circ}\text{C}$. On observe bien la contraction du gel de poly(Nipam) à l'extérieur et à l'intérieur de la pipette, ce qui est une preuve de la présence de gel dans la partie de la vésicule à l'intérieur de la pipette.

Bien évidemment il aurait été intéressant de tester la colocalisation du gel et de la membrane par un marquage fluorescent du gel, mais nous n'avons pas pu réaliser ce marquage. Il existe des techniques pour marquer en fluorescence les chaînes de poly(Nipam) [Winnik et al., 1993] mais cela implique une chimie que nous ne maîtrisons pas.

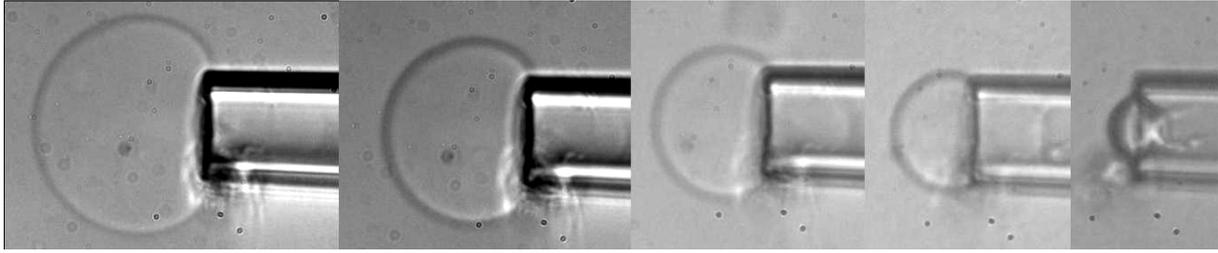


FIG. 8.4: Gel-GUV aspirée dans une micropipette, élévation de la température pour visualiser la contraction du gel à l'intérieur de la pipette

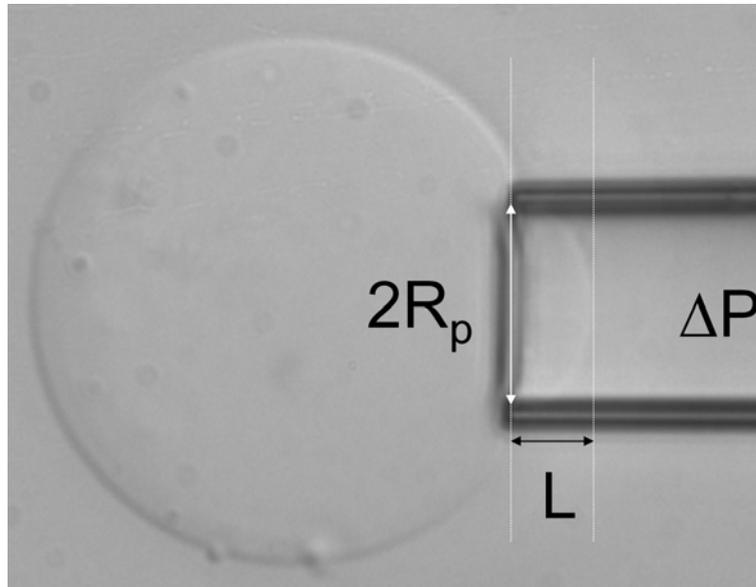


FIG. 8.5: Image typique de l'aspiration d'une gel-GUV dans une micropipette pour une mesure du module d'Young interne

Dispositif et précautions expérimentales

Le fort couplage de la membrane lipidique et du gel interne assure la continuité du champ de contraintes depuis la surface de la membrane jusque dans le milieu interne de la vésicule. Du point de vue de l'expérience d'aspiration, et à l'échelle de longueur correspondante, la vésicule composite apparaît comme une sphère élastique homogène de module d'Young E .

Le protocole d'expérience typique est d'approcher la micropipette au contact de la surface de la vésicule avec une pression d'aspiration aussi petite que possible. Puis la pression est augmentée d'un petit incrément, aboutissant à une nouvelle forme d'équilibre de la surface du gel et donc une nouvelle valeur de L , comme le montre la figure 8.5. Le module d'Young de la vésicule est extrait des courbes L/R_{pip} en fonction de ΔP dans le régime linéaire des faibles déformations en utilisant le modèle développé de [Théret et al., 1988].

On peut observer sur cette figure que le rayon de la vésicule n'est pas très grand devant

celui de la pipette, alors que le modèle de [Théret et al., 1988] impose $R_{ves} \gg R_{pip}$. Néanmoins il a été montré par des simulations numériques que la déformation du gel dans ce genre d'expériences était très localisée [Boudou et al., 2006]. En effet ces auteurs testent l'influence de l'épaisseur d'un substrat élastique sur la mesure par micropipettes de son module. Leurs simulations montrent qu'à partir d'une épaisseur de substrat comparable au rayon de la pipette, celle-ci n'a plus d'influence sur la mesure du module d'Young. De plus, ils montrent que le champ de déformation est très localisé dans une zone de taille $\approx R_{pip}$. Par conséquent, nous pensons qu'il n'y a pas d'effet important de la taille des vésicules sur la mesure de leur module d'Young dès que celle-ci est supérieure à R_{pip} et nos résultats expérimentaux sont donc corrects.

Nous avons également vérifié que la réponse des gel-GUVs aux variations de pression était immédiate, notamment si la pression d'aspiration est brutalement relâchée, cela entraîne un retour de la vésicule à son état initial avec un temps caractéristique inférieur à la résolution de notre système d'enregistrement (< 100 ms), ce qui montre qu'il ne semble pas y avoir de comportement visqueux des gel-GUVs.

Résultats

La figure 8.6 montre une courbe représentative d'une expérience d'aspiration. Nous avons particulièrement veillé à travailler dans le régime des faibles déformations comme il est nécessaire de le faire pour pouvoir comparer nos résultats avec l'analyse théorique d'élasticité linéaire présentée dans la section 2.4.3. En particulier, cela permet d'éviter d'avoir des singularités dans le champ de contraintes notamment aux extrémités de la micropipette, qui apparaîtraient dans le cas où la portion de gel aspirée dans la pipette était cylindrique et non sphérique. Le critère que nous avons utilisé pour s'assurer de travailler dans le régime des petites déformations est de vérifier que la déformation relative L/R_{pip} était toujours inférieure à l'unité.

La figure 8.7 montre une série d'expériences d'aspiration successives. La pression d'aspiration est augmentée, relâchée puis augmentée de nouveau ; on peut constater sur la figure que la pente des courbes successives, qui correspond au module d'Young, est identique dans les trois expériences. Ceci nous montre que, dans le régime des petites déformations, les gel-GUVs subissent des déformations réversibles ; nous sommes donc bien dans un régime pertinent pour appliquer le modèle théorique de [Théret et al., 1988].

La figure 8.8 présente les valeurs du module d'Young que nous avons obtenues pour des gel-GUVs préparées avec trois concentrations différentes de MBA : 3, 6 et 9 % donc trois taux de réticulation X différents. Chaque valeur de E correspond à une expérience sur une vésicule différente. Malgré une dispersion significative de l'ordre de 50%, les modules d'Young mesurés sont dans la gamme de 500 à 25000 Pa et nous constatons une augmentation prévisible du module d'Young avec le taux de réticulation. La dispersion pourrait être attribuée à la position des vésicules dans la chambre de polymérisation : certaines sont plus proches que d'autres de la lampe UV. Ces résultats montrent que la structure du gel interne est celle d'un gel réticulé homogène et que ses propriétés élastiques peuvent être expérimentalement contrôlées par la concentration en réticulant. Dans la gamme de concentration explorée ici, la valeur moyenne de E suit une loi de puissance d'exposant 2,8 en fonction du taux de réticulation.

Nous rappelons que nous ne connaissons pas le taux de réticulation X exact dans nos vési-

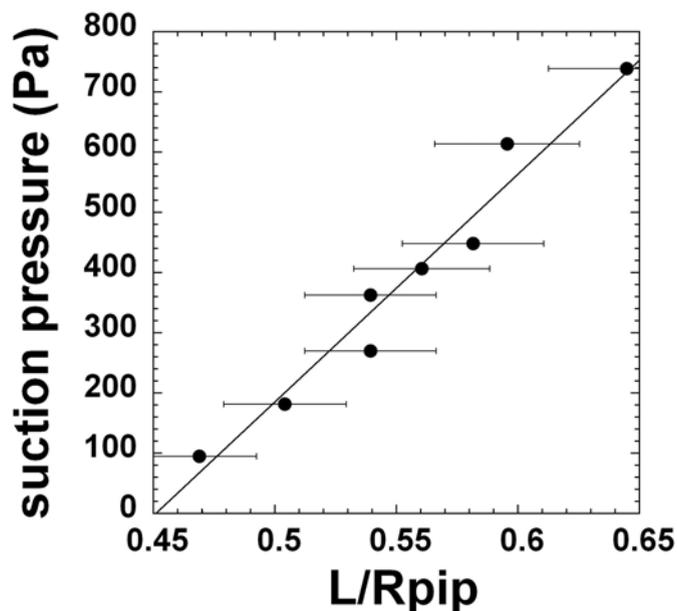


FIG. 8.6: Pression d'aspiration en fonction de L/R_{pip} : Courbe typique de l'aspiration d'une gel-GUV dans une micropipette pour une mesure du module d'Young interne

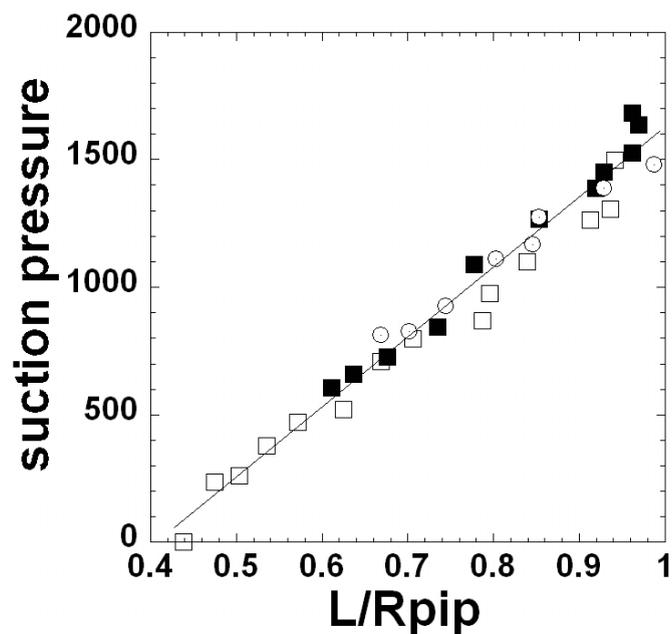


FIG. 8.7: Pression d'aspiration en fonction de L/R_{pip} pour une série d'aspirations successives au même endroit d'une gel-GUV : carrés blancs première aspiration croissante, ronds blancs pression décroissante, carrés noirs pression croissante

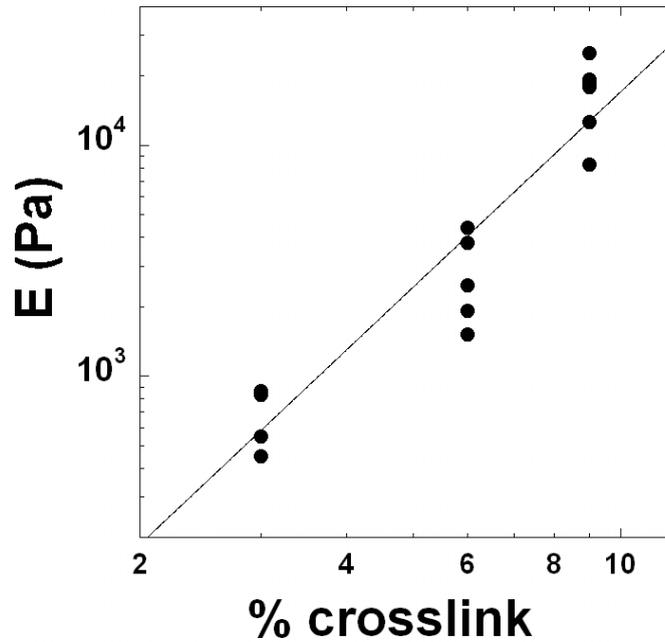


FIG. 8.8: Modules d'Young E de gel-GUVs en fonction de la concentration en réticulant lors de leur préparation.

cules, mais néanmoins nous pouvons comparer la gamme de modules que nous observons avec ceux que nous trouvons dans la littérature pour des gels de poly(Nipam). Rappelons également que nous mesurons le module d'Young E du gel interne, qui est relié à son module élastique G par $G = E/3$ [Théret et al., 1988] ; dans la littérature, les auteurs rapportent de préférence des valeurs de G . Nos mesures donnent donc des valeurs de G entre 0,2 kPa et 7 kPa.

[Sazaki and Koga, 2002] rapportent la préparation de gels de poly(Nipam) avec une technique différente de celle que nous utilisons¹. Les auteurs obtiennent des modules de 0,8 à 30 kPa pour des taux de réticulation de 0,125 % à 1,5 % et une concentration de Nipam de 1M. Avec la même technique de préparation, [Matzelle et al., 2003] donnent des valeurs de modules entre 5 et 20 kPa pour des gels avec X compris entre 1 et 5% et 1 M de Nipam. [Gundogan et al., 2002] rapportent la préparation de gels de poly(Nipam) chargés (incorporation de 2-acrylamido-2-méthylpropanesulfonic acid AMPS comme copolymère du Nipam) avec la même technique de préparation que l'article précédent et mesurent des modules entre 5,2 et 6,1 kPa pour X compris entre 1,04 et 1,18 %. [Laszlo et al., 2004] donnent des valeurs de modules de 2000 à 4000 Pa pour X compris entre 0,5 et 1,3%. Nous obtenons des valeurs systématiquement inférieures à celles rapportées, ce qui est cohérent avec le fait que dans notre cas les taux de réticulation sont surestimés à cause de la diffusion du MBA à l'extérieur des vésicules lors de l'étape de photopolymérisation (cf. section 4.1.4). On peut également remarquer qu'en comparant avec

¹Ammonium Persulfate comme initiateur chimique et N,N,N,N-tetraméthyléthylènediamine (TEMED) comme accélérateur, qui paraît être la technique la plus employée dans la littérature, mais qui ne convient pas à la préparation des gel-GUVs

les valeurs de [Laszlo et al., 2004], l'écart est plus grand pour les petites valeurs de X .

Quant à l'évolution de G avec X , la question n'est pas triviale. Dans une théorie d'échelle classique [de Gennes, 1979], on trouve que le module élastique du gel doit varier linéairement avec le taux de réticulation. Néanmoins, il est nécessaire de connaître le taux de gonflement à l'équilibre du gel pour comparer les valeurs de G . [Laszlo et al., 2004] montrent que G varie bien linéairement avec le taux de réticulation en prenant en compte le taux de gonflement à l'équilibre. Dans notre cas nous ne savons pas quel est ce taux de gonflement à l'intérieur des vésicules. Comme nous ne connaissons pas le X exact dans nos vésicules ni le taux de gonflement du gel interne, il ne serait pas pertinent d'aller plus loin dans l'interprétation de nos résultats sauf de remarquer que les ordres de grandeur des modules que nous obtenons sont cohérents avec ceux de la littérature.

Nous insistons en revanche sur le fait que les valeurs des modules mesurés se situent dans la gamme mesurée sur certaines cellules vivantes [Hochmuth, 2000]. On trouve également dans la littérature des modules de 3 à 5 kPa pour des fibroblastes, la même gamme pour des macrophages, 5 à 50 kPa pour des plaquettes ou 10 à 200 kPa pour des cardiocytes (voir [Rotsch and Radmacher, 2000], [Radmacher, 1997], [Rotsch et al., 1997] et [Hoffmann et al., 1997]) ce qui conforte la pertinence de nos gel-GUVs en terme de modèle mécanique de cellule.

8.2.2 Aspiration de gels macroscopiques

Dans cette section, nous présentons les résultats de mesures de modules d'Young sur des gels de polyNipam préparés dans les conditions que nous utilisons pour la fabrication des gel-GUVs. L'idée était de pouvoir comparer par une expérience identique les modules des gels macroscopiques et ceux des gel-GUVs afin de pouvoir estimer quelle était la fraction de réticulant expulsée lors de l'étape de dilution des vésicules pré-gel pendant la polymérisation (cf. section 4.1.4).

Pour ce faire, nous avons préparé des échantillons de gels macroscopiques à différents taux de réticulation, que nous avons aspirés de façon similaire aux gel-GUVs. Les échantillons sont fractionnés avec un scalpel pour former des morceaux aux interfaces planes que nous suspendons dans du glucose 100 mM dans des chambres identiques à celles dans lesquelles les expériences sur les gel-GUVs ont été réalisées.

Les résultats de ces expériences sont regroupés sur la figure 8.9 qui montre les valeurs des modules que nous avons mesurés. On constate que les valeurs sont très dispersées et qu'on ne voit pas de tendance se dessiner pour l'évolution du module en fonction du taux de réticulation. Même dans le cas des gels 3% pour lesquels on semble voir se distribuer les valeurs autour d'une valeur moyenne (voir figure 8.10) la dispersion est grande.

Nous allons tenter d'expliquer les raisons pour lesquelles nous obtenons ces résultats. La figure 8.11 montre une courbe typique d'aspiration de gel macroscopique. On peut constater la présence de deux régimes distincts pour de petites déformations. Par conséquent, nous pensons que le régime élastique pour ces gels se trouve dans une plage de déformation extrêmement fine

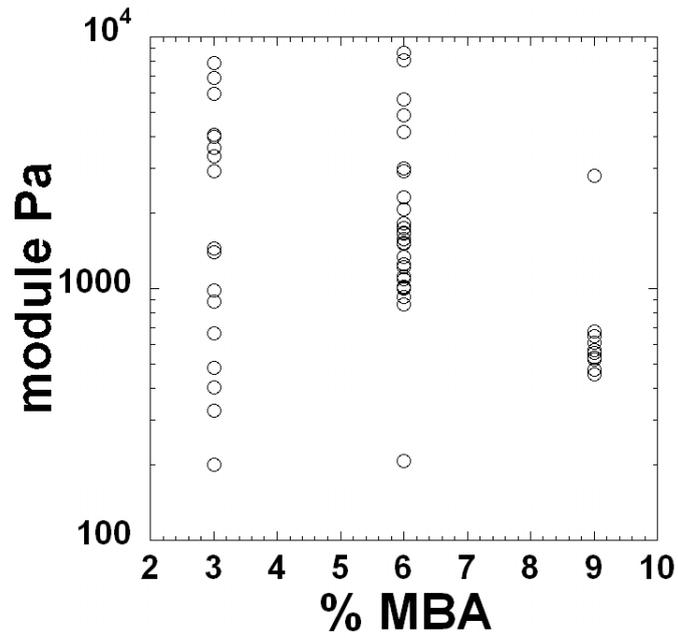


FIG. 8.9: Modules mesurés sur des gels macroscopiques en fonction de leur taux de réticulation

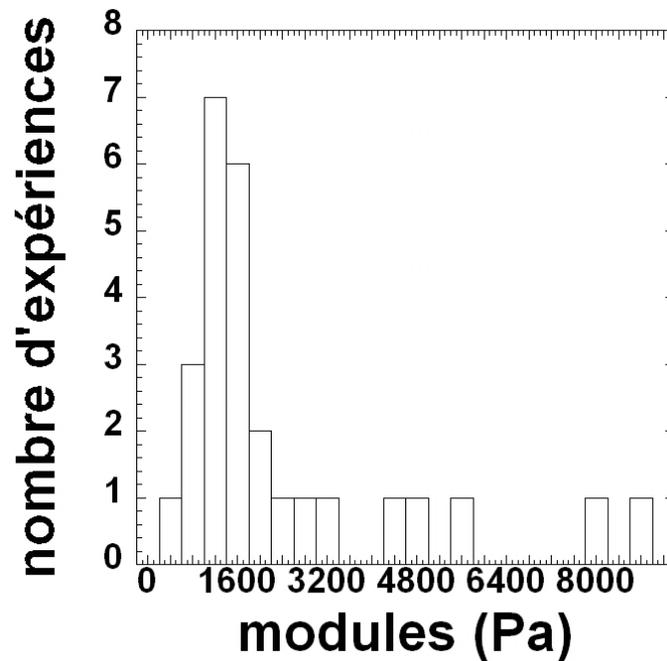


FIG. 8.10: Histogramme des modules d'Young mesurés sur des gels macroscopiques de poly(NIPam) à 3% de réticulation.

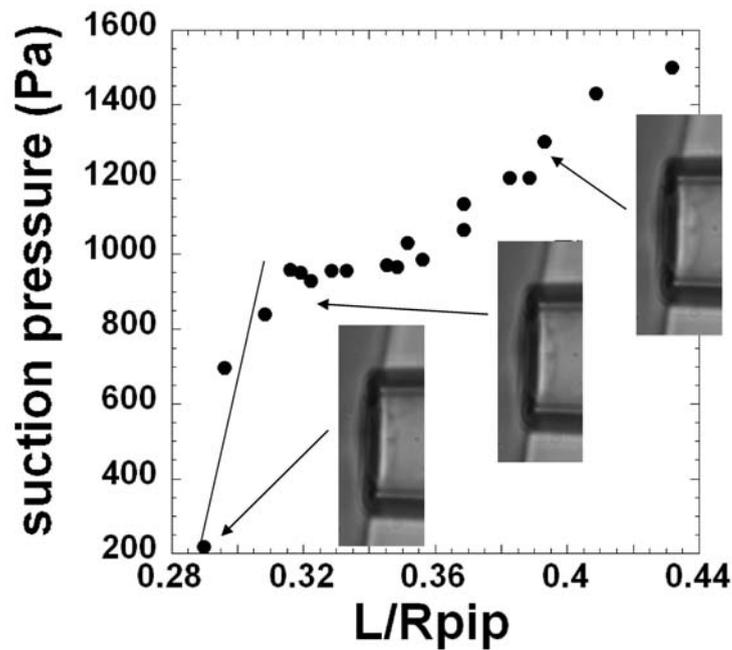


FIG. 8.11: Pression d'aspiration en fonction de L/R_{pip} : aspiration d'un échantillon de gel de poly(Nipam) dans une micropipette pour une mesure du module d'Young interne, mise en évidence de la finesse du régime des petites déformations

à laquelle nous n'avons pas toujours accès dans les expériences. Cette hypothèse est supportée par le fait que la portion de gel aspirée dans la pipette dans ces expériences n'a pas une forme sphérique, en tout cas pas avec un rayon de courbure égal à celui de la pipette. On peut penser qu'il y a un cassage du gel à l'extrémité de la pipette et que, donc, nous sondons des propriétés de rupture du gel.

Il est donc intéressant de noter que ce comportement n'a pas été observé pour les gel-GUVs malgré le nombre d'expériences réalisées. On peut formuler l'hypothèse que la présence de la membrane en interaction forte avec le gel interne empêche la rupture de ce dernier aux bords de la pipette.

Chapitre 9

Etude du comportement des vésicules composites sous contrainte : résultats préliminaires

9.1 Adhésion

L'adhésion des vésicules lipidiques a été largement étudiée tant de façon théorique [Seifert and Lipowsky, 1995] qu'expérimentale [Boulbitch et al., 2001], [Cuvelier and Nassoy, 2004] car elle est un premier pas vers la compréhension de l'adhésion cellulaire. Il nous semblait donc pertinent d'étudier l'influence des paramètres mécaniques (viscosité pour les sol-GUVs et module d'Young pour les gel-GUVs, voir chapitre 8) sur les propriétés d'adhésion des vésicules composites que nous avons préparées. Il se trouve que nous avons été confrontés à certaines difficultés expérimentales qui nous ont permis d'obtenir des compléments d'informations sur les propriétés structurales des membranes des systèmes composites.

Sol-GUVs

Toute étude d'adhésion ne peut s'envisager sans être capable de produire un système substrat/vésicule avec une adhésion reproductible dont les temps caractéristiques sont pertinents par rapport à nos moyens d'analyse. Nous allons présenter les essais que nous avons réalisés dans ce but avec différents substrats.

Substrats Silanes aminés

Dans un premier temps nous avons essayé de contrôler l'adhésion non-spécifique de vésicules sur des substrats. Dans le cas des substrats Silanes aminés, il s'agit d'une interaction électrostatique entre la surface chargée positivement et la membrane de lipides (légèrement chargée négativement [Pincet et al., 1999], [Quemeneur et al., 2007]). Nous avons décrit dans la section 4.2 la préparation de substrats recouverts de Silanes dont une fraction contrôlée est aminée, c'est à dire chargée. Nous pouvons donc faire varier le taux de charges à la surface du

substrat et observer l'effet de ce paramètre sur l'adhésion de vésicules.

Tout d'abord nous avons fait des essais avec des vésicules de DOPC pour trouver les bonnes conditions d'expériences.

La figure 9.1 (a) montre une observation en fluorescence d'un substrat recouvert à 100% de Silanes aminés sur lequel ont été déposées des vésicules : les tâches que l'on observe sont des vésicules ayant éclaté au moment où elles ont touché le substrat. Nous en avons conclu que ce taux de Silanes aminés était trop élevé, même si dans certaines zones de la chambre d'observation les vésicules ne semblaient pas adhérer. Nous avons progressivement diminué le rapport Silanes aminés/Silanes hydrophobes pour diminuer le nombre de charges sur le substrat. La figure 9.1 (b) montre une observation en RICM d'une vésicule de DOPC au voisinage d'un substrat avec 5% de Silanes aminés. On observe de grandes fluctuations dans la zone proche du substrat, indiquant qu'il n'y a pas d'adhésion.

Avec des essais en "aller-retour", nous avons observé qu'un taux de Silanes aminés de 10% permettait d'observer des phénomènes d'adhésion relativement lents (permettant ainsi l'étude de la cinétique d'étalement) ne conduisant pas à la destruction des vésicules. La figure 9.1 (c) montre une séquence d'observation en RICM de l'adhésion progressive d'une vésicule sur le substrat. On notera que le front d'adhésion a une géométrie très complexe et très ramifiée, sa forme est très différente de celles que nous observerons dans le cas de l'adhésion spécifique dans la section 9.1. Sur cette séquence on voit la surface d'adhésion de la vésicule sur le substrat grandir au cours du temps. La mesure de la taille de cette zone r normalisée par le rayon de la vésicule R est reportée sur la figure 9.1 (d). On voit sur cette courbe la croissance progressive de la zone d'adhésion jusqu'à saturation. L'échelle de temps pour ce phénomène (1 min) permet une étude de sa cinétique par RICM. Par conséquent nous considérons que ce taux de Silanes aminés en surface du substrat est bien adapté à nos expériences.

Nous avons donc injecté des sol-GUVs sur un substrat Silanes aminés 10%, nous n'avons observé aucune adhésion ni explosion. Des essais répétés sur ce type de substrat n'ont pas permis d'observer d'adhésion des sol-GUVs. Il nous est néanmoins arrivé quelquefois d'observer des points d'adhésion très localisée entre les vésicules et les substrats (figure 9.2).

Dans un deuxième temps nous avons travaillé dans un milieu chargé (TBE, Tris-borate-EDTA, Sigma) afin de mieux contrôler l'adhésion : effectivement l'adhésion des vésicules de DOPC a semblé favorisée, puisque sur des substrats à 10% de Silanes aminés on obtenait plus d'évènements d'adhésion. Néanmoins dans le cas des sol-GUVs, nous n'avons pas obtenu de meilleurs résultats qu'en milieu neutre.

Dès lors nous avons abandonné ce type de substrat et nous nous sommes tournés vers des substrats polyLysine.

Substrats PolyLysine

Nous avons mené une étude similaire à celle faite sur les substrats Silanes aminés. En effet la concentration de polyLysine utilisée lors de la préparation des substrats a été diminuée jusqu'à trouver une concentration qui induisait des évènements d'adhésion intéressants pour les vésicules de DOPC : cela a été le cas pour une solution de polyLysine à 0.005% en volume.

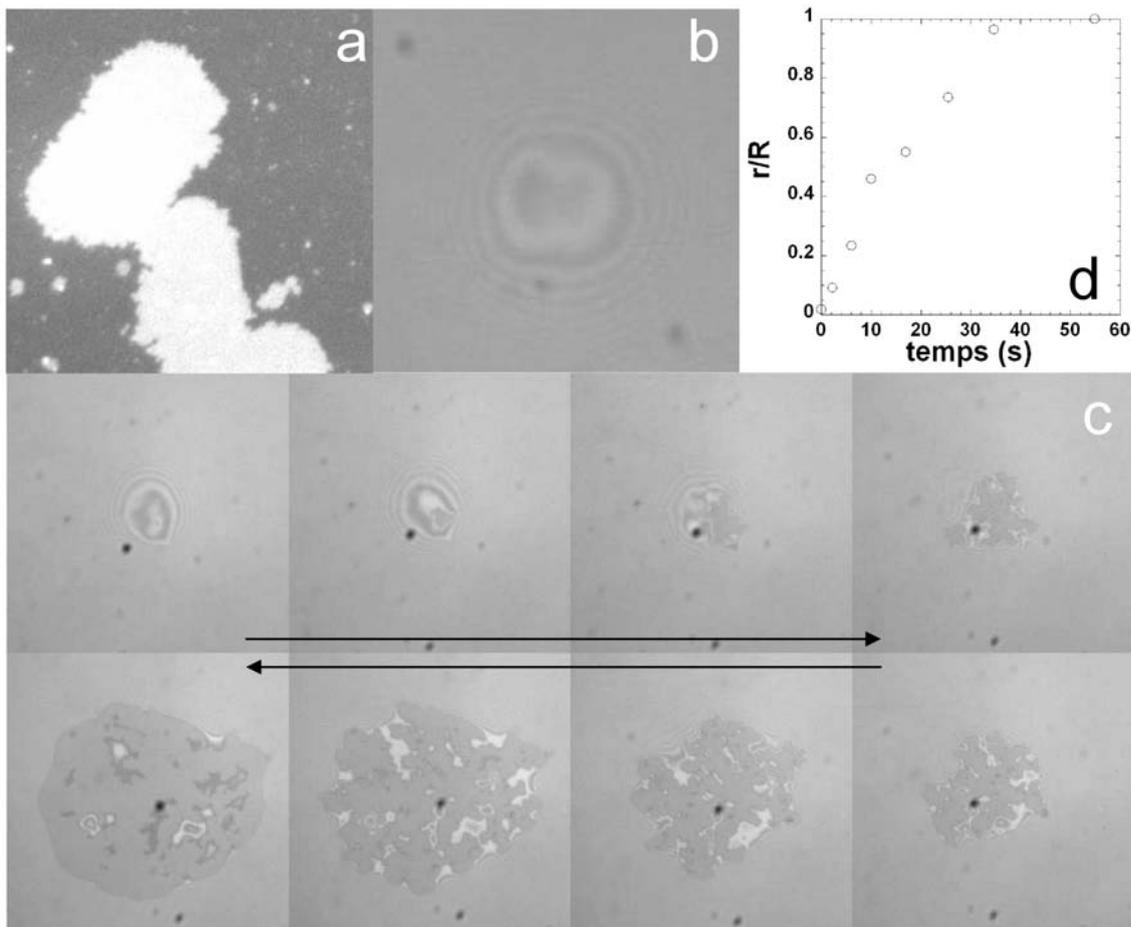


FIG. 9.1: (a) Observation en microscopie de fluorescence de vésicules de DOPC éclatées sur un substrat à 100% de Silanes Aminés (b) Observation en RICM d'une vésicule de DOPC fluctuant au voisinage d'un substrat à 5% de Silanes Aminés (c) Séquence d'observations en RICM de l'adhésion d'une vésicule de DOPC sur un substrat à 10% de Silanes aminés. (d) Taille du patch d'adhésion normalisé par le rayon de la vésicule r/R en fonction du temps correspondant à la séquence précédente.

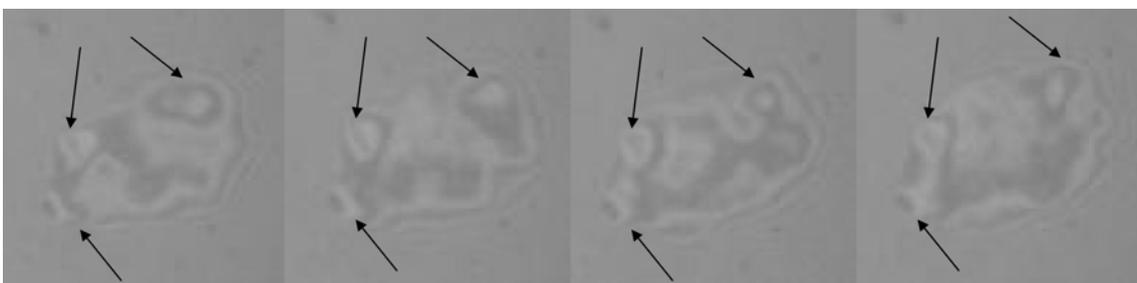


FIG. 9.2: Observation en RICM de l'adhésion ponctuelle de vésicules de DOPC sur un substrat Silane aminés 10%

Dans ce cas comme celui des substrats Silane aminés, aucune adhésion des sol-GUVs n'a été observée.

Il est nécessaire de préciser que pour les deux types de substrats chargés que nous avons étudiés, même si nous avons observé des événements d'adhésion correspondant à nos critères d'acceptabilité, la reproductibilité des expériences aurait pu être mise en doute. En effet, pour les vésicules de DOPC, sur un même substrat il n'était pas rare d'observer des vésicules qui éclatent, qui adhèrent ou qui n'adhèrent pas à peu de distance d'intervalle. Au vu de ces tentatives infructueuses de contrôler l'adhésion sur des substrats chargés, nous avons décidé d'utiliser un mécanisme d'adhésion spécifique.

Substrats Streptavidine

Nous avons montré la possibilité de fonctionnaliser la membrane de gel-GUVs par des fonctions biotine. Nous avons préparé des gel-GUVs dont la membrane contient des lipides biotinylés (1/100). Ces gel-GUVs biotinylés ont été incubées 1h dans une solution de streptavidine fluorescente puis observées en microscopie de fluorescence. On voit clairement sur la figure 9.3 que la membrane est marquée par la streptavidine fluorescente, indiquant qu'il est possible d'utiliser l'interaction streptavidine-biotine pour induire l'adhésion de nos vésicules avec un substrat.

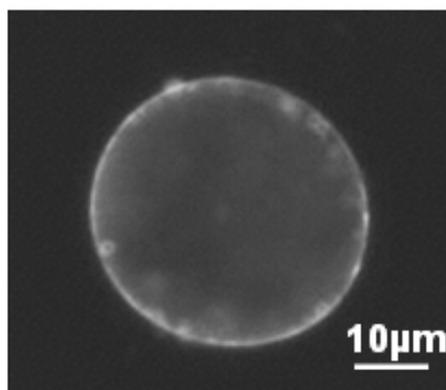


FIG. 9.3: Observation en fluorescence d'une gel-GUV dont la membrane est biotinylée après incubation dans la streptavidine fluorescente : mise en évidence de la possibilité de fonctionnaliser la membrane.

Nous avons décrit dans le chapitre 4.2 la préparation de substrats recouverts de streptavidine. Nous avons préparé des vésicules DOPC et des sol-GUVs contenant une fraction de lipides à tête biotinylés 1/50. Dans le cas présent la concentration en streptavidine sur le substrat a été maintenue constante et égale à celle présentée dans la section 4.2.

Dans ce cas l'adhésion des vésicules DOPC est apparue très convenable pour les études que nous voulions mener : une adhésion avec des temps caractéristiques de l'ordre de la minute, donc facile à observer, reproductible (toutes les vésicules de l'échantillon adhèrent au substrat) et pas d'éclatement des vésicules. Une séquence d'adhésion typique est représentée sur la figure

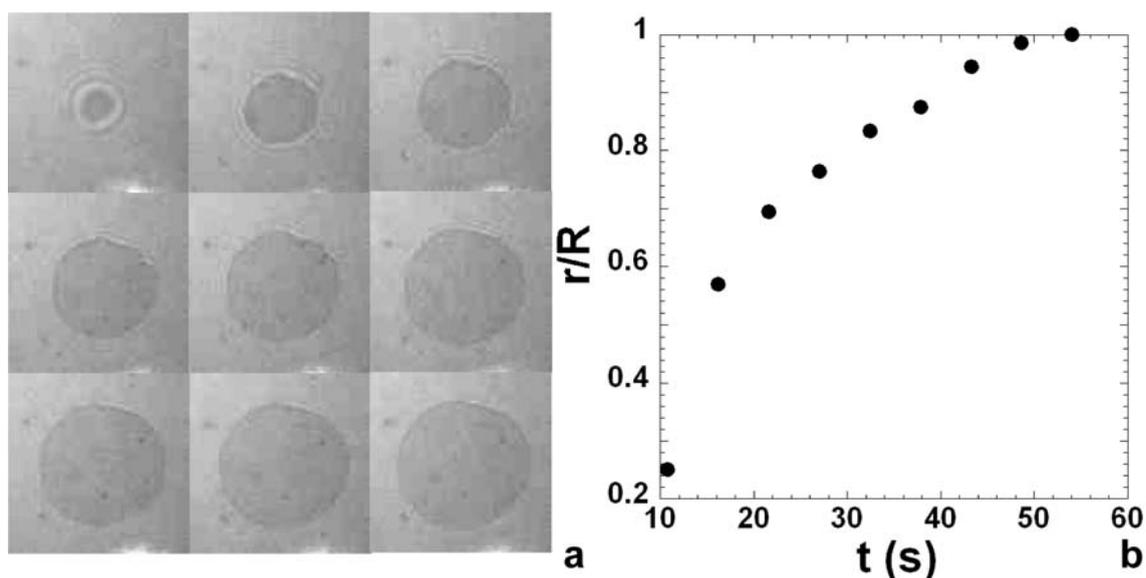


FIG. 9.4: (a) observation en RICM de l'adhésion d'une vésicule de DOPC à membrane biotinyllée sur un substrat streptavidine (b) taille du patch d'adhésion normalisée par la rayon de la vésicule r/R en fonction du temps correspondant à la séquence précédente.

9.4 (a), on peut noter la forme très régulière du front d'adhésion contrairement à celle que nous observons dans le cas d'une adhésion non-spécifique. L'évolution au cours du temps du rayon normalisé du patch d'adhésion r/R est représentée sur la figure 9.4 (b).

Au vu de ces résultats, nous avons donc tenté d'observer l'adhésion de sol-GUVs préparées avec des lipides biotinyllés (1/50) sur un substrat recouvert de streptavidine. En attendant de l'ordre d'une heure après l'injection des vésicules dans la chambre d'observation, nous n'observons aucune adhésion des sol-GUVs qui fluctuent librement au voisinage du substrat. Afin de tenter de favoriser les contacts membrane-substrat, nous avons même utilisé une pipette pour appuyer sur les vésicules, mais cela n'a pas changé leur comportement.

Nous allons conclure sur cette étude de façon globale après avoir présenté nos résultats sur les gel-GUVs.

Gel-GUVs

En parallèle des études d'adhésion des sol-GUVs, nous avons étudié celle des gel-GUVs. En effet il nous semblait intéressant de mesurer la déformation des gel-GUVs en adhésion et de traiter ces expériences avec un modèle JKR [Israelachvili, 1985], ceci aurait permis une mesure du module élastique des gel-GUVs alternative à celle présentée dans le chapitre 8.

Dans les conditions dans lesquelles nous avons fait cette étude, nous n'avons pas été capables de provoquer la déformation de nos gel-GUVs grâce à l'adhésion.

Notre interprétation de la non-adhésion des vésicule composites s'appuie sur les informations structurales que nous avons obtenues via les mesures de module de courbure et de SPR (cf.

sections 7.1.1 et 7.1.3). Leur membrane est recouverte de chaînes de poly(Nipam) qui écrantent l'interaction entre la membrane et le substrat. Les études du module de courbure et de SPR d'une part et d'adhésion d'autre part ont été menées en parallèle, et donnent des résultats convergents. C'est à la lumière de ces résultats que nous pensons qu'une étude d'adhésion pourrait se faire sur des substrats hydrophobes.

Les résultats de ces études d'adhésion et de celles concernant l'interaction des vésicules composites avec les α -cyclodextrines présentées à la section 7.3, qui toutes deux mettent en jeu des phénomènes à l'échelle moléculaire pourraient paraître antagonistes. En effet, on n'observe pas d'adhésion spécifique entre la membrane et le substrat alors que les α -cyclodextrines sont capables d'extraire les lipides de la membrane. Notre interprétation est la suivante : dans le cas de l'adhésion, les deux entités susceptibles d'interagir sont d'un côté la biotine qui est confinée sur la membrane et de l'autre la streptavidine qui est immobilisée sur le substrat. Comme la membrane est recouverte de poly(Nipam), la présence de ce polymère empêche l'interaction entre la biotine et la streptavidine. Dans le cas de l'interaction membrane- α -cyclodextrines, les lipides sont toujours confinés dans la membrane mais les α -cyclodextrines sont complètement libres de diffuser et sont ainsi capables de les extraire.

9.2 Dégonflement

Nous avons évoqué dans la section 6.2.2 l'utilité de dégonfler osmotiquement des sol-GUVs pour faire varier la concentration de poly(Nipam) interne. Nous avons constaté également l'apparition de formes transitoires originales pendant ces expériences de dégonflement osmotique.

Le principe de l'expérience est d'injecter une solution de glucose concentrée dans une chambre dans laquelle sont suspendues des sol-GUVs afin de les dégonfler. Nous avons observé un comportement singulier des sol-GUVs illustré sur la figure 9.5.

Nous observons l'évolution de la sol-GUV après l'injection de glucose concentré dans la chambre qui aboutit à un rapport $C_{glucose}^{externe} / C_{glucose}^{interne} = 0,8$. On observe au début du dégonflement l'apparition de formes crénelées avec une taille caractéristique de l'ordre du μm à la surface de la vésicule. Ces formes relaxent en une dizaine de minutes après l'injection du glucose, et, à une échelle de temps plus longue (3h), la vésicule a tendance à redevenir sphérique. Pour cela elle éjecte un fil de lipides pour réduire sa surface.

Ces expériences sont préliminaires, mais ces formes crénelées rappellent celles des globules rouges échinocytes [Lim et al., 2002] paraissent originales pour des vésicules et sont observées de façon reproductible. Le mécanisme de dégonflement du type apparition de formes crénelées puis relaxation vers une forme sphérique est observé sur la majorité des sol-GUVs lors d'une expérience. Il serait nécessaire d'étudier quantitativement l'influence de la viscosité interne et de l'intensité du choc osmotique que les vésicules subissent. Précisons que ces formes sont très différentes de celles observées sur des vésicules "simples" [Bernard et al., 2002], [Boroske et al., 1981].

On notera que dans le cas des gel-GUVs, le dégonflement des vésicules se fait de façon isotrope en conservant la forme sphérique des objets, et nous n'avons donc pas poussé plus loin cette étude.

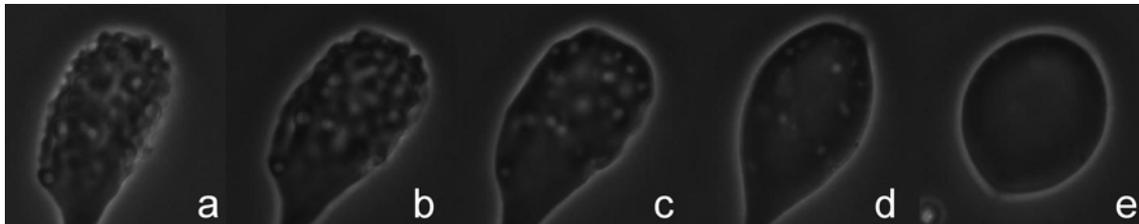


FIG. 9.5: Sol-GUV à 700 mM de Nipam avec $C_{\text{glucose}}^{\text{externe}}/C_{\text{glucose}}^{\text{interne}} = 0,8$ à $t =$ (a) 5 min, (b) 6 min, (c) 9 min, (d) 27, (e) 171 après l'injection de glucose.

Chapitre 10

Conclusions et perspectives

Nous présentons ici les différents bilans de notre travail, en rapport avec les objectifs que nous nous étions fixés au début de cette thèse. Nous indiquons, à la suite de chaque bilan, les perspectives offertes pour un travail futur en prolongement de celui-ci.

Le premier objectif était d'obtenir des vésicules composites susceptibles de présenter des propriétés mécaniques comparables à celles mesurées pour certaines cellules. Pour cela nous avons développé un protocole original permettant de modifier le milieu interne des vésicules et de contrôler de façon séparée viscosité et module d'Young en agissant sur des paramètres expérimentaux faciles à modifier. Le tableau 10.1 présente les divers objets que nous avons développés, les gammes couvertes par leur module de courbure, leur viscosité et leur module élastique et enfin les paramètres expérimentaux permettant de contrôler ces diverses propriétés mécaniques. Ce tableau montre également les valeurs de viscosité et de module d'Young relevées pour certaines cellules.

Nous espérons que ce bilan, en terme de "modélisation mécanique" de cellule, montre que nous avons réussi à atteindre notre premier objectif.

Le deuxième objectif était de conférer à ces systèmes un caractère de stimulabilité : en d'autres termes nous souhaitions être capables de moduler les propriétés mécaniques d'un objet **fixé** par l'intermédiaire d'un paramètre externe tel la température ou la pression.

Le tableau 10.2 dresse un bilan de notre travail en terme de stimulabilité. Pour tous les systèmes étudiés, ce tableau rapporte le (ou les) paramètre(s) de stimulation et illustre par des photos leur comportement en fonction des stimuli externes. Ce bilan nous autorise à penser que ce second objectif est atteint :

- **Concernant les gel-GUVs**, nous avons réussi à obtenir des vésicules dont le milieu interne présente une transition volumique à la température de transition du poly(Nipam) et dont la membrane reste intègre et localisée à la surface du gel encapsulé lors de la transition. La structure de la membrane probablement froissée sur le gel effondré reste à élucider.
- **Concernant les sol-GUVs**, nous avons mis en évidence la possibilité de choisir le type de transition via le taux de dégonflement osmotique (passage d'un système homogène à

Type d'objets	Module de courbure k_c ($k_B T$)	Viscosité interne η (Pa.s)	Module d'Young E (kPa)	Paramètre de contrôle
GUVs	20	10^{-3}	0	aucun
Sol-GUVs ($100 < [\text{Nipam}] < 600$ mM)	$20 < k_c < 4$	$10^{-3} < \eta < 10^{-1}$	0	[Nipam]
Sol-GUVs ([Nipam] imposée par dégonflement) ($100 < [\text{Nipam}] < 900$ mM)		$10^{-3} < \eta < 3$	0	[Glucose] _{ext}
Sol-GUVs ([Nipam] imposée lors de la préparation) ($600 < [\text{Nipam}] < 900$ mM)	$k_c < 3$	$10^{-1} < \eta < 3$	0	[Nipam]
Gel-GUVs ([Nipam] = 300 mM) ($0,03 < [\text{MBA}]/[\text{Nipam}] < 0,09$)		0	$0,5 < E < 25$	[MBA]/[Nipam]
Cellules		$10^{-1} < \eta < 6,5$	$3 < E < 200$	

FIG. 10.1: Module de courbure de membrane k_C , viscosité interne η , module d'Young E et paramètre de contrôle des paramètres mécaniques mesurés pour les différents types d'objets que nous avons préparés dans cette étude et relevés dans la littérature pour certaines cellules.

un système "à noyau"). Nous pouvons donc évoquer pour les sol-GUVs une propriété de "double stimulabilité".

Un autre résultat original sur les sol-GUVs concerne le rôle de la concentration initiale en poly(Nipam) sur le type de transition induit par la température (démixion locale du milieu interne ou transition de volume de l'objet global). Malgré une recherche bibliographique importante et de nombreuses discussions avec des spécialistes du poly(Nipam), nous n'avons pas trouvé mention de ce phénomène de démixion (à une échelle de la dizaine de μm) induit par la température dans des solutions concentrées de poly(Nipam), nous l'avons donc mis en évidence par nous-mêmes.

S'il s'avère que ce phénomène n'a encore jamais été observé, il serait pertinent d'envisager une étude détaillée de l'influence de la concentration en poly(Nipam) et de la distribution des longueurs de chaînes sur ce phénomène.

Nous insistons sur le fait que, dans les sol-GUVs, il est possible d'induire **trois types distincts de transitions** allant de la démixion locale simple à la transition volumique globale en passant par une séparation de phases à l'échelle de la vésicule.

Le troisième objectif était d'étudier l'effet de chaque paramètre mécanique sur le comportement de ces systèmes sous contrainte externe.

Effectivement nous avons étudié le comportement des vésicules composites (sol-GUVs et gel-GUVs) sous diverses contraintes externes à différentes échelles spatiales. Certaines de ces études, comme par exemple l'aspiration en micropipettes ou l'extrusion de fils de membrane, ont abouti à la détermination de paramètres mécaniques que nous avons relatés dans le tableau 10.3. D'autres, telles l'étude en adhésion ou en dégonflement osmotique, ont permis d'obtenir des résultats préliminaires ouvrant la voie à des études détaillées. Cependant, nous insistons sur le fait que toutes ces études nous ont également permis d'accéder à des informations structurales et de réactivité sur une large gamme de longueurs caractéristiques. Le tableau 10.3 rassemble ces informations que nous qualifions de façon simplifiées de "structurales" : il indique pour chaque type de sollicitation subie par les différents objets, l'échelle spatiale concernée, la représentation structurale que ces expériences nous ont permis de proposer et enfin les perspectives ouvertes par ces études.

Nous avons déjà présenté en prolongement de nos résultats un certain nombre de pistes pour poursuivre ce travail. Bien d'autres idées encore émergent après ces trois années consacrées à ces systèmes, allant de l'approfondissement de la relation entre interaction polymère-membrane et module de courbure, à l'étude de sol-GUVs "à noyau", en passant par l'étude de sol-GUVs encapsulant une solution de chaînes de poly(Nipam) fortement enchevêtrées susceptible de mimer le comportement visco-élastique des globules blancs.

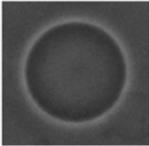
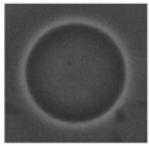
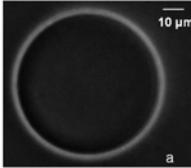
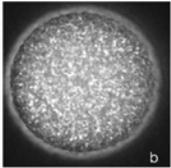
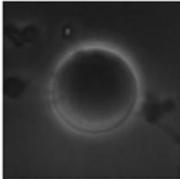
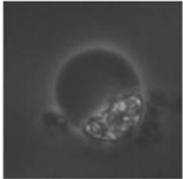
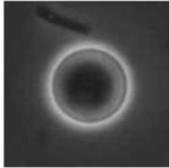
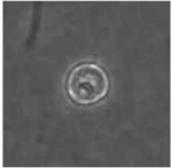
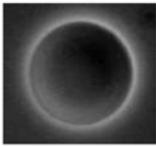
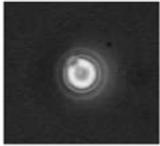
Type d'objets	Paramètre de stimulation	T < 32°C	T > 32°C
GUVs	Aucun		
Sol-GUVs (100 < [Nipam] < 600 mM)	Température et Pression osmotique		
Sol-GUVs ([Nipam] imposée par dégonflement) (600 < [Nipam] < 900 mM)			
Sol-GUVs ([Nipam] imposée lors de la préparation) (600 < [Nipam] < 900 mM)	Température		
Gel-GUVs ([Nipam] = 300 mM) (0,03 < [MBA]/[Nipam] < 0,09)	Température		

FIG. 10.2: Paramètre(s) de stimulation et comportement en fonction des stimuli externes pour les différents types d'objets que nous avons préparés dans cette étude.

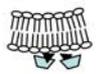
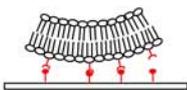
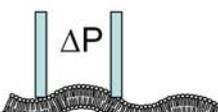
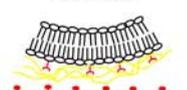
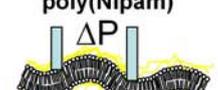
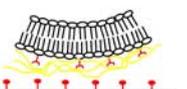
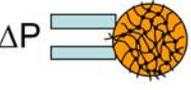
Solicitation Type d'objets	Interaction α -cyclodextrine	Adhésion spécifique	Force ponctuelle (extrusion de tubes de membrane)	Pression (micropipette)	Pression (dégonflement)	Structure schématique « actuelle »
	Longueur caractéristique					
	0,001 μm	0,025 μm	0,1 μm	1 μm	10 μm	
GUVs	Extraction de 2 lipides par 1 CD 	Adhésion 	Ressort entropique $K_{\text{eff GUV}}$ 	Membrane fluctuante 	Formes ADE	
Sol-GUVs	Extraction de 2 lipides par 1 CD 	Non adhésion: poly(Nipam) à la surface 	$K_{\text{eff solGUV}} \neq K_{\text{eff GUV}}$ Interaction poly(Nipam)-membrane 	Membrane fluctuante interaction avec poly(Nipam) 	Formes transitoires « échinocytes »	 $0,001 < \eta < 1 \text{ Pa.s}$
Gel-GUVs	Extraction de 1 ou 2 lipides par 1 CD ? 	Non adhésion: poly(Nipam) à la surface 	$K_{\text{eff}} \gg K_{\text{eff solGUV}}$ modèle en « patches » 	Sphère élastique homogène 	Dégonflement sphérique	 $0,5 < E < 25 \text{ Pa}$
Suite	Mesures quantitatives de l'extraction de lipides par les CD sur les gel-GUVs	Etude du comportement en adhésion = $f(\eta \text{ et } E)$ sur Substrats hydrophobes	Effet du taux de réticulation sur les patches	Effets de E et η sur le comportement sous flux en milieu confiné ou non confiné	Effet de la viscosité sur la forme et la relaxation des formes transitoires	

FIG. 10.3: Informations "structurales" apportés par les différentes techniques que nous avons utilisées et structures mises en évidence par leur intermédiaire pour les différents types d'objets que nous avons préparés dans cette étude.

Bibliographie

- [Abkarian, 2002] Abkarian, M. (2002). *Dynamique et formes d'enveloppes déformables sous champs externes : vésicules et globules rouges*. PhD thesis, Université Joseph Fourier - Grenoble.
- [Afroze et al., 2000] Afroze, F., Nies, E., and Berghmans, H. (2000). Phase transitions in the system poly(n-isopropylacrylamide)/water and swelling behaviour of the corresponding networks. *Journal of Molecular Structures*, 554 :55–68.
- [Angelova and Dimitrov, 1986] Angelova, M. and Dimitrov, D. (1986). Liposome electroformation. *Faraday Discuss. Chem. Soc.*, 81 :303 – 311.
- [Angelova and Menger, 1998] Angelova, M. and Menger, F. (1998). Giant vesicles : Imitating the cytological processes of cell membranes. *Acc. Chem. Res.*, 31 :789.
- [Balu, 2005] Balu, C. (2005). *Séparation de phases de polymères hydrosolubles thermosensibles*. PhD thesis, Université de Versailles - Saint Quentin en Yvelines.
- [Bathe et al., 2002] Bathe, M., Shirai, A., Doerschuk, C., and Kamm, R. (2002). Neutrophil transit times through pulmonary capillaries : The effects of capillary geometry and fmlp-stimulation. *Biophysical Journal*, 83 :1717.
- [Bernard et al., 2002] Bernard, A.-L., Guedeau-Boudeville, M.-A., Jullien, L., and di Meglio, J.-M. (2002). Raspberry vesicles. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1-5 :1567.
- [Bickel, 2001] Bickel, T. (2001). *Interactions polymères-membranes : une approche locale*. PhD thesis, Université Louis Pasteur - Strasbourg.
- [Bickel et al., 2000] Bickel, T., Marques, C., and Jeppesen, C. (2000). Pressure patches for membranes : The induced pinch of a grafted polymer. *Physical Review E*, 62 :1124.
- [Billot, 2005] Billot, V. (2005). *Deux approches de l'interaction entre membranes et supramolécules : effets de polymères et de cyclodextrines*. PhD thesis, Université Louis Pasteur, Strasbourg.
- [Borghi, 2006] Borghi, N. (2006). *Nanotubes membranaires : extrusion hydrodynamique*. PhD thesis, Université Paris 6.
- [Boroske et al., 1981] Boroske, E., Elwenspoek, M., and Helfrich, W. (1981). Osmotic shrinkage of giant egg-lecithin vesicles. *Biophysical Journal*, 34 :95 – 109.
- [Boudou et al., 2006] Boudou, T., Ohayon, J., Arntz, Y., Finet, G., Picart, C., and Tracqui, P. (2006). An extended modeling of the micropipette aspiration experiment for the characterization of the young's modulus and poisson's ratio of adherent thin biological samples : Numerical and experimental studies. *Journal of Biomechanics*, 39 :1677 – 1685.

- [Boulbitch et al., 2001] Boulbitch, A., Guttenberg, Z., and Sackmann, E. (2001). Kinetics of membrane adhesion mediated by ligand-receptor interaction studied with a biomimetic system. *Biophysical Journal*, 81 :2743–2751.
- [Brochard and Lennon, 1975] Brochard, F. and Lennon, J. (1975). Frequency spectrum of flicker phenomenon in erythrocytes. *Journal de Physique*, 36 :1035–1047.
- [Brochard-Wyart et al., 2006] Brochard-Wyart, F., Borghi, N., Cuvelier, D., and Nassoy, P. (2006). Hydrodynamic narrowing of tubes extruded from cells. *PNAS*, 20 :7660 – 7663.
- [Brooks et al., 1991a] Brooks, J., Marques, C., and Cates, M. (1991a). The effect of adsorbed polymer on the elastic moduli of surfactant bilayers. *J. Phys. II*, 1 :673–690.
- [Brooks et al., 1991b] Brooks, J., Marques, C., and Cates, M. (1991b). Role of adsorbed polymer in bilayer elasticity. *Europhy. Lett.*, 14 :713–718.
- [Clément and Joanny, 1997] Clément, F. and Joanny, J.-F. (1997). Curvature elasticity of an adsorbed polymer layer. *J. Phys. II (France)*, 7 :973.
- [Cohen-Addad, 1996] Cohen-Addad, J. (1996). *Physical Properties of Polymeric Gels*. Wiley & Sons.
- [Cuvelier et al., 2005] Cuvelier, D., Derényi, I., Bassereau, P., and Nassoy, P. (2005). Coalescence of membrane tethers : experiments, theory and applications. *Biophys. J.*, 88 :2714–26.
- [Cuvelier and Nassoy, 2004] Cuvelier, D. and Nassoy, P. (2004). Hidden dynamics of vesicle adhesion by specific stickers. *Physical Review Letters*, 93 :228101–1.
- [de Azevedo et al., 2001] de Azevedo, R. G., Rebelo, L., Ramos, A., Szydłowski, J., de Sousa, H., and Klein, J. (2001). Phase behaviour of (polyacrylamides + water) solutions : concentration, pressure and isotope effects. *Fluid Phase Equilibria*, 185 :189–198.
- [de Gennes, 1979] de Gennes, P.-G. (1979). *Scaling Concepts in Polymer Physics*. Cornell University Press.
- [Dominak and Keating, 2007] Dominak, L. and Keating, C. (2007). Polymer encapsulation within giant lipid vesicles. *Langmuir*, 23 :7148 – 7154.
- [Endo et al., 2000] Endo, H., Allgaier, J., Gompper, G., Jakobs, B., Monkenbusch, M., Richter, D., Sottmann, T., and Strey, R. (2000). Membrane decoration by amphiphilic block copolymers in bicontinuous microemulsions. *Physical Review Letters*, 85 (1) :103.
- [Evans, 1983] Evans, E. (1983). Bending elastic modulus of red blood cell membrane derived from buckling instability in micropipet aspiration tests. *Biophysical Journal*, 43 :27–30.
- [Evans et al., 1996] Evans, E., Bowman, H., Leung, A., Needham, D., and Tirell, D. (1996). Biomembrane templates for nanoscale conduits and networks. *Science*, 273 :933 – 935.
- [Evans and Rawicz, 1990] Evans, E. and Rawicz, W. (1990). Entropy-driven tension and bending elasticity in condensed-fluid membranes. *Physical Review Letters*, 64, number 17 :2094–2097.
- [Evans and Rawicz, 1997] Evans, E. and Rawicz, W. (1997). Elasticity of "fuzzy" membranes. *Physical Review Letters*, 79 :2379.
- [Evans and Yeung, 1989] Evans, E. and Yeung, A. (1989). Apparent viscosity and cortical tension of blood granulocytes determined by micropipet aspiration. *Biophysical Journal*, 56 :151–160.

- [Fa, 2003] Fa, N. (2003). *Micro-rhéologie de vésicules géantes*. PhD thesis, Université Louis Pasteur, Strasbourg.
- [Fabry et al., 2001] Fabry, B., Maksym, G., and M. Glogauer, J. B., Navajas, D., and Fredberg, J. (2001). Scaling the microrheology of living cells. *Physical Review Letters*, 87 :148102–1.
- [Faivre, 2006] Faivre, M. (2006). *Gouttes, vésicules et globules rouges : Déformabilité et comportement sous écoulement*. PhD thesis, Université Joseph Fourier - Grenoble.
- [Fournier et al., 2001] Fournier, J.-B., Ajdari, A., and Peliti, L. (2001). Effective-area elasticity and tension of micromanipulated membranes. *Phys. Rev. Lett.*, 86 :4970 – 4973.
- [Frette et al., 1999] Frette, V., Tsafirir, I., Guedeau-Boudeville, M.-A., Jullien, L., Kandel, D., and Stavans, J. (1999). Coiling of cylindrical membranes stacks with anchored polymers. *Physical Review Letters*, 83 :2465.
- [Fujishige et al., 1989] Fujishige, S., Kubota, K., and Ando, I. (1989). Phase transition of aqueous solutions of poly(n-isopropylacrylamide) and poly(n-isopropylmethacrylamide). *J. Phys. Chem.*, 93 :3311–3313.
- [Gibson and Lanni, 1989] Gibson, S. and Lanni, F. (1989). Diffraction by a circular aperture as a model for three-dimensional optical microscopy. *J. Opt. Soc. Am. A*, 6 :1357.
- [Gundogan et al., 2002] Gundogan, N., Melekaslan, D., and Okay, O. (2002). Rubber elasticity of poly(n-isopropylacrylamide) gels at various charge densities. *Macromolecules*, 35 :5616–5622.
- [Gutmayer et al., 2006] Gutmayer, D., Thomann, R., Bakowsky, U., and Schubert, R. (2006). Synthesis of a polymer skeleton at the inner leaflet of liposomal membranes : Polymerization of membrane-adsorbed pH-sensitive monomers. *Biomacromolecules*, 7 :1422–1428.
- [Han et al., 2006] Han, H., Shin, B., and Choi, H. (2006). Doxorubicin-encapsulated thermo-sensitive liposomes modified with poly(n-isopropylacrylamide-co-acrylamide) : Drug release behavior and stability in the presence of serum. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 62 :110–116.
- [Hayashi et al., 1999] Hayashi, H., Kono, K., and Takagishi, T. (1999). Temperature sensitization of liposomes using copolymers of n-isopropylacrylamide. *Bioconjugate Chem.*, 10 :412–418.
- [Helfrich et al., 2002] Helfrich, M., Mangeney-Slavin, L., Long, M. S., Djoko, K., and Keating, C. (2002). Aqueous phase separation in giant vesicles. *J. Am. Chem. Soc.*, 124 :13374–13375.
- [Heskins and Guillet, 1968] Heskins, H. and Guillet, J. (1968). Solutions properties of poly(n-isopropylacrylamide). *J. Macromol. Sci. - Chem.*, A2 (8) :1441–1455.
- [Hiergeist and Lipowsky, 1996] Hiergeist, C. and Lipowsky, R. (1996). Elastic properties of polymer-decorated membranes. *J. Phys. II France*, 6 :1465–1481.
- [Hirokawa and Tanaka, 1984] Hirokawa, Y. and Tanaka, T. (1984). Volume phase transition in a nonionic gel. *J. Phys. Chem.*, 81 (12) :6379.
- [Hochmuth, 2000] Hochmuth, R. (2000). Micropipette aspiration of living cells. *Journal of Biomechanics*, 33 :15–22.

- [Hoffmann et al., 1997] Hoffmann, U., Rotsch, C., Parak, W., and Radmacher, M. (1997). Investigating the cytoskeleton of chicken cardiocytes with the atomic force microscope. *Journal of Structural Biology*, 119 :84–91.
- [Israelachvili, 1985] Israelachvili, J. (1985). *Intermolecular and Surface Forces*. Academic Press.
- [Jean, 2000] Jean, B. (2000). *Un polymère thermosensible à l'interface eau-air : interaction avec les tensioactifs et stabilisation de films minces*. PhD thesis, Université Paris 6.
- [Jesorka et al., 2005] Jesorka, A., Markström, M., and Orwar, O. (2005). Controlling the internal structure of giant unilamellar vesicles by means of reversible temperature dependant sol-gel transition of internalized poly(n-isopropylacrylamide). *Langmuir*, 21 (4) :1230 – 1237.
- [Jin et al., 1996] Jin, T., Pennefeather, P., and Lee, P. (1996). Lipobeads : a hydrogel anchored lipid vesicle system. *FEBS Let*, 397 :70.
- [Joannic et al., 1997] Joannic, R., Auvray, L., and Lasic, D. (1997). Monodisperse vesicles stabilized by grafted polymers. *Physical Review Letters*, 78 (17) :3402.
- [Jones et al., 1999] Jones, W., Ting-Beall, H. P., Lee, G., Kelley, S., Hochmuth, R., and Guilak, F. (1999). Alterations in the young's modulus and volumetric properties of chondrocytes isolated from normal and osteoarthritic human cartilage. *Journal of Biomechanics*, 32 :119 – 127.
- [Karatekin et al., 2003] Karatekin, E., Sandre, O., Guitouni, H., Borghi, N., Puech, P., and Brochard-Wyart, F. (2003). Cascades of transient pores in giant vesicles : Line tension and transport. *Biophysical Journal*, 84 :1734–1749.
- [Karlsson et al., 2001] Karlsson, A., Karlsson, R., Karlsson, M., Cans, A.-S., Stromberg, A., Ryttsen, F., and Orwar, O. (2001). Networks of nanotubes and containers. *Nature*, 409 :150.
- [Karlsson et al., 2005] Karlsson, A., Sott, K., Marström, M., Davidson, M., Konkoli, Z., and Orwar, O. (2005). Controlled initiation of enzymatic reactions in micrometer-sized biomimetic compartments. *Journal of Physical Chemistry B*, 109 :1609–1617.
- [Kato et al., 2001] Kato, N., Sakai, Y., and Takahashi, F. (2001). Saccharide effect on the deswelling process of the thermosensitive poly(n-isopropylacrylamide) gel. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 74 :2025–2029.
- [Kazakov et al., 2003] Kazakov, S., Kaholek, M., Kudasheva, D., Teraoka, I., Cowman, M., and Levon, K. (2003). Poly(n-isopropylacrylamide-co-1-vinylimidazole) hydrogel nanoparticles prepared and hydrophobically modified in liposome reactors : Atomic force microscopy and dynamic light scattering study. *Langmuir*, 19 :8086–8093.
- [Kazakov et al., 2002] Kazakov, S., Kaholek, M., Teraoka, I., and Levon, K. (2002). UV-induced gelation on nanometer scale using liposome reactor. *Macromol*, 35 :1911.
- [Kiser et al., 1998] Kiser, P., Wilson, G., and Needham, D. (1998). A synthetic mimic of the secretory granule for drug delivery. *Nature*, 394 :459.
- [Kubota et al., 1990] Kubota, K., Fujishige, S., and Ando, I. (1990). Single-chain transition of poly(n-isopropylacrylamide) in water. *J.Phys. Chem.*, 94 :5154–5158.

- [Kwok and Evans, 1981] Kwok, R. and Evans, E. (1981). Thermoelasticity of large lecithin bilayer vesicles. *Biophysical J.*, 35 :637–652.
- [Laszlo et al., 2004] Laszlo, K., Kosik, K., and Geissler, E. (2004). High-sensitivity isothermal and scanning microcalorimetry in pnipa hydrogels around the volume phase transition. *Macromolecules*, 37 :10067–10072.
- [Lide, 2001] Lide, D. (2001). *CRC Handbook of Chemistry and Physics*. Chapman & Hall/CRC.
- [Lim et al., 2002] Lim, G., Wortis, M., and Mukhopadhyay, R. (2002). Stomatocyte-discocyte-echinocyte sequence of the human red blood cell : Evidence for the bilayer-couple hypothesis from membrane mechanics. *PNAS*, 99 :16766.
- [Limozin et al., 2005] Limozin, L., Roth, A., and Sackmann, E. (2005). Microviscoelastic moduli of biomimetic cell envelopes. *Phys. Rev. Lett.*, 95 :178101.
- [Limozin and Sackmann, 2002] Limozin, L. and Sackmann, E. (2002). Polymorphism of cross-linked actin networks in giant vesicles. *Physical Review Letters*, 89 (16) :168103.
- [Lipowsky et al., 1998] Lipowsky, R., Döbereiner, H., Hiergeist, C., and Indrani, V. (1998). Membrane curvature induced by polymers and colloids. *Physica A*, 249 :536–543.
- [Lipowsky and Sackmann, 1995] Lipowsky, R. and Sackmann, E. (1995). *Structure and dynamics of Membranes*. Elsevier.
- [Manneville, 1999] Manneville, J.-B. (1999). *Fluctuations de membranes actives*. PhD thesis, Université Paris 7 - Denis Diderot.
- [Matzelle et al., 2003] Matzelle, T., Geuskens, G., and N.Kruse (2003). Elastic properties of poly(n-isopropylacrylamide) and poly(acrylamide) hydrogels studied by scanning force microscopy. *Macromolecules*, 36 :2926–2931.
- [Miao et al., 1994] Miao, L., Seifert, U., Wortis, M., and Döbereiner, H.-G. (1994). Budding transitions of fluid-bilayer vesicles : The effect of area-difference elasticity. *Phys. Rev. E*, 49 :5389 – 5407.
- [Milner et al., 1988] Milner, S., Witten, T., and Cates, M. (1988). Theory of the grafted polymer brush. *Macromolecules*, 21 :2611.
- [Mui et al., 1995] Mui, B., Döbereiner, H., Madden, T., and Cullis, P. (1995). Influence of transbilayer area asymmetry on the morphology of large unilamellar vesicles. *Biophys. J.*, 69 :930–941.
- [Ng et al., 2004] Ng, C., Cheng, Y.-L., and Pennefather, P. (2004). Properties of a self-assembled phospholipid membrane supported on lipobeads. *Biophys. J.*, 87 :323–331.
- [Nicolas and Fourcade, 2003] Nicolas, A. and Fourcade, B. (2003). Polymers grafted to a fluid and flexible membrane : extreme sensitivity to the grafting density. *Eur. Phys. J. E*, 10 :355–367.
- [Nikolov et al., 2007] Nikolov, V., Lipowsky, R., and Dimova, R. (2007). Behavior of giant vesicles with anchored dna molecules. *Biophysical Journal*, 92 :4356–4368.
- [Noireaux and Libchaber, 2004] Noireaux, V. and Libchaber, A. (2004). A vesicle bioreactor as a step toward an artificial cell assembly. *PNAS*, 101 :17669–17674.

- [Olbrich et al., 2000] Olbrich, K., Rawicz, W., Needham, D., and Evans, E. (2000). Water permeability and mechanical strength of polyunsaturated lipid bilayers. *Biophysical Journal*, 79 :321–327.
- [Otake et al., 1990] Otake, K., Inomata, H., Konno, M., and Saito, S. (1990). Thermal analysis of the volume phase transition with n-isopropylacrylamide gels. *Macromolecules*, 23 :1990.
- [Papahadjopoulos et al., 1991] Papahadjopoulos, D., Allen, T., Gabizon, A., E., M., Matthey, K., Huang, S., Lee, K., Woodle, M., Lasic, D., Redemann, C., and Martin, F. (1991). Sterically stabilized liposomes : Improvements in pharmacokinetics and antitumor therapeutic efficacy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88 :11460 – 11464.
- [Pécéréaux, 2004] Pécéréaux, J. (2004). *Mesure du spectre de fluctuations de vésicules géantes par analyse de contours : application aux membranes passives et actives*. PhD thesis, Université Paris 6.
- [Pincet et al., 1999] Pincet, F., Cribier, S., and Perez, E. (1999). Bilayers of neutral lipids bear a small but significant charge. *Eur. Phys. J. B*, 11 :127–130.
- [Quemeneur et al., 2007] Quemeneur, F., Rammal, A., Rinaudo, M., and Pépin-Donat, B. (2007). Large and giant vesicles "decorated" with chitosan : Effects of ph, salt or glucose stress, and surface adhesion. *Biomacromolecules*, 8 :2512–2519.
- [Radmacher, 1997] Radmacher, M. (1997). Measuring the elastic properties of biological samples with the afm. *IEEE Engineering in Medicine and Biology*, March/April :47.
- [Rawicz et al., 2000] Rawicz, W., Olbrich, K., McIntosh, T., Needham, D., and Evans, E. (2000). Effect of chain length and unsaturation on elasticity of lipid bilayers. *Biophysical J.*, 79 :328–339.
- [Ringsdorf et al., 1993] Ringsdorf, H., Sackmann, E., Simon, J., and Winnik, F. (1993). Interactions of liposomes and hydrophobically-modified poly-(n-isopropylacrylamides) : an attempt to model the cytoskeleton. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1153 :335–344.
- [Rodriguez et al., 2005] Rodriguez, N., Pincet, F., and Cribier, S. (2005). Giant vesicles formed by gentle hydration and electroformation : A comparison by fluorescence microscopy. *Colloids and Surfaces B : Biointerfaces*, 42 :125–130.
- [Rossier et al., 2003] Rossier, O., Cuvelier, D., Borghi, N., Puech, P.-H., Derényi, I., Buguin, A., Nassoy, P., and Brochart-Wyart, F. (2003). Giant vesicles under flows : Extrusion and retraction of tubes. *Langmuir*, 19 :575 – 584.
- [Rotsch et al., 1997] Rotsch, C., Braet, F., Wisse, E., and Radmacher, M. (1997). Afm imaging and elasticity measurements on living rat macrophages. *Cell Biology International*, 21 :685–696.
- [Rotsch and Radmacher, 2000] Rotsch, C. and Radmacher, M. (2000). Drug-induced changes of cytoskeletal structure and mechanics in fibroblasts : An atomic force microscopy study. *Biophysical Journal*, 78 :520–535.
- [Sabri et al., 2000] Sabri, S., Soler, M., Foa, C., Pierres, A., Benoliel, A., and Bongrand, P. (2000). Glycocalyx modulation is a physiological means of regulating cell adhesion. *Journal of Cell Science*, 113 :1589–1600.

- [Sandre, 2000] Sandre, O. (2000). *Pores transitoires, adhésion et fusion de vésicules géantes*. PhD thesis, Université Paris.
- [Sazaki and Koga, 2002] Sazaki, S. and Koga, S. (2002). Slow relaxation of the elastic n-isopropylacrylamide gel. *Macromolecules*, 35 :857–860.
- [Schild, 1992] Schild, H. (1992). Poly(n-isopropylacrylamide) : Experiment, theory and applications. *Progress in Polymer Science*, 17 :163 – 249.
- [Scott-Long et al., 2005] Scott-Long, M., Jones, C., Helfrich, M., Mangeney-Slavin, L., and Keating, C. (2005). Dynamic microcompartmentation in synthetic cells. *PNAS*, 102 (17) :5920–5925.
- [Seifert and Lipowsky, 1990] Seifert, U. and Lipowsky, R. (1990). Adhesion of vesicles. *Physical Review A*, 42 :4768–4771.
- [Shiga et al., 1990] Shiga, T., Meada, N., and Kon, K. (1990). Erythrocyte rheology. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 10 (1) :88.
- [Simon et al., 1995] Simon, J., Kühner, M., Ringsdorf, H., and Sackmann, E. (1995). Polymer-induced shape changes and capping in giant liposomes. *Chemistry and Physics of Lipids*, 76 :241–258.
- [Stauch et al., 2002a] Stauch, O., Schubert, R., Savin, G., and Burchard, W. (2002a). Structure of artificial cytoskeleton containing liposomes in aqueous solution studied by static and dynamic light scattering. *Biomacromolecules*, 3 :565–578.
- [Stauch et al., 2002b] Stauch, O., Uhlmann, T., Fröhlich, M., Thomann, R., El-Badry, M., Kim, Y.-K., and Schubert, R. (2002b). Mimicking a cytoskeleton by coupling poly(n-isopropylacrylamide) to the inner leaflet of liposomal membranes : Effects of photopolymerization on vesicle shape and polymer architecture. *Biomacromolecules*, 3 :324–332.
- [Steiner, 2004] Steiner, G. (2004). Surface plasmon resonance imaging. *Anal. Bioanal. Chem.*, 379 :328–331.
- [Suraniti et al., 2007] Suraniti, E., Tumolo, T., Baptista, M., Livache, T., and Calemczuk, R. (2007). Construction of hybrid bilayer membrane (hbm) biochips and characterization of the cooperative binding between cytochrome-c and hbm. *Langmuir*, 23 :6835 – 6842.
- [Szostak et al., 2001] Szostak, J., Bartel, D., and Luisi, P. L. (2001). Synthetising life. *Nature*, 409 :387.
- [Théret et al., 1988] Théret, D., Levesque, M., Sato, M., Nerem, R., and Wheeler, L. (1988). The application of a homogeneous half-space model in the analysis of endothelial cell micropipette measurements. *Transactions of the ASME*, 110 :190.
- [Trepap et al., 2007] Trepap, X., Deng, L., An, S., Navajas, D., Tschumperlin, D., Gerthoffer, W., Butler, J., and Fredberg, J. (2007). Universal physical responses to stretch in the living cell. *Nature*, 447 :592.
- [Tsafrir et al., 2003] Tsafrir, I., Caspi, Y., Guedeau-Boudeville, M.-A., Arzi, T., and Stavans, J. (2003). Budding and tubulation in highly oblate vesicles by anchored amphiphilic molecules. *Physical Review Letters*, 91 :138102–1.
- [Viallat et al., 2004] Viallat, A., Dalous, J., and Abkarian, M. (2004). Giant lipid vesicles filled with a gel : Shape instability induced by osmotic shrinkage. *Biophysical Journal*, 86 :2179–2187.

- [Walde et al., 1994] Walde, P., Goto, A., Monnard, P.-A., Wessicken, M., and Luisi, P.-L. (1994). Oparin's reactions revisited : Enzymatic synthesis of poly(adenylic acid) in micelles and self-reproducing vesicles. *JACS*, 116 :7541–7547.
- [Wang et al., 2005] Wang, J., Guo, K., Qiu, F., Zhang, H., and Yang, Y. (2005). Predicting shapes of polymer-chain-anchored fluid vesicles. *Physical Review E*, 71 :041908–1.
- [Wang et al., 1998] Wang, X., Qiu, X., and Wu, C. (1998). Comparison of the coil-to-globule and the globule-to-coil transitions of a single poly(n-isopropylacrylamide) homopolymer chain in water. *Macromolecules*, 31 (9) :2972 – 2976.
- [Warriner et al., 1998] Warriner, H., Keller, S., Idziak, S., Slack, N., Davidson, P., Zasadzinski, J., and Safinya, C. (1998). The influence of polymer molecular weight in lamellar gels based on peg-lipids. *Biophysical Journal*, 75 :272–293.
- [Winnik et al., 1993] Winnik, F., Ottaviani, M. F., Bossman, S., Pan, W., Garcia-Garibay, M., and Turro, J. (1993). Phase separation of poly(n-isopropylacrylamide) in water : A spectroscopic study of a polymer tagged with a fluorescent dye and a spin label. *J. Phys. Chem.*, 97 :12998–13005.
- [Wintz et al., 1996] Wintz, W., Döbereiner, H., and Seifert, U. (1996). Starfish vesicles. *Europhys. Lett.*, 33 (5) :403–408.
- [Yang et al., 1998] Yang, Y., Prudhomme, R., McGrath, K., Richetti, P., and Marques, C. M. (1998). Confinement of polysoaps in membrane lyotropic phases. *Physical Review Letters*, 80 (12) :2729.
- [Zhu et al., 2000] Zhu, C., Bao, G., and Wang, N. (2000). Cell mechanics : Mechanical response, cell adhesion and molecular deformation. *Annu. Rev. Eng.*, 02 :189–226.