



**HAL**  
open science

# Adhésion cellulaire et tubes de membrane: Quelques aspects dynamiques, mécaniques et rhéologiques

Damien Cuvelier

► **To cite this version:**

Damien Cuvelier. Adhésion cellulaire et tubes de membrane: Quelques aspects dynamiques, mécaniques et rhéologiques. Biophysique [physics.bio-ph]. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2005. Français. NNT: . tel-00010490

**HAL Id: tel-00010490**

**<https://theses.hal.science/tel-00010490>**

Submitted on 8 Oct 2005

**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 PARIS 6

Spécialité :

Matière Condensée : Chimie et Organisation

Présentée par

**Damien CUVELIER**

Pour obtenir le grade de

**DOCTEUR de l'UNIVERSITE PARIS 6**

Sujet de la thèse :

Adhésion cellulaire et tubes de membrane :  
Quelques aspects dynamiques, mécaniques et rhéologiques.

Soutenue le 10 Juin 2005 devant le jury composé de :

Mme Françoise BROCHARD-WYART	Président
M. Pierre BONGRAND	Rapporteur
M. Ken RITCHIE	Rapporteur
M. Didier CHATENAY	Examineur
Mme Marileen DOGTEROM	Examineur
M. Elie RAPHAEL	Examineur
Mme Patricia BASSEREAU	Directrice de thèse
M. Pierre NASSOY	Co-directeur de these





# Tables des matières

<b>Tables des matières</b>	<b>1</b>
<b>Introduction générale</b>	<b>9</b>
<b>Partie 1 : Adhésion cellulaire</b>	<b>13</b>
<b>Chapitre I. Introduction : Généralités</b>	<b>15</b>
I.A. Nature des interactions moléculaires	15
I.A.1. Interactions non-spécifiques	16
I.A.1.a. Interactions électrostatiques	16
I.A.1.b. Interactions de Van der Waals	17
I.A.1.c. Interactions de solvatation et stériques	17
I.A.2. Interactions spécifiques	18
I.A.2.a. Interaction type clef-serrure	18
I.A.2.b. Exemples de molécules de l'adhésion cellulaire	19
I.A.2.c. Couple récepteur/ligand modèle : streptavidine/biotine	21
I.B. Adhésion cellulaire : de la cellule vivante à des systèmes biomimétiques	22
I.B.1. Adhésion de cellules vivantes : quelques éléments de biologie cellulaire	23
I.B.2. Adhésion de vésicules synthétiques : approche physique	27
I.B.2.a. Cadre théorique	27
I.B.2.a.i. Etude statique : morphologie de vésicules adhérees à l'équilibre	27
I.B.2.a.ii. Etude dynamique de l'étalement d'une vésicule sur une surface	30
I.B.2.b. Expériences de dynamique d'adhésion de vésicules	33
Bibliographie : Chapitre I	37
<b>Chapitre II. Système d'étude et technique expérimentale choisie</b>	<b>41</b>
II.A. Trois niveaux de complexité	41
II.A.1. Les vésicules	42
II.A.1.a. La membrane d'une vésicule est liquide	42
II.A.1.b. La membrane d'une vésicule peut se courber et se "tendre"	43
II.A.1.b.i. Déformations de membrane	43
II.A.1.b.ii. Tension de membrane	46
II.A.2. Les globules rouges	49
II.A.3. Les cellules	52
II.B. Technique de visualisation : microscopie par réflexion à contraste interférentiel	55
II.B.1. Introduction bibliographique	55
II.B.2. Principe : Comment obtenir une image en microscopie à contraste interférentiel?	56

## Table des matières

II.B.3.	Analyse quantitative d'images RICM	58
	Bibliographie : Chapitre II	62
<b>Chapitre III. Surfaces biomimétiques pour l'adhésion cellulaire</b>		<b>67</b>
III.1.	Premiers écueils : la décoration d'une surface avec des molécules spécifiques n'assure pas une adhésion spécifique de vésicules/cellules	68
III.2.	Passivation de surface vis-à-vis des interactions non-spécifiques	69
III.2. a.	Principe général et exemples	69
III.2. b.	Nos deux protocoles de passivation	72
III.2.b.i.	Adsorption de caséine	72
III.2.b.ii.	Greffage de PolyEthylène Glycol (PEG)	73
III.3.	Bio-Fonctionnalisation de surfaces pour l'adhésion cellulaire	76
III.4.	Bio-fonctionnalisation de surfaces spatialement hétérogènes: Technique de micro-impression par contact et par capillarité reactive	78
III.4.a.	Introduction aux techniques de micro-impression de surfaces	80
III.4.b.	Notre approche : Impression couplée par micro-contact et capillarité	85
III.4.b.i.	Protocoles de préparation des surfaces à motifs « adhérents/antiadhérents »	85
III.4.b.ii.	Visualisation des surfaces à motifs par microscopie de fluorescence	86
III.5.	Comportement de globules rouges et de vésicules géantes sur des surfaces à motifs « adhérents/non-adhérents »	88
III.6.	Applications variées	94
	Bibliographie : Chapitre III	96
<b>Chapitre IV. Dynamique d'adhésion de vésicules induite par des interactions spécifiques</b>		<b>101</b>
IV.1.	Matériels et expérience préliminaire	102
IV.1.a.	Vésicules et Surfaces	102
IV.1.b.	Visualisation de la forme de vésicules en cours d'étalement	104
IV.2.	Visualisation de la zone de contact d'une vésicule en cours d'étalement sur un substrat	106
IV.2.a.	Mesure du rayon de contact de la zone d'adhésion par RICM	106
IV.2.b.	Profil de densité des molécules de streptavidine dans la zone d'adhésion déterminé par microscopie de fluorescence	109
IV.2.c.	Analyse des franges d'interférence et limitations de la microscopie à contraste interferential	110
IV.3.	Résultats expérimentaux	115
IV.4.	Analyse théorique	117
IV.4.a.	Hypothèses de travail	117
IV.4.b.	Cas des surfaces « PEG-biotine » : le ligand est connecté à un long espaceur flexible	118
IV.4.b.i.	Vésicules saturées en récepteurs : comportement de goutte collante	118

## Table des matières

IV.4.b.ii.	Vésicules faiblement couvertes de récepteurs : dynamique d'étalement gouvernée par la diffusion	121
IV.4.b.iii.	Arrêt de l'étalement limité par la tension de membrane	123
IV.4.c.	Cas des surfaces « caséine-biotine » : le ligand est connecté à un court espaceur rigide	125
IV.4.c.i.	Evolution de l'énergie d'adhésion au cours de l'étalement	125
IV.4.c.ii.	Dynamique d'étalement contrôlée par une cinétique de réaction récepteur-ligand ralentie en géométrie bidimensionnelle	126
IV.4.c.iii.	Éléments de validation supplémentaires du modèle	131
IV.4.c.iv.	Constante d'association récepteur-ligand à deux dimensions ?	132
IV.4.d.	Résumé des comportements observés	133
IV.5.	Interprétation des données obtenues par le groupe de Sackmann	133
	Bibliographie : Chapitre IV	137
<b>Chapitre V. Dynamique d'adhésion de cellules</b>		<b>139</b>
V.1.	Travaux antérieurs et enseignements	139
V.1.a.	D'une adhésion passive à un étalement actif : découplage des échelles de temps ?	140
V.1.b.	Adhésion cellulaire spécifique : la dynamique d'étalement n'est pas contrôlée par la diffusion des protéines d'adhésion	141
V.1.c.	Etalement induit par des interactions spécifiques ou non-spécifiques de fortes similitudes	143
V.1.d.	Modèle théorique existant	145
V.2.	Matériaux et Méthodes	146
V.2.a	Surfaces spécifiques et non-spécifiques	147
V.2.b	Cellules : parentales, transfectées, « droguées » et énuclées	148
V.2.c	Visualisation par microscopie à contraste interférentiel	150
V.3.	Résultats expérimentaux	152
V.3.a.	Adhésion de cellules exprimant des intégrines sur des surfaces couvertes de fibronectine	152
V.3.b.	Adhésion de cellules exprimant des cadhérines sur des surfaces décorées de cadhérines	153
V.3.c.	Comportement de cellules énuclées	154
V.4.	Modèle théorique	156
V.4.a.	La cellule : Une goutte à coque visqueuse?	156
V.4.b.	Dynamique d'étalement d'une coque visqueuse	158
V.4.b.i.	Aux temps courts	159
V.4.b.ii.	Aux temps longs	161
V.5.	Discussion : validation du modèle et expériences supplémentaires	163

## Table des matières

V.5.a.	Cellules possédant un cortex d'actine intact et interagissant spécifiquement avec une surface décorée de ligands	163
V.5.a.i.	Cellules intactes : récapitulatif	163
V.5.a.ii.	Influence des microtubules	165
V.5.a.iii.	Influence des filopodes	167
V.5.b.	Cellules sans cortex d'actine interagissant spécifiquement avec une surface de verre modifiée	169
V.5.c.	Cellules interagissant avec des surfaces non-spécifiques	171
V.6.	Observations supplémentaires : influence du nocodazole sur l'activité de la cellule	173
V.6.a.	Dynamique des « blebs »	173
V.6.b.	Restauration des microtubules...et « lévitation » du noyau	176
V.7.	Le cas des globules rouges : cellule, vésicule ou hybride ?	177
V.7.a.	Dynamique d'adhésion de globules rouges couverts de streptavidine sur des surfaces biotinylées	177
V.7.b.	Discussion	178
V.8.	Conclusion	180
	Bibliographie : Chapitre V	181
<b>Partie 2 : Tubes de membranes</b>		<b>187</b>
<b>Chapitre I. Introduction aux tubes de membrane</b>		<b>189</b>
I.1.	Première observation reportée	189
I.2.	De la théorie des tubes de globules rouges aux tubes de vésicules	190
I.2.a.	Détermination du rayon d'un tube de membrane à tension contrôlée	190
I.2.b.	Détermination de la force pour maintenir un tube de membrane	191
I.2.c.	Forme d'un tube de membrane et courbe force-extension	194
I.2.c.i.	Le tube est pratiquement un cylindre parfait	194
I.2.c.ii.	L'extraction d'un tube peut être vue comme une transition du premier ordre	195
I.3.	Comment extraire un tube de membrane?	196
I.4.	Les tubes de membranes : Objet d'étude pour biophysiciens ou réalité biologique	199
I.5.	Conclusion	202
	Bibliographie : Chapitre I	203
<b>Chapitre II. Pince optique et micromanipulation</b>		<b>207</b>
II.A.	Construction d'une pince optique adaptée	207
II.A.1.	Rappels théoriques et expérimentaux	207
II.A.1.a.	La pince optique est un micromanipulateur	207
II.A.1.b.	La pince optique est un capteur de force	209
II.A.1.c.	Réalisation pratique d'un piège optique	211

## Table des matières

II.A.1.d.	Quelques applications des pinces optiques en biologie et biophysique	213
II.A.2.	Notre pince optique	214
II.A.2.a.	Dispositif expérimental : piège unique et fixe	214
II.A.2.b.	Choix de la méthode de mesure de force	216
II.A.2.c.	Calibration	217
II.A.2.c.i.	Mesure des fluctuations	217
II.A.2.c.ii.	Force d'échappement	220
II.A.2.c.iii.	Mesure du déplacement de la bille en fonction du flux appliqué	221
II.A.2.c.iv.	Mesure du déplacement de la bille par oscillation de la chambre d'observation	222
II.B.	Micromanipulation par micropipettes	224
II.B.1.	Fabrication des micropipettes	224
II.B.2.	Système de pression	225
	Bibliographie : Chapitre II	228
<b>Chapitre III. Extraction de tube de membrane modèle à tension constante : validation du dispositif expérimental</b>		231
III.1.	Expériences et resultants	231
III.1.a.	Montage experimental	232
III.1.b.	Résultats	234
III.2.	Validation : détermination de la rigidité de courbure de membranes lipidiques	238
III.3.	Conclusion	240
	Bibliographie : Chapitre III	241
<b>Chapitre IV. Extraction de tube de membrane à surface constante</b>		243
IV.1.	Introduction et résumé de l'article : "Pulling long tubes from firmly adhered vesicles"	243
IV.2.	Article soumis	250
IV.3.	Application de l'extraction de tube à la détermination de tension de membrane	263
	Bibliographie : Chapitre IV	266
<b>Chapitre V. Coalescence de tubes de membrane</b>		269
V.1.	Introduction	269
V.2.	Expérience préliminaire	272
V.2.a.	Observation de la coalescence	273
V.2.b.	Mesure de force	275
V.2.c.	Explication intuitive du phénomène de coalescence	276
V.3.	Analyse théorique de la coalescence de tubes de membrane	277
V.4.	Résultats expérimentaux	280
V.4.a.	Confrontation avec les prédictions théoriques	280

## Table des matières

V.4.b.	Mesures indépendantes de la tension et de la rigidité de courbure d'une membrane_____	282
V.5.	Applications_____	284
V.5.a.	Détermination du module de courbure pour des vésicules rigides_____	284
V.5.b.	Détermination d'énergie d'adhésion vésicule-substrat_____	287
V.6.	Dynamique de coalescence_____	289
V.7.	Conclusion_____	291
	Bibliographie : Chapitre V_____	292
<b>Chapitre VI. Extraction de tubes de membrane à plusieurs lipides_____</b>		<b>295</b>
VI.1.	Introduction_____	295
VI.2.	Expériences_____	298
VI.2.a.	Tubes de vésicules en phase $L_o$ homogène_____	298
VI.2.b.	Tubes de vésicules présentant une séparation de phase_____	302
VI.3.	Remarque finale : force d'extraction de tube et rigidité de courbure de membranes biphasiques_____	306
VI.4.	Conclusion_____	308
	Bibliographie : Chapitre VI_____	309
<b>Chapitre VII. Extraction de tubes de membrane cellulaire : interaction membrane-cytosquelette et stabilité des cavéoles_____</b>		<b>311</b>
VII.A.	Mécanique et rhéologie des tubes de globules rouges_____	311
VII.A.1.	Propriétés mécaniques des globules rouges_____	312
VII.A.1.a.	Elasticité du globule rouge_____	312
VII.A.1.a.i.	Module d'élasticité d'extension de surface, $K_a$ _____	312
VII.A.1.a.ii.	Module d'élasticité de courbure, $\kappa$ _____	313
VII.A.1.a.iii.	Module d'élasticité extensionnelle ou module de cisaillement, $\mu$ _____	313
VII.A.1.b.	Viscosité du globule rouge_____	314
VII.A.2.	Réponse force-extension de tubes de membranes de globules rouges extraits par pince optique_____	314
VII.A.2.a.	Introduction : rappels historiques_____	315
VII.A.2.b.	Matériels et Méthodes_____	316
VII.A.2.c.	Allure des courbes force-temps_____	318
VII.A.2.d.	Force statique et énergie de séparation entre le squelette de spectrine et la membrane_____	319
VII.A.2.e.	Comparaison avec les vésicules lipidiques_____	320
VII.A.2.f.	Déformation élastique initiale du globule rouge_____	321
VII.A.2.g.	Un événement moléculaire de détachement membrane-cytosquelette à l'origine de la formation du tube_____	323

## Table des matières

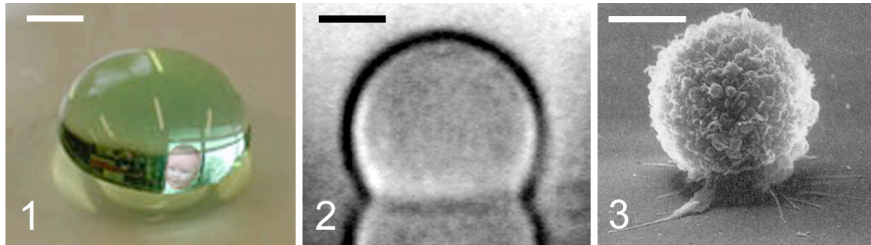
VII.A.2.h.	L'élongation des tubes révèle une réponse viscoélastique caractérisée par des effets rhéo-fluidifiants significatifs	326
VII.A.2.i.	Relaxation de la force à longueur constante vers la force d'équilibre	330
VII.A.2.j.	La rétraction de tubes à vitesse constante est caractérisée par une réponse élastique	332
VII.A.2.k.	La raideur du tube rétracté dépend de sa longueur initiale	334
VII.A.2.l.	Discussion	337
VII.A.3.	Rétraction « libre » d'un tube de globule rouge adhérent à une surface : phénomène de perlage (« pearling »)	340
VII.A.4.	Dé-coalescence d'une jonction de tubes de globule rouge	342
VII.A.5.	Coalescence de tubes dans les cellules?	345
VII.B.	Tubes de membrane cellulaire et stabilité des caveolae	347
VII.B.1.	Les caveolae : un micro-réservoir de membrane	347
VII.B.1.a.	Introduction	347
VII.B.1.b.	Expérience préliminaire	348
VII.B.2.	Vision physique de la structure des caveolae	349
Bibliographie : Chapitre VII		352
<b>Conclusion générale et perspectives</b>		<b>357</b>
<b>Annexes</b>		<b>I</b>
<b>Annexe A. Lipides utilisés</b>		<b>III</b>
<b>Annexe B. Electroformation des vésicules géantes</b>		<b>VII</b>
<b>Annexe C. Préparation des globules rouges bioinylés</b>		<b>XI</b>
<b>Annexe D. Fabrication du moule d'élastomère</b>		<b>XIII</b>



## Table des matières

# Introduction

## Du mouillage à l'adhésion cellulaire...



Les barres d'échelle des photographies 1, 2, 3 sont respectivement de 1mm, 10 $\mu$ m, 5 $\mu$ m

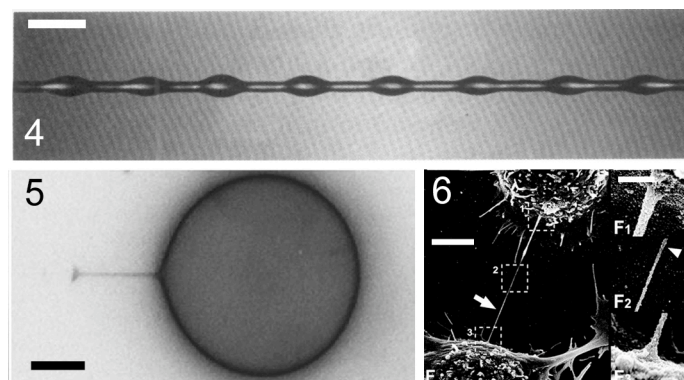
Une petite goutte d'eau de taille millimétrique posée sur une table prend la forme d'une calotte sphérique, si la table n'est ni trop propre ni trop sale (photographie 1). Au delà de cette observation de la vie quotidienne, l'aptitude d'un liquide à s'étaler ou non sur une surface peut avoir une importance considérable dans des domaines aussi variés que l'imprimerie, l'agriculture, l'industrie textile, cosmétique, automobile, pour n'en citer que quelques uns. La science du mouillage, qui permet non seulement d'expliquer la forme de ces gouttes en relation avec les propriétés surfaciques des substrats, mais aussi de savoir sur quels paramètres agir pour modifier ces interactions liquide-solide, est maintenant bien comprise.

De façon surprenante, une cellule de taille micrométrique qui commence à s'étaler sur une surface a une forme ressemblante à celle de la goutte précédente (photographie 3). Pourtant, il n'est pas besoin d'être expert en biologie cellulaire pour réaliser que la complexité d'une cellule *vivante* dépasse largement celle d'un liquide *inerte* aussi simple que l'eau ! D'ailleurs, contrairement à une goutte d'eau, une cellule n'a pas de forme d'équilibre sur un substrat, puisque, rapidement, elle peut se polariser, migrer et communiquer avec ses congénères. Toutefois, étant donnée la ressemblance morphologique frappante entre les photographies 1 et 3, nous pouvons nous interroger sur la nature des mécanismes mis en jeu au cours des premières étapes de l'adhésion d'une cellule. Faut-il prendre en compte toute la richesse de la signalisation biochimique intra-cellulaire ? Au contraire, une simplification extrême conduisant à assimiler la cellule à une goutte liquide serait-elle suffisante? Ou bien, à un niveau intermédiaire, l'assimilation de la cellule à une

membrane décorée de molécules d'adhésion spécifiques, bien identifiées par les biologistes, permettrait-elle de rendre compte correctement de la dynamique d'étalement ?

Conscients de l'importance biologique des CAMs (molécules de l'adhésion cellulaire), notre premier réflexe a été d'examiner le comportement d'un système modèle artificiel : des vésicules décorées de molécules d'adhésion s'étalant sur une surface de verre fonctionnalisée avec le partenaire moléculaire adéquat (photographie 2). Cela nous a conduit à développer des protocoles de préparation de surfaces bio-spécifiques, puis à mesurer et analyser quantitativement la dynamique d'adhésion de vésicules induite par ces interactions spécifiques. La pertinence biologique des mécanismes physiques dégagés de cette étude a été enfin testée en réalisant des expériences similaires sur des cellules. Comme on pouvait s'y attendre, une cellule n'est pas une vésicule ! Mais, de façon surprenante, sa dynamique d'étalement présente un caractère qui nous semble universel, et que nous avons essayé d'expliquer par un mécanisme physique simple.

## De l'instabilité de Rayleigh des cylindres de liquide à la stabilité des tubes de membrane cellulaire...



Les barres d'échelle des photographies 4, 5, 6 sont respectivement de 500  $\mu$ m, 5  $\mu$ m, 1  $\mu$ m

Un film d'eau qui gaine une fibre ou un cheveu est instable et préfère former un chapelet de gouttelettes (photographie 4). Cette instabilité, dite de Plateau-Rayleigh, est guidée par la tension de surface de liquide ; la configuration en perles développant une surface moins grande que celle du cylindre.

A l'inverse, comme on le voit sur la photographie 6, deux cellules peuvent communiquer par l'intermédiaire d'un nanotube membranaire, qui peut être stable sur de longues durées. L'origine de la stabilité de la structure tubulaire vient de la présence d'une rigidité de courbure de membrane qui contrebalance l'effet déstabilisant de la tension de surface.

La physique des tubes de membranes a été beaucoup étudiée d'un point de vue expérimental et théorique sur des vésicules lipidiques notamment. Ces tubes peuvent être formés mécaniquement par l'application d'une force extérieure ponctuelle (photographie 5).

Au cours de cette thèse, nous avons cherché à approfondir la compréhension de certains aspects mécaniques de ces nanotubes. Nous avons, en particulier, étudié des situations inexplorées jusqu'alors. Alors que le formalisme des tubes de membranes et la plupart des expériences modèles portent sur la formation d'un tube extrait d'une vésicule à tension constante, les situations concrètes sont sensiblement différentes. Par exemple, rien n'assure qu'un tube extrait d'une membrane plasmique de cellule adhérente le soit à tension constante. Nous avons donc analysé quantitativement la réponse force-longueur d'un tube extrait d'une vésicule adhérente. D'autre part, de multiples tubes peuvent être observés autour de cellules en phase mitotique. Nous avons donc souhaité étudier l'interaction entre deux tubes lipidiques extrudés à partir d'une même vésicule. Enfin, en suivant la même approche que celle adoptée pour la partie « Adhésion », nous nous sommes intéressés à des tubes formés à partir de cellules, afin d'évaluer l'influence de l'interaction entre la membrane et le cytosquelette sur la réponse mécanique du tube. Nous verrons qu'une composante visco-élastique supplémentaire doit être considérée pour rendre compte de la modification de la courbe de force.

Ce mémoire comporte donc deux parties largement indépendantes. Dans la partie « Adhésion », après quelques généralités et un récapitulatif bibliographique des travaux existants (chapitre I), nous présenterons les différents systèmes d'étude sélectionnés et la technique expérimentale choisie pour étudier leur dynamique d'étalement sur des surfaces (chapitre II). L'accent sera ensuite mis sur la préparation de surfaces bio-fonctionnalisées, que nous avons utilisées tout au long de ce travail (chapitre III). Enfin, les chapitres IV et V seront consacrés à l'étude proprement dite et l'analyse de la dynamique d'adhésion de vésicules et de cellules.

La deuxième partie, dédiée aux tubes de membrane, sera structurée de la même manière. Dans le chapitre I, on fera un rappel historique de l'état des connaissances. Les chapitres II et III présenteront la technique expérimentale de pince optique couplée à un système de micromanipulation par micropipette ainsi que la validation de notre méthode de mesure des courbes force-extension. Les chapitres IV, V et VI concernent l'étude de la mécanique des tubes de vésicule lipidique et les applications envisageables dans trois situations différentes : i) tube unique de vésicule adhéree, ii) coalescence de deux tubes, et iii) tube de vésicules à plusieurs composants. Enfin, le chapitre VII revisitera la micro-mécanique et la rhéologie des tubes de globules rouges, et nous décrirons une expérience préliminaire destinée à sonder la stabilité des structures cavéolaires à la surface des membranes plasmiques.

# **Partie 1**

## **Adhésion cellulaire**



# Chapitre I

## Introduction : Généralités

L'adhésion cellulaire joue un rôle particulièrement important dans différentes fonctions biologiques. Elle intervient notamment dans le développement, en permettant la différenciation et la migration des cellules ou en assurant la formation et le maintien de l'architecture des tissus (Alberts et al, 1995). Ce rôle dual, à la fois cohésif et migratoire, n'est possible que si les liaisons mises en jeu sont susceptibles de se former et de se défaire. Cette propriété est assurée par des molécules spécialisées engagées dans des interactions dites spécifiques, de temps de vie fini mais finement contrôlé. Des interactions déficientes entre ces molécules ont un rôle crucial dans le développement de cancers par exemple (Guilford, 1999). Ce sont ces liaisons qui distinguent essentiellement l'adhésion cellulaire de l'agrégation colloïdale, pour laquelle les interactions, qualifiées par la suite de « non-spécifiques », qui sont mises en jeu, sont le plus souvent irréversibles.

Dans une première partie, nous ferons un bref récapitulatif de l'ensemble de ces interactions. Nous exposerons ensuite les principes généraux permettant de concevoir des systèmes d'étude minimaux pour mimer l'adhésion cellulaire et en étudier les mécanismes physiques principaux.

### I.A. Nature des interactions moléculaires

La « reconnaissance » d'une cellule pour une congénère, si importante dans les processus de réponse immunitaire, par exemple, a lieu si les cellules présentent à leur surface les anticorps et antigènes adéquats. Toutefois, on peut se demander pourquoi deux cellules, qui n'étaient pas destinées à « se reconnaître », n'adhèrent pas lorsqu'elles entrent en collision de manière fortuite. Toutes les interactions génériques (ou non-spécifiques), bien connues en physique des colloïdes par



## Partie 1 : Adhésion cellulaire

exemple, sont universelles et donc existent également à l'échelle des cellules. Pour se faire, nous allons revenir sur toutes ces interactions, en essayant d'examiner quelles sont celles qui seront importantes au niveau cellulaire.

### I.A.1. Interactions non-spécifiques

Les forces génériques entre deux surfaces dans un liquide sont définies par un potentiel d'interaction, fonction de la distance qui sépare ces deux surfaces. On peut les regrouper en trois catégories : les forces électrostatiques, les forces de Van der Waals et les forces stériques. Une description abrégée est fournie ci-dessous. Pour une revue plus détaillée, on pourra se reporter à (Israelachvili, 1992). Nous verrons qu'un « design » astucieux d'une surface permet d'en éliminer certaines et d'en accentuer d'autres.

#### I.A.1.a. Interactions électrostatiques

Ces forces sont toujours présentes entre deux surfaces chargées. Elles peuvent être attractives ou répulsives pour des surfaces de signes opposés ou identiques. La portée de l'interaction électrostatique est fixée par la longueur de Debye, qui représente l'épaisseur de la couche diffuse permettant aux contre-ions d'équilibrer la charge de surface. Deux surfaces chargées, séparées d'une distance  $D$ , vont donc être soumises à une interaction électrostatique si leurs couches diffuses se recouvrent, et l'énergie d'interaction par unité de surface sera :

$$W_{elec} \propto e^{-D/\lambda_D} \quad \text{I.1.}$$

où  $\lambda_D$  représente la longueur de Debye.

Non seulement cette énergie décroît exponentiellement avec la distance, mais, en plus,  $\lambda_D$  décroît lorsque la concentration en sel dans le milieu augmente. Typiquement, dans des conditions physiologiques (correspondant à une concentration en sel de l'ordre de 100mM), la longueur de Debye est de l'ordre de  $\lambda_D=3\text{nm}$ . Cela signifie que, s'il existe d'autres interactions de plus longue portée, les interactions électrostatiques ne seront pas les principales responsables de l'attraction entre cellules ou d'une cellule avec une surface.

### I.A.1.b. Interactions de Van der Waals

L'interaction de Van der Waals est la plus universelle. Elle est toujours présente quelle que soit la nature des surfaces. Ces interactions, d'origine dipôle-dipôle, sont caractérisées par une énergie décroissante comme  $D^{-n}$ , avec  $D$  la distance entre les deux surfaces, et l'exposant  $n$  dépend de la géométrie des objets en interactions. Par exemple, pour une sphère de rayon  $R$  située à une distance  $D \ll R$  d'une surface plane, l'énergie de Van der Waals s'écrit :

$$W_{\text{vdw}} = -\frac{AR}{6D} \quad \text{I.2,}$$

où,  $A$  est la constante de Hamaker.  $A$ , qui est effectivement une constante si on peut négliger les effets de « retardement » (i.e. aux distances plus petites qu'une dizaine de nanomètres), peut être négative parfois, mais le plus souvent positive, et elle dépend des propriétés diélectriques des matériaux et du milieu environnant.

Typiquement, pour une bicouche lipidique,  $A$  est de l'ordre de  $4-7 \cdot 10^{-21} \text{J}$  ( $1-2k_B T$ ). Ainsi, l'effet des forces de Van der Waals sur une vésicule lipidique au voisinage d'un substrat sera négligeable pour des distances de séparation de l'ordre de la taille de la vésicule, et peut-être énorme (plusieurs centaines de  $k_B T$ ) pour des distances de quelques nanomètres.

### I.A.1.c. Interactions de solvatation et stériques

Ce sont les deux principaux types de forces répulsives. Leur origine est essentiellement entropique. La force d'hydratation résulte de la « structuration » des molécules d'eau liées à des surfaces hydrophiles ou associées à des groupes polaires de molécules amphiphiles par exemple. Sa portée est d'une taille moléculaire (i.e.  $< 1 \text{nm}$ ). A l'inverse, les forces stériques résultant des interactions entre des surfaces couvertes de polymères peuvent être à beaucoup plus longue portée, de l'ordre de l'épaisseur de cette couche de polymères (donc fonction de la masse moléculaire et de la densité de greffage notamment). D'un point de vue technologique, ces effets ont été largement exploités pour stabiliser des suspensions colloïdales.

## Partie 1 : Adhésion cellulaire

Pour revenir au problème des interactions entre cellules, le fait qu'elles n'adhèrent pas les unes aux autres de manière anarchique lorsqu'elles se touchent signifie qu'il existe une force répulsive de portée supérieure aux attractions électrostatiques et de Van der Waals. Une répulsion d'origine stérique est réalisée par le glycocalix, une couche de glycosaccharides présentes à la surface de la membrane plasmique. Dans les conditions physiologiques habituelles, les forces électrostatiques sont faibles et cette barrière de polymères permet de maintenir les deux surfaces hors de portée des forces de Van der Waals. Nous verrons plus tard (chapitre III) comment nous nous sommes inspirés de cette stratégie naturelle pour fabriquer des surfaces non adhérentes du point de vue biologique.

### I.A.2. Interactions spécifiques

Ces interactions résultent de l'association de molécules particulières, appelées récepteur et ligand, et capables de se reconnaître de façon très spécifique. Après une description succincte des caractéristiques des interactions spécifiques, nous donnerons des exemples de couples de molécules biologiques et nous donnerons quelques détails sur le couple modèle récepteur-ligand, choisi pour nos études.

#### I.A.2.a. Interaction type clef-serrure

Les complexes récepteur-ligand sont identifiés à des couples clef-serrure. La clef s'associe à la serrure via une combinaison de liaisons hydrogène et d'interactions hydrophobes (par exemple entre des groupements aromatiques de certains acides aminés).

Contrairement aux interactions non-spécifiques, les interactions spécifiques ne peuvent pas être décrites par une relation force-distance simple. Elles sont plutôt caractérisées par leur constante d'affinité et par leurs constantes cinétiques d'association et de dissociation. La formation d'une liaison entre un récepteur et un ligand peut être envisagée comme un équilibre chimique entre un état libre et un état lié  $Rec + Lig \rightleftharpoons R \square L$

A l'équilibre, on définit une constante d'affinité  $K_a$  (exprimée en  $M^{-1}$  à 3 dimensions) par :

$$K_a = \frac{[R \square L]}{[Rec][Lig]} \quad 1.3.$$

La cinétique de la réaction est caractérisée par des constantes  $k_{on}$  (en  $M^{-1} \cdot s^{-1}$  à 3 dimensions) et  $k_{off}$  (en  $s^{-1}$ ) qui vérifient:

$$\frac{d[R \square L]}{dt} = k_{on}[Rec][Lig] - k_{off}[R \square L] \quad 1.4.$$

Plus concrètement,  $1/k_{on}$  est relié au temps nécessaire à la formation de la liaison et  $1/k_{off}$  donne la durée de vie de la liaison formée.

La constante d'affinité décrit la probabilité de trouver les deux partenaires dans l'état lié. Elle est reliée aux constantes cinétiques par la relation suivante :

$$K_a = k_{on}/k_{off} \quad 1.5.$$

Ces constantes sont souvent très bien connues en volume. Une technique usuelle est d'immobiliser le récepteur sur une surface et d'étudier l'équilibre chimique avec du ligand libre en volume. La cinétique d'association du ligand avec le récepteur peut être suivie par la technique de résonance de plasmon de surface (Yu et al, 2003). Comme exemple, une liaison anticorps-antigène est caractérisée par une constante d'affinité de l'ordre de  $10^9 l \cdot mol^{-1}$  et un taux de dissociation de  $10^{-3} s^{-1}$  (Mao et al, 1999; Nicholson et al, 1998), ce qui signifie une durée de vie spontanée (i.e. en l'absence de sollicitation extérieure) de la liaison d'environ 15 min.

### I.A.2.b. Exemples de molécules de l'adhésion cellulaire

De nombreux processus biologiques font intervenir des interactions spécifiques. En particulier, l'adhésion cellulaire est induite par des molécules désignées couramment sous le sigle anglais de CAMs (pour Molécules de l'Adhésion Cellulaire). D'un point de vue structural, elles comportent une partie intracellulaire, capable d'interagir avec le cytosquelette, une partie transmembranaire, permettant l'ancrage de ces molécules dans la membrane plasmique, et une partie extracellulaire, responsable des interactions avec les autres partenaires. Cette portion extracellulaire confère à la protéine (ou molécule) ses propriétés de reconnaissance spécifique et s'avère essentielle dans l'initiation de l'adhésion

## Partie 1 : Adhésion cellulaire

cellule/cellule ou cellule/matrice (Bongrand, 1995). La figure I.1. représente des exemples de quelques CAMs, où seule la partie extracellulaire a été schématisée.

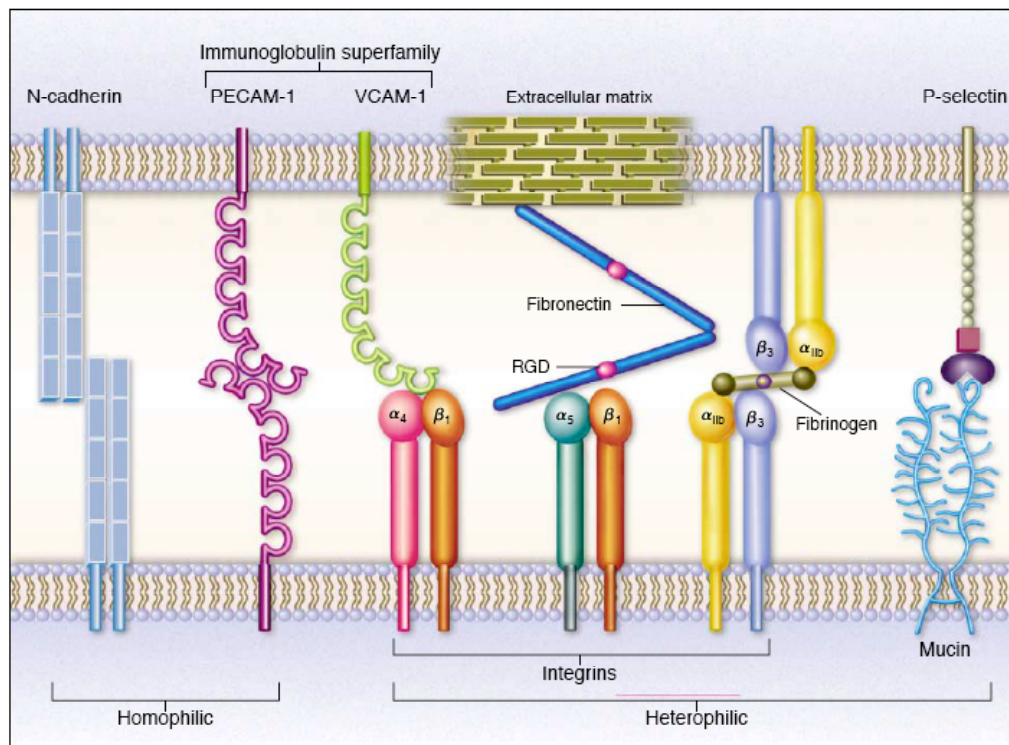


Figure I.1. : Représentations schématiques de quelques couples de molécules de l'adhésion cellulaire (Frenette et Wagner, 1996).

Les intégrines sont des glycoprotéines qui agissent comme récepteurs de différentes protéines de la matrice extracellulaire ou des ligands situés à la surface d'autres cellules. Leur capacité à se lier spécifiquement à un ligand dépend de la combinaison des deux sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$ . Nous reviendrons sur ces protéines dans le chapitre VII, qui portera sur l'interaction des intégrines avec la fibronectine, composant de la matrice extracellulaire, à travers la dynamique d'étalement de cellules exprimant des intégrines sur des surfaces couvertes de fibronectine.

Les cadhérines sont des CAMs qui jouent un rôle important dans l'adhésion intercellulaire (Trojanovsky, 1999). L'interaction mise en jeu est homotypique (c'est-à-dire que les cadhérines exprimées par une cellule se lient aux cadhérines de la cellule adjacente) et n'est activée qu'en présence de calcium (Alattia et al, 1999). La partie extracellulaire est constituée de 5 domaines immunoglobuline. Les cadhérines sont actives lorsqu'elles sont associées en dimères « cis » et la liaison avec la cellule voisine est assurée par la formation de dimères « trans » (voir figure I.1.). Nous

mentionnerons à nouveau ces propriétés d'association de cadhérines en dimères lorsque nous évoquerons l'immobilisation de fragments de cadhérines sur des surfaces dans le chapitre sur la dynamique d'étalement de cellules.

### I.A.2.c. Couple récepteur/ligand modèle : streptavidine/biotine

Un couple modèle pour étudier les interactions spécifiques est le couple streptavidine-biotine. Ce couple n'intervient pas dans des processus d'adhésion cellulaire proprement dits. La streptavidine est une protéine cousine de l'avidine, extraite du blanc de l'oeuf. Cette protéine sert de rempart à l'invasion bactérienne en immobilisant la biotine, vitamine H, nécessaire à la survie des bactéries.

La streptavidine possède quatre poches de liaison avec la biotine. La constante d'affinité du complexe est très élevée, de l'ordre de  $10^{-13} \text{l.mol}^{-1}$  (Green, 1975). Le taux de dissociation de la liaison en volume est estimé à  $10^{-7} \text{s}^{-1}$ , ce qui correspond à un temps de vie spontané (à zéro force) de 100 jours environ. De plus, la résistance à l'application d'une force a été étudiée par la Biomembrane Force Probe (BFP), permettant d'obtenir l'allure du puits de potentiel énergétique de la liaison streptavidine-biotine (Merkel et al, 1999). La profondeur du puits de potentiel énergétique est estimée, selon les auteurs et les méthodes employées à  $22\text{-}30k_B T$ , ce qui en fait "la liaison non covalente la plus forte de la Nature" (ou plutôt, la plus stable !). Cette grande affinité atténue fortement les effets de réversibilité de la liaison, ce qui peut constituer un avantage (en simplifiant certaines analyses - voir chapitre IV) ou un relatif inconvénient dans certains cas où l'on souhaiterait favoriser la dissociation (comme on le verra dans la partie "tubes de membrane" du chapitre VI).

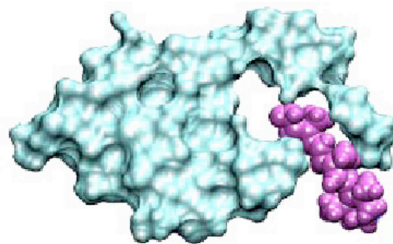


Figure I.2. : Schéma représentant une partie de la streptavidine (en bleu) comportant une poche de liaison à la biotine (en rose).

Malgré sa non-pertinence biologique, ce couple récepteur-ligand possède de nombreux avantages. C'est un système modèle, bien connu d'un point de vue biochimique et structural. Contrairement à la plupart des protéines facilement dénaturées dans des conditions peu physiologiques, la streptavidine possède une grande robustesse sur une gamme étendue de température, de pH, de salinité (Green, 1975). De plus, des surfaces décorées par la streptavidine peuvent être considérées comme substrats "universels", dans la mesure où la grande majorité des protéines peuvent être biotinylées. Enfin, des versions fluorescentes de ces deux composés sont disponibles commercialement, ce qui permet une visualisation directe, facile et peu coûteuse par microscopie de fluorescence.

### **I.B. Adhésion cellulaire : de la cellule vivante à des systèmes biomimétiques**

D'un point de vue physique, le mécanisme d'adhésion est quantifié par l'énergie d'adhésion, c'est-à-dire l'énergie gagnée lors de la formation du contact. Une telle description permet de rendre compte de l'étalement d'une goutte liquide sur une surface solide. L'approche naturelle d'un physicien qui s'intéresse à des problématiques biologiques consisterait donc à voir si cette description est applicable à l'étalement de cellules et/ou comment elle devrait être modifiée. D'un autre côté, les biologistes préfèrent une approche plus microscopique, voire moléculaire, pour tenter de comprendre les mécanismes de l'adhésion cellulaire. Afin de réconcilier ces deux conceptions, une première solution serait d'adopter une approche biomimétique (et minimale), permettant de contrôler et mesurer les grandeurs caractéristiques pertinentes selon les physiciens tout en y incorporant des données moléculaires chères aux biologistes. La vésicule lipidique est clairement un système trop simpliste pour modéliser une cellule dans sa globalité. Néanmoins, c'est un outil utile qui permet de comparer, dans des cas bien précis qui ne font pas intervenir l'activité cellulaire, les deux systèmes. Evidemment, nous sommes conscients des différences énormes existantes entre les deux systèmes. Nous aurons d'ailleurs l'occasion d'y revenir maintes fois. Notre espoir est cependant de pouvoir dégager des

mécanismes physiques simples qui pourraient être significatifs pour l'adhésion cellulaire, en tirant profit des possibilités de contrôle offertes par les vésicules géantes (densité de surface en ligand, tension de membrane, ...). Nous verrons dans les conclusions de ce chapitre que les informations acquises sur les vésicules, bien que fort instructives d'un point de vue physique fondamentale (de notre point de vue), ne sont pas forcément transposables à l'étude de l'adhésion de cellules.

Dans une première partie, nous ferons le point sur quelques notions de base de biologie de l'adhésion cellulaire. Dans une deuxième partie, nous ferons le bilan des nombreuses études théoriques, expérimentales, statiques et dynamiques de l'adhésion de vésicules synthétiques sur substrat solide.

### **I.B.1. Adhésion de cellules vivantes : quelques éléments de biologie cellulaire**

Alors que, d'un point de vue physique, l'adhésion entre deux objets, résulte d'abord des propriétés de surface des objets en interaction, les biologistes ont une vision plus « intégrée » (donc plus complète ?) de l'adhésion cellulaire. Pour résumer, l'adhésion d'une cellule sur un substrat par exemple est considérée sous l'angle des conséquences que ce phénomène produit. En d'autres termes, l'étalement est initié par la formation de liaisons entre les molécules d'adhésion de surface. Ensuite, une cascade biochimique de signalisation intracellulaire est déclenchée. Cela se traduit, sur des échelles de temps de l'ordre de l'heure suivant l'ensemencement des cellules, à une réorganisation du cytosquelette de la cellule, donc à une modification de ses propriétés mécaniques, pouvant conduire finalement à la mise en mouvement de la cellule. Enfin, la transmission des signaux biochimiques vers le noyau ayant également stimulé l'expression d'environ une centaine de gènes « silencieux » (Mahoney et al, 2001), les machineries de transcription et traduction se mettent en marche pour réguler la croissance, la différenciation et la migration de la cellule.

Cette dernière étape de modification génétique provoquée par le stimulus « d'adhésion » est bien au-delà du cadre de notre travail. Nous nous contentons d'illustrer ici les premières étapes de l'adhésion cellulaire, sur l'exemple particulier,



## Partie 1 : Adhésion cellulaire

bien documenté, de l'adhésion à la matrice extra-cellulaire induite par les intégrines. Un travail extensif dans ce domaine a été réalisé par le groupe de B. Geiger (Institut Weizmann) (Bershadsky et al, 2003).

Les intégrines présentes à la surface des cellules établissent des interactions adhésives avec les molécules ECM (pour Matrice Extra-Cellulaire) via leur partie extracellulaire. La formation d'agrégats (« clusters ») de complexes intégrines-ECM induit ensuite l'assemblage de filaments d'actine et la formation d'une liaison entre les filaments d'actine et la membrane via la partie cytoplasmique des intégrines et des complexes protéiques variés (taline, tensine, vinculine, paxiline, ...). Les morphologies et les compositions moléculaires des motifs correspondants sont également variées. On distingue généralement trois catégories : les adhésions focales (FAs), qui ont la forme de petits bâtonnets aux extrémités de fuseaux de filaments d'actines appelés les fibres de stress, les adhésions fibrillaires (FBs), situés uniquement dans la partie centrale de la cellule, et les complexes focaux (FXs), qui apparaissent sous la forme de points très dynamiques le long du lamellipode en avant de la cellule en migration (Figure I.3.) (Zaidel-Bar et al, 2004). Le schéma de la figure I.4 a pour seul objectif d'évoquer, de façon plus réaliste, la très grande diversité des protéines impliquées et d'illustrer la complexité des voies de signalisation biochimique liées à la formation de ces contacts focaux. Il est bon de garder à l'esprit l'existence de ce type de diagramme pour réaliser, si besoin est malgré nos précédents avertissements, à quel point une vésicule synthétique décorée de ligands est loin de pouvoir mimer fidèlement un quelconque comportement cellulaire !

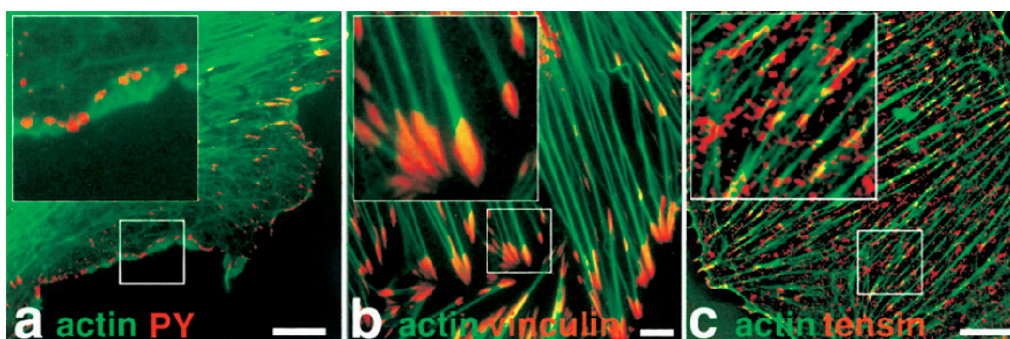


Figure I.3. : Images par microscopie de fluorescence des différentes morphologies des contacts adhésifs entre une cellule et un substrat. (a) Complexes focaux (FXs) à la périphérie d'une cellule endothéliale (PY : Phosphotyrosine). (b) Adhésions focales (FAs) à l'extrémité des fibres de stress d'un fibroblaste. (c) Adhésions fibrillaires (FBs) dans la région centrale adhésive d'une cellule endothéliale. Les barres d'échelle représentent 5  $\mu$ m (Extrait de (Zaidel-Bar et al, 2004))

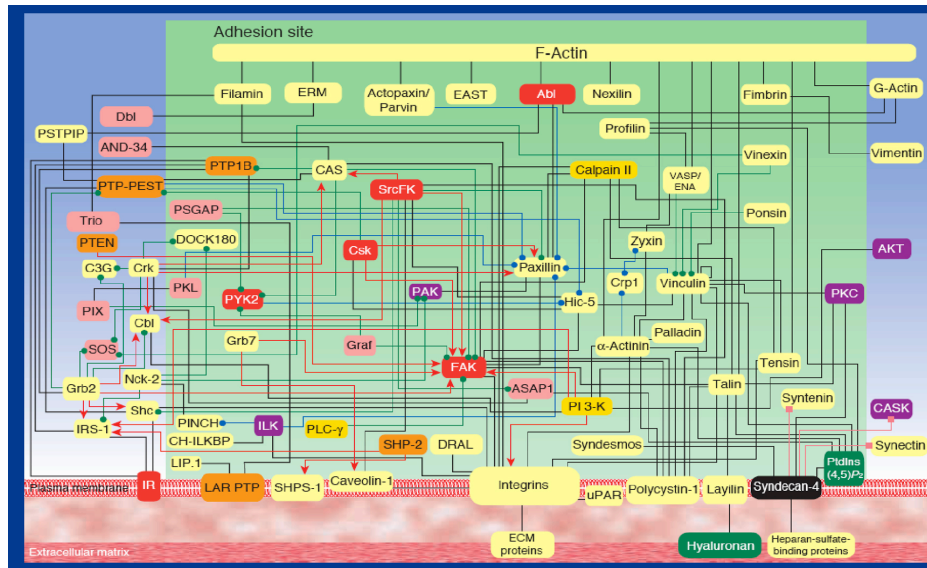


Figure 1.4. : Résumé schématique des interactions connues qui interviennent dans l'adhésion cellule-matrice extracellulaire. Les annotations ont été volontairement supprimées, le but étant de montrer la complexité des voies de signalisation (Extrait de (Zamir et Geiger, 2001)).

De plus, comme le montre la figure 1.5, ces points focaux sont des structures dynamiques, constamment régulées spatialement et temporellement (Zamir et al, 2000).

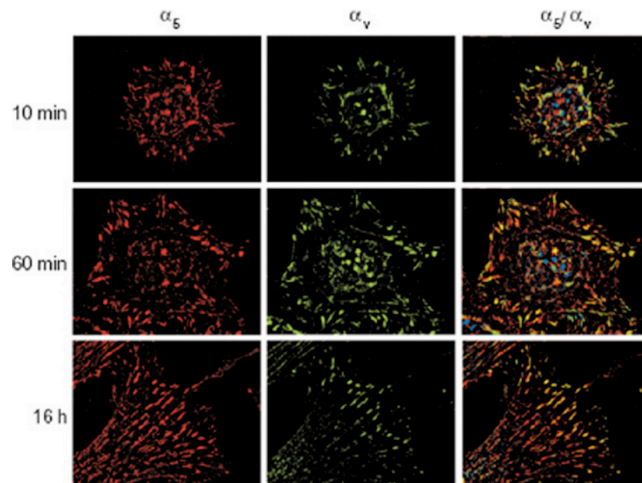


Figure 1.5. : Image de microscopie de fluorescence par la méthode d'ondes évanescentes (TIRF). Les intégrines (rouge) se regroupent à la surface par agrégats. La vinculine (vert) initialement non colocalisée avec les intégrines s'accumule au fur et à mesure pour former des points focaux (jaune). La largeur d'une image représente 80 μm (Extrait de (Zamir et al, 2000)).

Enfin, il semble bien établi maintenant que ces contacts focaux se comportent comme des mécano-senseurs. Les forces qu'exerce une cellule sur un substrat sont essentiellement localisées au niveau des FAs. Ce signal mécanique est converti en

## Partie 1 : Adhésion cellulaire

un signal biochimique qui permet de réguler la taille et le nombre des points focaux (Riveline et al, 2001). Une récente observation directe et analysable quantitativement a été réalisée en faisant adhérer des cellules exprimant des intégrines sur une surface déformable, structurée par des pylônes d'élastomère, senseurs de force (Figure I.6.) (Tan et al, 2003).

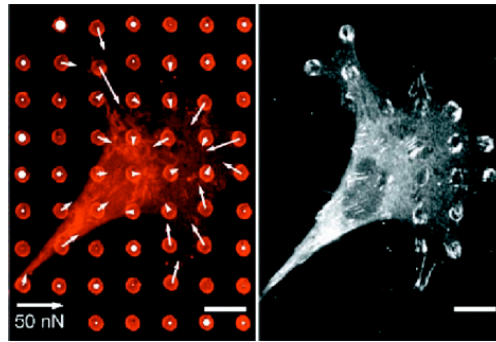


Figure I.6. : Images de microscopie de fluorescence d'une cellule adhérente sur des pylônes recouverts de fibronectine (rouge). La déflexion de ces pylônes donne la force générée par la cellule sur la surface. L'actine (rouge) est visualisée sur l'image de droite. La barre d'échelle représente 50 nN (Extrait de (Tan et al, 2003)).

Les forces exercées par la cellule jouent un rôle fondamental dans la motilité cellulaire, qui repose sur un mécanisme d'adhésion-traction (Sheetz et al, 1998). La cellule crée de nouveaux points focaux mais détruit en même temps des points adhésifs pour avancer à la façon d'une chenille de tank (Figure I.7.). La rupture des points focaux s'effectue par dépolymérisation de l'actine, de plus la traction est réalisée par le travail des myosines, moteurs moléculaires associés à l'actine, au niveau des points focaux.

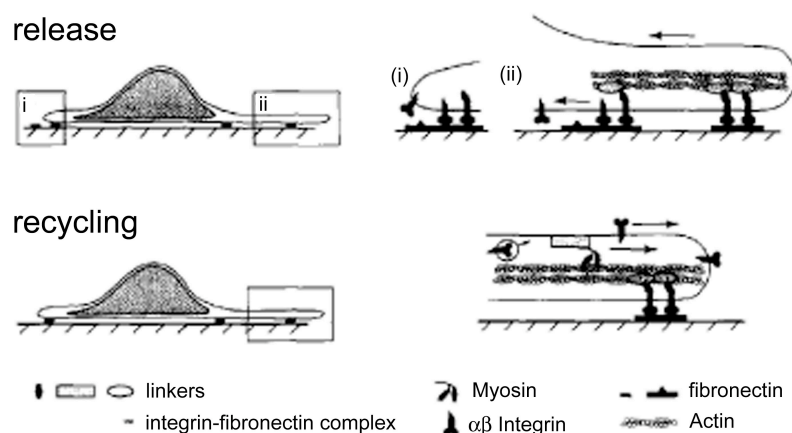


Figure I.7. : Schématisation de la motilité cellulaire par rupture et création de points focaux (Extrait de (Sheetz et al, 1998)).

La direction que choisit la cellule est déterminée par une variété de facteurs : un gradient de molécules d'adhésion sur la surface, un gradient de « nourriture » en solution (chimiotaxie) ou un gradient de rigidité de surface (durotaxie) (Lo et al, 2000).

Le résumé très partiel et subjectif de ces quelques notions de biologie cellulaire nous servira à justifier certaines hypothèses et à valider certains points du modèle proposé pour expliquer les étapes initiales de la dynamique d'étalement de cellules au chapitre V. En effet, nous nous concentrerons à étudier les étapes initiales de l'étalement et essaierons de les décrire par des arguments physiques et macroscopiques. Il sera donc important de vérifier que toutes les manifestations de cette activité biochimique intracellulaire ne sont pas dominantes aux échelles de temps sur lesquelles nous travaillons.

### **I.B.2. Adhésion de vésicules synthétiques : approche physique**

De nombreuses études d'adhésion de vésicules géantes sur des substrats solides ont été justifiées par le caractère modèle de membrane cellulaire. Des études à la fois théoriques et expérimentales ont été menées, d'un point de vue souvent statique et parfois dynamique. La forme d'équilibre est susceptible de renseigner sur l'énergie d'adhésion et la dynamique d'étalement aux temps courts (pour lesquels la signalisation biochimique intracellulaire n'est pas effective) pourrait renseigner sur des mécanismes moteurs de l'adhésion cellulaire.

#### **I.B.2.a. Cadre théorique**

##### **I.B.2.a.i. Etude statique : morphologie de vésicules adhérees à l'équilibre**

On sait, depuis les travaux de de Gennes et Brochard notamment (de Gennes, 1985; de Gennes et al, 2002) que la forme d'une goutte d'eau sur une surface

## Partie 1 : Adhésion cellulaire

dépend de la taille de la goutte d'eau (calotte sphérique en régime capillaire et crêpe en régime de gravité) et de l'énergie de surface de la surface. Sur du verre propre (haute énergie de surface), une goutte d'eau sera en situation de mouillage total, formant un fin film d'eau sur la plus grande aire possible. Sur une poêle Tefal, une goutte d'eau sera en situation de mouillage partiel (voire nul), prenant la forme d'une sphère tronquée avec un angle de contact élevé.

Dans le cas des vésicules, l'effet de la gravité est souvent négligeable. Mais, on retrouve qualitativement les cas de mouillage partiel et total. Sur une surface de haute énergie (ex : verre recouvert de polylysine), une vésicule de phospholipides finira par éclater, tandis que sur une surface « passivée » (par de la caséine par exemple), elle prendra la forme d'une goutte d'eau sur du téflon. L'énergie d'adhésion par unité de surface,  $W$ , définit donc en partie les formes de vésicules adhérentes. En réalité, l'effet de l'adhésion est en partie contre-balancé par la résistance de la membrane à la courbure (rigidité de courbure  $\kappa$ ), qui se manifeste au niveau de la ligne de contact par un « arrondissement » du profil de la vésicule. Le paramètre adimensionné important est donc  $w = WR^2/\kappa$ , avec  $R$  la taille de la vésicule. Des valeurs de  $w > 1$  (resp.  $\sim 1$ ) caractérisent une situation d'adhésion forte (resp. adhésion faible). Mais, il faut également tenir compte de la tension initiale de la membrane, ou de manière équivalente, de l'état de dégonflement de la vésicule

(c'est-à-dire de son volume réduit  $v = \frac{V}{\frac{4}{3}\kappa(A/4\kappa)^{3/2}} < 1$ , où  $V$ ,  $A$  sont respectivement le volume et l'aire de la vésicule.).

U. Seifert et R. Lipowsky (Lipowsky et Seifert, 1991; Seifert et Lipowsky, 1990; Seifert et Lipowsky, 1993) ont pu établir un diagramme de phase en fonction de ces deux paramètres, par une minimisation de la fonctionnelle de l'énergie libre associée et des simulations Monte Carlo. La figure I.8 reprend quelques-unes des formes de vésicules obtenues, allant de la sphère un peu aplatie à la « crêpe-discocyte ».

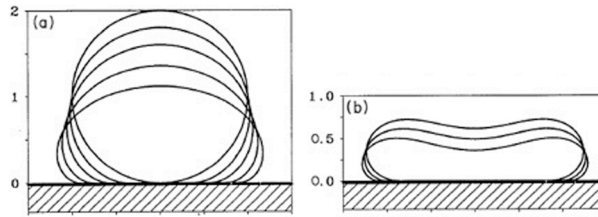


Figure I.8. : Forme théorique d'une vésicule adhéree sur une surface. La vésicule garde la même aire  $A=4\pi R^2$ . (a) La différence de pression entre l'extérieur et l'intérieur de la vésicule est nulle, l'accroissement de la zone de contact augmente avec l'énergie d'adhésion. (b) La différence de pression est négative et  $W$  augmente (Extrait de (Seifert et Lipowsky, 1990)).

Dans les cas pratiques que nous étudierons (chapitre IV), les vésicules seront toujours proches d'une sphère ( $\nu > 0.95$ ) et les surfaces seront préparées de telle façon qu'un régime d'adhésion forte soit atteint rapidement. Ce cas s'avérera plus simple à analyser.

En effet, en adhésion forte, la rigidité de courbure a un effet négligeable et la vésicule prend la forme macroscopique d'une sphère tronquée, caractérisée par un angle de contact  $\theta$ , (en toute rigueur, l'angle entre la tangente de la sphère et la surface - voir figure I.9.). La relation de Young-Dupré permet alors de relier l'énergie d'adhésion  $W$ , la tension de membrane  $\sigma$  (ou, dans le langage de Udo Seifert, le multiplicateur de Lagrange associé à la contrainte d'aire) et  $\theta$  :

$$W = \sigma (1 - \cos \theta) \quad \text{I.6.}$$

Plus récemment, en se limitant au cas d'adhésion forte, C. Tordeux, J.-B. Fournier et P. Galatola (Tordeux et al, 2002) ont pu décrire pour la première fois analytiquement la forme de vésicules adhérees en fonction des divers paramètres géométriques mesurables (Figure I.9.).

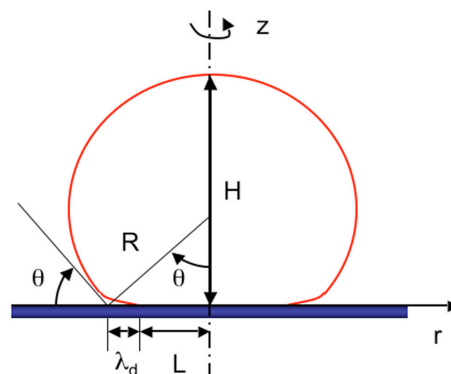


Figure I.9. : Coupe latérale d'une vésicule en adhésion forte.  $\lambda_d$  est appelé généralement la longueur d'extrapolation et  $\theta$ , l'angle de contact (Adapté de (Tordeux et al, 2002)).

**I.B.2.a.ii. Etude dynamique de l'étalement d'une vésicule sur une surface**

Alors que la dynamique de mouillage d'une goutte de liquide simple sur un substrat solide est bien comprise (de Gennes, 1985), la dynamique d'étalement d'une vésicule décorée de molécules-ligands sur une surface n'a attiré l'intérêt des théoriciens que depuis quelques années. On peut en effet anticiper une difficulté supplémentaire à modéliser l'étalement de vésicules, pour au moins deux raisons. Tout d'abord, alors que l'énergie de surface d'un liquide est fixée et constante, la tension d'une membrane lipidique est susceptible d'augmenter au cours de l'adhésion. En effet, le passage d'une sphère à une sphère tronquée s'accompagne d'une augmentation d'aire, donc d'un dépliage des fluctuations de membrane, voire d'un étirement élastique de celle-ci, pouvant aller jusqu'à l'éclatement de la vésicule, quand la tension imposée par l'adhésion dépasse la tension de lyse de la vésicule (voir Chapitre II et IV). On peut donc se demander comment cette mise sous tension va ralentir l'accroissement de la zone d'adhésion. Deuxièmement, les ligands présents à la surface de la membrane sont libres de diffuser, donc de se regrouper au niveau de la zone d'adhésion et de faire varier l'énergie d'adhésion. Dans ce cas, la diffusion devient-elle prédominante?

A notre connaissance, il existe quatre études théoriques détaillées sur le sujet. Nous en donnons ici les principaux ingrédients.

- Chronologiquement, la première a été proposée par A. Boulbitch (Boulbitch et al, 2001). Les auteurs décrivent la dynamique d'étalement d'une vésicule recouverte de ligands ainsi que de polymères mimant le glycocalix de la cellule. Deux situations sont distinguées : i) le cas où une faible densité de ligands sur la vésicule correspond à un régime dominé par la diffusion des ligands. En couplant équation de diffusion et conservation du nombre de molécules, en supposant des conditions aux limites adéquates, les auteurs montrent que le rayon de la zone adhérente  $R$  varie comme  $t^{1/2}$  ; ii) dans le cas où la vésicule est densément couverte de ligands, le régime est dominé par la cinétique de la réaction récepteur-ligand. Le temps caractéristique d'avancée du front est le temps de formation des liaisons modulé par un facteur de Boltzmann qui prend en compte l'énergie des fluctuations imposées par la brosse de

lipopolymères (mimant le glycocalix). La vitesse de croissance de la zone d'adhésion est alors constante, c'est-à-dire que  $R \sim t$ .

Le modèle proposé est très général, donc tentant à tester. Nous aurions presque tendance à dire, a priori, « trop » général. Des expériences du groupe de Sackmann semblent pourtant le valider (Boulbitch *et al*, 2001). Comme d'autres modèles théoriques concurrents sont radicalement différents, nous tenterons de réanalyser ces données expérimentales sous un angle différent au chapitre IV.

- La seconde analyse théorique est basée sur des simulations numériques effectuées par un groupe de mathématiciens appliqués (Hodges et Jensen, 2002). La cellule est modélisée par une membrane extensible sous tension. L'interaction avec la paroi sur laquelle elle sédimente est la combinaison d'une attraction à longue portée et d'une répulsion à courte portée. A partir de l'application de la théorie de lubrification pour décrire le flux de liquide interstitiel, les auteurs ont calculé numériquement, moyennant de nombreux paramètres moléculaires adimensionnés, la dynamique d'étalement. Nous n'avons pas réussi à exploiter cette approche plutôt « inhabituelle » en biophysique.

- F. Brochard et P.-G. de Gennes ont ensuite proposé de nombreux scénarios théoriques mettant en évidence différentes lois de puissance pour la variation temporelle du rayon de contact de la vésicule en train d'adhérer en fonction de conditions expérimentales diverses (Brochard-Wyart et de Gennes, 2002; de Gennes *et al*, 2003). Ici, l'approche est radicalement différente : la préparation de la surface (récepteurs mobiles ou non sur la surface), la présence ou non d'interactions non-spécifiques résiduelles, la préparation des vésicules (lourdes ou seulement « collantes »), l'influence de la tension de membrane, la compétition entre temps de diffusion et temps de réaction, la distribution des « connecteurs » (i.e. liaisons récepteur-ligand) dans la zone d'adhésion (dans la limite diluée du gaz parfait ou dans une situation entraînant une transition de phase du premier ordre entre des zones denses et des zones diluées en connecteurs) sont les principaux paramètres considérés. Les auteurs montrent que chacun de ses paramètres peut avoir une influence considérable sur la loi de croissance du disque d'adhésion.

Puisque nous reviendrons sur une approche de ce type pour analyser nos résultats expérimentaux du chapitre IV, nous ne détaillons pas ici tous les scénarios.



## Partie 1 : Adhésion cellulaire

Le tableau 1 résume les différents résultats obtenus théoriquement. Mentionnons seulement que dans tous les cas l'hypothèse d'une adhésion forte a été considérée, c'est-à-dire que la loi de Young-Dupré est applicable pour relier l'énergie d'adhésion  $W$ , la tension de membrane  $\sigma$  et l'angle de contact,  $\theta \approx R/R_v$ , où  $R$  est le rayon de contact et  $R_v$  le rayon de la vésicule (définition valable dans la limite des petits angles  $\theta$ ) (voir figure I.9.). Reste cependant à exprimer indépendamment  $W$ . Comme le remarquent les auteurs, si les connecteurs sont immobiles à l'intérieur de la zone d'adhésion (correspondant au cas où les récepteurs sont greffés sur la surface),  $W$  est simplement l'énergie chimique  $\rho_i U$ , où  $\rho_i$  est la densité de connecteurs liés et  $U$  l'énergie de liaison d'un couple récepteur-ligand (20-30  $k_B T$  pour streptavidine-biotine). En revanche, si les connecteurs sont mobiles à l'intérieur de la zone d'adhésion (correspondant au cas où les récepteurs seraient « immobilisés » via une bicouche supportée fluide),  $W$  est donnée par la différence de pression osmotique entre l'intérieur du disque d'adhésion,  $\rho(\rho_i)$ , et l'extérieur (c'est-à-dire la portion libre de la vésicule),  $\rho(\rho_o)$  :  $W = \rho(\rho_i) \sigma \theta - \rho(\rho_o) \sigma \theta$ . Cette notion avait déjà été introduite, il y a une vingtaine d'années par Bell, Dembo et Bongrand (Bell et al, 1984). Cet effet peut s'expliquer simplement en imaginant une expérience de traction (verticale) sur la vésicule. A cause de la fluidité des membranes, les couples ligand-récepteur liés se retrouvent concentrés car la vésicule tend à se détacher de la surface adhésive. En supposant un comportement de gaz parfait bidimensionnel pour les ligands de la vésicule, la relation précédente s'écrit :  $W = k_B T(\rho_i \sigma \theta - \rho_o \sigma \theta) = k_B T \rho_i \sigma \theta$ . On voit donc que selon les cas, l'énergie d'adhésion peut varier de plus d'un ordre de grandeur.

Vésicules	Réaction	Pression	loi de puissance $R \propto t^p$
collantes	rapide	gaz parfait	1/4
		constante	0
	lente	gaz parfait	1/2
lourdes	rapide		1
	lente	5/2	

Tableau 1 : Résumé des différentes situations dans le cas de récepteurs fixes sur la surface (extrait de (de Gennes et al, 2003)).

- La quatrième description théorique de l'étalement de vésicules lipidiques sur des substrats est encore plus récente (Shenoy et Freund, 2005). Les auteurs ont étudié l'évolution d'un front d'adhésion circulaire en se limitant à un régime où la diffusion des ligands mobiles est induite par un gradient de potentiel chimique au niveau de la ligne de contact. Ils trouvent ainsi une variation de  $R$  comme  $t^{1/2}$ , en accord avec le modèle de Boulbitch, tout en raffinant l'expression du préfacteur. Ils insistent également sur l'existence, au-delà d'un rayon critique d'adhésion, d'une instabilité de la forme circulaire.

En bref, ces approches théoriques sont radicalement différentes. Même si des lois de puissance  $R(t)$  similaires sont parfois obtenues, cela ne semble être que coïncidence. Les mécanismes physiques sous jacents n'ont rien à voir les uns avec les autres. Nous chercherons à analyser nos expériences de dynamique d'étalement de vésicules (Chapitre IV) en faisant appel au plus petit nombre possible de paramètres moléculaires inconnus.

### **I.B.2.b. Expériences de dynamique d'adhésion de vésicules**

Les expériences visant à étudier quantitativement la dynamique d'étalement de vésicules sont rares.

Parmi les trois cas que nous avons répertoriés, les techniques expérimentales utilisées sont, soit la microscopie de fluorescence en ondes évanescentes (TIRF), soit la microscopie interférentielle par réflexion (RICM). Dans la première méthode, une onde évanescente est produite par la réflexion totale d'un faisceau monochromatique au niveau de la surface d'observation. La profondeur de l'onde évanescente est typiquement de 100 nm et permet une visualisation de la surface de contact (si celle-ci est fluorescente) en éliminant le bruit de fond de fluorescence du volume. La RICM est la technique que nous avons sélectionnée et sera décrite en détail dans le chapitre II. Elle n'implique pas l'utilisation de sonde fluorescente et donne le profil de la vésicule au voisinage de la membrane en temps réel.

A.-L. Bernard et al (Bernard et al, 2000) ont étudié par TIRF la dynamique d'adhésion de vésicules chargées négativement sur des substrats couverts de

## Partie 1 : Adhésion cellulaire

polymères cationiques. Ce système n'implique pas des interactions spécifiques entre récepteurs et ligands et aucune modélisation théorique n'a pu être réalisée.

Pierre-Henry Puech (Puech et al, 2004) a étudié par RICM l'adhésion de vésicules décorées de fragments extra-cellulaires de cadhérines sur des bicouches supportées également fonctionnalisées avec des cadhérines. En faisant une statistique sur le nombre de vésicules adhérentes en absence et en présence de calcium, il a montré que le calcium agit bien en tant qu'interrupteur (Figure I.10.). Cependant aucune étude dynamique quantitative n'a pu être effectuée sur ce système difficilement contrôlable et conduisant à une adhésion faible.

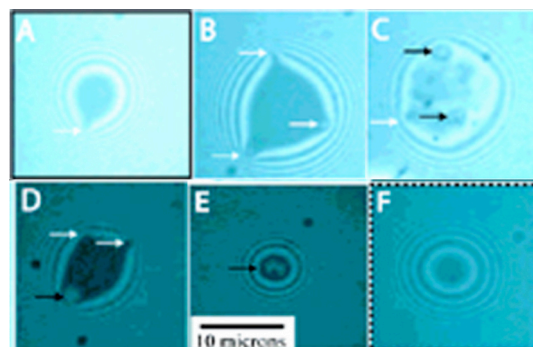


Figure I.10. : Images par microscopie interférentielle. (A-E) Vésicules adhérentes. Les flèches blanches représentent les points d'adhésion et les noires, les zones de contact larges. (F) Vésicules non adhérentes (Extrait de (Puech et al, 2004)).

P.-H. Puech a ensuite étudié un exemple d'adhésion forte (article en préparation, 2005) : celui de vésicules contenant des lipides biotinylés sur des bicouches fluides décorées par de la streptavidine. Le couple récepteur-ligand est le même que celui que nous avons choisi, mais les surfaces décorées sont différentes, des nôtres. Nous en donnons ici les résultats principaux (Puech, 2003). Des vésicules tendues ou dégonflées ont été considérées, ce qui conduit à des mécanismes d'étalement radicalement différents.

- Lorsque la vésicule est initialement tendue (Figure I.11.), le rayon de contact varie comme  $t^{0.2}$ , ce qui est en bon accord avec les prédictions de P.-G. de Gennes et F. Brochard (Brochard-Wyart et de Gennes, 2002), correspondant à la première ligne du tableau résumant les différents scénarios ( $R \sim t^{1/4}$ ).

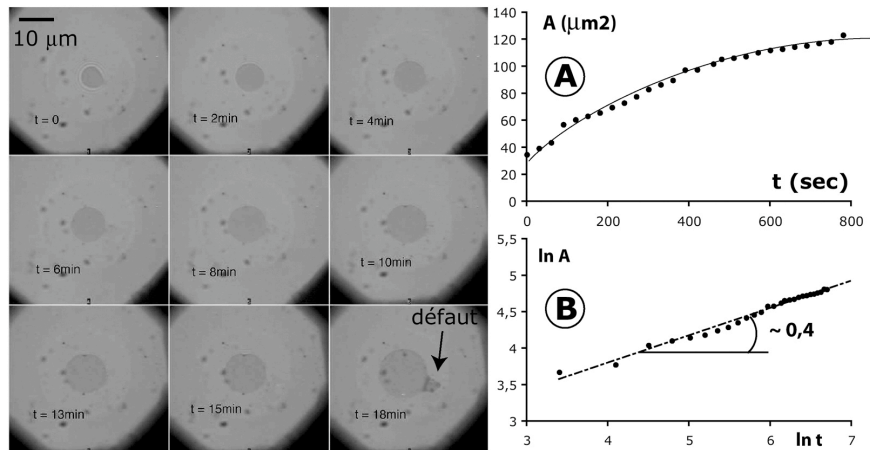


Figure I.11. : Séquence d'image par RICM d'une vésicule biotinylée tendue sur des bicouches lipidiques décorées de streptavidine. L'évolution de l'aire de contact A en fonction du temps est représentée en échelle linéaire (A) et en échelle logarithmique (B) (Extrait de (Puech, 2003)).

- Lorsque la vésicule est détendue, la croissance de la zone d'adhésion n'est plus circulaire, mais se fait par petits centres de nucléation qui fusionnent ensuite (Figure I.12.). Chaque petit patch suit une loi de croissance en  $t^{0.5}$ , ce qui a été vérifié être en bon accord avec une prédiction théorique de F. Brochard reposant sur une nucléation et croissance par démouillage du film d'eau sur lequel la vésicule fluctuante « flotte », et annonçant une loi  $R \sim t^{5/8}$ .

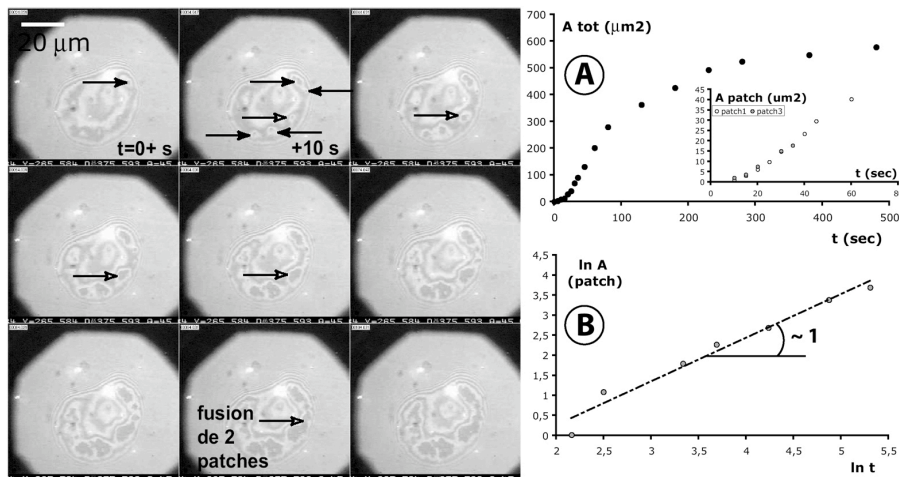


Figure I.12. : Séquence d'image par RICM d'une vésicule biotinylée détendue sur des bicouches lipidiques décorées de streptavidine. L'évolution de l'aire de contact, A, en fonction du temps est représentée en échelle linéaire (A) et en échelle logarithmique (B) (Extrait de (Puech, 2003)).

Enfin, le groupe de Sackmann à Munich a choisi un système composé d'une lame de verre décorée avec des intégrines, sur laquelle des vésicules contenant des lipides fonctionnalisés avec des tripeptides Arginine-Glycine-Aspartate (RGD), qui

## Partie 1 : Adhésion cellulaire

représentent la partie minimale des ligands de la matrice extra-cellulaire interagissant avec les intégrines (Boulbitch *et al*, 2001). Le glycocalix a été mimé à l'aide de lipides fonctionnalisés avec un polymère hydrophile, le PolyEthylèneGlycol (PEG), de manière à inhiber les interactions non-spécifiques. La figure I.13 montre une séquence d'images de RICM d'un étalement de vésicule. Comme nous l'avons indiqué précédemment, deux dynamiques d'adhésion, dominées respectivement par la diffusion et par la réaction, dépendant de la concentration en lipides RGD ont été mises en évidence. Les auteurs ont montré que les résultats trouvés sont cohérents avec le modèle de Boulbitch. Si notre approche expérimentale semblera équivalente, nous verrons dans le chapitre IV qu'il pourrait exister une autre façon d'analyser ces données expérimentales.

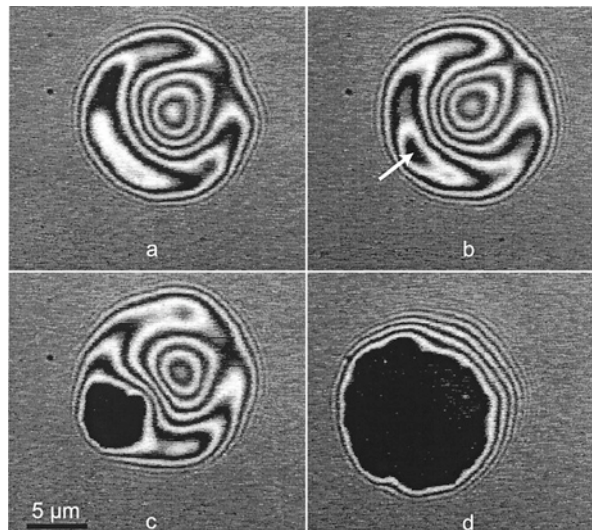


Figure I.13. : Image par microscopie interférentielle. La zone de contact initiale (flèche blanche) évolue avec le temps (Extrait de (Boulbitch *et al*, 2001)).

## Bibliographie : Chapitre I

- Alattia JR, Kurokawa H et Ikura M, 1999.  
Structural view of cadherin-mediated cell-cell adhesion.  
*Cellular and Molecular Life Sciences*,55:359-367.
- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K et Watson J, 1995.  
Biologie moléculaire de la cellule.  
Editor: Flammarion.
- Bell GI, Dembo M et Bongrand P, 1984.  
Cell adhesion. Competition between nonspecific repulsion and specific bonding.  
*Biophysical Journal*,45:1051-1064.
- Bernard A-L, Guedeau-Boudeville M-A, Jullien L et Di Meglio J-M, 2000.  
Strong Adhesion of Giant Vesicles on Surfaces: Dynamics and Permeability.  
*Langmuir*,16:6809-6820.
- Bershadsky A, Balaban NQ et Geiger B, 2003.  
Adhesion dependent cell mechanosensitivity.  
*Annual Review of Cell Developmental Biology*,19:677-695.
- Bongrand P, 1995.  
Adhesion of cells. In: Handbook of biological physics. Lipowsky R, Sackmann E, Elsevier Science Publishers B.V.,
- Boulbitch A, Guttenberg Z et Sackmann E, 2001.  
Kinetics of membrane adhesion mediated by ligand-receptor interaction studied with a biomimetic system.  
*Biophysical Journal*,81:2743-2751.
- Brochard-Wyart F et de Gennes PG, 2002.  
Adhesion induced by mobile binders: Dynamics.  
*Proceedings of the National Academy of Science U.S.A.*,99:7854-7859.
- de Gennes PG, 1985.  
Wettings : statics and dynamics.  
*Review of Modern Physics*,57:827-863.
- de Gennes PG, Brochard-Wyart F et Quéré D, 2002.  
Gouttes, bulles, perles et ondes.  
Editor: Belin.
- de Gennes PG, Puech PH et Brochard-Wyart F, 2003.  
Adhesion Induced by Mobile Stickers: A List of Scenarios.  
*Langmuir*,19:7112-7119.

## Partie 1 : Adhésion cellulaire

- Frenette PS et Wagner DD, 1996.  
Adhesion molecules.  
*The New England Journal of Medicine*,334:1526-1529.
- Green NM, 1975.  
Avidin.  
*Advances in Protein Chemistry*,29:85.
- Guilford P, 1999.  
E-cadherin downregulation in cancer : fuel on the fire?  
*Molecular Medicine Today*,5:172-177.
- Hodges SR et Jensen OE, 2002.  
Spreading and peeling dynamics in a model of cell adhesion.  
*Journal of Fluid Mechanics*,460:381-409.
- Israelachvili JN, 1992.  
Intermolecular and Surface Forces.  
Editor, London: Academic Press.
- Lipowsky R et Seifert U, 1991.  
Adhesion of vesicles and membranes.  
*Molecular Crystals and Liquid Crystals*,202:17-25.
- Lo CM, Wang HB, Dembo M et Wang YL, 2000.  
Cell movement is guided by the rigidity of the substrate.  
*Biophysical Journal*,79:144-152.
- Mahoney TS, Weyrich AS, Dixon DA, McIntyre T, Prescott SM et Zimmerman GA, 2001.  
Cell adhesion regulates gene expression at translational checkpoints in human myeloid leukocytes.  
*Proceedings of the National Academy of Science U.S.A.*,98:10284-10289.
- Mao S, Gao C, Lo CHL, Wirsching P, Wong CH et Janda KD, 1999.  
Phase-display library selection of high-affinity human single-chain antibodies to tumor-associated carbohydrate antigens sialyl Lewis<sup>x</sup> and Lewis<sup>x</sup>.  
*Proceedings of the National Academy of Science U.S.A.*,96:6953-6958.
- Merkel R, Nassoy P, Leung A, Ritchie K et Evans E, 1999.  
Energy landscapes of receptor-ligand bonds explored with dynamic force microscopy.  
*Nature*,397:50-53.
- Nicholson MW, Barclay AN, Singer MS, Rosen SD et van der Merwe PA, 1998.  
Affinity and kinetic of L-selectin (CD62L) binding to glycosylation-dependent cell-adhesion molecule-1.  
*Journal of Biological Chemistry*,273:763-770.

- Puech PH, 2003.  
Vésicules géantes décorées : adhésion et transport.  
Paris: Université de Paris VI.
- Puech PH, Feracci H et Brochard-Wyart F, 2004.  
Adhesion between Giant Vesicles and Supported Bilayers Decorated with Chelated E-Cadherin Fragments.  
*Langmuir*,20:9763-9768.
- Riveline D, Zamir E, Balaban NQ, Schwarz US, Ishizaki T, Narumiya S, Kam Z, Geiger B et Bershadsky AD, 2001.  
Focal contacts as mechanosensors: externally applied local mechanical force induces growth of focal contacts by an mDia1-dependent and ROCK-independent mechanism.  
*Journal of Cell Biology*,153:1175-86.
- Seifert U et Lipowsky R, 1990.  
Adhesion of vesicles.  
*Physical Review A*,42:4768-4771.
- Seifert U et Lipowsky R, 1993.  
Adhesion and unbinding of vesicles. In: Dynamical phenomena at surfaces, interfaces, and membranes. Beysens D, Boccara N, Forgacs S, Nova Science Publishers, New York
- Sheetz MP, Felsenfeld DP et Galbraith CG, 1998.  
Cell migration : regulation of force on extracellular-matrix-integrin complexes.  
*Trends in Cell Biology*,8:51-54.
- Shenoy VB et Freund LB, 2005.  
Growth and shape stability of a biological membrane adhesion complex in the diffusion-mediated regime.  
*Proceedings of the National Academy of Science U.S.A.*,102:3213-3218.
- Tan JL, Tien J, Pirone DM, Gray DS, Bhadriraju K et Chen CS, 2003.  
Cells lying on a bed of microneedles : An approach to isolate mechanical force.  
*Proceedings of the National Academy of Science U.S.A.*,100:1484-1489.
- Tordeux C, Fournier JB et Galatola P, 2002.  
Analytical characterization of adhering vesicles.  
*Physical Review E*,65:041912.
- Troyanovsky SM, 1999.  
Mechanism of cell-cell adhesion complex assembly.  
*Current Opinion in Cell Biology*,11:561-566.
- Yu F, Yao D et Knoll W, 2003.  
Surface-Plasmon-Field-Enhanced Fluorescence Spectroscopy Studies of Interactions between Antibody and Surface Coupled Antigen.



**Partie 1 : Adhésion cellulaire**

*Analytical Chemistry*,75:2610-2617.

Zaidel-Bar R, Cohen M, Addadi L et Geiger B, 2004.  
Hierarchical assembly of cell-matrix adhesion complexes.  
*Biochemical Society Transactions*,32:416-420.

Zamir E et Geiger B, 2001.  
Molecular complexity and dynamics of cell-matrix adhesions.  
*Journal of Cell Science*,114:3583-3590.

Zamir E, Katz M, Posen Y, Erez N, Yamada KM, Kazt BZ, Lin S, Lin CD,  
Bershadsky A, Kam Z et Geiger B, 2000.  
Dynamics and segregation of cell-matrix adhesion in cultured fibroblasts.  
*Nature Cell Biology*,2:191-196.

## Chapitre II

# Systeme d'étude et technique expérimentale choisie

Les expériences de dynamique d'étalement que nous décrivons dans les chapitre IV et V ne nécessitent aucune compétence technique particulière. Il s'agira simplement de laisser tomber des vésicules, globules rouges et cellules sur une surface et de les regarder s'étaler. L'action de l'expérimentateur est pour ainsi dire pratiquement nulle. Son activité se situe plutôt en amont dans la préparation des échantillons et en aval dans l'analyse des résultats.

Dans ce chapitre, nous allons décrire les différents systèmes d'étude utilisés, en partant du plus simple, les vésicules, pour finir par le plus complexe, les cellules eucaryotes. Ensuite nous détaillerons la technique de microscopie à contraste interférentiel par réflexion qui va nous permettre d'observer les zones de contact développées par nos objets sur des surfaces adhérentes. Les préparations des différentes surfaces seront l'objet du chapitre suivant.

### **II.A. Trois niveaux de complexité : de la membrane modèle à la cellule**

Extérieurement, les premiers contacts d'une cellule sur un substrat s'établissent avec la membrane plasmique. Les vésicules, étant composées d'une simple bicouche lipidique, constituent le système membranaire le plus simple. Plus complexes, les globules rouges, faciles à manipuler, possèdent en plus un squelette interne bidimensionnel soutenant la membrane. Finalement les cellules eucaryotes présentent une membrane plasmique qui englobe toute une machinerie active bio chimique et physique, au contraire du comportement passif du globule rouge, et un

## Partie 1 : Adhésion cellulaire

cytosquelette très dynamique (Figure II.1.). Dans un premier temps, nous rappellerons les points principaux sur la physique des membranes qui ont été largement développés grâce aux vésicules. Nous introduirons ainsi deux paramètres physiques qui interviendront tout au long de ce travail de thèse : la tension de membrane et la rigidité de courbure. Enfin, nous insisterons sur les différences entre ces membranes modèle et les deux types de cellules que nous avons utilisés.

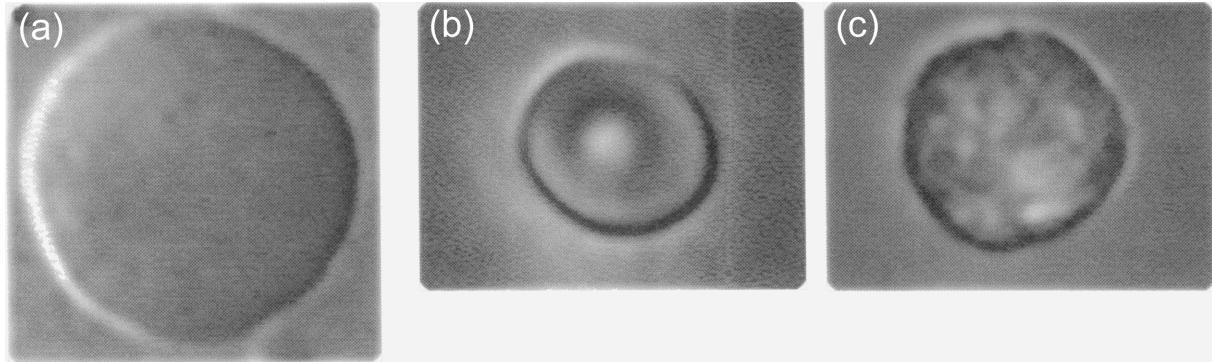


Figure II.1. : Images par vidéo microscopie des trois objets étudiés : la vésicule, ici de diamètre  $12\mu\text{m}$  (a), le globule rouge de diamètre  $7\mu\text{m}$  (b) et la cellule eucaryote, ici un neutrophile de diamètre  $12\mu\text{m}$  (c) (Extrait de (Luisi et Walde, 2000)).

### II.A.1. Les vésicules

Si l'existence d'une barrière lipidique entre le cytoplasme d'une cellule et le monde extérieure est connue depuis plus d'un siècle, l'étude de simple bicouche lipidique, matérialisée par exemple par les vésicules géantes unilamellaires synthétiques ("Giant Unilamellar Vesicles", GUVs), n'a commencé qu'au cours des années 70 du siècle dernier.

#### II.A.1.a. La membrane d'une vésicule est liquide.

Une membrane est composée d'un ensemble de lipides. Un lipide est une molécule amphiphile qui possède à la fois une tête polaire et de plusieurs queues hydrophobes (voir annexe A). Ces queues s'assemblent entre elles pour éviter le contact avec l'eau alors que les têtes polaires sont dirigées vers l'eau. Suivant la géométrie de la molécule, l'auto-assemblage conduit à différentes formes, que nous ne détaillerons pas ici (Israelachvili, 1992; Lipowsky, 1995). Différentes organisations

sont possibles donnant lieu des diagrammes de phases riches. Dans notre cas, les lipides utilisés donnent lieu à des bicouches planes homogènes et fluides. Ces bicouches peuvent se refermer pour former des vésicules. Dans certaines conditions de préparation, leur taille peut être supérieure à  $10\mu\text{m}$  (GUVs). Etant donnée la taille des lipides de l'ordre du nanomètre pour une surface de tête polaire de  $0.5\text{nm}^2$ , les GUVs peuvent être considérées comme des surfaces planes.

L'une des premières propriétés importantes des bicouches lipidiques est la fluidité de la membrane, lorsqu'on se place au dessus de la température de transition gel/liquide des lipides. Les lipides sont capables alors de diffuser librement à la surface de la membrane, l'échange entre lipides voisins étant possible. La diffusion latérale est très rapide dans des membranes homogènes et fluides : le coefficient de diffusion est de l'ordre du  $\mu\text{m}^2/\text{s}$ , c'est-à-dire qu'un lipide dans une vésicule de  $10\mu\text{m}$  met 5min à parcourir l'ensemble de la surface de la vésicule. Notons que ce coefficient de diffusion dépend de la température et bien évidemment de la phase de la membrane dans laquelle le lipide diffuse. Expérimentalement, ce coefficient de diffusion a été mesuré par différentes techniques, de la plus lourde par RMN (Saxton et Jacobson, 1997; Smith et Oldfield, 1984) à la plus "simple" en observant le mouvement individuel de lipide (Saxton et Jacobson, 1997).

Si les lipides peuvent diffuser, ils peuvent aussi basculer d'une mono-couche à l'autre par un mouvement de "flip-flop". Ce phénomène est très lent pour une bicouche parfaitement plane de l'ordre de  $10^{-8}\text{s}^{-1}$  (Alberts *et al*, 1995). Cependant, il peut être accéléré soit lorsqu'une différence d'aire entre la couche interne et externe est appliquée, notamment lors de la formation d'un tube de membrane (Raphael et Waugh, 1996), ou par l'action de protéines appelées flippases (Sprong *et al*, 2001).

### **II.A.1.b. La membrane d'une vésicule peut se courber et se "tendre"**

#### **II.A.1.b.i. Déformations de membrane**

A une échelle supérieure à celle des lipides, la membrane peut être modélisée par un milieu continu. La description utilisée ne tient compte que des propriétés géométriques des surfaces et des propriétés physiques des fluides élastiques. Nous

## Partie 1 : Adhésion cellulaire

allons voir ici une description classique des bicouches inspirée des travaux de Canham (Canham, 1970), Helfrich (Helfrich, 1973) et Evans (Evans, 1973). L'énergie élastique est décrite à partir de trois modes de déformation de la membrane, que sont la compression-extension, le cisaillement et la courbure (Figure II.2). Toute déformation est une combinaison linéaire de ces trois déformations élémentaires.

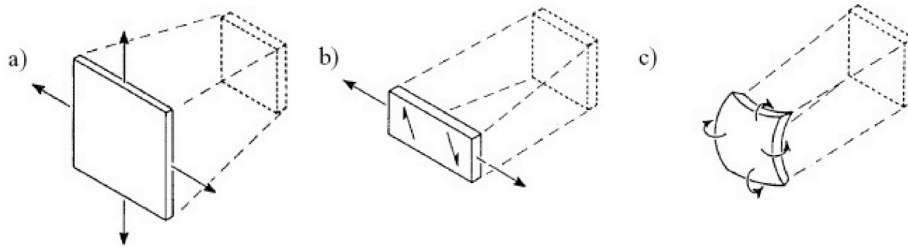


Figure II.2. : Les trois déformations possibles : a) compression-extension, b) cisaillement, et c) courbure (Extrait de (Evans et Needham, 1986))

Le premier type de déformation citée est la compression-extension. Elle correspond à une déformation identique dans toutes les directions du plan de la membrane (Figure II.2.a.). C'est une déformation élastique caractérisée par un module de compressibilité,  $K_a$ . Ce module a été estimé de l'ordre de 0.2N/m pour des vésicules par des techniques d'aspiration par micropipette (Evans et Rawicz, 1990; Olbrich *et al*, 2000). Nous verrons dans la partie "tube" au chapitre IV, que l'extraction de tube à surface constante est sensible à ce type de déformation. L'énergie associée par unité de surface,  $H_{ext}$ , dépend quadratiquement avec la variation de la surface :

$$H_{ext} = \frac{1}{2} K_a \left( \frac{\Delta A}{A} \right)^2 \quad \text{II.1,}$$

où  $\Delta A/A$  est la variation relative de surface associée à la déformation. Cette variation n'excède jamais 8%. Au delà des pores s'ouvrent dans la membrane impliquant pour une tension critique de l'ordre de  $10^{-3}$ N/m, la lyse de la vésicule (Sandre *et al*, 1999). Remarquons que l'ajout de tensio-actif dans la membrane peut ralentir le phénomène de lyse (Puech *et al*, 2003).

Le deuxième mode de déformation évoquée est le cisaillement. C'est une déformation à surface constante dans une direction du plan de la membrane (Figure II.2.b.). L'énergie associée par unité de surface,  $H_{cis}$ , est obtenue à partir de la loi de Hooke donnée par l'équation suivante :

## Chapitre II : Système d'étude et technique expérimentale choisie

$$H_{\text{cis}} = \frac{1}{2} \mu (\lambda^2 + \lambda^{-2} - 2) \quad \text{II.2,}$$

où  $\lambda = (L_0 + \Delta L)/L_0$  est le taux d'extension latérale et  $\mu$ , le module de cisaillement. Dans le cas de membranes fluides, l'énergie est négligeable : étant à surface constante, les lipides sont libres de diffuser et n'offrent pas de résistance au cisaillement. Cette déformation n'intervient que dans le cadre de systèmes plus complexes comme des membranes polymérisées, à structure cristalline ou lorsque la membrane est associée à un cytosquelette.

Finalement, le troisième mode de déformation regroupe sous le nom de courbure toutes les déformations qui ne sont pas dans le plan de la membrane et qui sont réalisées à surface constante (Figure II.2.c.). Elle constitue la contribution principale des trois citées et l'énergie associée,  $H_{\text{courb}}$ , est donnée par l'équation suivante :

$$H_{\text{courb}} = \frac{1}{2} \kappa (c_1 + c_2 - c_0)^2 + \kappa_G c_1 c_2 \quad \text{II.3.}$$

où  $c_1 = 1/R_1$  et  $c_2 = 1/R_2$  sont les courbures principales de la membrane et  $R_1, R_2$ , sont les deux rayons principaux dans deux directions perpendiculaires.  $c_0$  est la courbure spontanée, c'est-à-dire, la courbure locale de la membrane sans contrainte mécanique. Ce terme correspond à une éventuelle asymétrie de la membrane soit dans la composition lipidique des deux feuilletts de la membrane, soit associée à la forme adoptée par la bicouche en absence de contrainte. Le produit  $c_1 c_2$  est la courbure gaussienne. Le théorème de Gauss-Bonnet montre que ce produit intégré sur la surface de la vésicule est un invariant topologique : comme dans notre étude, les déformations appliquées aux membranes n'impliquent pas de changement topologique (vésicule torique par exemple), nous ne prendront pas en compte ce terme caractérisée par le module de courbure gaussienne,  $\kappa_G$ .

$\kappa$  est le module de rigidité de courbure (homogène à une énergie et exprimé en unité d'énergie thermique  $k_B T$ ). Il dépend de la température et de la composition de la membrane. Il existe de nombreuses techniques pour mesurer ce module. Elles peuvent être classées en deux catégories :

\* les techniques basées sur l'analyse des fluctuations de forme de vésicules quasi sphériques qui combinent la détection de contours de la vésicule et une analyse de Fourier rapide des images en microscopie de fluorescence (Schneider *et al*, 1984), de contraste de phase (Pécraux *et al*, 2004). La lumière pulsée peut être

## Partie 1 : Adhésion cellulaire

aussi utilisée (Méléard *et al*, 1992). Ce sont des techniques non perturbatives, n'impliquant pas de déformations supplémentaires aux membranes ;

\* les techniques qui étudient la réponse élastique à une déformation mécanique de la membrane créée par aspiration dans une micropipette (Kwok et Evans, 1981; Zhelev *et al*, 1994). D'autres utilisent un champ électrique alternatif (Kummrow et Helfrich, 1991) ou un champ magnétique sur une vésicule remplie d'un ferrofluide (Bacri *et al*, 1996).

Il est à noter que pour des vésicules constituées d'un même type de lipide, ces techniques ont donné des valeurs sensiblement différentes, restant cependant autour de la dizaine de  $k_B T$ . Une explication est que ces techniques sondent des domaines de longueurs d'onde différents, par exemple les techniques d'analyses de contour ne permettent pas d'accéder au régime des courtes longueurs d'onde. Nous verrons d'autres techniques utilisées basées sur l'extraction de tubes de membranes (voir partie "tubes" chapitre I) et nous validerons un nouveau dispositif expérimental novateur permettant de passer outre le contrôle de la tension de membrane dans la détermination du module de courbure (voir partie "tube" chapitre V).

L'énergie associée à la courbure intégrée sur l'ensemble de la membrane est donnée par l'hamiltonien de Canham-Helfrich (Canham, 1970; Helfrich, 1973) :

$$H = \oint H_{\text{courb}} dA = \oint \left( \frac{1}{2} \kappa (c_1 + c_2 - c_0)^2 + \kappa_G c_1 c_2 \right) dA \quad \text{II.4.}$$

Cet hamiltonien suffit en première approximation à décrire la forme d'une membrane. Il constitue le "modèle de courbure". Bien sûr cette expression ne tient pas compte de toutes les contraintes imposées au système. En l'absence d'échange de lipides entre la membrane et le fluide environnant, la membrane peut être considérée comme une surface à aire constante. Cette propriété va introduire une notion importante qu'est la tension de membrane.

### II.A.1.b.ii. Tension de membrane

Deux écoles, si on peut dire, définissent la tension de membrane. D'un côté, les théoriciens ne considèrent pas la tension de membrane, mais préfèrent utiliser un multiplicateur de Lagrange associé à la conservation de l'aire (Seifert, 1995) :

$$H = \oint (H_{\text{courb}} + \sigma) dA \quad \text{II.5.}$$

## Chapitre II : Système d'étude et technique expérimentale choisie

De l'autre côté, les expérimentateurs préfèrent parler de tension latérale,  $\sigma$ , qui est un paramètre intensif associé à l'aire de la vésicule  $\sigma = \partial F / \partial A$  où  $F$  est l'énergie libre de la membrane. Dans ce cas, deux régimes sont clairement définis. Le premier reprend la définition de l'élasticité de la membrane. Lorsqu'une membrane est étirée, celle-ci est mise sous tension et son aire varie de  $\Delta A$ , c'est le régime où l'aire moyenne de chaque lipide augmente avec la tension : la tension tend à écarter les lipides. La variation d'énergie associée à cette transformation est  $\sigma \Delta A$ . En introduisant une densité d'énergie surfacique pour une membrane tendue, la relation suivante est obtenue :

$$H_{\text{tens}} = \sigma \frac{\Delta A}{A} \quad \text{II.6.}$$

En reprenant la relation II.1., la tension de membrane s'écrit alors par :

$$\sigma = K_a \frac{\Delta A}{A} \quad \text{II.7.}$$

L'origine de la tension est ici enthalpique mais ne décrit pas tous les régimes de tension possible. En effet il faut noter que la relation II.7. n'est valable que pour une membrane préalablement tendue.

Expérimentalement, les vésicules ne sont pas dans un régime tendu, mais dans un régime dit « de fluctuations ». Une membrane lipidique, par sa faible épaisseur (5nm), est soumise à l'agitation thermique. Dans un milieu aqueux, le choc des molécules d'eau va faire fluctuer la membrane autour d'une position moyenne. En conséquence, l'aire observée par microscopie optique ne correspond pas à l'aire réelle de la surface mais à l'aire projetée (Figure II.3.).

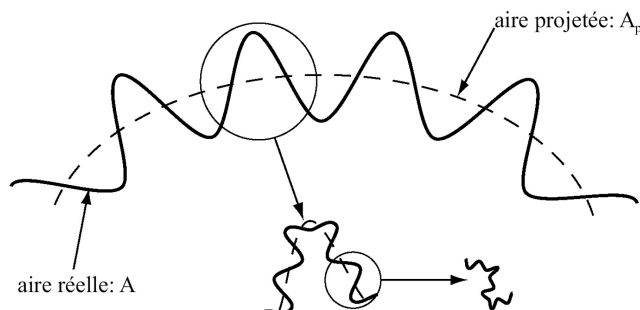


Figure II.3. : Représentation schématique d'une membrane fluctuante à toutes les échelles spatiales (presque!). Chaque élément d'aire de la surface projetée  $A_p$  (traits pointillés) a une masse plus grande que la surface réelle (trait plein) en raison du froissage. Le degré de froissage peut localement changer la densité effective et rendre la membrane compressible (extrait de (Girard, 2004)).



## Partie 1 : Adhésion cellulaire

Il est à noter que les fluctuations ont été observées visuellement sur des globules rouges, il y a plus d'un siècle, par le biologiste E. Browicz sous forme de scintillement et expliquées par Françoise Brochard et J.-F. Lennon par des arguments de fluctuation thermique (Brochard et Lennon, 1975). De la même manière que précédemment, la densité de membrane peut être écrite en utilisant la variation relative entre l'aire réelle et l'aire projetée (Helfrich et Servuss, 1984). De plus, pour des vésicules sphériques le terme de courbure gaussienne est nulle, la contribution associée au cisaillement est négligeable et, dans le cas de vésicules purement fluctuantes, le terme associé à l'extension de la membrane est négligeable. Par conséquent la densité d'énergie surfacique,  $H$ , de la membrane s'écrit :

$$H = \frac{1}{2} \kappa (c_1 + c_2 - c_0)^2 + \sigma \frac{\Delta A}{A} \quad \text{II.8.}$$

En appliquant le théorème d'équipartition de l'énergie, pour chaque mode de fluctuations, à la relation précédente, la tension de membrane pour une vésicule fluctuante et fluide peut s'écrire sous la forme :

$$\sigma = \sigma_0 \exp\left(-\frac{8\pi\kappa}{k_B T} \frac{\Delta A}{A}\right) \quad \text{II.9,}$$

où  $\sigma_0$ , est une tension de membrane reliée à un "cut-off" microscopique associé aux lipides (Helfrich, 1985). Pour des valeurs typiques de tension de l'ordre de  $10^{-5}$ N/m et de module de courbure de l'ordre de  $10k_B T$ , l'excès d'aire correspond à  $\Delta A/A=5\%$ .

Dans le cas général où l'extension d'aire est telle que le régime élastique est atteint, il a été montré expérimentalement (Evans et Rawicz, 1990) ou théoriquement (Fournier *et al*, 2001) que l'excès d'aire  $\Delta A/A$  peut être exprimé en fonction de la tension de membrane en additionnant les deux contributions de fluctuation et d'élasticité :

$$\frac{\Delta A}{A} = \frac{k_B T}{8\pi\kappa} \ln\left(\frac{\sigma}{\sigma_1}\right) + \frac{\sigma - \sigma_1}{K_a} \quad \text{II.10,}$$

où  $\sigma_1$  est un paramètre ajustable homogène à une tension.

Cette relation indique que si une membrane est soumise à une contrainte, les fluctuations macroscopiques vont d'abord être dépliées correspondant au terme "terme logarithmique", et ensuite la membrane sera tendue de manière élastique, le terme logarithmique est alors négligeable et le terme linéaire domine. On peut aussi se représenter la membrane comme une suite de ressort en série, les uns

entropiques correspondant aux fluctuations et de raideur faible, les autres élastiques correspondant à l'extension de la membrane et de raideur plus importante.

Cette relation a permis de décrire le comportement d'une vésicule aspirée de façon contrôlée dans une micropipette (Evans et Rawicz, 1990). De plus nous verrons que cette relation est encore vérifiée et permet de rendre compte de nos résultats lors de l'extension d'un tube de membrane à surface constante (voir partie "tube" chapitre IV).

Les descriptions exposées précédemment ne prennent pas en compte l'existence de la structure en bicouche et le fait que ces deux monocouches peuvent avoir une aire différente, ceci induisant une courbure supplémentaire (Miao *et al*, 1994). Nous ne rentrerons pas dans les détails du modèle ADE (Area Difference Elasticity) permettant de décrire de façon plus complète les différentes morphologies des vésicules (Döbereiner, 2000).

### II.A.2. Les globules rouges

Si la vésicule est composée d'une simple bicouche lipidique composée ou non d'un seul type de lipide, le globule rouge est un système plus complexe. L'existence d'un squelette interne va lui conférer des propriétés mécaniques, notamment de cisaillement, supplémentaires par rapport à des vésicules. Ces propriétés seront développées dans la partie "tube"-chapitre VII. Dans ce paragraphe, nous verrons simplement quelques aspects morphologiques et bio-chimiques du globules rouges.

Le globule rouge est un composant essentiel du sang, transportant l'oxygène à travers l'organisme. Morphologiquement, l'érythrocyte est une cellule discoïde, biconcave, de 7 à 8 $\mu$ m de diamètre et 1.5 $\mu$ m d'épaisseur. C'est une cellule sans noyau ni organelles (pour les globules rouges de mammifère). L'intérieur est principalement composé d'une solution d'hémoglobine de concentration 20g/dl et de viscosité de 20mPa.s.

Cette cellule est sensible à la pression osmotique du milieu environnant. La figure II.4. montre une série de globules rouges dans différentes conditions d'osmolarité, des conditions physiologiques (300mOs) à des milieux hypotoniques

## Partie 1 : Adhésion cellulaire

(130mOs). Lorsque la pression osmotique du milieu extérieur diminue, le globule rouge se gonfle d'eau pour équilibrer sa pression interne. Nous devons noter une première différence mécanique entre les globules rouges et les vésicules. La tension de lyse est moins élevée pour les érythrocytes de l'ordre de  $10^{-3}$ N/m par rapport aux simples bicouches lipidiques de composition équivalente de l'ordre de  $2.10^{-3}$ N/m (Mohandas et Evans, 1994). Les auteurs évoquent la possible relation de la présence des protéines transmembranaires avec la baisse de la tension de lyse.

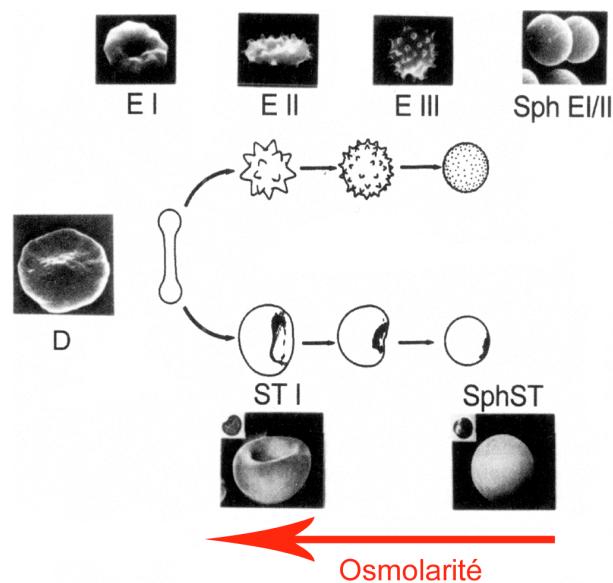


Figure II.4. : Evolution de la forme des globules rouges par changement de volume (d'osmolarité) ou à volume constant. La forme physiologique est un discocytes (D) et les changements morphologiques conduisent soit à des stomatocytes (ST) de plus en plus sphériques (SphST) (différence d'osmolarité) soit à des échinocytes (E) de plus en plus sphériques (SphE) (volume constant) (extrait de (Bernhardt et Clive Ellory, 2003)).

La bicouche lipidique du globule rouge est composée d'une multitude de lipides que nous pouvons diviser en quatre familles : les phospholipides, le cholestérol, les sphingoglycolipides et les acides gras (Tableau II.1.) (Mohandas et Evans, 1994). En plus de la variété lipidique, les compositions des feuillettes internes et externes de la membrane sont différentes. Notamment les lipides chargés (PS) sont préférentiellement dans la membrane interne au contraire des lipides non chargés (PC, SM). Le feuillet interne contient également une forte proportion de lipides PE, lipide qui induit, en général une courbure négative. Ce mélange d'un grand nombre de lipides fait qu'il n'y a pas de séparation de phase macroscopique (voir partie "tube"-chapitre VI). Dans la suite, nous négligerons l'asymétrie de composition des feuillettes internes et externes.

## Chapitre II : Système d'étude et technique expérimentale choisie

Types de lipides	Composition lipidique dans la totalité de la membrane (%)	Composition lipidique dans le feuillet externe (% par rapport à la totalité)	Composition lipidique dans le feuillet interne (% par rapport à la totalité)
PhosphatidylCholine (PC)	30	75	25
Sphingomyeline (SM)	25	75	25
PhosphatidylEthanolamine (PE)	28	20	80
PhosphatidylSerine (PS)	14	20	80
Autres	2	∅	∅

Tableau II.1. : Composition lipidique d'un globule rouge (adapté de (Mohandas et Evans, 1994)).

La membrane de l'érythrocyte n'est pas seulement composée d'une simple bicouche lipidique mais aussi d'un réseau bidimensionnel hautement organisé de protéines : le squelette. Ce squelette tapisse la face interne de la bicouche. Il est constitué principalement de longs filaments de spectrine reliés entre eux par des complexes de jonction. Essentiellement, ces complexes sont composés d'actine polymérisée, de protéines 4.1 et de tropomyosine (Figure II.5. et II.6.).

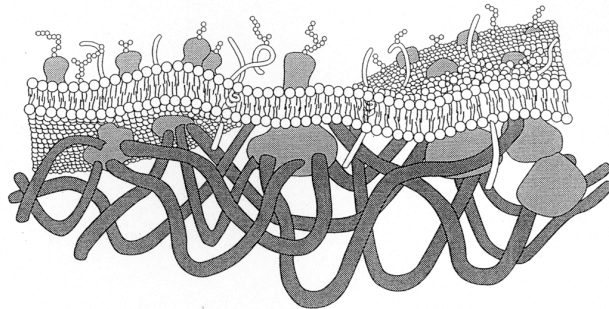


Figure II.5. : Schéma de la membrane d'un globule rouge en coupe comportant la bicouche lipidique, les protéines transmembranaires et le squelette de spectrine (Extrait de (Mohandas et Evans, 1994)).

Le réseau bidimensionnel est présenté dans la figure II.6.a.. La microscopie électronique révèle une structure en réseau triangulaire. Chaque arête est composée de plusieurs filaments de spectrine et chaque sommet correspond à un complexe de jonction. La spectrine est une protéine déformable composée de quatre tétramères.

## Partie 1 : Adhésion cellulaire

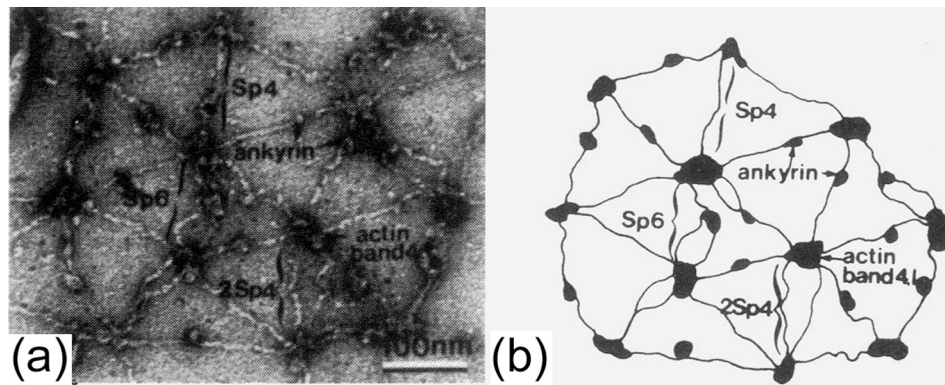


Figure II.6. : (a) Photographie en microscopie électronique du squelette du globule rouge. La barre d'échelle représente nm. (b) Schéma présentant les protéines essentielles du réseau et de la membrane lipidique où Sp représente la spectrine. (extrait (Mohandas et Evans, 1994))

En plus des ces attaches membranaires, il existe des protéines transmembranaires. En particulier, la protéine bande 3 interagit avec le réseau de spectrine via l'ankyrine. Cette dernière est en proportion égale avec les arêtes du réseau de spectrine.

A la différence des cellules eucaryotes, le globule rouge n'est pas un système actif mais passif. Notamment, l'action de la température joue un rôle qui peut être critique sur les propriétés mécaniques, les conformations des différentes protéines présentes étant alors modifiées. Par exemple un globule rouge qui obstrue une pipette de  $1.3\mu\text{m}$  à température ambiante passera à travers au-delà d'une température critique de  $36.4^\circ\text{C}$  (Artmann *et al*, 1999). Dans le même esprit, un globule rouge aspiré dans une micropipette pendant plusieurs minutes garde une déformation permanente due à une possible réorganisation du squelette (Evans et La Celle, 1975).

### II.A.3. Les cellules

Lorsqu'on en arrive à la cellule, tout devient beaucoup plus compliqué, notamment avec la dynamique de la membrane et du cytosquelette. Une cellule eucaryote est constituée d'une membrane plasmique qui entoure de nombreux organites (Reticulum endoplasmique, Golgi, endosomes...) (Figure II.7.a). Elle contient également un noyau et des mitochondries. De nombreux échanges entre

ces organites et la membrane plasmique engendrent une importante dynamique membranaire.

Ces membranes sont constituées d'une grande diversité de lipides et de protéines membranaires. Définir les propriétés mécaniques de telles membranes en terme de tension et de rigidité de courbure, mais aussi de diagramme de phase est évidemment plus compliqué. Ces cellules contiennent de plus un cytosquelette actif composé de trois types de filaments, les microtubules, les filaments intermédiaires et l'actine polymérisée. La figure II.7.b permet de situer les différents éléments filamentaires au sein du cytoplasme.

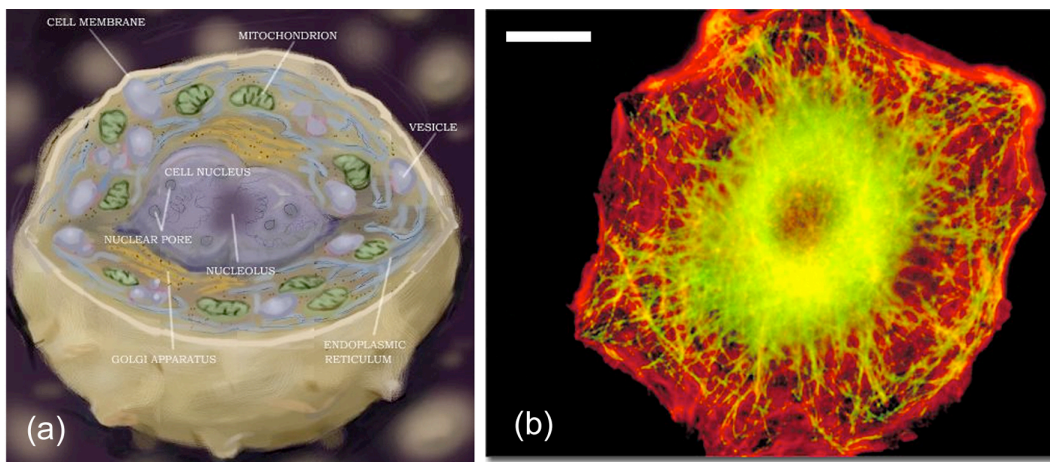


Figure II.7. : (a) Représentation schématique d'une cellule montrant les différents organites intracellulaire (Extrait de [www.dartmouth.edu/~cbbc/courses](http://www.dartmouth.edu/~cbbc/courses)). (b) Image par microscopie de fluorescence des deux composants principaux du cytosquelette : l'actine filamentaire (en rouge) et les microtubules (en vert) (Extrait de [www.olympusmicro.com](http://www.olympusmicro.com)).

Ces structures protéiques sont elles-aussi très dynamiques. Elles peuvent former de longues structures tubulaires (Mt) mais également des réseaux ou des gels (actine). Des drogues permettent d'interagir avec la polymérisation du cytosquelette. De nombreuses études *in vitro* ont été réalisées pour étudier les propriétés mécaniques et polymérisation des éléments du cytosquelette. Un élément commun à ces études est encore une fois la complexité du système. Nous ne sommes pas capables d'en faire une revue détaillée, ce qui, de plus allongerait d'autant ce manuscrit déjà long. Nous pouvons simplement citer un exemple concernant l'étirement entre microplaques de cellules (Desprat *et al*, 2005). Si conceptuellement la déformation d'un objet est une manipulation simple, la réalisation et surtout l'interprétation des effets rhéologiques observés s'avèrent difficiles concernant l'origine microscopique du phénomène rhéologique observé

## Partie 1 : Adhésion cellulaire

(Figure II.8.). En effet, un simple modèle défini par un nombre donné de ressorts et de pistons caractérisant respectivement la partie élastique et visqueuse de la cellule ne permet pas de décrire les résultats observés. La déformation de la cellule est caractérisée par une loi de puissance plus compatible avec le comportement d'un verre. De même, nous verrons au chapitre V ce problème de l'interprétation des résultats concernant les expériences de dynamique d'adhésion de cellules.

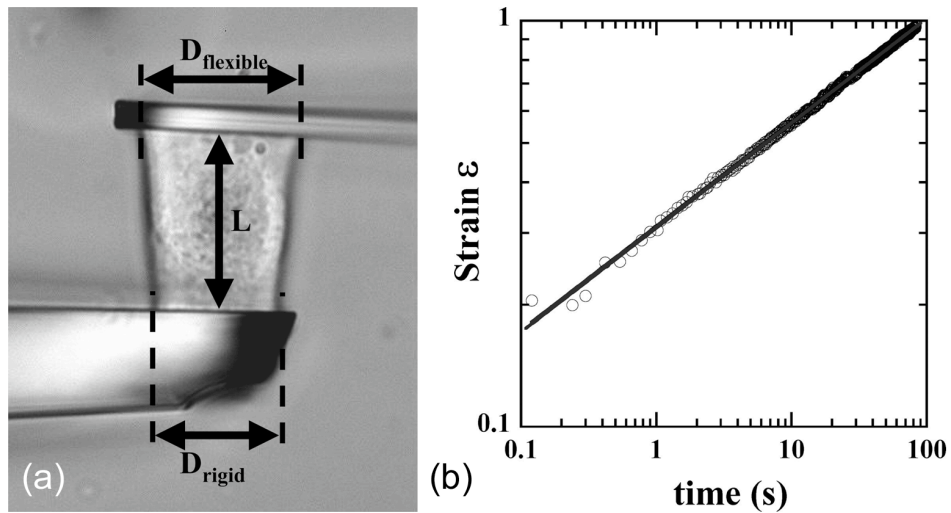


Figure II.8. : Déformation d'une cellule vivante à force constante. (a) Image par vidéo-microscopie d'une cellule étirée entre deux micro-plaques de verre. (b) Variation de la déformation,  $\epsilon$ , en fonction du temps en échelle logarithmique (Extrait de (Desprat *et al*, 2005)).



## II.B. Technique de visualisation : microscopie par réflexion à contraste interférentiel

### II.B.1. Introduction bibliographique

La microscopie par réflexion à contraste interférentiel (« Reflexion Interference Contrast Microscopy » : RICM) est une technique optique de visualisation d'interfaces par interférences reposant sur le principe des franges d'égale épaisseur. Elle permet de mesurer avec une très grande sensibilité la distance d'un objet à un substrat, donc son profil avec une résolution latérale optique. De la même façon que des anneaux de Newton sont les motifs d'interférence caractéristiques d'une lentille déposée sur une surface plane, une cellule ou une vésicule en adhésion sur une surface plane donnera lieu à des motifs particuliers par interférence de faisceaux de lumière monochromatique sur la surface du verre et sur la membrane. La RICM a été d'abord développée pour visualiser les points focaux de cellules sur des substrats sans avoir à utiliser des sondes fluorescentes (Curtis, 1964). Après de premières utilisations qualitatives de ce genre, une analyse plus quantitative de la RICM a ensuite été développée et le contraste de la méthode amélioré en utilisant les propriétés des faisceaux polarisés. De la détermination précise du profil d'une membrane au voisinage d'une surface, les modules de courbure de globules rouges par exemple ont été mesurés par étude du spectre de fluctuations (Zilker *et al*, 1992) ou les tensions de vésicules adhérentes ont été estimées (Bruinsma et Sackmann, 2001). D'autres applications telles que la « Biomembrane Force Probe » (en mode vertical) exploitent la remarquable résolution spatiale verticale (de l'ordre de 5-10 nm) pour détecter des ruptures de contact adhésif (Merkel *et al*, 1999) ou pour sonder la compressibilité de fantômes de globules rouges (Heinrich *et al*, 2001). Alors qu'un avantage de la RICM réside dans le fait qu'elle a une très grande sensibilité sous l'eau, donc dans des conditions physiologiques et qu'elle permet une visualisation des contacts en temps réel, un de ses principaux inconvénients est la difficulté à extraire de façon absolue une distance de séparation membrane-substrat, puisque, comme toutes les méthodes interférentielles, elle ne permet d'obtenir que des mesures relatives par rapport à l'interfrange. Pourtant, le groupe de Sackmann a



## **Partie 1 : Adhésion cellulaire**

proposé récemment une modification expérimentale du dispositif de base qui consiste à effectuer de la RICM à deux longueurs d'onde et qui permettrait donc d'obtenir des mesures de distance absolue (Schilling *et al*, 2004).

L'utilisation de la RICM que nous en avons faite au cours de ce travail n'a pas nécessité de tels raffinements. En général nous avons seulement mesuré l'aire contact des vésicules et dans certains cas le profil d'une vésicule adhéree. Ce type de mesure, apparemment rudimentaire, ne pose pas de problème dans le cas de vésicules synthétiques. En revanche, comme P. Bongrand l'a décrit en grands détails, pour des cellules vivantes, le traitement des images doit être parfois plus rigoureux du fait de la présence de structure cellulaires internes conduisant à des hétérogénéités d'indice de réfraction et qui peuvent altérer localement le motif d'interférences (Pierres *et al*, 2003).

Dans le reste de ce chapitre, nous décrivons le principe de base de la technique de RICM et les applications principales qui nous servirons par la suite. Cela nous permettra de définir précisément ce que nous appelons RICM. Certains groupes font une distinction entre RICM et IRM (« Interference Contrast Microscopy »). Nous n'en faisons pas.

### **II.B.2. Principe : comment obtenir une image en microscopie à contraste interférentiel ?**

Le principe de la RICM repose sur l'illumination d'un objet proche d'une surface (c'est-à-dire typiquement à moins de 1 micron) avec une lumière monochromatique. Concrètement, les échantillons, constitués d'une lame de verre sur laquelle est déposée une solution contenant les cellules ou vésicules, sont placés sur la platine d'un microscope inversé (Zeiss, Axiovert 200) et sont éclairés par une lampe à arc à vapeur de mercure (HBO, 200Watts). Une partie du spectre est sélectionnée grâce à un filtre interférentiel très sélectif ( $\lambda=546\text{nm}$ , correspondant à une raie verte, avec  $\Delta\lambda=10\text{nm}$ ). L'éclairage est épiscopique, c'est-à-dire que l'on éclaire l'échantillon à travers l'objectif. La lumière qui se réfléchit aux différentes interfaces est ensuite récupérée dans l'objectif (Figure II.9.). L'interférogramme est capturé : i) soit par une caméra analogique (XC-ST70CE, Sony, Japan) et traité en ligne grâce à un

## Chapitre II : Système d'étude et technique expérimentale choisie

processeur d'image (Argus 20, Hamamatsu) de manière à améliorer la qualité de l'image (contraste et homogénéité) en soustrayant à l'image brute une image de fond, ii) soit par une caméra digitale (CoolSnap<sup>HQ</sup>, Ropper) qui permet d'effectuer la même opération avec une cadence plus faible (maximum 15 images/s) mais une meilleure résolution et sensibilité.

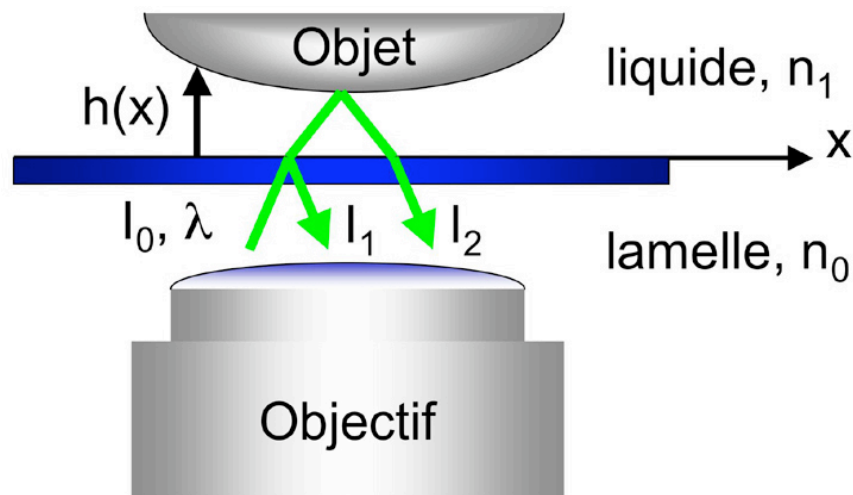


Figure II.9. : Principe de la microscopie à contraste interférentiel en réflexion. Une onde monochromatique est envoyée sur un objet au voisinage d'une surface. Il y a formation d'interférences entre les faisceaux réfléchis par la surface et l'objet.  $n_0$  et  $n_1$  sont respectivement les indices de réfraction de la lame de verre et du milieu environnant,  $I_0$ ,  $I_1$ ,  $I_2$  respectivement les intensités des faisceaux incidents, réfléchis par la lamelle et par l'objet.  $\lambda$  est la longueur d'onde utilisée. La mesure de l'interférogramme permet de d'obtenir la distance  $h(x)$  entre l'objet et la lamelle.

Dans le cas de vésicules ou de globules rouges, nous observons les franges d'interférence d'égale épaisseur entre les rayons réfléchis à l'interface verre-eau et ceux qui se réfléchissent à l'interface vésicule/globule-eau. L'écart entre deux franges est donné par l'équation :

$$i = \frac{\lambda}{2n_1} \quad \text{II.11.}$$

où  $n_1$  est l'indice de réfraction du liquide intercalé (pour l'eau,  $n_1=1.33$ ).

Dans notre cas, l'interfrange  $i$  est de 205 nm, et la distance entre une frange sombre et une frange brillante est de 102.5 nm. Etant donnée la cohérence du faisceau incident, ces franges ne peuvent être observées que si les deux interfaces qui réfléchissent sont suffisamment proches ( $<1\mu\text{m}$ ). (Figure II.10.).

## Partie 1 : Adhésion cellulaire

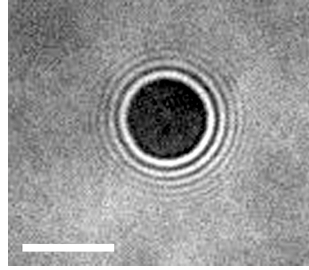


Figure II.10. : Image par RICM d'une vésicule recouverte de streptavidine adhérente sur une surface de verre biotinylée. La zone d'adhésion sombre correspond à des interférences destructives. Les anneaux de Newton sont clairement visibles. La barre d'échelle représente 5µm

L'aire de la zone de d'adhésion entre un objet et la surface de verre peut être mesurée directement et automatiquement par seuillage des images obtenues. Cette mesure sera la base de notre étude dans les chapitres IV et V.

Notons à ce niveau, à titre d'information, que le contraste des images peut être amélioré de deux façons. Tout d'abord, si la surface de verre est recouverte avec une couche diélectrique (Fluorure de Magnésium,  $MgF_2$ ), d'indice proche du milieu aqueux, l'écart entre les intensités réfléchies aux deux interfaces diminue, ce qui améliore le contraste (Rädler et Sackmann, 1993). De plus, ceci conduit à un décalage de l'origine sur l'interférogramme et donc à une zone linéaire plus grande. Cependant cette méthode suppose de modifier les lamelles de verre, ce qui nous empêche ensuite de les fonctionnaliser comme nous le souhaitons. Pour supprimer les réflexions parasites et donc diminuer le bruit des images RICM, il a également été proposé d'ajouter une lame quart d'onde au niveau de l'objectif, ainsi que deux polariseurs croisés. Ces améliorations sont nécessaires pour l'étude des fluctuations des vésicules au voisinage une surface.

Nous n'avons pas eu besoin de recourir à ces deux astuces. L'utilisation d'un filtre interférentiel et d'un objectif x100 de type Neofluar se sont avérées suffisantes pour nos études.

### II.B.3. Analyse quantitative d'images RICM

Nous allons rappeler ici comment il est possible d'obtenir le profil d'un objet au voisinage d'une surface à partir des figures d'interférences. Il s'agit de déterminer le

## Chapitre II : Système d'étude et technique expérimentale choisie

profil d'épaisseur du film fin d'eau (indice  $n_1$ ) intercalé entre l'objet (indice  $n_2$ ) et la lame de verre (indice  $n_0$ ). Bien que la distance entre une frange brillante et une frange sombre soit de l'ordre de 100 nm, une résolution spatiale en  $z$  de l'ordre de 5 à 10 nm peut être obtenue sur l'épaisseur  $h$  du film intercalé par analyse complète du profil d'intensité (la résolution latérale est donnée par la résolution optique).

En incidence normale, l'intensité  $I(h)$  est donnée par :

$$I(h) = I_0 \left( \frac{r_{01}^2 + 2r_{01}r_{12} \cos 2kh + r_{12}^2}{1 - 2r_{01}r_{12} \cos 2kh} \right) \quad \text{II.12,}$$

où  $I_0$  est l'intensité de la lumière incidente,  $k=2\pi n_1/\lambda$  est le vecteur d'onde associé à la longueur d'onde  $\lambda$  et  $r_{ij}=(n_i-n_j)/(n_i+n_j)$  est le coefficient de réflexion (en amplitude) sur l'interface  $i/j$ . Nous avons négligé les termes en  $r_{ij}^n$  avec  $n>2$  ( $r_{ij}\sim 10^{-2}$ ).

Cette équation peut se réécrire :

$$I(x) = I_a \sin^2 \left( 2\pi \frac{n_1 h(x)}{\lambda} \right) + I_b \quad \text{II.13,}$$

où  $I_{\max} = I_0 (r_{01} + |r_{12}|)^2 = I_a + I_b$  est l'intensité d'une frange blanche et  $I_{\min} = I_0 (r_{01} - |r_{12}|)^2 = I_b$  est l'intensité d'une frange noire.

Connaissant  $I_{\max}$  et  $I_{\min}$ , il suffit d'inverser l'équation II.13. pour déterminer le profil  $h(x)$ , modulo l'interfrange  $i$ .

Remarquons que ce calcul ne prend pas en compte la modulation de l'intensité réfléchiée par la dépendance angulaire et la convolution par la fonction de transfert du microscope. Comme on le voit sur la Figure II.11.a, cela conduit à une forte décroissance des maxima et minima des franges avec la distance (Evans *et al*, 1995; Heinrich *et al*, 2001). Dans nos expériences, plutôt que d'ajouter 4 paramètres d'ajustement pour décrire cette enveloppe gaussienne, nous avons, après détection des maxima et minima, ajusté le profil d'intensité suivant un rayon par parties, puis reconstitué le profil par intervalle de 102.5 nm (Figure II.11.b.).

## Partie 1 : Adhésion cellulaire

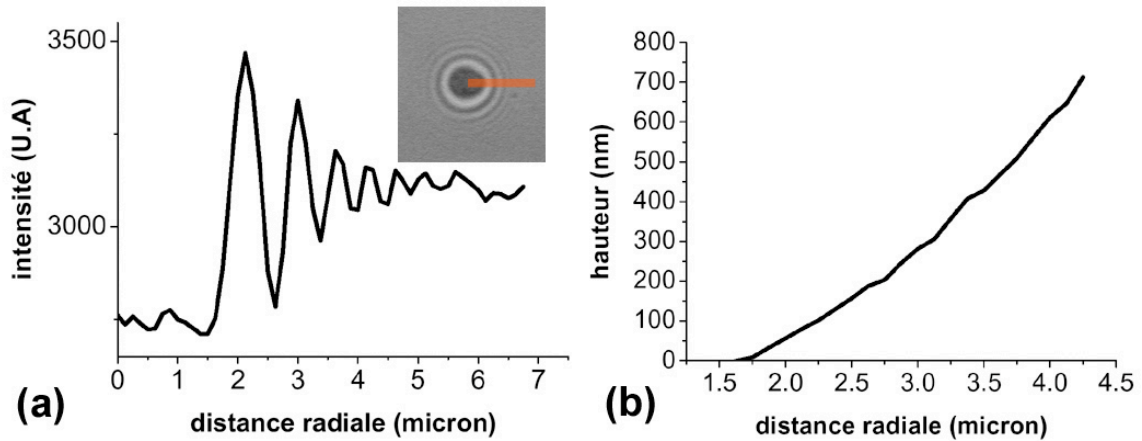


Figure II.11. : (a) Profil d'intensité avec la distance radiale suivant la section rouge d'une vésicule adhérente sur un substrat type caséine-biotine. (b) Profil déduit de la hauteur avec la hauteur suivant la même section.

Enfin, il est possible d'obtenir le profil tridimensionnel d'une vésicule adhérente en répétant l'opération précédente sur différents rayons de l'image RICM. La figure II.12 montre un tel profil 3D de vésicule adhérente. Cependant, cette opération, purement démonstrative, n'apporte pas d'informations quantitatives nouvelles. De plus, comme on le verra aux chapitres suivants, la zone de contact des vésicules s'est avérée quasiment parfaitement circulaire ; une coupe selon un rayon nous a donc suffi pour déterminer de façon fiable et rapide, la dynamique d'étalement.

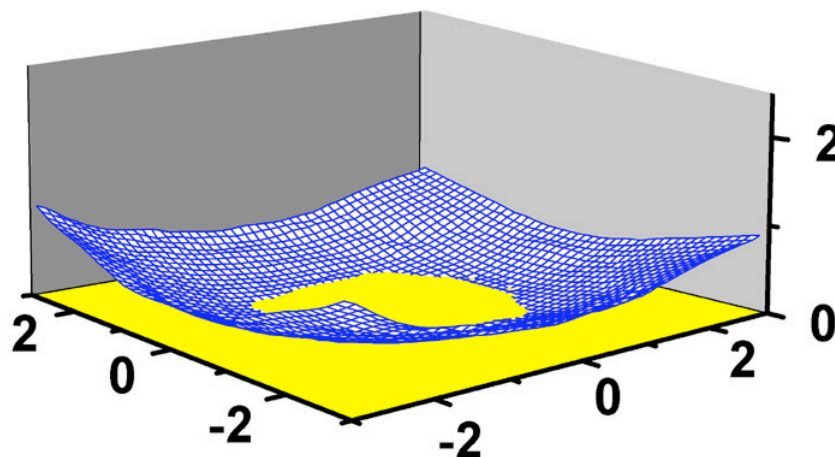


Figure II.12. : Profil tridimensionnel reconstitué à partir d'une image RICM d'une vésicule adhérente sur un substrat. L'échelle est en micromètres.

Le groupe de Sackmann a proposé et largement exploité la possibilité de déduire certaines propriétés mécaniques de membrane du profil au voisinage de la ligne de contact (Albersdörfer *et al*, 1998). Comme on le voit sur la figure II.13, le

profil près de la ligne de contact n'est pas un coin d'angle de contact  $\theta$ , caractérisé par une discontinuité de pente. Du fait de l'énergie de courbure de la membrane, l'angle passe continûment de 0 à  $\theta$  sur une longueur caractéristique,  $\lambda$ , appelée longueur d'extrapolation (Rädler *et al*, 1995). Cette longueur est fixée par la courbure,  $\kappa$ , et la tension de membrane,  $\sigma$ , et définie par :

$$\lambda = \sqrt{\frac{\kappa}{\sigma}} \quad \text{II.14.}$$

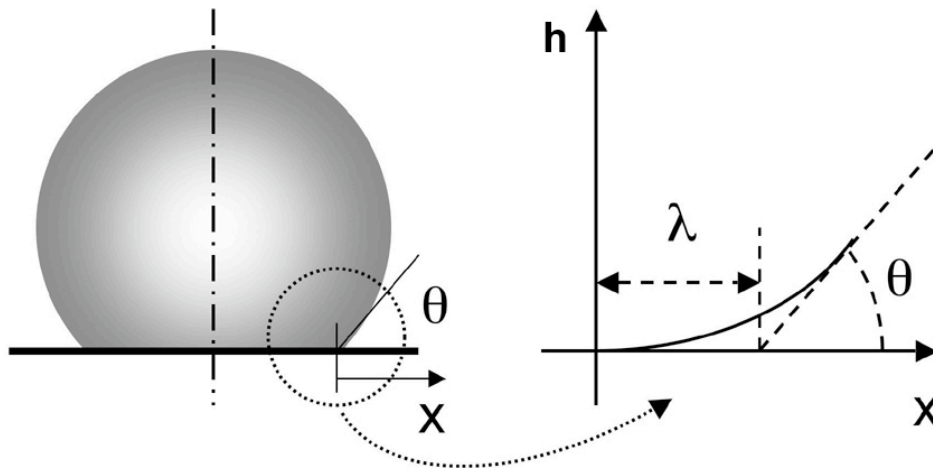


Figure II.13. : Profil macroscopique d'une vésicule adhéree avec un angle de contact  $\theta$  et zoom sur la ligne de contact, mettant en évidence l'influence conjuguée de la courbure et de la tension de la membrane.

Le profil du bord de la vésicule s'obtient en minimisant l'énergie de tension, l'énergie de courbure et l'énergie d'adhésion. Une solution approchée satisfaisante est donnée par les équations suivantes :

$$h(x) = \theta x - \theta \lambda (1 - e^{-x/\lambda}) \quad \text{pour } x > 0 \quad \text{II.15.}$$

$$h(x) = 0 \quad \text{pour } x \leq 0 \quad \text{II.16.}$$

Ainsi en ajustant les courbes de profil de hauteur obtenues à partir des interférogrammes, il est possible de déterminer  $\lambda$  et donc la tension de membrane. Cette technique permet donc de déduire  $\sigma$  de façon non invasive. Cependant nous verrons les limitations de cette méthode surtout dans le cas d'une adhésion forte dans le paragraphe IV.2.a.ii.

## Bibliographie : Chapitre II

- Albersdörfer A, Bruinsma R et Sackmann E, 1998.  
Force spectroscopy on adhesive vesicles.  
*Europhysics Letters*,42:227-231.
- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K et Watson J, 1995.  
Biologie moléculaire de la cellule.  
Editor: Flammarion.
- Artmann GM, Kelemen C, Porst D, Büldt G et Chien S, 1999.  
Temperature transition of properties in human red blood cells.  
*Biophysical Journal*,75:3179-3183.
- Bacri J-C, Cabuil V, Cebers AC, Menager C et Perzynski R, 1996.  
Flattening of ferro-vesicle undulations under a magnetic field.  
*Europhysics Letters*,33:235-240.
- Bernhardt I et Clive Ellory J, 2003.  
Red cell membrane transport in health and disease.  
Editor, Berlin: Springer-Verlag.
- Brochard F et Lennon J-F, 1975.  
Frequency spectrum of the flicker phenomenon in erythrocytes.  
*Journal de physique*,36:1035-1047.
- Bruinsma R et Sackmann E, 2001.  
Bioadhesion and the dewetting transition.  
*Compte Rendu de l'Académie des Sciences Paris, Série IV, Biophysics*,2:803–815.
- Canham P, 1970.  
The minimum energy of bending as a possible explanation of the biconcave shape of human red blood cell.  
*Journal of Theoretical Biology*,26:61.
- Curtis ASG, 1964.  
The mechanism of adhesion of cells to glass. A study by interference reflection microscopy.  
*Journal of Cell Biology*,20:199-215.
- Desprat N, Richert A, Simeon J et Asnacios A, 2005.  
Creep function of a single living cell.  
*Biophysical Journal*,88:2224-2233.
- Döbereiner H-G, 2000.  
Fluctuating vesicle shapes.

## Chapitre II : Système d'étude et technique expérimentale choisie

In: *Giant vesicles*, Luisi PL, Walde P. Ascona (Switzerland), June 1998. p 149-167.

Evans E, 1973.

A new material concept for the red cell membrane.  
*Biophysical Journal*,13:926.

Evans E et La Celle PL, 1975.

Intrinsic material properties of the erythrocyte membrane indicates by mechanical analysis of deformation.  
*Blood*,45:29-43.

Evans E et Needham D, 1986.

Giant vesicles composed of mixtures of lipids, cholesterol and polypeptides.  
*Faraday Discussions of the Chemical Society*,81:267-280.

Evans E et Rawicz W, 1990.

Entropy-driven tension and bending elasticity in condensed-fluid membranes.  
*Physical Review Letters*,64:2094-2097.

Evans E, Ritchie K et Merkel R, 1995.

Sensitive force technique to probe molecular adhesion and structural linkages at biological interfaces.  
*Biophysical Journal*,68:2580-2587.

Fournier JB, Ajdari A et Peliti L, 2001.

Effective-area elasticity and tension of micromanipulated membranes.  
*Physical Review Letters*,86:4970-4973.

Girard P, 2004.

Membranes hors d'équilibre : échanges et transport actif.  
Paris: Université de Paris VII.

Heinrich V, Ritchie K, Mohandas N et Evans E, 2001.

Elastic thickness compressibility of the red cell membrane.  
*Biophysical Journal*,81:1452-1463.

Helfrich W, 1973.

Elastic properties of lipid bilayers : theory and possible experiments.  
*Zur Naturforschung*,28c:693-703.

Helfrich W, 1985.

Effect of thermal undulations on the rigidity of fluid membranes and interfaces.  
*Journal de physique*,46:1263-1268.

Helfrich W et Servuss R-M, 1984.

Undulations, steric interactions and cohesion of fluid membranes.  
*Il Nuovo Cimento*,3 D:137-161.

Israelachvili JN, 1992.



## Partie 1 : Adhésion cellulaire

Intermolecular and Surface Forces.  
Editor, London: Academic Press.

Kummrow M et Helfrich W, 1991.

Deformation of giant lipid vesicles by electric fields.  
*Physical Review A*,44:8356-8360.

Kwok R et Evans E, 1981.

Thermoelasticity of large lecithin bilayer vesicles.  
*Biophysical Journal*,35:637-652.

Lipowsky R, 1995.

The morphology of lipid membranes.  
*Current Opinion in Cell Biology*,5:531.

Luisi PL et Walde P, 2000.

Giant vesicles.  
Editor, Zürich: John Wiley & Sons, Inc.

Méléard P, Faucon JF, Mitov MD et Bothorel P, 1992.

Pulsed-light microscopy applied to the measurement of the bending elasticity of giant liposomes.  
*Europhysics Letters*,19:267-271.

Merkel R, Nassoy P, Leung A, Ritchie K et Evans E, 1999.

Energy landscapes of receptor-ligand bonds explored with dynamic force microscopy.  
*Nature*,397:50-53.

Miao L, Seifert U, Wortis M et Döbereiner H-G, 1994.

Budding transitions of fluid-bilayer vesicles: The effect of area-difference elasticity.  
*Physical Review E*,49:5389-5407.

Mohandas N et Evans E, 1994.

Mechanical properties of the red cell membrane in relation to molecular structure and genetic defects.  
*Annual Review of Biophysical and Biomolecular Structures*,23:787-818.

Olbrich K, Rawicz W, Needham D et Evans E, 2000.

Water Permeability and Mechanical Strength of Polyunsaturated Lipid Bilayers.  
*Biophysical Journal*,79:321-327.

Pécrcéaux J, Döbereiner H-G, Prost J, Joanny J-F et Bassereau P, 2004.

Refined contour analysis of giant unilamellar vesicles.  
*The European Physical Journal E*,13:277-290.

Pierres A, Eymeric P, Baloché E, Touchard D, Benoliel AM et Bongrand P, 2003.

## Chapitre II : Système d'étude et technique expérimentale choisie

- Cell membrane alignment along adhesive surfaces : contribution of active and passive processes.  
*Biophysical Journal*,84:2058-2070.
- Puech PH, Borghi N, Karatekin E et Brochard-Wyart F, 2003.  
Line thermodynamics: adsorption at a membrane edge.  
*Physical Review Letters*,90:128304.
- Rädler J, Feder TJ, Strey HH et Sackmann E, 1995.  
Fluctuation analysis of tension-controlled undulation forces between giant vesicles and solid substrates.  
*Physical Review E*,51:4526-4536.
- Rädler J et Sackmann E, 1993.  
Imaging optical thickness and separation distances of phospholipid vesicles at solid surfaces.  
*Journal de Physique II France*,3:727.
- Raphael RM et Waugh RE, 1996.  
Accelerated inter-leaflet transport of phosphatidylcholine molecules in membranes under deformation.  
*Biophysical Journal*,71:1374.
- Sandre O, Moreaux L et Brochard-Wyart F, 1999.  
Dynamics of transient pores in stretched vesicles.  
*Proceedings of the National Academy of Science U.S.A.*,96:10591-10596.
- Saxton M et Jacobson K, 1997.  
Single-particle tracking : applications to membrane dynamics.  
*Annual Review of Biophysical and Biomolecular Structures*,26:373.
- Schilling J, Sengupta K, Goennenwein S, Bausch AR et Sackmann E, 2004.  
Absolute interfacial distance measurements by dual-wavelength reflection interference contrast microscopy.  
*Physical Review E*,69:021901.
- Schneider MB, Jenkins JT et Webb WW, 1984.  
Thermal fluctuations of large quasi-spherical bimolecular phospholipid vesicles.  
*Journal de Physique*,45:1457-1472.
- Seifert U, 1995.  
The concept of effective tension for fluctuating vesicles.  
*Zeitung für Physics B*,97:299-309.
- Smith R et Oldfield E, 1984.  
Dynamic structure of membranes by deuterium NMR.  
*Science*,225:720.
- Sprong H, van der Sluijs P et van Meer G, 2001.

## **Partie 1 : Adhésion cellulaire**

How proteins move lipids and lipids move proteins.  
*Nature Reviews Molecular Cell Biology*,2:504-13.

Zhelev DV, Needham D et Hochmuth RM, 1994.  
A novel micropipet method for measuring the bending modulus of vesicle membranes.  
*Biophysical Journal*,67:720-7.

Zilker A, Ziegler M et Sackmann E, 1992.  
Spectral analysis of erythrocyte flickering in the  $0.3\text{-}4\ \mu\text{m}^{-1}$  regime by microinterferometry combined with fast image processing.  
*Physical Review E*,46:7998-8001.

## Chapitre III

# Surfaces biomimétiques pour l'adhésion cellulaire

Dans le chapitre I, nous avons fait un bref récapitulatif des principales interactions non spécifiques ou spécifiques. Avant de voir comment fabriquer des surfaces bio-adhésives (c'est-à-dire permettant de reconnaître spécifiquement de cellules ou des vésicules synthétiques présentant à leur surface les ligands partenaires), il faut dans un premier temps s'assurer que les attractions non spécifiques de longue portée sont bien supprimées. La photographie de la figure III.1. montre que des globules rouges, par exemple, n'ont qu'une envie, celle de venir se coller fortement à la surface de verre, même en l'absence de tout récepteur spécifique immobilisé sur le verre.

En d'autres termes, si l'on souhaite étudier l'action d'un couple récepteur-ligand particulier sur la dynamique d'adhésion de cellules, il convient, dans un premier temps, d'établir une stratégie de passivation des surfaces, afin de découpler la contribution non-spécifique de la contribution spécifique à l'adhésion. Parmi les différentes méthodes de passivation rapportées dans la littérature, nous en choisirons et adapterons deux, que nous utiliserons dans tout le reste du travail de cette thèse.

Puis, à partir de là, nous verrons comment obtenir simplement des surfaces adhésives exclusivement spécifiques. Cette approche nous permettra enfin de simplifier les protocoles habituels de fabrication de substrats à micro-motifs adhérents entourés de zones passivées.

La plupart des résultats de ce chapitre sont résumés dans deux articles :

1. D. Cuvelier, C. Vezy, A. Viallat, P. Bassereau, and P. Nassoy (2004). « Mimicking cell/extracellular matrix adhesion with lipid membranes and solid substrates: Requirements, pitfalls and proposals » *J. Phys.: Condens. Matter.* 16 :S2427-2437.

## Partie 1 : Adhésion cellulaire

2. D. Cuvelier, O. Rossier, P. Bassereau, and P. Nassoy (2003). « Micro-patterned "adherent/repellent" glass surfaces for studying the spreading kinetics of individual red blood cells onto protein-decorated substrates ». *Eur. Biophys. J.*, 32 :342-354.

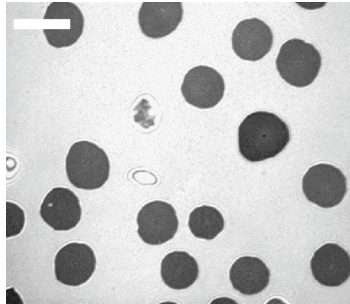


Figure III.1. : Image par RICM de globules rouges adhérents sur une surface de verre simplement nettoyée par un mélange eau/éthanol. Les globules s'étalent sous forme de crêpes. Les zones de contact sombres correspondent à la tâche d'adhésion, mettant en évidence une forte attraction non spécifique. La barre d'échelle représente 10 $\mu$ m

### III.1. Premiers écueils : la décoration d'une surface avec des molécules spécifiques n'assure pas une adhésion spécifique de vésicules/cellules

Le premier type de substrat que nous avons testé a été une lame de verre amino-silanisée, puis fonctionnalisée avec une biotine contenant un espaceur court, une chaîne carbonée C<sub>10</sub> (EZlink-LC-LC-biotin, Pierce). La présence des groupes biotine sur la surface a été testée en incubant de la streptavidine fluorescente (Cy3-Extravidin, E4142, Sigma). La forte intensité de fluorescence obtenue (par rapport à un contrôle où de la streptavidine fluorescente pré-neutralisée par de la biotine libre a été incubée) suggère que la streptavidine est efficacement et spécifiquement immobilisée sur les surfaces décorées de biotine. Pour tester ensuite la spécificité de la reconnaissance cellulaire, nous avons « ensemencé » des globules rouges couverts de streptavidine (voir annexe C pour la préparation) sur ces surfaces biotinylées. La figure III.2.a montre une image RICM d'un globule rouge gonflé osmotiquement sur une telle surface, dans une solution de PBS (« Phosphate Buffered Saline ») additionnée de diol-PEG3400, afin d'éviter la formation de globules rouges échinocytes. Tous les globules rouges observés s'étalent et ont une

zone de contact de l'ordre de leur taille. Nous pourrions penser que l'interaction mise en jeu est la liaison streptavidine-biotine. Cependant, les expériences-contrôle des photographies de la figure III.2.b et c, nous prouvent le contraire, à notre grande surprise. Si des globules rouges natifs (i.e. sans streptavidine) sédimentent sur les mêmes surfaces, nous observons des images RICM similaires aux précédentes. Au contraire, si une solution d'albumine (« Bovine Serum Albumin », BSA) est ajoutée à la suspension de globules rouges couverts de streptavidine, l'aire projetée est beaucoup plus petite et les globules peuvent être détachés par un léger flux.

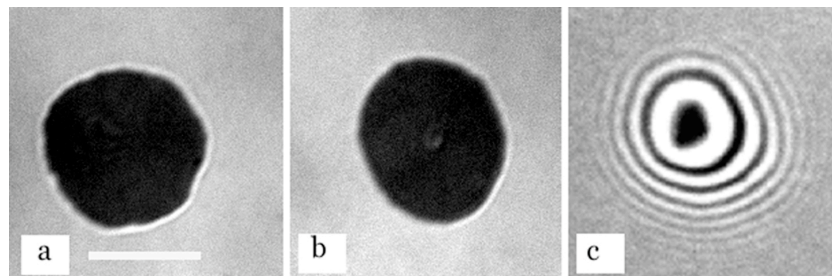


Figure III.2. : Image par RICM de zone de contact sur une surface biotinyllée contenant un court espaceur entre la biotine et la surface. (a) Avec un globule recouvert de streptavidine. (b) Avec un globule natif. (c) Avec un globule natif dans un solution de BSA.

A l'évidence, l'adhésion de globules rouges couverts de streptavidine sur ces surfaces n'est pas purement spécifique. La fonctionnalisation par le réticulant LC-LC-biotine n'empêche pas l'adhésion d'érythrocytes natifs et l'adsorption de BSA masque cette surface. De cette expérience préliminaire, nous déduisons qu'il faut prendre plus de précautions pour rendre une surface spécifique vis-à-vis de l'adhésion. Dans un premier temps, il s'agit d'éliminer toute attraction non-spécifique.

## III.2. Passivation de surface vis-à-vis des interactions non-spécifiques

### III.2. a. Principe général et exemples

La passivation des surfaces a pour but d'empêcher toute adsorption non-spécifique de biomolécules et toute adhésion non-spécifique de cellules. La

## Partie 1 : Adhésion cellulaire

littérature sur le sujet est très vaste. Nous ne souhaitons pas ici être exhaustifs, mais simplement donner quelques principes généraux et quelques exemples.

Tout d'abord, il peut-être utile de mentionner que nos éventuelles expériences culinaires ou « vestimentaires » ne sont pas nécessairement utiles dans ce domaine ! En effet, alors que les aliments sont réputés pour ne pas attacher sur une poêle Tefal et que les gouttes de pluie vont couler sur un vêtement en Gore-Tex comme sur les plumes d'un canard, des surfaces téflonnées ne sont pas nécessairement les meilleures candidates pour éviter l'adsorption non-spécifique (Andersson, 2001). Sur les photographies de microscopie électronique à balayage de la figure III.2, une pastille de silicium mixte, à moitié nue et à moitié téflonnée (par  $C_4F_8$ ), a été incubée dans une solution de BSA biotinylée. Puis, des billes de latex couvertes de streptavidine ont été déposées. L'expérience montre que les billes se collent sur les deux surfaces sans distinction (Figure III.2.a.). La BSA biotinylée s'est adsorbée soit par l'intermédiaire de ses domaines hydrophobes sur la surface  $C_4F_8$ , soit par l'intermédiaire de ses domaines hydrophiles sur la surface de verre, et permet l'interaction spécifique avec les billes. Il faut appliquer un traitement « énergétique » (lavage en présence de détergent et ultra-sons), pour se débarrasser des billes adsorbées sur la zone hydrophobe (Figure III.2.).

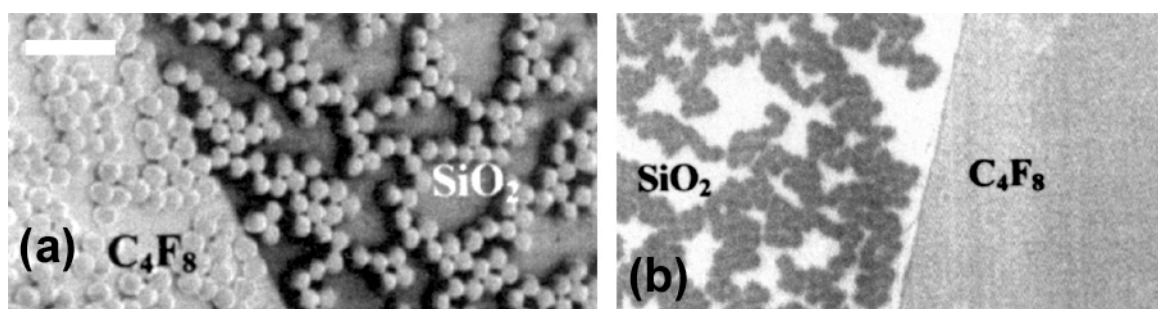


Figure III.2. : (a) Images en microscopie électronique de billes couvertes de streptavidine adhérentes sur des surfaces hydrophiles et hydrophobes préalablement incubées avec une solution d'albumine biotinylée. (b) Image après lavage avec un détergent puis ultra-sons. La barre d'échelle représente  $5\mu\text{m}$  (Extrait de (Andersson, 2001)).

D'un point de vue général, une stratégie plus efficace pour inhiber les interactions non-spécifiques biomolécules/substrat et cellule/substrat consiste à s'inspirer de la Nature ! La membrane d'une cellule est constituée d'une bicouche lipidique fluctuante et d'une « brosse » de polymères hydrophiles, le glycocalix (Figure III.3.). Aussi, peut-on classer les méthodes de passivation de surfaces en

### Chapitre III : Surface biomimétique pour l'adhésion cellulaire

deux grandes catégories : 1) celles basées sur l'utilisation de bicouches supportées, exploitant les effets de répulsion dits de Helfrich dus aux fluctuations thermiques de la membrane, et 2) celles reposant sur l'utilisation d'une couche de polymères (synthétiques ou naturels) opposant un effet stérique à l'adsorption.

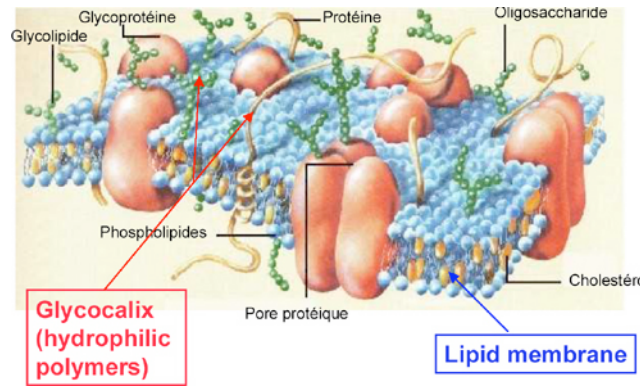


Figure III.3. : Représentation schématique d'une membrane cellulaire.

- Les bicouches supportées, formées par rupture et fusion de petits liposomes, se sont révélées fort efficaces pour réduire l'adsorption de protéines et empêcher l'adhésion de cellules (Kam et Boxer, 2001). Un inconvénient de cette approche réside dans le fait que la formation de ces bicouches dépend fortement de la nature du substrat et des conditions de salinité et de pH (Cremer et Boxer, 1999). D'autre part, il est difficile d'obtenir des bicouches sans défaut (Reviakine et Brisson, 2000) et celles-ci sont relativement fragiles, notamment vis-à-vis d'un séchage ou de la présence de bulles d'air (Puech, 2003).

L'utilisation de couches de polymères est plus ancienne, et de nombreuses variantes, des plus rudimentaires aux plus sophistiquées en termes de chimie de surface, ont été proposées. Les techniques d'immobilisation principales sont l'adsorption physique, le greffage chimique, la formation de monocouches auto-assemblées (SAM) et l'adsorption de (multi)couches de polyélectrolytes.

\* Les biologistes utilisent depuis longtemps des protéines « inertes », telles que la BSA ou la caséine, comme agents bloquants, par simple physisorption sur les lamelles de verre ou les boîtes de Pétri. Ces protéines globulaires se dénaturent (au moins partiellement) par adsorption, créant ainsi une brosse de polypeptides n'interagissant pas (ou peu) avec les protéines d'intérêt ou les cellules.

\* Le groupe de G. Whitesides a utilisé des molécules thiols (se fixant aux surfaces d'or) fonctionnalisées avec des oligomères d'éthylène glycol (EG) qui



## **Partie 1 : Adhésion cellulaire**

permettent également de créer des surfaces résistantes à l'adsorption de protéines (Chapman et al, 2000; Ostunt et al, 2001). Sur du verre, l'équivalent consiste à utiliser des silanes-PEG (Polyéthylène-glycol), comme l'a montré le groupe de T. Desai (Sharma et al, 2002; Zhang et al, 1998).

\* Une approche un peu plus lourde du point de vue de la chimie, mais très efficace, est celle des réseaux interpénétrés de PEG et d'acrylamide, utilisée par A. Folch et K. Healy (Stille et Healy, 2002; Tourovskaia et al, 2003). Brièvement, un gel de polyacrylamide est ancré à une surface de verre fonctionnalisée avec des vinylsilanes, puis du PEG est greffé pour y former une « couche chevelue ». Dans le même ordre d'idées, le groupe de M. Textor a synthétisé un copolymère formé d'un squelette PLL (poly-L-Lysine) et de branches latérales PEG (Huang et al, 2001). La poly-lysine est un polycation qui s'adsorbe fortement sur le verre chargé négativement. Les chaînes de PEG forment alors la couche stérique souhaitée. Le taux de greffage des chaînes latérales fixe la conformation, brosse ou champignon, de la couche obtenue. Sur des surfaces hydrophobes, l'utilisation de copolymères triblocs du type « pluronics », PEO-PPO-PEO (polyéthylène-oxyde/polypropylène-oxyde/ polyéthylène-oxyde) est une alternative envisageable (Liu et al, 2002).

### **III.2. b. Nos deux protocoles de passivation**

Notre choix des protocoles de passivation des surfaces a été guidé essentiellement par la simplicité et la rapidité de la préparation. D'une part, nous ne souhaitons pas faire de la chimie de synthèse lourde. D'autre part, nous voulions des traitements stables sur la durée des expériences effectuées (de l'ordre de l'heure).

#### **III.2.b.i. Adsorption de caséine**

La méthode la plus simple consiste à adsorber une solution de  $\beta$ -caséine à 0.5mg/ml dans un tampon phosphate (pH=7.4, osmolarité variable de 100 à 300mOs) sur des lamelles de verre préalablement nettoyées aux ultra-sons dans un mélange eau/éthanol. Elles sont ensuite séchées sous azote. Sur un côté est déposé un volume de 50 $\mu$ l de la solution de caséine, étalé ensuite à l'aide d'une bande de

Parafilm de même taille que la lamelle. Le temps d'incubation est de 15 minutes. La lamelle est ensuite lavée à l'eau pure (MilliQ) et séchée, prête à l'emploi immédiat.

Il est à noter que, bien que l'adsorption de caséine soit forte, il y a toujours une petite fraction qui peut se désorber au cours de l'expérience. On s'assure donc que le milieu d'étude contiennent une solution de caséine diluée pour garantir un recouvrement constant et total dans le temps.

#### III.2.b.ii. Greffage de PolyEthylène Glycol (PEG)

La deuxième méthode consiste à greffer un polymère PEG sur des lamelles préalablement silanisées. Ceci est réalisé en trois étapes.

i) Activation des surfaces de verre par nettoyage pendant dix minutes dans un mélange "piranha" composé d'acide sulfurique/eau oxygénée (70/30 en volume). Les lamelles sont ensuite rincées abondamment avec de l'eau pure et mises dans un bain de méthanol avant la silanisation.

ii) L'étape de silanisation vise à fonctionnaliser la lamelle de verre avec des groupes amines. Pour un volume total de 10ml, le mélange réactif est composé de 286 $\mu$ l d'amino silane (N-[3-(Triméthoxysilyl)propyl]-éthylènediamine, Sigma) 86 $\mu$ l d'acide acétique pur, 450 $\mu$ l d'eau pure et le reste de méthanol. Le temps de réaction est de deux heures à température ambiante ou d'une nuit à 4°C. Après rinçage au méthanol, les lamelles sont séchées à l'azote et placées dans un four à 100°C pendant 15min pour éliminer le film d'eau intercalé et améliorer le rendement de greffage covalent. Les lamelles silanisées peuvent être conservées jusqu'à utilisation dans un dessiccateur à vide pendant plusieurs mois.

iii) Le greffage de PEG est effectué en utilisant un agent réticulant réactif vis-à-vis des amines primaires. Le polymère que nous avons choisi de greffer possède un groupement N-HydroxySuccinimide (NHS) à une extrémité, est terminé par un groupe méthoxy inerte à l'autre et a une masse moléculaire de 3400 g/mol (métoxy-PEG<sup>3400</sup>-NHS, Nektar USA). Le rayon de giration de ce polymère est de l'ordre de 3-4nm. En pratique, un volume de 100 $\mu$ l de solution de ce réactif à 1mg/100 $\mu$ l dans du tampon carbonate-bicarbonate (0.1M, pH=8.5) est déposé et étalé de la même manière que pour l'adsorption de caséine, avec une bande de Parafilm. Après une heure de réaction à température ambiante, la lamelle est rincée à l'eau pure. La figure III.5. résume l'ensemble de la stratégie de fonctionnalisation.

## Partie 1 : Adhésion cellulaire

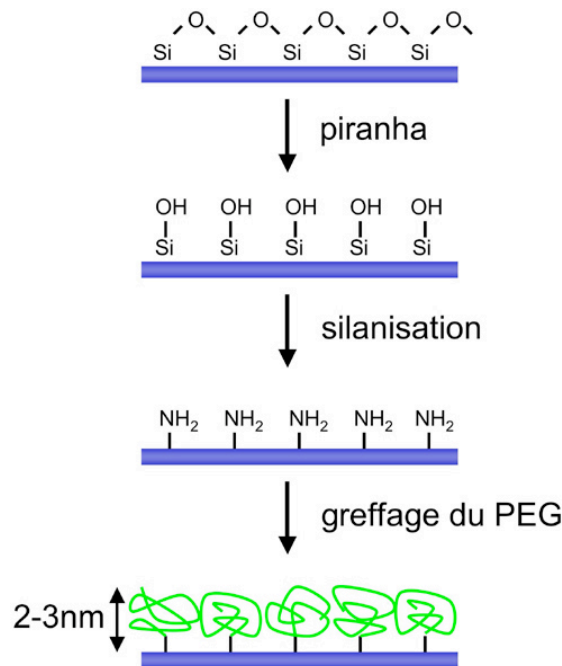


Figure III.5. : Passivation de lamelles de verre par un procédé de greffage d'un PEG via une silanisation préalable.

L'effet passivant du PEG est particulièrement visible dans la série d'expériences suivantes. Si on arrête le protocole à l'étape (ii - amino-silanisation), et que l'on ensemence une suspension de globules rouges dépourvue de BSA, le résultat est dramatique, et résumé sur les images RICM de la figure III.6. Le globule rouge s'approchant de la surface ( $t=0$ ) apparaît sous la forme d'un disque noir en moins de 40 ms. L'étalement est total. Ensuite, les contraintes induites dans la membrane plasmique entraînent un éclatement du globule : l'hémoglobine s'échappe du globule par des pores et la membrane supérieure s'affaisse sur la partie de membrane adhéree ( $t=2s$  et  $2.5s$ ).

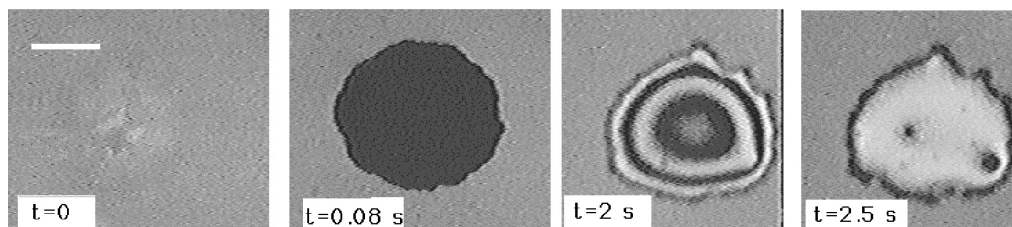


Figure III.6. : Séquence temporelle par RICM représentant l'adhésion et l'éclatement d'un globule rouge sur une surface amino-silanisée. La barre d'échelle représente  $5\mu\text{m}$ .

En revanche, après l'étape (iii-greffage du PEG) ou, de manière équivalente, l'adsorption de caséine, les zones de contact entre des globules rouges ou des

### Chapitre III : Surface biomimétique pour l'adhésion cellulaire

vésicules géantes et la surface sont réduites (Figure III.7.). Les membranes fluctuent au voisinage de la surface (ce qui est difficile à voir sur une image fixe).

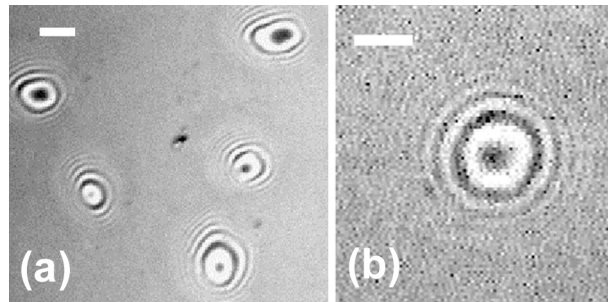


Figure III.7. : Photographie par RICM (a) de globules rouges (barre d'échelle :  $5\mu\text{m}$ ) et (b) d'une vésicule (barre d'échelle :  $1\mu\text{m}$ ) sédimentés mais non collés sur une surface fonctionnalisée au PEG.

Une autre technique d'observation plus démonstrative qui peut être utilisée est la microscopie horizontale. Cette méthode est inspirée des mesures d'angle de contact de goutte dans le domaine du mouillage. En pratique, un microscope est couché et la chambre d'observation reste horizontale. Une vue de côté d'échantillon peut être obtenue. Nous avons effectué les mêmes tests que précédemment dans le laboratoire d'Annie Viallat (Spectrométrie Physique à Grenoble). La figure III.8. montre une vue de coté d'une vésicule sur une surface de PEG. Nous pouvons noter que l'angle de contact est proche de zéro.

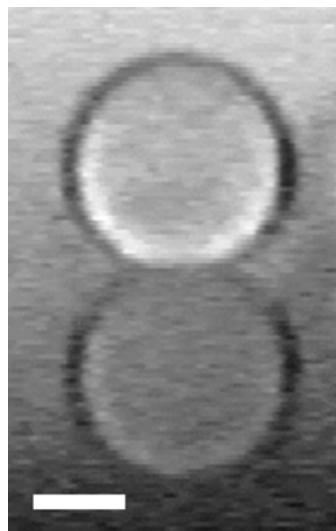


Figure III.8. : Photographie par vidéo microscopie horizontale d'une vésicule sur une surface de PEG. La partie supérieure de la vésicule est la partie réelle tandis que la partie inférieure correspond à la réflexion de celle-ci par la surface. La barre d'échelle représente  $10\mu\text{m}$  (expérience effectuée en collaboration avec Annie Viallat)

### III.3. Bio-Fonctionnalisation de surfaces pour l'adhésion cellulaire

Dans le paragraphe précédent, nous avons établi deux protocoles simples (et reproductibles) permettant de produire des surfaces passivées face à l'adhésion non-spécifique. Il s'agit maintenant, malgré la contradiction apparente, d'activer ces surfaces anti-adhérentes/adsorbantes avec des biomolécules spécifiques.

Puisque nous avons choisi de nous focaliser sur le couple streptavidine-biotine, nous allons simplement fonctionnaliser nos « tapis passivants », à savoir la caséine et le PEG, par de la biotine.

Sur la couche de caséine adsorbée, il suffit de greffer des biotines via un réticulant NHS. En effet, la plupart des protéines (dont la caséine) contiennent dans leur séquence exposée à la surface des acides aminés à terminaison amine (la lysine par exemple). Concrètement, on pré-greffe la biotine sur la caséine avant de l'adsorber. Cela est effectué selon des protocoles de biologie moléculaires standards (Hermanson *et al*, 1992). Brièvement, à une solution de caséine à 1mg/ml dans un tampon carbonate-bicarbonate (0.1M, pH=8.5) est ajouté le NHS-biotine (Pierce) en excès 10 fois. Après 30min de réaction à température ambiante, la caséine biotinylée est séparée de la biotine libre par chromatographie d'exclusion sur des colonnes PD10 (17-851-01, Amersham Biosciences). Il suffit ensuite de déposer cette protéine modifiée sur les lames de verre nettoyées.

Au lieu de chercher à fonctionnaliser la brosse de PEG, on utilise directement un NHS-PEG3400 terminé par biotine, qui est disponible commercialement (Nektar). Nous suivons alors le même protocole de greffage que précédemment.

A ce niveau, notons que, même si nous limitons notre étude au couple streptavidine-biotine, les surfaces produites peuvent être plus largement utilisées pour l'immobilisation d'autres biomolécules. Puisque la plupart des protéines peuvent être biotinylées, il suffit d'utiliser nos surfaces biotinylées, couvertes de streptavidine, comme « templates » (ou surface active primaire, en français ?). Une autre solution réside à utiliser un PEG fonctionnalisé différemment sur ces extrémités, l'une comportant un groupement NHS, réagissant avec les groupements NH<sub>2</sub> des protéines et l'autre vinyl sulfone réagissant avec le groupement thiol d'un silane

mercapto préalablement greffé sur la surface. Pour plus de détails, nous nous référons à la thèse de Sébastien Pierrat (Pierrat, 2004).

Nous avons vérifié par fluorescence à l'aide d'une streptavidine fluorescente (Cy3-Extravidine, Sigma) que la densité de biotine sur la surface révélée par de la streptavidine en solution est la même suivant la méthode de fonctionnalisation utilisée. Par des effets de dilutions successives, nous avons pu estimer que la densité de biotine maximale atteinte est de l'ordre d'un pavage complet de la surface par la streptavidine, soit 1 molécule par  $25\text{nm}^2$ .

Nous pouvons visualiser l'efficacité de nos protocoles de fonctionnalisation par la biotine en microscopie horizontale à l'aide vésicule couverte de streptavidine (voir annexe B pour préparation). Comme on le voit sur la figure III.9, l'angle de contact obtenu est de l'ordre de  $45^\circ$  et la vésicule a la forme d'une sphère tronquée, caractéristique d'un régime d'adhésion forte. L'absence de streptavidine sur la vésicule conduit à une configuration identique à celle de la figure III.8..

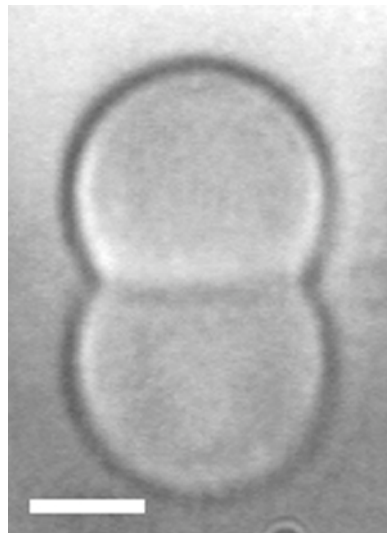


Figure III.9. : Vue latérale par microscopie horizontale d'une vésicule couverte de streptavidine sur une surface fonctionnalisée avec du PEG-biotine. La barre d'échelle représente  $10\mu\text{m}$  (expérience effectuée en collaboration avec Annie Viallat).

Ce résultat a été confirmé par des mesures en microscopie confocale. La streptavidine est fluorescente (Cy3 extravidin) et permet de sonder la membrane section par section. Une vue de côté d'une vésicule couverte de streptavidine sur un substrat de caséine-biotine a été représentée sur la figure III.10. Nous devons noter que la microscopie confocale provoque une distortion axiale, qui devient significative

## Partie 1 : Adhésion cellulaire

pour des objets de grande dimension, du fait de la différence d'indice entre l'huile à immersion et le milieu aqueux utilisé (Hell *et al*, 1993). La position réelle du plan de focalisation est donnée par la position nominale corrigée d'un facteur  $n_1/n_2$ . Sans cette précaution, l'image brute donne une représentation erronée de la vésicule adhérente. L'angle de contact entre la vésicule et la surface vaut ici  $43^\circ$ , ce qui est très proche de la valeur trouvée sur PEG-biotine par microscopie horizontale.

Nous ne montrerons pas ici de vérification expérimentale par RICM de l'efficacité de nos surfaces car cela fait l'objet d'une partie entière (Chapitre IV).

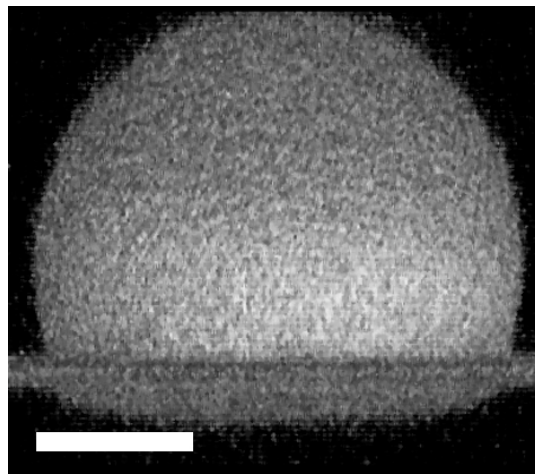


Figure III.10. : Projection latérale par microscopie confocale d'une vésicule couverte de streptavidine adhérente sur un substrat décoré de caséine-biotine. La barre d'échelle représente  $5\mu\text{m}$ .

### III.4. Bio-fonctionnalisation de surfaces spatialement hétérogènes: Technique de micro-impression par contact et par capillarité réactive

Dans les précédents paragraphes, nous avons développé et caractérisé des protocoles simples de chimie de surface permettant de produire, soit des surfaces inhibant l'adsorption indésirée de protéines et non-adhérentes vis-à-vis de vésicules ou globules rouges, soit des surfaces bio-actives permettant l'immobilisation d'un type de récepteur et adhérentes pour des vésicules ou des globules rouges présentant le ligand associé.

### Chapitre III : Surface biomimétique pour l'adhésion cellulaire

Maintenant, nous voudrions tester le « contraste adhérent/non-adhérent » que l'on peut espérer atteindre ainsi. Pour ce faire, nous avons décidé de fabriquer des surfaces présentant des micro-motifs adhérents entourés de zones passivées. Cette approche n'est pas nouvelle. Les progrès récents de la micro-fabrication (Rai-Choudhury, 1997), de la micro/nano-lithographie (Hoch et al, 1996) ont permis de produire des surfaces dites « patternées » en français, utilisées pour guider des cellules ou les « immobiliser » en des endroits prédéfinis (Mrksich, 1998; Mrksich et al, 1996). Toutefois, il faut prendre conscience que le « cahier des charges » est moins contraignant pour des cellules motiles que pour des vésicules synthétiques ou de globules rouges immobiles. En effet, comme le montrent les photographies de la figure III.11 (Rheea et al, 2004), dans la plupart des cas, onensemence des cellules sur une partie de la lame de verre fonctionnalisée. Puis, celles-ci pouvant explorer le reste de la surface vont choisir sélectivement les zones qui leur sont favorables et ainsi se laisser guider par les micro-motifs imprimés. Cela montre bien la capacité d'une cellule à sentir de très faibles gradients d'énergie de surface. Lorsque les cellules sont dispersées sur des surfaces leur offrant des motifs isolés (plutôt que des rails), la situation est similaire : si une zone adhérente est hors de portée d'une cellule, cette situation « inconfortable » va provoquer l'apoptose de la cellule. En revanche, si un lamellipode touche par chance une zone adhérente, la cellule va s'engouffrer dans cette direction, comme le montre la séquence de videophotographies de la figure II.12. (Manuel Théry, UMR 144, Institut Curie).

Dans notre cas, il ne faut pas attendre de réponse active de ce genre de la part de vésicules ou de globules rouges. Aussi est-il crucial d'observer un bon « contraste d'adhésion » entre les zones favorisant et inhibant l'adhésion spécifique.

Dans cette partie, nous rapportons une méthode nouvelle adaptée de la combinaison des techniques bien connues d'impression par micro-contact ( $\mu$ CP, « micro-contact printing ») et d'impression par réseaux micro-fluidiques ( $\mu$ FN, « microfluidic network »), qui permet la fabrication rapide de substrats spatialement hétérogènes du point de vue de l'adhésion spécifique. Dans un premier temps, nous commencerons par faire une petite revue des différentes méthodes de production de micro/nano-motifs sur des surfaces.



## Partie 1 : Adhésion cellulaire

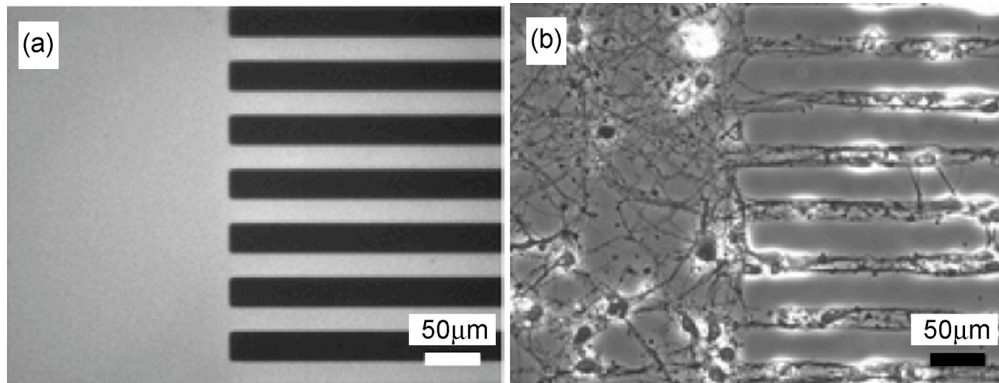


Figure III.11. : Etallement de neurones de rat sur des surfaces « patternées » par de la poly-L-lysine (marquée en fluorescence (a)) (b) (Extrait de (Rheea et al, 2004)).

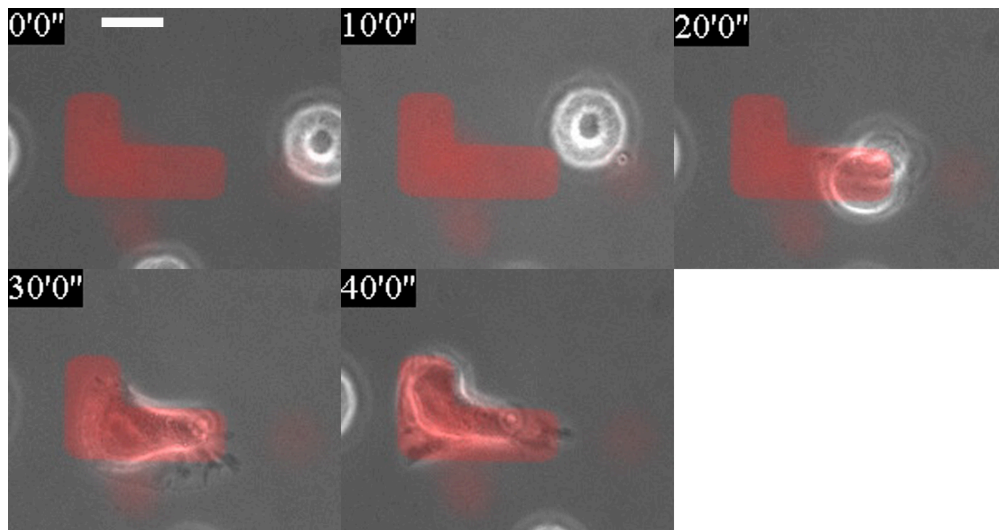


Figure III.12. : Séquence d'images par vidéo microscopie d'une cellule HeLa explorant une zone adhérente (rouge) via un lamellipode. La barre d'échelle représente 10µm (Séquence prise par Manuel Théry, UMR 144, Institut Curie)

### III.4.a. Introduction aux techniques de micro-impresion de surfaces

La production de surfaces micro-imprimées a connu un essor considérable ces dernières années grâce aux progrès de la micro-fabrication, notamment. Les applications dans le domaine du diagnostic médical (puces à ADN et protéines pour la détection de maladies génétiques ou d'agents pathogène) représentent un marché important. L'idée de base consiste à effectuer un criblage de haut-débit en parallèle, dans des conditions de miniaturisation maximale.

### Chapitre III : Surface biomimétique pour l'adhésion cellulaire

Pour ce faire, les « spotters » (ou « micro-arrayer », i.e. des imprimantes à jet d'encre multi-pointes) ont été développées et sont largement utilisées dans la plupart des plate-formes génomiques et laboratoires pharmaceutiques (voir photographie figure III.13.a). La nécessité d'accroître le nombre de points (« spots ») par lame a conduit au passage du « micro » vers le « nano ». Maintenant, des nano-stylos constitués de pointes de microscope à force atomique (Lee *et al*, 2002; Wadu-Mesthrige *et al*, 1999) sont utilisés en recherche académique (voir Figure III.13.b). Ce type de réalisation, bien que permettant d'imprimer autant de spots différents que l'on souhaite, est cependant long et difficile à mettre en oeuvre.

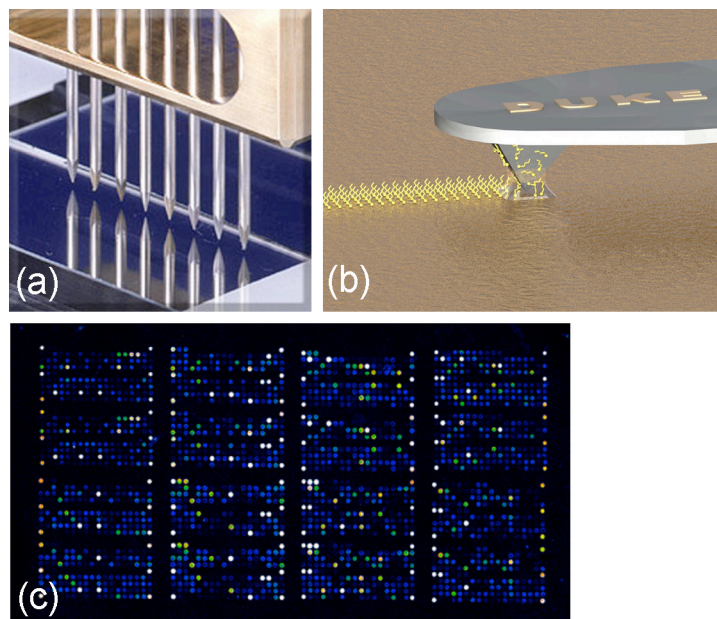


Figure III.13. : Deux techniques particulières de micro-impression type "stylo". (a) A l'aide de micropointes. (b) A l'aide d'une pointe de microscope à force atomique (extrait de [http://asaslab.mems.duke.edu/matt\\_research.html](http://asaslab.mems.duke.edu/matt_research.html)). (c) Application à la fabrication de puces à ADN (puce Genescore). La taille des « spots » fait 50-100  $\mu\text{m}$  par la technique (a) et serait de l'ordre de 500 nm par la technique (b).

Il existe deux autres grandes familles de techniques de micro-impression, plus faciles d'utilisation et peu coûteuses. Ces deux techniques, baptisées  $\mu\text{CP}$  et  $\mu\text{FN}$ , sont directement issues d'une adaptation des techniques de lithographie classiquement utilisées en microélectronique. C'est ce que l'on appelle la lithographie molle, développée par le groupe de G. Whitesides à Harvard (Xia et Whitesides, 1998), et directement appliquée à la  $\mu\text{CP}$ . Le groupe d'IBM Zurich de Delamarche/Michel a ensuite développé la  $\mu\text{FN}$  (Bernard *et al*, 2001).

## Partie 1 : Adhésion cellulaire

Dans les deux cas, le matériel de base est un tampon constitué d'un élastomère de PolyDyMéthylSiloxane (PDMS) réticulé, contenant des reliefs en surface. L'obtention de ce moule de PDMS est récapitulée dans la figure III.14.. Brièvement, un "master" en résine ou en silicium présente le négatif des reliefs que l'on souhaite réaliser. Ce substrat est recouvert d'un mélange contenant du PDMS et un agent réticulant. Le gel formé (à 60°C pendant quelques heures) est démoulé par pelage et utilisé, soit comme un tampon encreur ( $\mu$ CP), soit pour créer des canaux microfluidiques ( $\mu$ FN).

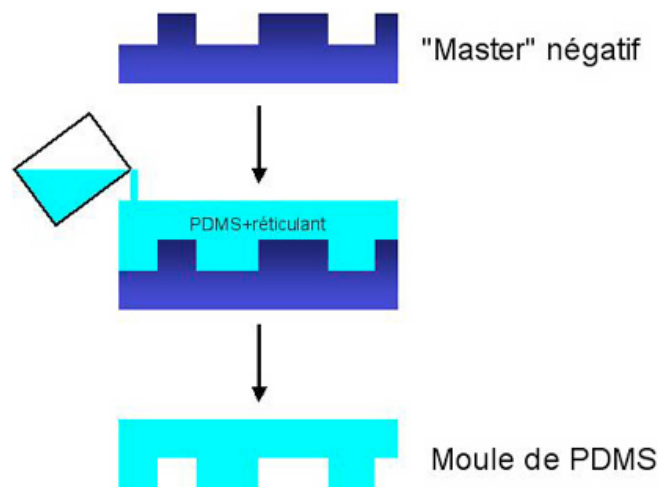


Figure III.14. : Résumé schématique de la réalisation d'un élastomère de PDMS contenant des reliefs à sa surface.

Il est à noter que la réalisation du "master" peut être effectuée par différentes techniques. Une surface de silicium peut être creusée soit par un traitement chimique, soit par faisceau d'électron (Vieu et al, 2000). La résolution obtenue peut être sub-nanométrique. Une autre technique, celle que nous avons choisie, consiste à partir d'un photomasque (sans relief) fabriqué par déposition sélective de chrome, et de révéler les zones ombrées ou illuminées sur une résine photoactivable. Ici, la résolution est définie par la longueur d'onde utilisée, de l'ordre de la fraction de micromètre, ce qui est suffisant pour nos applications.

L'impression par micro-contact,  $\mu$ CP, s'inspire directement des travaux de Gutenberg, à une échelle micrométrique. Elle repose sur le « pré-encrage » du tampon de PDMS par le composé que l'on veut déposer, suivi de son transfert vers le substrat solide par contact. Le groupe de Whitesides a surtout développé cette

méthode sur des surfaces d'or, en utilisant des dérivés thiolés pour fonctionnaliser la surface. De très nombreuses variantes ont été déclinées. Pour y fixer des protéines (ou localiser des cellules), il est possible, par exemple, de jouer sur la différence d'hydrophobie en utilisant des thiols à chaîne alcane (hydrophobe) et d'autres à terminaison de type éthylène glycol (hydrophile). Les protéines (resp. les cellules), auront tendance à s'adsorber (resp. s'étaler) sur les zones alcanes et "fuir" les zones éthylène glycol. La figure III.15 résume le protocole de préparation et montre quelques images de cellules adhérentes sur ces surfaces. Parmi les travaux effectués par le groupe de Harvard, on peut mentionner par exemple la mise en évidence d'une taille de zone adhérente minimale pour une cellule avant que celle-ci n'entre en apoptose (Chen *et al*, 1997).

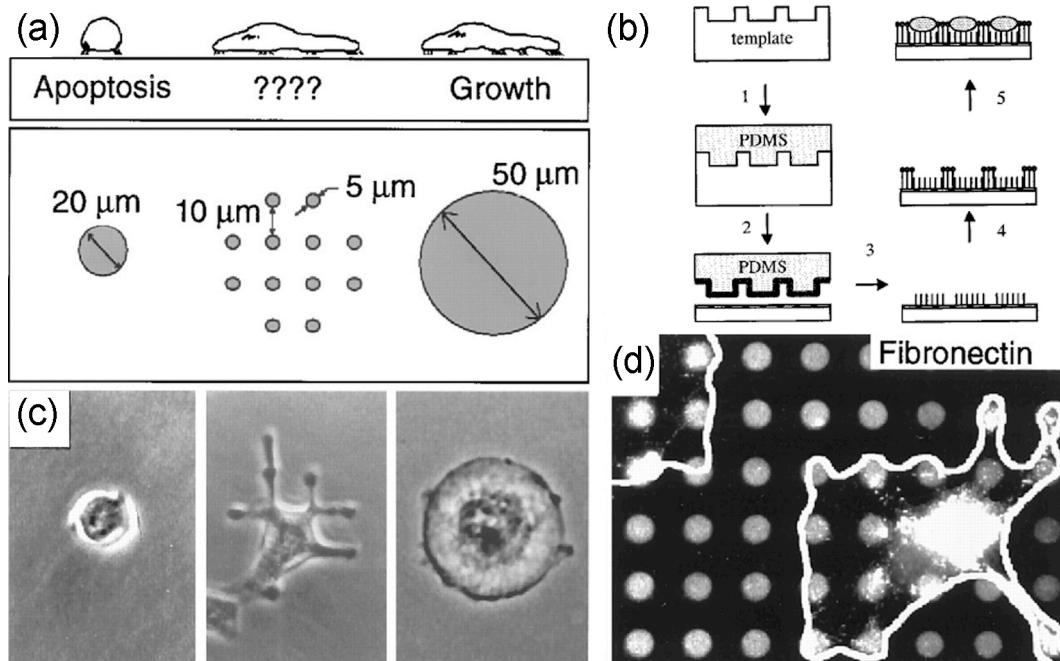


Figure III.15 : Réalisation de motifs par la méthode d'impression par micro-contact sur des surfaces d'or (b) ; Etalement de cellules sur des surfaces « patternées » (a,c). La taille et la distribution des motifs déterminent le destin de la cellule ! (Extrait de (Chen *et al*, 1997)).

Un gros inconvénient de cette technique est que les protéines d'intérêt, adsorbées sur des SAMs hydrophobes, sont susceptibles d'être dénaturées ; néanmoins de gros efforts de chimie sur ces dérivés ont été réalisés ces dernières années afin de synthétiser des thiols spécifiquement fonctionnalisés par les ligands d'intérêt (Kato et Mrksich, 2004; Mrksich, 2002). Toutefois, de notre point de vue, cette méthode conserve un inconvénient intrinsèque qui réside dans l'utilisation de

## Partie 1 : Adhésion cellulaire

surfaces d'or. Nous souhaitons en effet observer le contact entre une vésicule ou une cellule et une surface par RICM. La couche d'or augmente considérablement l'indice de réflexion de la lame de verre ce qui engendre une grande diminution du contraste des images. Nous allons voir comment adapter la  $\mu$ CP à l'utilisation de surfaces de verre.

Une deuxième méthode couramment employée pour imprimer des motifs consiste à utiliser des réseaux microfluidiques,  $\mu$ FN. Le gel de PDMS, sur lequel sont gravées des lignes, est appliqué sur une surface de verre plane préalablement activée au gaz plasma ce qui assure un contact très étroit moule/substrat dans les zones non creusées. Dans l'exemple de la figure III.16, une solution d'anticorps est injectée par capillarité dans les canaux formés entre le PDMS et le verre. Une fois l'élastomère retiré, la lame est passivée à l'aide d'une solution de BSA. L'immobilisation de l'anticorps peut être révélée par fluorescence. A partir de là, des variantes sont possibles : on peut ainsi effectuer des tests d'antigènes en effectuant un quadrillage de la surface par repositionnements successifs des canaux.

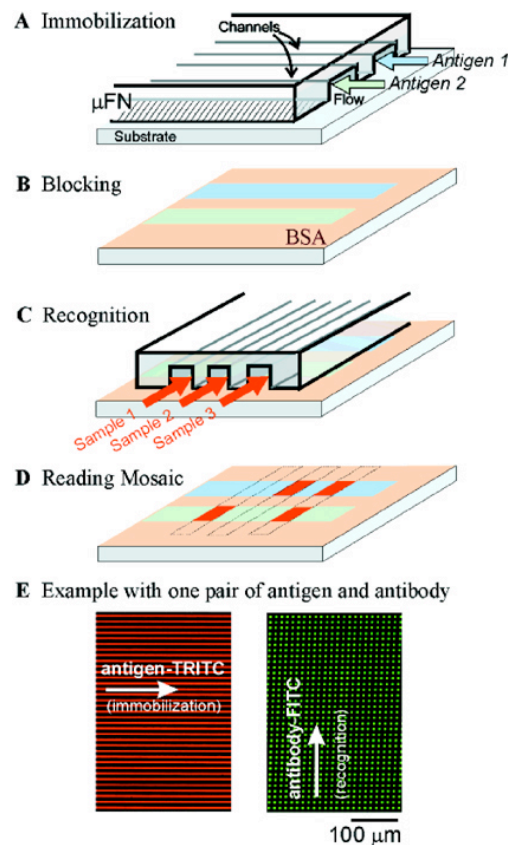


Figure III.16. : Illustration de la méthode d'impression à l'aide de réseaux micro-fluidiques. Application à l'immobilisation d'anticorps et d'antigènes (Extrait de (Bernard *et al*, 2001)).

### **III.4.b. Notre approche : Impression couplée par micro-contact et capillarité**

Notre objectif concret est d'imprimer des motifs biotinylés entourés de zones passivées sur des lames de verre. Nous avons développé deux méthodes. La première, qui se passe en deux étapes successives, est une transposition directe de la technique  $\mu$ FN, excepté pour l'étape de passivation. Pour cette raison, nous l'avons baptisée dans la suite « Méthode GREFFAGE ». La seconde, plus originale mais tout aussi efficace, réduit la préparation des surfaces à une seule étape. Elle consiste à combiner simultanément  $\mu$ CP et  $\mu$ FN, et sera appelée « Méthode COUPLÉE ».

#### **III.4.b.i. Protocoles de préparation des surfaces à motifs « adhérents/antiadhérents »**

Les détails de fabrication du moule de PDMS sont présentés en Annexe D. La figure III.17. résume les différentes étapes des deux méthodes de fonctionnalisation.

Dans les deux cas, les motifs biotinylés sont imprimés en effectuant la réaction de greffage de NHS-PEG-biotin à l'intérieur des micro-canaux. En pratique, une goutte de solution de NHS-PEG-Biotin à 1mg/100 $\mu$ L dans du tampon carbonate-bicarbonate (0.1 M, pH=8,5) est déposée à l'extrémité du moule (ouvert aux deux extrémités). Le liquide s'infiltré par capillarité en quelques minutes. Après 1h de réaction, la lamelle est séparée du gel, rincée abondamment à l'eau MQ, puis séchée sous azote.

La principale différence entre les deux méthodes réside dans le fait que le tampon de PDMS qui est appliqué sur le verre est soit « nu » (pour la méthode « greffage » ), soit préalablement recouvert de caséine (ou de BSA) (pour la méthode « couplée »).

Par conséquent, après avoir retiré le tampon, la lame de verre est à la fois activée au niveau des canaux et passivée au niveau des zones de contact avec le moule de PDMS, si la méthode « couplée » a été poursuivie. Dans l'autre cas, une



## Partie 1 : Adhésion cellulaire

étape supplémentaire est nécessaire : nous passivons le reste de la surface aminosilanisée avec du méthoxy-PEG<sup>3400</sup>-NHS.

A ce niveau, les lames peuvent être utilisées directement après séchage.

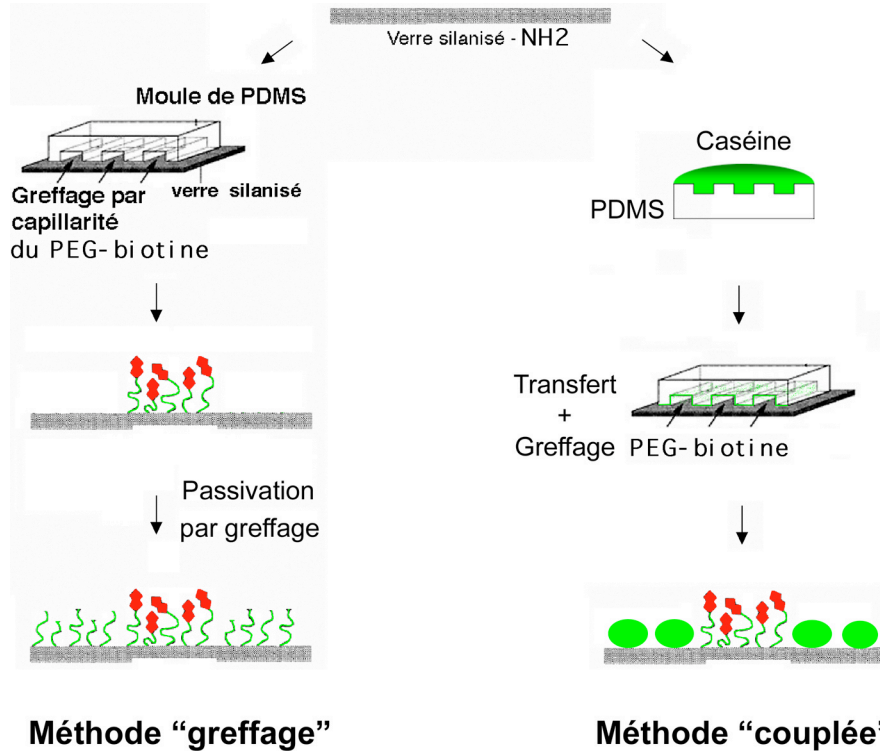


Figure III.17. : Schéma de formation de motifs alternativement biotinylés et "passivés" soit par la méthode "greffage", soit par la méthode "couplée".

### III.4.b.ii. Visualisation des surfaces à motifs par microscopie de fluorescence

Afin de révéler les motifs, une solution de streptavidine fluorescente (Cy3-Extravidin) à 1mg/mL dans du PBS (pH=7,4) est déposée sur la lamelle. Après 10 min d'incubation, la lamelle est rincée avec de la solution tampon. Les photographies de la figure III.18. montrent les meilleurs résultats obtenus (de manière reproductible et courante!). Outre le bon rapport S/N obtenu (de l'ordre de 10), nous observons que la qualité de la réplique est excellente (sub-micrométrique ?).

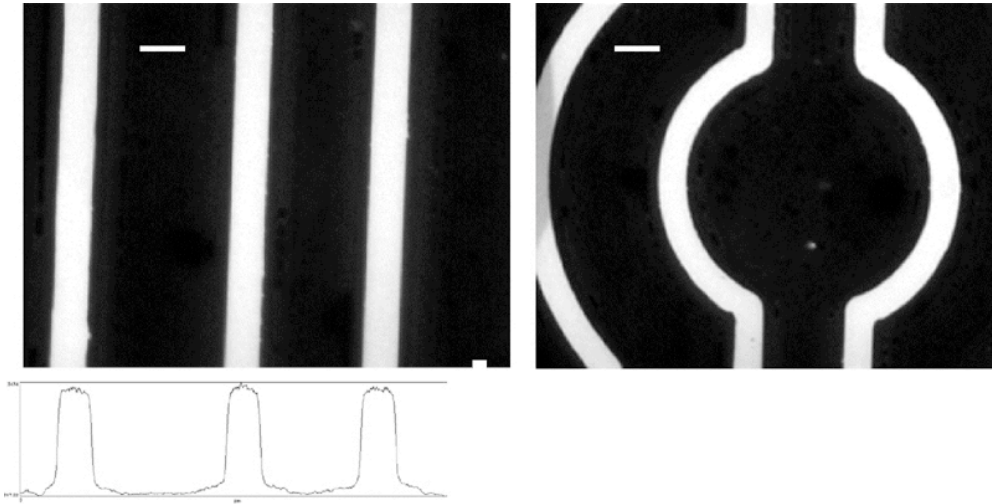


Figure III.18. : Video-micrographies de fluorescence de lignes de streptavidine entourées de zones passivées. La largeur des lignes est 4 microns. Le rapport signal/bruit est compris entre 9 et 11. Chaque barre d'échelle représente 5µm.

Pour visualiser les zones passivées, nous pouvons utiliser lors de la préparation soit un PEG soit de la caséine (ou la BSA), tous deux fonctionnalisés avec un fluorophore (FITC). La figure III.19. montre une superposition des images de fluorescence correspondant aux zones spécifiques (rouge) et passivées (verte). Dans ce cas, de la BSA fluorescéine a été choisie pour passer la surface et de la streptavidine fluorescente (Cy3-Extravidin) révèle les lignes fonctionnalisées de PEG-biotine.

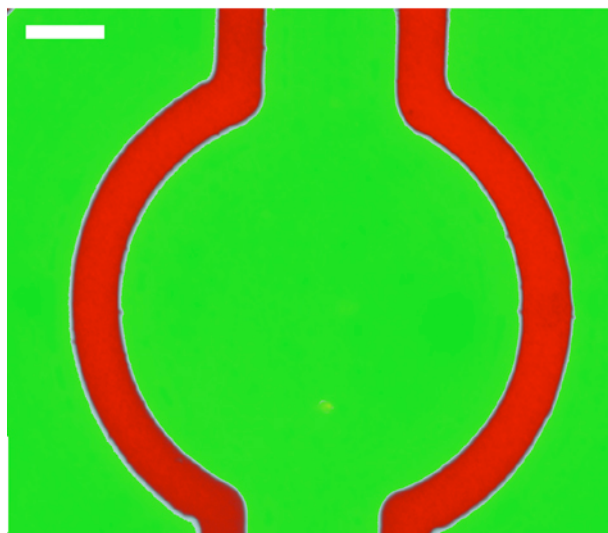


Figure III.19. : Superposition des images de fluorescence "verte" et "rouge" correspondant respectivement à la BSA et à la streptavidine fluorescentes. La barre d'échelle représente 5µm.



## Partie 1 : Adhésion cellulaire

En particulier, il n'y a aucune dégradation (visible dans le domaine optique) de la définition des motifs par rapport à celle du photomasque. En réalité, la perte en définition ne s'effectue que lors de l'étape d'illumination sous UV de la résine photoactive. En effet, pendant l'étape du moulage, le PDMS encore non réticulé reproduit les défauts de la résine qui seront ensuite révélés au greffage et de l'incubation de la streptavidine. Des effets de coin d'air entre le masque et la résine peuvent produire des interférences destructives et donc laisser de la résine autour du motif lors du passage au révélateur. Cet effet peut être compensé en mettant une goutte d'eau entre les deux objets, les effets de capillarité rendent les deux surfaces en contact parallèles. La présence d'une poussière dans un des sillons peut aussi entraîner une légère fuite. Les photographies de la Figure III.20. montrent ces défauts d'impression que nous avons rencontrés au début de notre travail.

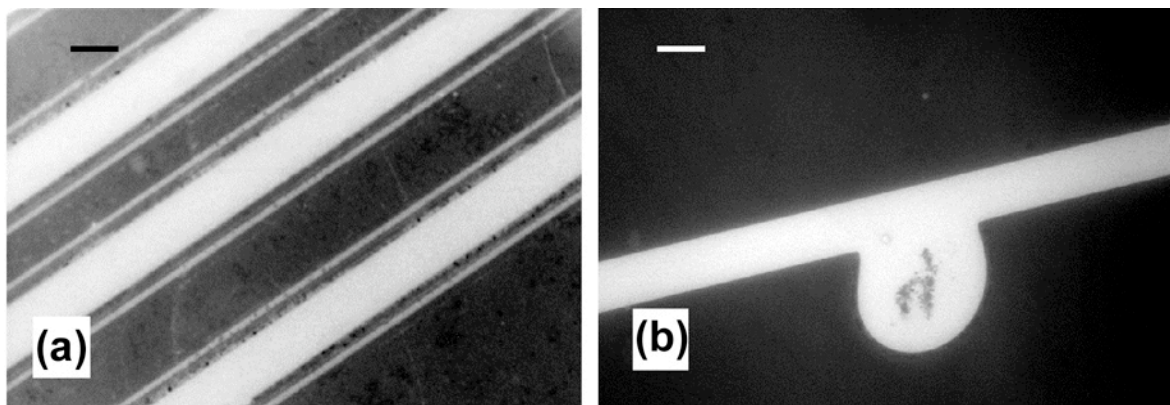


Figure III.20. : Images de défauts. (a) Effets de coins d'air au moment de l'illumination de la résine, révélés sur la surface de verre. (b) Fuite de la solution réactive (due à la présence d'une poussière). Chaque barre d'échelle représente 5 $\mu$ m.

### III.5. Comportement de globules rouges et de vésicules géantes sur des surfaces à motifs « adhérents/non-adhérents »

Nous avons montré, au paragraphe précédent, que les surfaces que nous avons préparées conduisent bien à une immobilisation sélective spatialement des molécules de streptavidine. Toutefois, il reste donc à vérifier que les substrats fonctionnalisés sont tout aussi efficaces pour localiser des cellules.

### Chapitre III : Surface biomimétique pour l'adhésion cellulaire

Nous avons choisi d'étudier l'adhésion de notre cellule favorite, le globule rouge, pour plusieurs raisons. D'une part, ce sont des cellules faciles à manipuler et à marquer avec de la biotine (Le protocole de biotinylation d'érythrocytes via leurs protéines membranaires est décrit en Annexe C). D'autre part, ils seront encore utilisés plus tard dans plusieurs chapitres de cette thèse. Enfin, contrairement à des cellules motiles, l'incapacité des globules rouges à se mouvoir nous semble être un critère élevé d'estimation de nos surfaces (voir remarque du § introductif de III.4). A la fin de ce paragraphe, nous considérerons également le cas de vésicules synthétiques.

La surface utilisée est un lame de verre décorée de lignes de streptavidine et passivée partout ailleurs. Après quelques minutes suivant le dépôt sur la lamelle d'une suspension de globules biotinylés et gonflés osmotiquement pour les rendre sphériques, la lamelle est observée en RICM.

Comme on le voit sur les photographies de la figure III.21., les globules biotinylés adhèrent de manière préférentielle et exclusive sur la surface de streptavidine. Alors que la zone de contact qui est reconnaissable par sa teinte noire uniforme est de l'ordre du diamètre du globule au niveau des lignes de streptavidine, elle est beaucoup plus réduite ( $<1\mu\text{m}^2$ ) ou très hétérogène et plus grise en dehors de ces zones (Fig. III.21.a.). De plus, un lavage des surfaces par un flux de solution tampon permet d'éliminer les globules non-adhérés (Fig. III.21.d.). Lorsque la densité de globules augmente, de véritables "fils cellulaires" sont formés (Fig. III.21.b.). Enfin, le grossissement de la figure III.21.c. montre qu'un globule, qui s'est déposé "à cheval" entre une ligne adhérente et une zone passivée, ne s'étale pas au-delà de la frontière. Il y a donc bien adhésion spécifique et exclusive.

## Partie 1 : Adhésion cellulaire

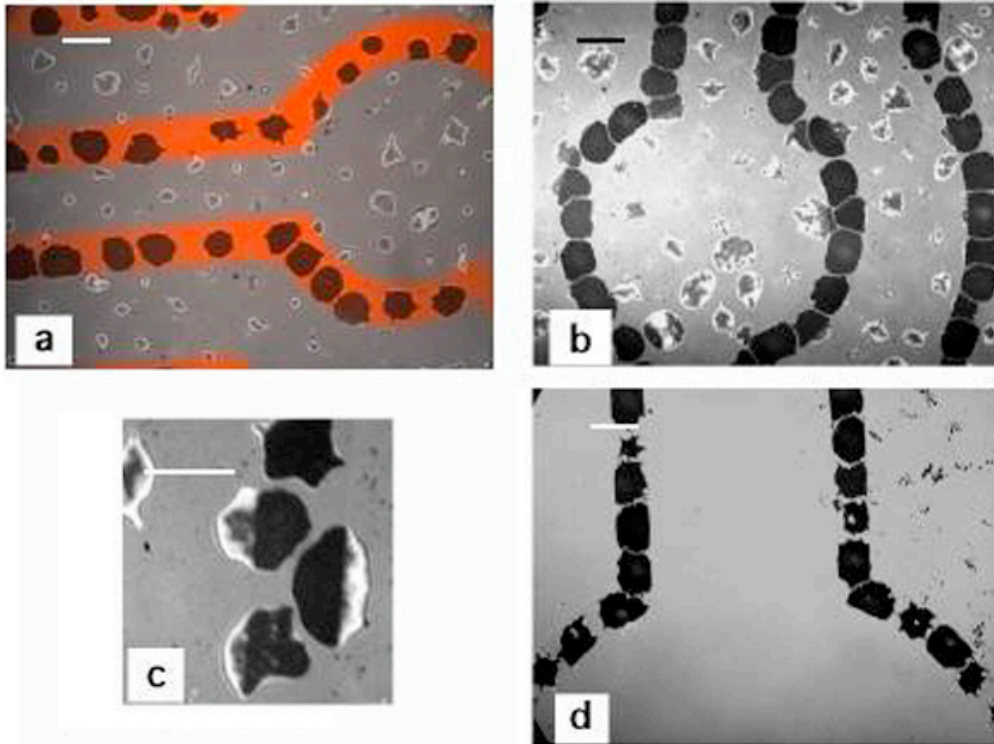


Figure III.21. : Photographies par RICM montrant l'adhésion de globules rouges biotinylés sur des lignes de streptavidine. (a) Superposition de 2 images prises en RICM et en microscopie de fluorescence. (b) Image de RICM qui montre la formation de "fils" de globules rouges. (c) Zoom sur des globules à la frontière entre une zone passivée par le PEG et une ligne de streptavidine. (d) Images obtenue après lavage avec de la solution tampon de la lamelle. Chaque barre représente 6 $\mu$ m.

Au delà de ces observations qualitatives, nous pouvons, à partir de la forme des globules adhérents sur des lignes plus étroites que le diamètre du globule rouge, obtenir une estimation de l'énergie d'adhésion par des arguments semi-quantitatifs. La figure III.22. montre quelques exemples. Dans tous les cas, la largeur des zones d'adhésion est limitée par la largeur des lignes de streptavidine. La cellule est alors étirée dans le sens de la longueur, cette déformation étant d'autant plus prononcée que les lignes sont étroites.

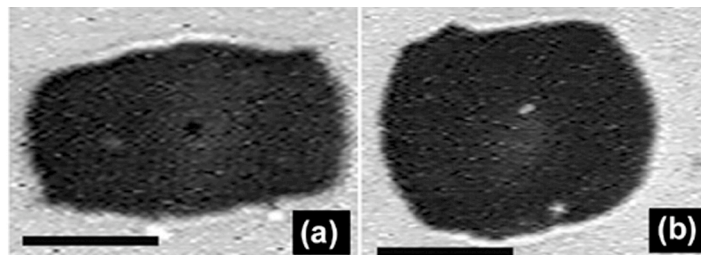


Figure III.22. : Photographie par RICM de globules rouge biotinylés déformés sur des lignes de streptavidine (a) de largeur 5 et 6,5 $\mu$ m. Chaque barre d'échelle représente 5 $\mu$ m.

### Chapitre III : Surface biomimétique pour l'adhésion cellulaire

Nous exploitons ici une analyse de Parker et Winlove (Parker et Winlove, 1999), qui ont calculé numériquement la force appliquée aux pôles d'une cellule sphérique en fonction de la contrainte polaire. Le paramètre important est :

$$C = R^2 \frac{\mu}{\kappa} \quad \text{III.1,}$$

où  $\kappa$  est le module de courbure de la membrane,  $\mu$ , le module de cisaillement dans le plan, et  $R$ , le rayon de la sphère.

Dans le cas où  $C > 10$ , une approximation analytique peut être obtenue pour la force appliquée,  $F$ , qui est directement proportionnelle à l'extension  $\varepsilon$ . Celle-ci est définie par :

$$\varepsilon = \frac{L}{2R} - 1 \quad \text{III.2,}$$

où  $L$  est la longueur de la cellule dans le sens de la déformation. La force est donnée par :

$$F = 5\varepsilon (R\kappa\mu^2)^{1/3} \quad \text{III.3.}$$

En prenant les valeurs dans la littérature,  $\kappa = 50k_B T$ ,  $\mu = 6 \cdot 10^{-6} \text{ N/m}$  (Mohandas et Evans, 1994) et  $R = 3.5 \mu\text{m}$  pour des globules gonflés, nous obtenons  $C = 1000 > 10$ , et la force est donnée par  $F = 150 \cdot \varepsilon \text{ pN}$ . De plus, nous pouvons estimer cette force à partir de l'énergie d'adhésion par

$$F = \frac{W}{b} \equiv \frac{\pi R^2 w}{b} \quad \text{III.4,}$$

où  $W$  est l'énergie d'adhésion,  $b$ , la largeur des lignes, et  $w$ , l'énergie d'adhésion par unité de surface. Des deux équations précédentes, à partir de mesures sur différentes lignes de largeur de  $5 \mu\text{m}$  et  $6.5 \mu\text{m}$ , l'extension est respectivement de  $0,35 \pm 0,3$  et  $0,27 \pm 0,3$ . Nous en déduisons une estimation de l'énergie d'adhésion par unité de surface de  $5 \mu\text{J/m}^2$ . La littérature pour le couple streptavidine-biotine estime cette énergie entre quelques  $\text{nJ/m}^2$  à  $100 \mu\text{J/m}^2$ . Nous verrons, dans le chapitre suivant, que cette estimation est correcte avec ce mode de préparation des surfaces fonctionnalisées.

Alors que les lignes de la figure III.22. ont une largeur de 5 et  $6.5 \mu\text{m}$ , ce qui entraîne une faible déformation des globules, le résultat avec des motifs sub-microniques (largeur 500 nm) est plus spectaculaire (Figure III.23.). Sur ce type de

## Partie 1 : Adhésion cellulaire

motifs (beaucoup plus difficiles à manipuler), nous observons tout d'abord que l'intensité de fluorescence (c'est-à-dire la quantité de streptavidine immobilisée) présente une moins bonne homogénéité (Figure III.23.a.). Cela est vraisemblablement dû à une plus faible efficacité du greffage de la biotine à cause d'un effet de confinement accru. Mais l'adhésion des globules rouges est tout aussi sélective, conduisant même à une déformation de la cellule sous forme de "digitation". Sur des zones de streptavidine de dimension bien inférieure à la taille du globule, celui-ci s'étale localement davantage que sur l'interligne suivant sur lequel la membrane cellulaire n'est que "suspendue".

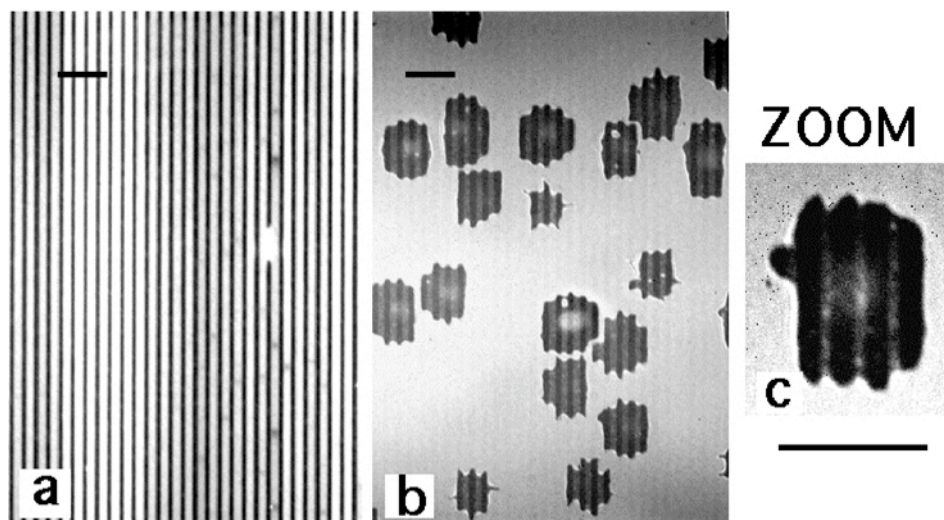


Figure III.23. : (a) Image de microscopie de fluorescence d'un réseau de lignes de streptavidine fluorescente (largeur 500 nm). (b) Image de RICM de globules rouges adhérents sur ce réseau. (c) Zoom sur un tel globule rouge mettant en évidence le développement de "doigts" de membranes au niveau des lignes de plus forte adhésion. Chaque barre d'échelle représente 5µm.

Il semble donc que la méthode utilisée permette bien l'adhésion spécifique et sélective de globule rouges biotinylés. Mais qu'en est-il maintenant pour des vésicules biotinylées?

Nous avons laissé sédimenter des vésicules couvertes de streptavidine fluorescente, à une concentration inférieure à la couverture totale de la surface de la vésicule (annexe C). La figure III.24. montre, par RICM et microscopie de fluorescence, la zone de contact d'une vésicule avec un coin de ligne biotinylée. Nous observons que ces vésicules se déforment globalement d'une manière similaire aux globules rouges adhérents. Toutefois, l'image par RICM suggère que la vésicule ne s'adhère pas exclusivement sur la ligne biotinylée. La vésicule dépasse la ligne et

est collée sur la surface pourtant passivée. Cependant, l'image de la même vésicule en fluorescence au niveau de la surface révèle que seule la ligne biotinylée est fluorescente (exceptée quelques bavures). D'une part, cela signifie bien que l'interaction est purement spécifique et que cette adhésion induit un recrutement des molécules de streptavidine de la vésicule au niveau de la ligne. D'autre part, l'adhésion en dehors des lignes biotinylées est faible et non spécifique.

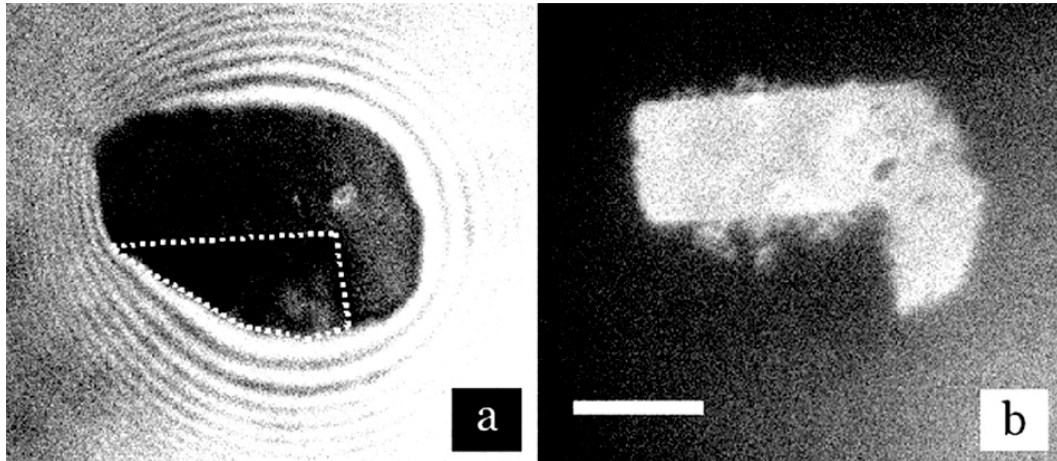


Figure III.24. : Adhésion d'une vésicule géante couverte de streptavidine fluorescente sur des lignes biotinylées. (a) Photographie par RICM. La ligne pointillée indique une zone d'adhésion non spécifique. (b) Image par microscopie de fluorescence. La barre d'échelle représente 5µm.

Nous pouvons nous demander pourquoi les vésicules résistent moins bien aux interactions non spécifiques alors que les globules rouges se comportent de la manière que nous espérons. Deux explications peuvent être apportées. La première concerne la différence de rigidité de la membrane entre les deux systèmes étudiés. Le module de courbure des vésicules EPC est cinq fois plus faible que celui des globules rouges ( $10 k_B T$  contre  $50 k_B T$ ). Les fluctuations thermiques d'une vésicule étant plus importantes que celles d'un érythrocyte, la membrane des vésicules a une probabilité plus grande de toucher et donc de se coller à la surface. Une deuxième explication consiste à évoquer la mobilité de la brosse des polymères PEG présents à la surface des vésicules. Outre la présence de lipides PEG-biotine, nous avons en effet ajouté des lipides-PEG afin de mimer le glycocalix d'une cellule (Boulbitch *et al*, 2001). Si un effet de déplétion de la brosse de polymère est envisageable au contact de la surface, cet effet semble limité dans le cas des globules rouges, pour lesquels les PEG-biotine sont greffés sur des protéines transmembranaires peu mobiles ou connectées au squelette de spectrine.



### **III.6. Applications variées**

Bien que la partie de notre travail décrite dans ce chapitre eût pu paraître trop longue, voire ennuyeuse, pour un lecteur physicien, nous avons souhaité la décrire en détail pour deux raisons essentielles. Tout d'abord, les méthodes de fonctionnalisation développées sont pré-requises à toutes les études physiques que nous exposerons dans les chapitres suivants. Sans cet effort visant à établir des protocoles simples, rapides, efficaces et contrôlés de fonctionnalisation de surface, il apparaîtra évident au lecteur que de nombreuses analyses n'auraient pas pu être menées à leur terme. Par ailleurs, même si ce travail nous est apparu à nous-même parfois fastidieux et peu gratifiant, nous pouvons mentionner que les méthodes proposées, bien que se focalisant sur le couple streptavidine-biotine, se sont révélées utiles à d'autres groupes en de nombreuses reprises, dans des domaines très variés, bien au-delà de nos espérances. Par exemple, les protocoles de passivation et biofonctionnalisation sont maintenant repris ou adaptés par le groupe d'Annie Viallat (Grenoble) pour étudier le roulement sous flux de vésicules, par des groupes travaillant sur les interactions ADN-protéine à l'échelle de la molécule unique (à l'Institut Curie et à l'Ecole Normale) ou sur les interactions microtubules-moteurs moléculaires (EMBL - Heidelberg) et par un groupe canadien fabriquant des puces à ADN (McGill University).

Nous nous contenterons de décrire brièvement une utilisation de notre stratégie de fonctionnalisation : celle développée par Manuel Théry dans le groupe de Michel Bornens (UMR 144, Institut Curie). L'objectif est localiser des cellules sur des surfaces adhérentes et isolées. Le couple d'interaction spécifique mis en jeu est le couple fibronectine-intégrine, qui intervient au niveau de l'adhésion de cellules à la matrice extra-cellulaire. Un tampon de PDMS imbibé préalablement de fibronectine est appliqué sur une surface mercapto-silanisée. Après transfert et retrait du gel, un PEG-méthoxy comportant la fonction maléimide réagissant avec la fonction thiol des silanes est greffée sur l'ensemble de la surface. Le mode opératoire est résumé dans la figure III.25.

### Chapitre III : Surface biomimétique pour l'adhésion cellulaire

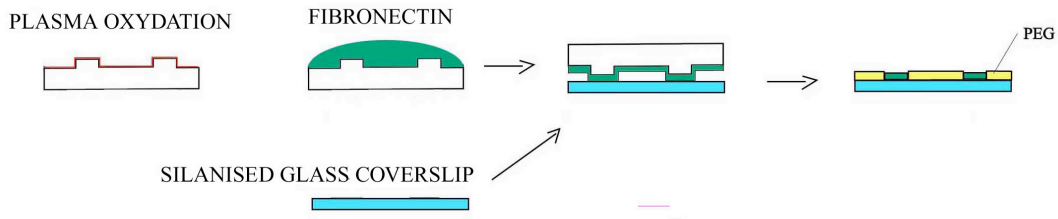


Figure III.25. : Modification du protocole de décoration de surface appliquée à l'adhésion cellulaire par Manuel Théry.

La figure III.26. montre quelques « spots » de la « puce à cellules » obtenue. Les cellules sont parfaitement localisées au niveau du motif décoré de fibronectine. Une même forme globale de cellules peut être obtenue à partir de motifs de géométrie sensiblement différente. Manuel a ensuite étudié l'influence de ces motifs sous-jacents sur la division des cellules sur ces substrats.

Nous pouvons cependant émettre une critique. La fibronectine est une protéine possédant des résidus aminés à sa surface. Or, le PEG-maléimide utilisé réagit également sur ces groupes amine, ce qui tend à réduire l'activité des molécules de fibronectine. Comme la cellule est un système dynamique capable de se réarranger, elle est capable de trouver ces zones plus adhésives, quand bien même le contraste d'adhésion pourrait être augmenté.

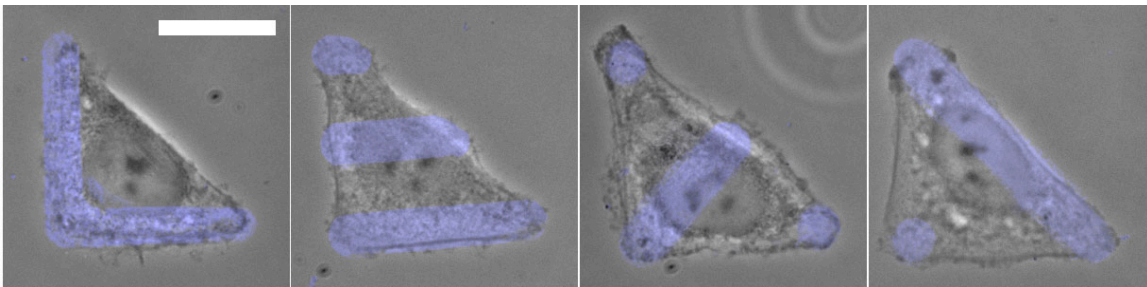


Figure III.26. : Superposition d'images par microscopie de fluorescence et par vidéo microscopie de cellules HeLa sur des motifs de fibronectines (bleu), le reste étant passivé par du PEG. Les cellules adoptent des formes similaires pour des patterns différents. La barre d'échelle est de 10 $\mu$ m.



## Bibliographie : Chapitre III

- Andersson H, 2001.  
Microfluidic devices for biotechnology and organic chemical applications.  
Stockholm: Royal Institute of Technology.
- Bernard A, Michel B et Delamarche E, 2001.  
Micromosaic Immunoassays.  
*Analytical Chemistry*,73:8-12.
- Boulbitch A, Guttenberg Z et Sackmann E, 2001.  
Kinetics of membrane adhesion mediated by ligand-receptor interaction studied with a biomimetic system.  
*Biophysical Journal*,81:2743-2751.
- Chapman RC, Ostunt E, Yan L et Whitesides GM, 2000.  
Preparation of Mixed Self-Assembled Monolayers (SAMs) That Resist Adsorption of Proteins Using the Reaction of Amines with a SAM That Presents Interchain Carboxylic Anhydride Groups.  
*Langmuir*,16:6927-6936.
- Chen CS, Mrksich M, Huang S, Whitesides GM et Ingber DE, 1997.  
Geometric control of cell life and death.  
*Science*,276:1425-1428.
- Cremer PS et Boxer SG, 1999.  
Formation and Spreading of Lipid Bilayers on Planar Glass Supports.  
*Journal of Physical Chemistry B*,103:2554-2559.
- Hell S, Reiner G, Cremer C et Stelzer EHK, 1993.  
Aberrations in confocal fluorescence microscopy induced by mismatches in refractive index.  
*Journal of Microscopy*,169:391-405.
- Hermanson GT, Mallia AK et Smith PK, 1992.  
Immobilized affinity ligand techniques.  
Editor, San diego: Academic Press.
- Hoch HC, Jelinski LW et Craighead HG, 1996.  
Nanofabrication and Biosystems integrating materials science, engineering, and biology.  
Editor, Cambridge: Cambridge University Press.
- Huang NP, Michel R, Voros J, Textor M, Hofer R, Rossi A, Elbert DL, Hubbell JA et Spencer ND, 2001.

### Chapitre III : Surface biomimétique pour l'adhésion cellulaire

- Poly(L-lysine)-g-poly(ethylene glycol) Layers on Metal Oxide Surfaces: Surface-Analytical Characterization and Resistance to Serum and Fibrinogen Adsorption.  
*Langmuir*,17:489-498.
- Kam L et Boxer SG, 2001.  
Cell adhesion to protein-micropatterned-supported lipid bilayer membranes.  
*Journal of Biomedical Materials Research*,55:487-495.
- Kato M et Mrksich M, 2004.  
Using Model Substrates To Study the Dependence of Focal Adhesion Formation on the Affinity of Integrin-Ligand Complexes.  
*Biochemistry*,43:2699-2707.
- Lee K-B, Park S-J, Mirkin CA, Smith JC et Mrksich M, 2002.  
Protein Nanoarrays generated by Dip-Pen Nanolithography.  
*Science*,295:1702-1705.
- Liu VA, Jastromb WE et Bhatia SN, 2002.  
Engineering protein and cell adhesivity using PEO-terminated triblock polymers.  
*Journal of Biomedical Materials Research*,60:126–134.
- Mohandas N et Evans E, 1994.  
Mechanical properties of the red cell membrane in relation to molecular structure and genztic defects.  
*Annual Review of Biophysical and Biomolecular Structures*,23:787-818.
- Mrksich M, 1998.  
Tailored Substrates for Studies of Attached Cell Culture.  
*Cellular and Molecular Life Sciences*,54:653-662.
- Mrksich M, 2002.  
What Can Surface Chemistry do for Cell Biology?  
*Current opinion in Chemical Biology*,6:794-797.
- Mrksich M, Chen CS, Xia Y, Dike LE, Ingber DE et Whitesides GM, 1996.  
Controlling Cell Attachment on Contoured Surfaces with Self-Assembled Monolayers of Alkanethiolates on Gold.  
*Proceedings of the National Academy of Science U.S.A.*,93:10775-10778.
- Ostunt E, Chapman RG, Liang MN, Meluleni G, Pier G, Ingber DE et Whitesides GM, 2001.  
Self-Assembled Monolayers That Resist the Adsorption of Proteins and the Adhesion of Bacterial and Mammalian Cells.  
*Langmuir*,17:6336-6343.
- Parker KH et Winlove CP, 1999.  
The deformation of spherical vesicles with permeable, constant-area membranes : Application to the red blood cell.

## Partie 1 : Adhésion cellulaire

*Biophysical Journal*,77:3096-3107.

Pierrat S, 2004.

Etude de l'adhésion cellulaire à différentes échelles : de la molécule unique à la cellule.

Paris: Université de Paris VI.

Puech PH, 2003.

Vésicules géantes décorées : adhésion et transport.

Paris: Université de Paris VI.

Rai-Choudhury P, 1997.

Handbook of Microlithography, Micromachining and Microfabrication.

Editor, London: The Institution of Electrical Engineers.

Reviakine I et Brisson A, 2000.

Formation of supported phospholipid bilayers from unilamellar vesicles investigated by atomic force microscopy.

*Langmuir*,16:1086.

Rheea SW, Taylor AM, Tub CH, Cribbsb DH, Cotmanb CW et Jeon NI, 2004.

Patterned cell culture inside microfluidic devices.

*Lab on a chip*,4.

Sharma S, Popat KC et Desai TA, 2002.

Controlling Nonspecific Protein Interactions in Silicon Biomicrosystems with Nanostructured Poly(ethylene glycol) Films.

*Langmuir*,18:8728-8731.

Stille RA et Healy KE, 2002.

Poly( N-isopropylacrylamide)-Based Semi-interpenetrating Polymer Networks for Tissue Engineering Applications. 1. Effects of Linear Poly(acrylic acid) Chains on Phase Behavior.

*Biomaterials*,3:591-608.

Tourovskaja A, Barber T, Wickes BT, Hirdes D, Grin B, Castner DG, Healy KE et Folch A, 2003.

Micropatterns of chemisorbed cell adhesion-repellent films using oxygen plasma etching and elastomeric masks.

*Langmuir*,19:4754-4764.

Vieu C, Carcenac F, Pepin A, Chen Y, Mejias M, Lebib A, Manin-Ferlazzo L, Couraud L et Launois H, 2000.

Electron beam lithography: resolution limits and applications.

*Applied Surface Science*,164:111-117.

Wadu-Mesthrige K, Xu S, Amro NA et Liu G-Y, 1999.

Fabrication and imaging of nanometer-sized protein patterns.

*Langmuir*,15:8580-8583.

### Chapitre III : Surface biomimétique pour l'adhésion cellulaire

Xia Y et Whitesides GM, 1998.

Soft Lithography.

*Annual Review of Material Science*,28:153-184.

Zhang M, Desai T et Ferrari M, 1998.

Proteins and cells on PEG immobilized silicon surfaces.

*Biomaterials*,19:953-960.

## **Partie 1 : Adhésion cellulaire**

## Chapitre IV

# Dynamique d'adhésion de vésicules induite par des interactions spécifiques

Alors que la morphologie de vésicules adhérees à l'équilibre a déjà beaucoup été étudiée à la fois expérimentalement et théoriquement (voir références du chapitre I), la dynamique d'étalement de vésicules n'a attiré l'attention d'expérimentateurs et de théoriciens que depuis peu de temps. Les études quantitatives sont rares. Nous avons donc abordé ce sujet, en nous limitant à une adhésion induite par des interactions spécifiques streptavidine-biotine. L'utilisation de vésicules géantes nous offre la possibilité de contrôler et faire varier la densité de récepteurs mobiles sur la membrane. Nos protocoles de préparation de surface décorée par des ligands (présentés dans le chapitre III) nous donnent un bon contrôle de la chimie de surface.

D'un point de vue technique, les expériences présentées ici sont très simples : elles consistent à laisser tomber des vésicules sur des lames de verre et à suivre l'évolution de leur zone de contact en fonction du temps. En revanche, l'analyse des résultats nous a demandé davantage d'attention. Les résultats obtenus, d'abord déconcertants, car révélant qu'une variation apparemment mineure de la préparation des surfaces pouvait engendrer des différences drastiques dans la cinétique d'étalement, ont pu finalement être expliqués quantitativement, sur la base de modèles théoriques nouveaux proposés par P.-G. de Gennes.

Cette partie du travail a donné lieu, sous une forme abrégée, à la publication d'une lettre : D. Cuvelier, and P. Nassoy (2004) « Hidden dynamics of vesicle adhesion induced by specific stickers ». *Phys. Rev. Lett.* 93:228101.

## IV.1. Matériels et expérience préliminaire

### IV.1.a. Vésicules et Surfaces

Comme le montre schématiquement le dessin de la figure IV.1., nous avons choisi de suivre la dynamique d'adhésion de vésicules décorées de streptavidine sur des lamelles de verre fonctionnalisées avec de la biotine. Les surfaces sont ici homogènes chimiquement (i.e. pas de motifs adhérents/non-adhérents).

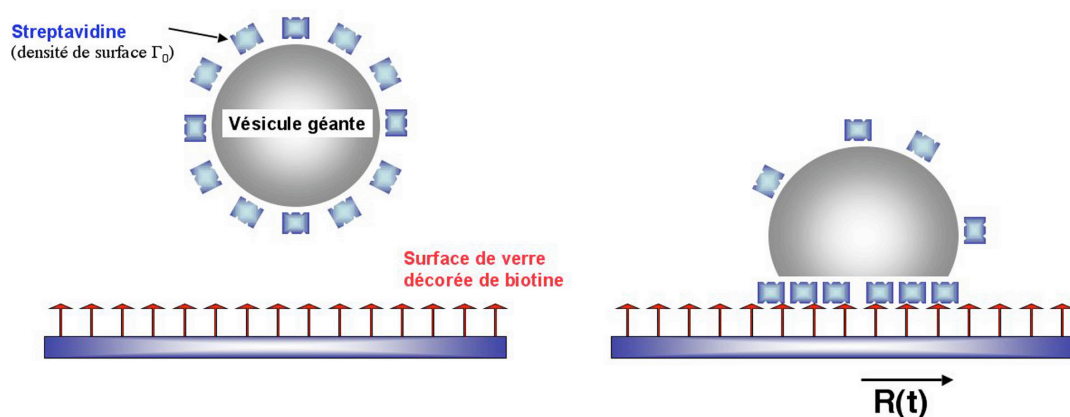


Figure IV.1. : Représentation schématique de l'étude de la dynamique d'adhésion de vésicules couvertes de streptavidine sur des surfaces biotinyllées.

En ce qui concerne les vésicules, le protocole de préparation est donné dans l'annexe B. Brièvement, des vésicules comportant des lipides PEG et PEG-biotine sont formées par électroformation. Après incubation dans une solution concentrée de streptavidine (pour limiter la formation de mousses de vésicules), l'excès de streptavidine est éliminé par centrifugation « douce » de la suspension de vésicules. Enfin, les vésicules sont redispersées dans la solution d'étude (PBS, 160mOsm). Le tableau IV.1. récapitule les différentes compositions lipidiques utilisées. Le lipide-PEG sert à mimer les glycolyx et réduire les interactions non-spécifiques. Le lipide PEG-biotine est celui dont la concentration varie, et qui fixe le taux de couverture de streptavidine.

Remarquons qu'une streptavidine peut être représenté approximativement par un cube de 5nm d'arête soit une surface de  $25\text{nm}^2$  par streptavidine (Green, 1975). Pour une vésicule de  $10\mu\text{m}$  de rayon, la surface est de  $1200\mu\text{m}^2$  environ. Or la surface d'une tête polaire d'un lipide est de  $0,5\text{nm}^2$ . Une vésicule comportant 5% de

## Chapitre IV : Dynamique d'adhésion de vésicules induites par des interactions spécifiques

lipides biotinylés contient  $100 \cdot 10^6 / 2$  de tels lipides sur le feuillet extérieur de la membrane, soit une aire de  $1250 \mu\text{m}^2$  si tous les lipides sont liés à une streptavidine. Nous considérons alors que la vésicule est saturée en streptavidine, soit un taux de couverture de 100%. Des taux de couverture de 10% et 1% en streptavidine ont été aussi utilisés pour envisager la limite diluée.

Taux de couverture en streptavidine	Composition lipidique des vésicules		
	EPC	DOPE-PEG <sup>2000</sup>	DSPE-PEG <sup>2000</sup> -biotine
100% ( $\square_{\text{sat}}$ )	95%	0%	5%
10% ( $\square_{\text{sat}}/10$ )	95%	4.5%	0.5%
1% ( $\square_{\text{sat}}/100$ )	95%	4.95%	0.05%

Tableau IV.1. : Composition lipidique des différentes vésicules utilisées et taux de couverture en streptavidine correspondant.

*Notations* : EPC : egg-phosphatidylcholine ; DOPE-PEG2000 : 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[methoxy(polyéthylène glycol)-2000]; DSPE-PEG2000-biotine 1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[biotinyl(polyéthylène glycol) 2000].

En ce qui concerne les surfaces utilisées, nous avons repris les protocoles du chapitre III. Les lamelles de verre sont fonctionnalisées avec de la biotine, soit par greffage d'un PEG-biotine, soit par adsorption de la caséine-biotine. Le dessin de la figure IV.2. schématise ces deux types de surfaces, baptisées « surface PEG-biotine » et « surface caséine-biotine ». Le nombre de biotines dessinées ne donne pas une vision réaliste de la situation. En réalité, nous ne connaissons pas la densité de surface en biotine. Mais, comme nous l'avons indiqué au chapitre III, nous avons vérifié, par microscopie de fluorescence, que la densité de biotines capables de capturer un récepteur à partir d'une *solution* de streptavidine était identique dans les deux cas ( $\square_{\text{biot}} = 2.8 \pm 0.5 \times 10^{16}$  molécules/m<sup>2</sup>). Pour la suite, il sera important de se souvenir de cette remarque, car, malgré une densité équivalente de ligands susceptibles de former un complexe, les cinétiques d'étalement de vésicules sur les deux types de surfaces seront radicalement différentes.



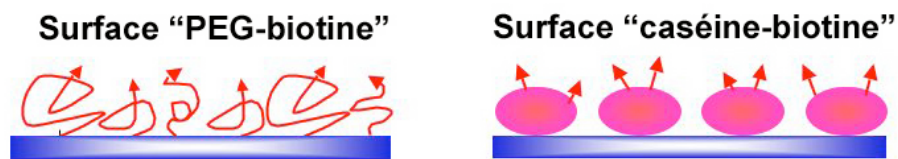


Figure IV.2. : Représentation schématique des deux types de surfaces utilisées. L'une sera greffée par du PEG-biotine, l'autre adsorbera de la caséine-biotine.

### IV.1.b. Visualisation de la forme de vésicules en cours d'étalement

Dans un premier temps, nous avons voulu visualiser directement l'évolution de l'angle de contact d'une vésicule sur un substrat en regardant la vésicule de côté, comme on le fait classiquement en mouillage pour des gouttes.

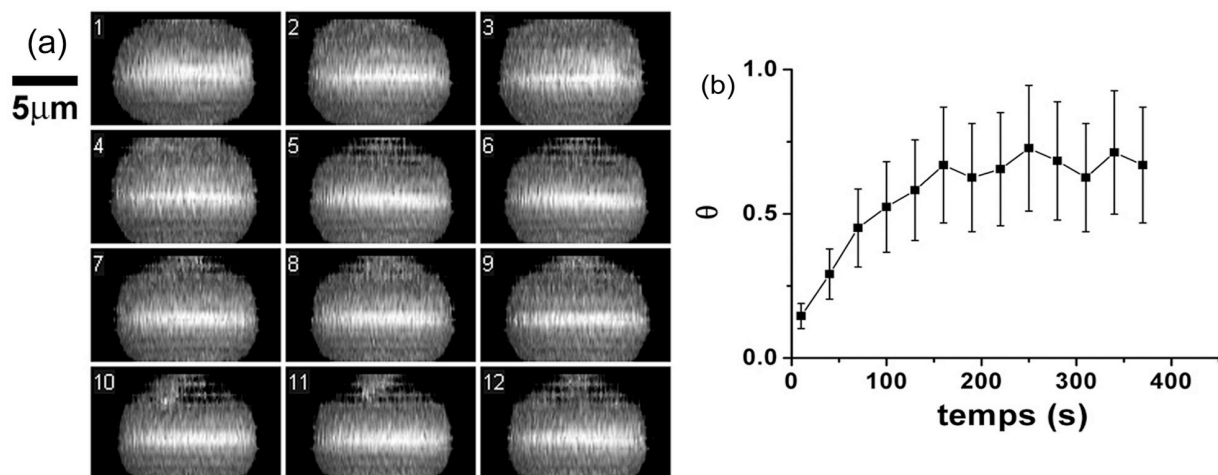
La première approche, la plus directe, consiste à utiliser le « microscope horizontal » développé dans le groupe d'Annie Viallat. Les quelques essais que nous avons effectués se sont révélés infructueux. Seules des images statiques (voir figure III.9. du chapitre III) ont pu être obtenues. Pour des raisons purement techniques, le temps nécessaire pour trouver les vésicules (en l'absence de système de fluorescence) et effectuer la mise au point était trop long.

A priori, la microscopie confocale aurait pu constituer un bon outil alternatif pour réaliser indirectement le même genre d'opérations. Toutefois, du fait de son mode intrinsèque de fonctionnement, sa cadence d'acquisition est limitée à environ 0.01Hz, alors que la plupart des cinétiques d'étalement que nous avons étudiées peuvent être aussi rapides que 1 à 100 secondes.

Une méthode alternative est la microscopie 4-5D à déconvolution, développée par le groupe de Jean-Baptiste Sibarita à l'Institut Curie (Sibarita *et al*, 2002). Pratiquement, cette technique repose sur un microscope classique équipé d'un élément piezoélectrique au niveau de l'objectif et muni d'un système d'épifluorescence. L'acquisition d'une pile d'image s'effectue suivant Z par incrémentation de l'objectif avec l'élément piézo-électrique. Un logiciel de déconvolution permet ensuite de reconstituer une image tridimensionnelle de bonne qualité. Pour le lecteur non averti, précisons tout de même que la dénomination « microscopie 4-5D » (qui n'est pas de notre fait) signifie simplement qu'on peut

## Chapitre IV : Dynamique d'adhésion de vésicules induites par des interactions spécifiques

acquérir des images tridimensionnelles (3D), plus rapidement qu'en géométrie confocale (+1D pour le temps) et en fluorescence (+1D pour une couleur). Par exemple, pour une vésicule de  $5\mu\text{m}$  de rayon et un incrément de  $0.5\mu\text{m}$  en Z, l'acquisition est de l'ordre de la seconde, ce qui laisse envisager en effet une étude dynamique de l'angle de contact après reconstruction de la vue latérale par projection des piles d'images. La figure IV.3.a montre l'évolution de la forme d'une vésicule en cours d'étalement sur une surface caséine-biotine. Les vues latérales de la vésicule sont de moins bonne qualité que celles obtenues par microscopie confocale (voir figure III.10. du chapitre III pour comparaison) du fait qu'aucun filtrage n'est effectué sur le faisceau retour de lumière. Cependant, de la surface à l'équateur de la vésicule, l'image semble assez bien résolue pour effectuer des mesures d'angles de contact.



A partir de cette séquence, nous avons évalué l'angle de contact,  $\theta$ , entre la surface et la vésicule, en fonction du temps. Comme on le voit sur la figure IV.3.b Après une augmentation rapide, l'angle de contact semble atteindre un palier après 300s. L'erreur de mesure est estimée à 30% car la zone de contact est difficilement localisable.

Même si cette méthode de microscopie dite « rapide » nous permet d'avoir, dans ce cas précis, une bonne idée de la dynamique d'adhésion, nous devons souligner que les dynamiques d'étalement étudiées sont parfois plus rapides. Nous

## **Partie 1 : Adhésion cellulaire**

verrons plus tard que, sur les surfaces PEG-biotine, l'étalement est achevé en une dizaine de secondes. La résolution temporelle de la microscopie 4-5D est donc insuffisante. Notons cependant que cette première approche, pas complètement satisfaisante, nous a permis de vérifier que l'étalement n'entraînait pas une variation de volume significative. C'était un point important à vérifier, car on aurait pu imaginer que l'augmentation de tension induite par l'adhésion eût pu déclencher l'ouverture de pores et l'expulsion de fluide (communication privée avec J.-B. Fournier et P. Galatola ; (Bernard, 1999)).

### **IV.2 Visualisation de la zone de contact d'une vésicule en cours d'étalement sur un substrat**

Pour améliorer encore la résolution temporelle, nous avons envisagé d'utiliser la microscopie à contraste interférentiel (RICM), pour ne visualiser que la membrane au voisinage immédiat de la surface à une cadence maximale de 25Hz (celle de la vidéo). Cette technique a été présentée succinctement dans le chapitre II.B.. Nous montrerons ici comment la variation au cours du temps de l'aire de la zone de contact ainsi que de la forme de la vésicule ont été mesurées pratiquement. Nous nous attarderons également sur les limitations de cette méthode, pouvant conduire à des interprétations erronées. Enfin, alors que la RICM ne donne que des informations « topographiques », nous montrerons que ces mesures peuvent être complétées par une visualisation en microscopie de fluorescence de la zone de contact afin de déterminer le profil de densité de récepteurs dans le patch d'adhésion.

#### **IV.2.a. Mesure du rayon de contact de la zone d'adhésion par RICM**

Au cours d'une expérience typique, nous opérons de la façon suivante. Une vésicule, couverte de streptavidine fluorescente (Cy3-Extravidine) est d'abord repérée dans la chambre d'observation, avant qu'elle ne touche la surface. Puis, il

## Chapitre IV : Dynamique d'adhésion de vésicules induites par des interactions spécifiques

suffit de passer en mode « contraste interférentiel » et acquérir la séquence d'images.

La figure IV.4 montre des séquences d'instantanés pris à intervalle de temps régulier de la croissance de la zone de contact d'une vésicule à  $\lambda_{\text{sat}}/10$  sur les deux types de surfaces étudiées. Plusieurs observations qualitatives peuvent être faites à ce niveau. Tout d'abord, l'étalement sur une surface « PEG-biotine » est nettement plus rapide (environ 20 secondes) que sur un substrat « caséine-biotine » (environ 10 minutes). Ensuite, dans les deux cas, la croissance de la zone d'adhésion (sombre) est d'abord rapide, puis ralentit au fur et à mesure que l'on s'approche de l'état d'équilibre. Enfin, l'étalement est radial et homogène, ce qui signifie que les vésicules sont initialement peu fluctuantes. Nous attribuons cela au fait que les vésicules décorées de streptavidine ont été centrifugées pour éliminer l'excès de streptavidine libre. Cette centrifugation, pourtant à faible vitesse (500rpm), a pu « sélectionner » les vésicules les plus tendues ou fractionner des vésicules fluctuantes. Il est à noter que cette situation est nettement différente de celle rapportée dans les expériences de P.-H. Puech (Puech, 2003) et du groupe de Sackmann (Boulbitch *et al*, 2001), où le patch d'adhésion était de forme irrégulière ou croissait par coalescence de plusieurs centres de nucléation.

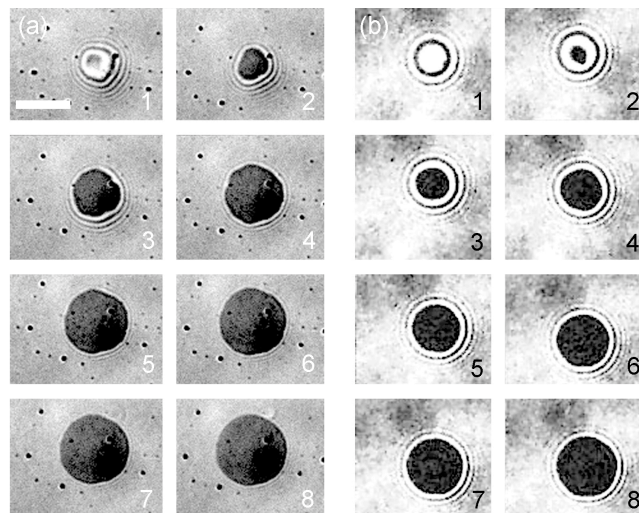


Figure IV.4. : Séquence d'images par RICM de la zone de contact d'une vésicule à  $\lambda_{\text{sat}}/10$  en streptavidine sur (a) une surface « PEG-biotine », et (b) sur une surface « caséine biotine ». L'intervalle de temps entre chaque image est de 5s pour (a) et de 30s pour (b). La barre d'échelle représente 5 $\mu\text{m}$ .

Cette dernière remarque est importante dans la mesure où elle va simplifier notre analyse. En effet, l'aire  $A_c$  du disque d'adhésion donne directement un rayon

## Partie 1 : Adhésion cellulaire

de contact,  $R$ , ou de manière équivalente l'angle de contact vésicule-substrat,  $\theta$ , selon la relation géométrique :  $R = R_v \cdot \sin\theta = \sqrt{A_c/\pi}$ , avec  $R_v$  le rayon de la vésicule.

Concrètement, l'aire de contact  $A_c$  est déterminée par seuillage (« off-line ») des images obtenues. Comme indiqué par P. Bongrand (Pierres et al, 2003), le choix de l'intensité seuil est souvent crucial. Dans notre cas, les images sont bien contrastées. Nous devons seulement veiller à prendre en compte d'éventuelles variations d'illumination au cours de l'acquisition. Cela est atteint en fixant l'intensité moyenne du fond de l'image à une valeur constante.

La figure IV.5 montre une courbe représentative du rapport  $R/R_v$  en fonction du temps pour une vésicule à  $\theta_{sat}/10$  en streptavidine sur des surfaces « PEG-biotine » et « caséine-biotine ». Tout d'abord, on vérifie bien les observations qualitatives exposées ci-dessus. Mais, plus important, on remarque que, non seulement la cinétique d'étalement est plus lente sur le substrat caséine-biotine », mais la dynamique semble différente, ce qui suggérerait que le mécanisme gouvernant l'adhésion est différent dans les deux cas. Enfin, il est à noter que le rayon de contact normalisé  $R/R_v$  tend vers un plateau égal à environ 0.55 sur « PEG-biotine » et à 0.45 sur « caséine-biotine ». Si l'on suppose que la tension de membrane à l'équilibre des vésicule est identique dans les deux cas, cela indiquerait que l'énergie d'adhésion effective est sensiblement plus faible sur les surfaces « caséine-biotine » (cf paragraphe I.B.2.a.ii.).

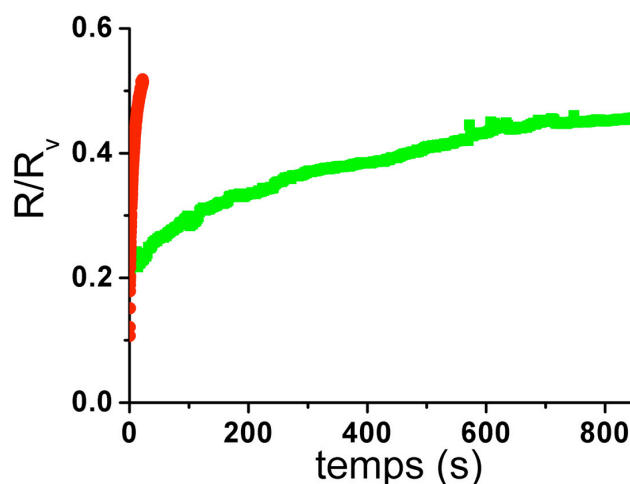


Figure IV.5. : Rayon de la zone de contact,  $R$ , normalisé par le rayon de la vésicule,  $R_v$ , en fonction du temps pour une vésicule à  $\theta_{sat}/10$  en streptavidine adhérant sur un substrat « PEG-biotine » (rouge) et « caséine-biotine » (vert).

### IV.2.b. Profil de densité des molécules de streptavidine dans la zone d'adhésion déterminé par microscopie de fluorescence

La streptavidine que nous avons utilisée étant fluorescente, nous avons pu visualiser la croissance de la zone de contact par microscopie de fluorescence, dans l'idée d'obtenir un profil de distribution des récepteurs au sein du patch d'adhésion. Les photographies de la figure IV.6.a sont des instantanés extraits d'une séquence d'étalement d'une vésicule à  $\square_{\text{sat}}/10$  sur un substrat « PEG-biotine ». Sur la figure IV.6.b nous avons tracé une coupe radiale de l'intensité de fluorescence.

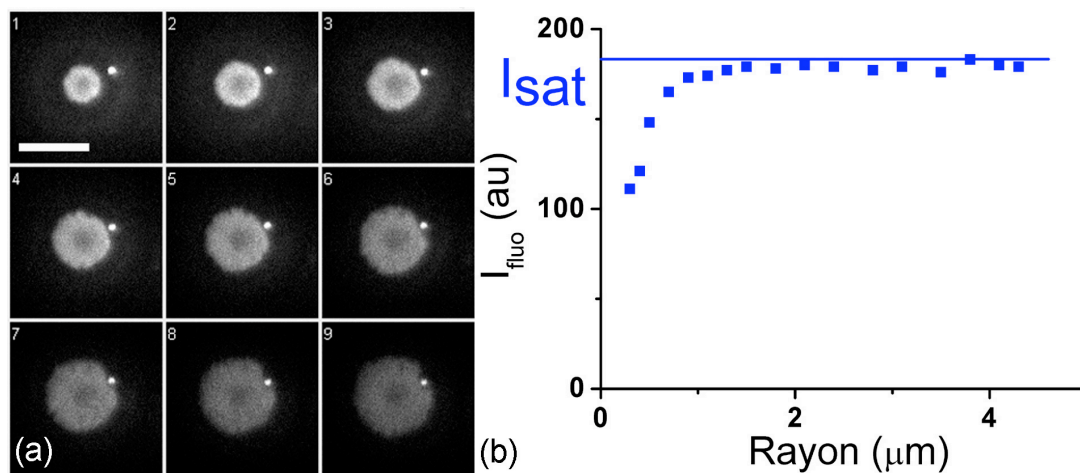


Figure IV.6. : (a) Evolution de la zone de contact sur une surface type PEG-biotine d'une vésicule diluée à 10% en streptavidine. L'intervalle de temps entre chaque image est de 3s. La barre d'échelle est de 10  $\mu\text{m}$ . (b) Profil d'intensité de fluorescence selon un rayon. L'unité d'intensité est arbitraire.

Cette séquence de vidéo-micrographies appelle plusieurs commentaires. Premièrement, on pourrait suivre l'augmentation de la zone de contact de la même façon qu'en RICM. Deuxièmement, les images reproduites sont les images brutes, révélant une décroissance globale de l'intensité de fluorescence due au photoblanchiment des fluorophores. Troisièmement, et plus remarquablement, nous observons que le centre de la zone de contact est moins brillant que le reste. En dehors de cette zone, l'intensité de fluorescence est homogène et constante après correction de l'effet de photo-blanchiment. Cela suggère qu'en dehors du noyau de déplétion (qui s'étend ici sur environ 2  $\mu\text{m}^2$ , soit dans ce cas un angle de 0.1rad pour un rayon de vésicule de 7  $\mu\text{m}$ ), la densité de molécules de streptavidine est constante, invariable au cours du temps, donc qu'il n'y a pas de diffusion des

## Partie 1 : Adhésion cellulaire

récepteurs à l'intérieur du disque d'adhésion. D'autre part, nous avons vérifié que le niveau de fluorescence est identique quelle que soit la densité de streptavidine sur les vésicules. On peut donc penser que les molécules de streptavidine sont « recrutées », par diffusion de l'extérieur vers l'intérieur du patch jusqu'à atteindre une valeur maximale, limitée par la densité de biotines greffées.

Quant à la zone déplétée en streptavidine, elle garde la même taille tout au long de l'étalement. Son existence peut être expliquée spéculativement de la façon suivante (résumée schématiquement sur le dessin de la figure IV.7.). Lors de l'arrivée de la vésicule, la compression des couches de PEG peut provoquer une expulsion des molécules de streptavidine sans formation de complexe streptavidine-biotine. Ensuite, les premiers contacts formés entre la vésicule et la surface empêchent l'arrivée d'autres molécules de streptavidine au centre pour combler la zone de déplétion. Ceci permet aussi d'expliquer le fait que, plus le taux de couverture en streptavidine sur la vésicule est faible, plus la zone de déplétion est étendue (données non montrées).

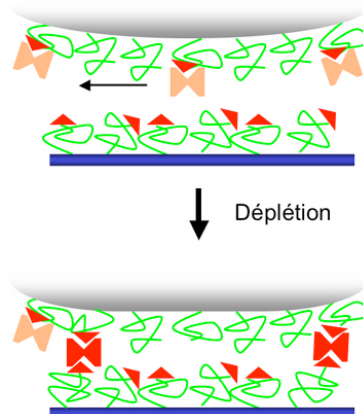


Figure IV.7. : Effet de déplétion des molécules de streptavidine lors du contact initial. Les récepteurs de la membrane liés aux ligands de surface sont représentés en rouge et les récepteurs libres en orange translucide.

### IV.2.c. Analyse des franges d'interférence et limitations de la microscopie à contraste interférentiel

Comme nous l'avons exposé dans le chapitre II.B, la RICM est une technique qui permet, en principe, d'aller au-delà de la simple mesure d'aire de contact. La possibilité de déduire le profil des objets au voisinage de la surface a beaucoup été exploitée (Bruinsma et Sackmann, 2001). De plus, après reconstruction du profil de



## Chapitre IV : Dynamique d'adhésion de vésicules induites par des interactions spécifiques

la membrane, il est envisageable de déduire l'angle de contact  $\theta$  et la longueur d'extrapolation  $\lambda$ , qui est reliée au module de courbure et à la tension de membrane. Connaissant la rigidité de courbure des vésicules ( $10 k_B T$ ), la mesure de  $h(x)$  devrait nous donner directement  $\lambda(t)$ , c'est-à-dire la variation de la tension de membrane. Puisque le passage d'une vésicule initialement sphérique adhérant sur une surface pour se transformer en une sphère tronquée se traduit par une augmentation d'aire, on peut s'attendre à une augmentation concomitante de la tension de membrane. C'est d'ailleurs cette augmentation de tension qui finit par stopper l'étalement. Afin de modéliser complètement la dynamique d'étalement, cette variation  $\lambda(t)$  doit être prise en compte.

De telles analyses ont été conduites pour des vésicules décorées de streptavidine s'étalant sur une surface « caséine biotine ». La figure IV.8 donne une des sections de profils représentatifs à différents temps au cours de l'étalement. La zone centrale d'adhésion sombre est considérée à altitude nulle (nous ne cherchons pas une mesure absolue de la distance vésicule/paroi) et le profil a pu être tracé jusqu'à des altitudes d'environ 600-700 nm (correspondant aux 6-7 franges bien visibles). Nous remarquons que la forme de la membrane (courbure et angle) évolue énormément au début de l'étalement, puis semble figée après 200s environ : le front d'adhésion avance comme par simple translation.

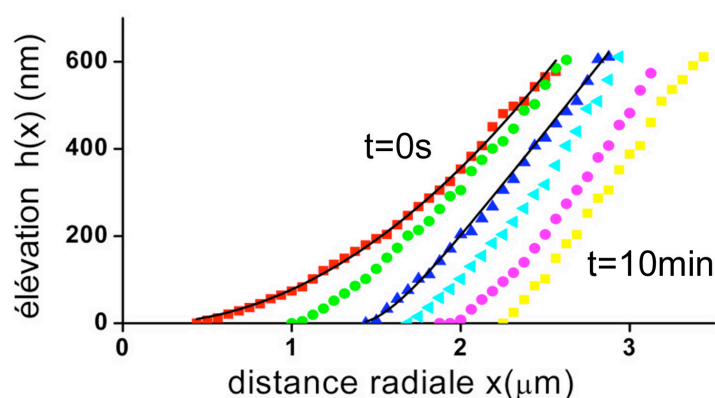


Figure IV.8. : Evolution d'une section de profil d'une vésicule en fonction du temps pendant l'étalement sur un substrat type caséine-biotine. Chaque profil est défini par la variation de l'élévation en fonction de la distance radiale du centre de la zone de contact. L'intervalle de temps entre les différentes sections est de 100s à partir d'un temps initial arbitraire. Les courbes noires sont les ajustements donnant l'angle de contact  $\theta$  et la longueur d'extrapolation,  $\lambda$ , respectivement pour la courbe rouge (0.35, 500nm) et pour la courbe bleue (0.45, 200nm) en utilisant l'équation  $h(x) = \lambda \left[ 1 - \frac{1}{2} \left( 1 - \frac{x}{\lambda} \right)^2 \right] e^{-x/\lambda}$  pour  $x > 0$  (voir II.B.2).



## Partie 1 : Adhésion cellulaire

Chaque profil est ensuite ajusté par une fonction (eq. II.15.) comportant une contribution exponentielle qui donne  $\lambda$ , et une contribution linéaire qui représente la tangente à la membrane, donc fournit une valeur de  $\theta$ .

Nous avons tracé  $\theta(t)$  pour différentes vésicules sur le graphe de la figure IV.9.a. De manière surprenante, l'angle de contact décroît initialement, jusqu'à un minimum atteint vers 100s. Ensuite,  $\theta$  augmente lorsque l'étalement se poursuit, et tend vers un plateau autour de 0.5 lorsque l'équilibre est atteint, après une dizaine de minutes. Ce comportement étonnant a été observé de façon systématique et reproductible sur toutes les vésicules étudiées.

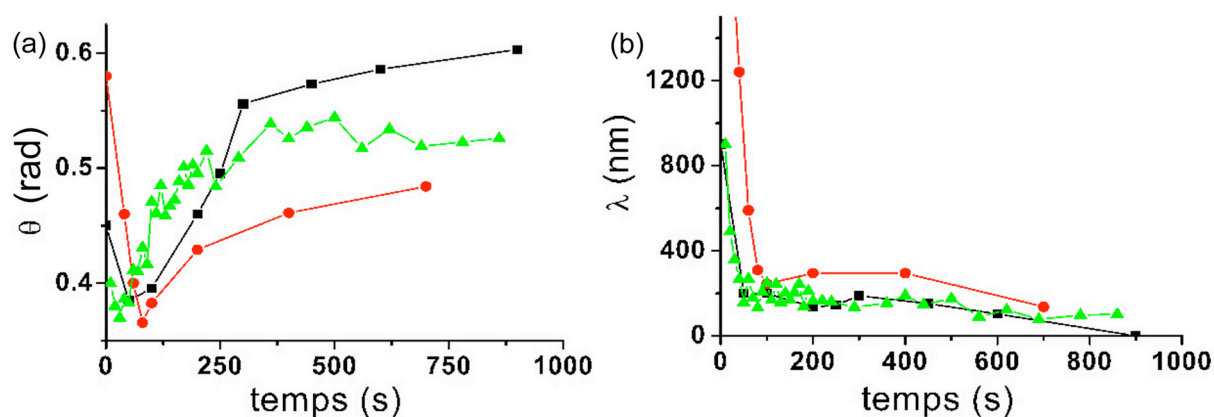


Figure IV.9. : (a) Evolution de l'angle de contact en fonction du temps pour trois vésicules différentes adhérant sur un substrat « caséine-biotine ». (b) Evolution de la longueur d'extrapolation,  $\lambda$ , en fonction du temps pour les trois vésicules précédentes adhérant sur un substrat « caséine-biotine ».

Sur la figure IV.9.b, nous avons également représenté  $\lambda(t)$  pour ces trois mêmes vésicules. Après une chute brutale, la longueur d'extrapolation semble se stabiliser à partir de 100 s environs à une valeur de 200nm. Une superposition des courbes des figures IV.9.a et IV.9.b montre que le début de l'augmentation de  $\theta$  coïncide exactement avec la fin de la diminution de  $\lambda$ .

La diminution initiale de l'angle de contact semble aller contre le sens physique, puisqu'à l'instant même où la vésicule touche la surface,  $\theta$  est nul. On ne devrait observer qu'un accroissement de  $\theta$  au cours du temps. Cette variation est donc artificielle. A posteriori, il est aisé de s'en convaincre : aux temps courts, le profil de la membrane est proche de celui d'une sphère, avec une courbure importante au

## Chapitre IV : Dynamique d'adhésion de vésicules induites par des interactions spécifiques

niveau de la surface. Or, ce profil est approché par une droite terminée par un raccord exponentiel à la surface. Cette droite est la tangente à la sphère prise au niveau de la ligne de contact virtuelle (i.e. ligne de contact réelle + longueur d'extrapolation). Par conséquent, si  $\lambda$  est de l'ordre de grandeur (ou supérieur) à l'altitude explorée (600-700 nm), la tangente au profil sera incorrectement estimée. Les deux paramètres issus de l'ajustement n'étant pas indépendants, une diminution de  $\lambda$  sera corrélée à une diminution apparente de  $\theta$ . Ceci est clairement une limitation à la technique RICM par analyse de profils : pour les valeurs de  $\lambda$  élevées, la détermination de  $\theta$  est imprécise, voire erronée (Figure IV.11.).

Une deuxième limitation vient de ce qui se passe pour les très faibles valeurs de la longueur d'extrapolation. Le graphe de la figure IV.9.b montre qu'après une centaine de secondes,  $\lambda$  reste constant, de l'ordre de 200 nm. Cela signifierait, par définition de  $\lambda = \sqrt{\sigma/\rho}$ , que la tension de membrane reste constante, autour de  $10^{-6}$  N/m. Or, il faut garder à l'esprit que la RICM a une très bonne résolution verticale, mais que la résolution horizontale est celle de la microscopie optique classique, c'est-à-dire limitée par la diffraction. Cette valeur minimale de 150-200 nm coïncide étrangement avec la distance de coupure basse imposée par la résolution optique. De la constance de  $\lambda$  pour les temps « longs » de l'étalement, on peut donc seulement déduire que  $\sigma$  est égale ou supérieure à  $10^{-6}$  N/m. Cette technique n'est donc pas adaptée pour suivre la variation temporelle de tension.

Face à ces difficultés intrinsèques à la technique RICM pour mesurer l'angle de contact et la tension de membrane à partir des profils partiels de vésicules, il nous faut trouver une approche alternative. Au § IV.2.A, et dans le chapitre II, nous avons annoncé que l'angle de contact pouvait être obtenu de façon équivalente par la détermination du rayon de contact et du rayon de la vésicule :  $\theta = \arcsin(R/R_v)$ . Encore fallait-il le vérifier expérimentalement !

Sur le graphe de la figure IV.10, nous avons tracé, pour la même vésicule, la variation  $\theta(t)$  obtenue à partir des profils et la variation de  $R(t)/R_v$ . Hormis le problème de décroissance de l'angle de contact maintenant expliqué, les deux courbes ont la même allure. Il existe cependant un écart systématique :  $\theta_{\text{RICM}}$  déduit de l'ajustement du profil est toujours supérieur à  $\theta_A$  déduit de la mesure de l'aire de contact. Cette différence peut se comprendre aisément à partir du schéma de la figure IV.11. L'aire

## Partie 1 : Adhésion cellulaire

de contact est déterminée en seillant la zone sombre, et ne prend donc pas en compte la longueur d'extrapolation qui est introduite dans l'ajustement du profil RICM, quand bien même celle-ci serait inférieure à la résolution optique. Aussi, l'angle de contact déduit du profil RICM sera systématiquement plus grand que l'angle déduit de la mesure d'aire. On peut même estimer cette différence :  $\sin \theta_{\text{RICM}} - \sin \theta_A \approx \theta_{\text{RICM}} - R/R_v = \theta/R_v$ , soit 0.04 pour une vésicule de 10 microns de diamètre, ce qui est bien observé sur la courbe.

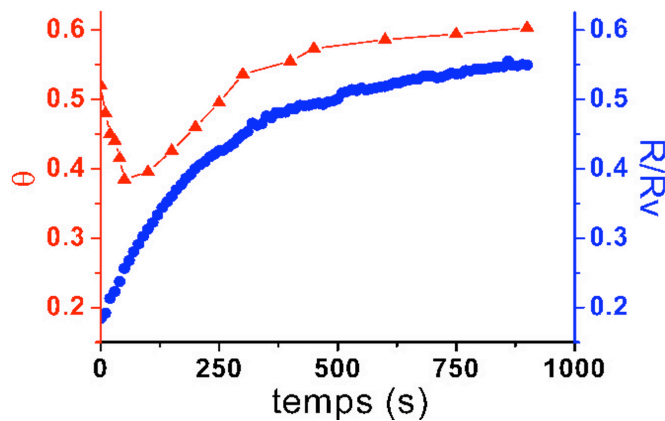


Figure IV.10 : Comparaison de la variation de l'angle de contact obtenu par ajustement des profils et de la variation du rayon de contact normalisé par le rayon de la vésicule pour un étalement sur un substrat « caséine-biotine ».

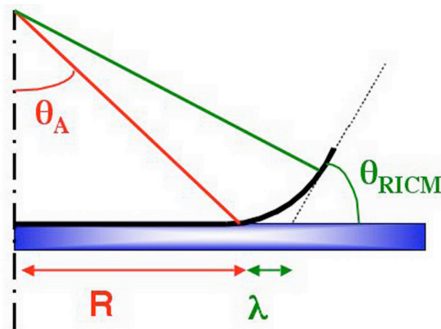


Figure IV.11 : Equivalence entre l'angle de contact et le rapport un rayon de contact avec le rayon de la sphère aux petits angles dans le cas d'une sphère tronquée.

Dorénavant, nous assimilerons, dans le reste du chapitre, l'angle de contact entre la vésicule et la surface, avec le rayon de contact normalisé par le rayon de la vésicule. Comment suivre la variation de la tension de membrane au cours de l'étalement ? Puisque l'analyse basée sur la longueur d'extrapolation a été infructueuse, nous pouvons exploiter le fait que tension de membrane et excès d'aire sont reliés. Effectivement, le passage de la vésicule sphérique (aire  $A$ ) en suspension à une sphère tronquée engendre une augmentation d'aire.  $\Delta A/A$ , qui

## Chapitre IV : Dynamique d'adhésion de vésicules induites par des interactions spécifiques

directement relié à l'angle de contact moyennant des relations géométriques simples (Zuckerman et Bruinsma, 1998) :

$$\frac{\sigma A}{A} = \frac{\sigma_0}{16} \quad \text{IV.1.}$$

Or, d'après la relation de Helfrich, en supposant que l'adhésion n'induit pas d'étirement élastique de la membrane (voir partie "tube" chapitre IV), la tension augmente exponentiellement avec l'excès d'aire, donc avec l'angle de contact :

$$\frac{\sigma}{\sigma_0} = \exp\left[\frac{2\kappa\theta^4}{k_B T}\right] \quad \text{IV.2,}$$

avec  $\sigma_0$ , la tension initiale de la vésicule avant adhésion,  $\kappa$ , la rigidité de courbure de la membrane et  $k_B T$ , l'énergie thermique. Cette dépendance exponentielle peut sembler drastique, mais, l'angle de contact demeure relativement faible ( $<1$ ), et il intervient à la puissance quatrième. Le graphe de la figure IV.12 représente la variation relative de  $\sigma$  par rapport à  $\sigma_0$  en fonction du temps, déduite de  $\sigma(t)$  en utilisant l'équation précédente. On s'aperçoit que la tension de membrane varie faiblement, puisqu'elle ne double même pas sur toute la durée de l'expérience.

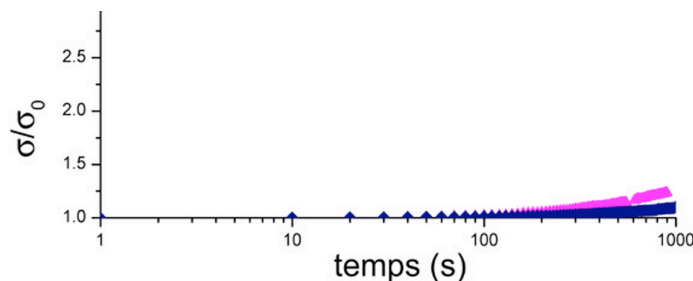


Figure IV.12. : Evolution de la tension de membrane avec le temps au cours de l'étalement de deux vésicules sur surface « caséine-biotine ».

Dans la suite de ce chapitre, nous négligerons donc toute augmentation de tension induite par l'adhésion des vésicules.

### IV.3. Résultats expérimentaux

Après toutes ces précisions sur les méthodes d'analyse et sur leurs limitations, nous pouvons maintenant présenter les résultats sous leur forme définitive.

## Partie 1 : Adhésion cellulaire

Nous avons suivi la cinétique d'étalement de vésicule couvertes de streptavidine sur des substrats biotinylés. Nous avons étudié deux types de substrat, à savoir « PEG-biotine » et « caséine-biotine », et nous avons fait varier la densité de streptavidine sur les vésicules sur deux ordres de grandeur (de  $\rho_{\text{sat}}$  à  $\rho_{\text{sat}}/100$ ). Les graphes des figures IV.13 (« PEG-biotine ») et IV.14 (« caséine-biotine ») rassemblent des courbes représentatives obtenues.

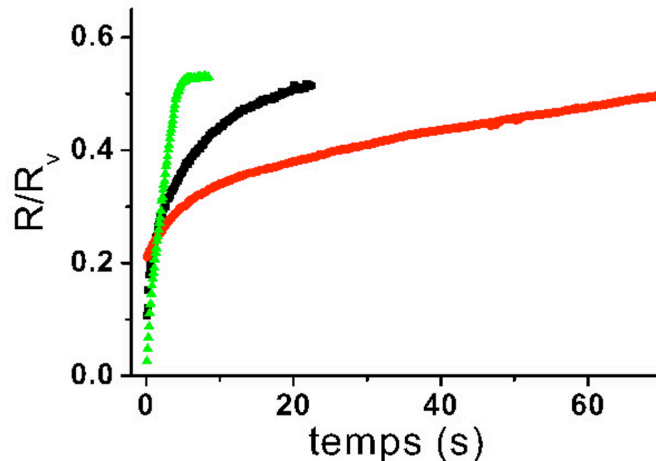


Figure IV.13. : Variation du rayon de la zone de contact  $R$  normalisé par le rayon de la vésicule  $R_v$  en fonction du temps sur des substrats « PEG-biotine ». Les courbes verte, noire, et rouge correspondent respectivement à un taux de couverture de streptavidine sur les vésicules de 100%, 10%, 1%.

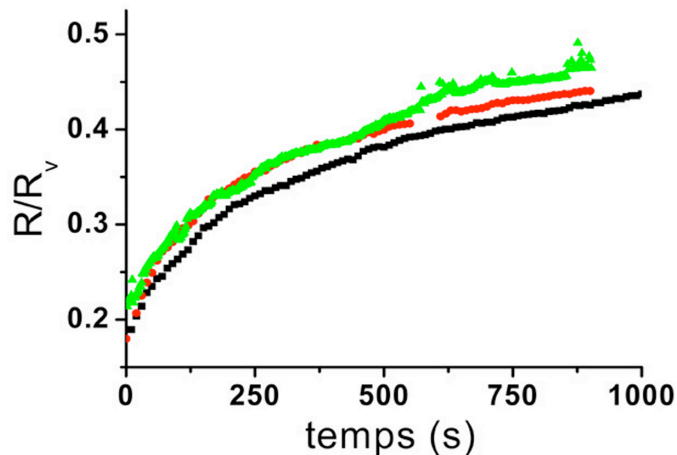


Figure IV.14 : Variation du rayon de la zone de contact  $R$  normalisé par le rayon de la vésicule  $R_v$  en fonction du temps sur des substrats « caséine-biotine ». Les courbes verte, noire, et rouge correspondent respectivement à un taux de couverture de streptavidine sur les vésicules de 100%, 10%, 1%.

Deux observations notables ressortent de l'examen de ces graphes :

-La cinétique est beaucoup plus lente sur les substrats « caséine-biotine » que sur « PEG-biotine ».

## **Chapitre IV : Dynamique d'adhésion de vésicules induites par des interactions spécifiques**

- La dynamique d'adhésion est d'autant plus lente que le taux de couverture en streptavidine des vésicules est faible sur « PEG-biotine », tandis qu'elle est insensible à la densité en récepteurs sur « caséine-biotine ».

Comme la densité de surface en biotine est identique sur les deux types de substrats (voir § IV.1.a), il faut chercher dans le mécanisme de l'étalement la raison de ces différences.

### **IV.4. Analyse théorique**

Avant de développer les différents modèles proposés pour interpréter nos données expérimentales, nous allons préciser les hypothèses générales communes, puis nous montrerons que, dans le cas des substrats « PEG-biotine », l'étalement est limité par la diffusion des molécules de streptavidine, alors que, sur les surfaces « caséine-biotine », le temps de réaction entre la streptavidine et la biotine immobilisée devient le phénomène limitant.

#### **IV.4.a. Hypothèses de travail**

Première hypothèse : Les molécules de streptavidine dans la zone de contact, qu'elles soient liées à une biotine de la surface ou libres, ne diffusent pas.

Si un complexe est formé, cette hypothèse est évidente, puisque la caséine biotinylée est adsorbée ou le PEG-biotine est greffé. En d'autres termes, la diffusion des liaisons formées est négligeable devant la diffusion des récepteurs dans la membrane fluide en dehors de la zone de contact. D'autre part, même si une streptavidine située dans le patch d'adhésion n'a pas « trouvé » de partenaire, son état de confinement (entre surface et membrane) limite sa mobilité. Dans tous les cas, le disque d'adhésion est considéré comme un état figé, sans diffusion possible.

Deuxième hypothèse : nous supposons que la tension de membrane reste constante au cours de l'étalement. Nous avons testé cette hypothèse au §IV.2.C, et nous en avons déduit que l'augmentation de tension était en effet négligeable (moins d'un facteur 2).

#### IV.4.b. Cas des surfaces « PEG-biotine » : le ligand est connecté à un long espaceur flexible

Nous avons vu que la densité de récepteurs sur la vésicule avait une influence significative sur la cinétique d'étalement. Nous allons distinguer deux cas : celui de vésicules saturées en streptavidine, et celui de vésicules pour lesquelles la densité de récepteurs est faible par rapport à  $\rho_{\text{sat}}$ . Ces deux situations donnent lieu, selon nos propositions, à des mécanismes physiques différents permettant de rendre compte de la dynamique d'adhésion.

Toutefois, dans ce paragraphe, nous supposerons que la cinétique de formation des complexes streptavidine/PEG-biotine est rapide par rapport aux autres processus mis en jeu, et donc ne constitue pas l'étape limitante de l'étalement. Cette hypothèse peut être justifiée de la façon suivante. A partir de la constante d'association du couple ligand-récepteur en volume,  $k_{\text{on}}^{3D}$ , une estimation du temps nécessaire à la formation de la liaison à deux dimensions,  $\tau$ , avait été suggérée par Bell (Bell, 1978; Boulbitch *et al*, 2001) et s'exprime sous la forme :

$$\tau = \frac{d_r}{\Gamma k_{\text{on}}^{3D} \rho_0} \quad \text{IV.3.}$$

où  $d_r$  est une distance moléculaire de l'ordre du nm,  $\Gamma$  un facteur géométrique prenant en compte la perte de degré de liberté et  $\rho_0$ , la concentration de récepteurs à la surface. En prenant  $d_r \approx 1 \text{ nm}$ ,  $\Gamma \approx 100$ ,  $\rho_0 \approx 10^{16} \text{ m}^{-2}$ , et  $k_{\text{on}}^{3D} = 10^{-19} \text{ m}^3/\text{s}$ ,  $\tau$  est estimée à 1ms ce qui est effectivement 3 à 4 ordres de grandeur plus court que le temps de nos expériences.

##### IV.4.b.i. Vésicules saturées en récepteurs : comportement de goutte collante

Nous considérons qu'une vésicule à  $\rho_{\text{sat}}$  en streptavidine a un comportement analogue à celui d'une goutte collante. Dans ce cas, la dynamique d'étalement est limitée par la dissipation visqueuse au niveau de la ligne de contact. L'angle de contact,  $\theta$ , croît jusqu'à un angle d'équilibre,  $\theta_E$ , au fur et à mesure que le front d'adhésion avance (Figure IV.13). Les arguments développés sont les mêmes que

**Chapitre IV : Dynamique d'adhésion de vésicules induites par des interactions spécifiques**

ceux proposés par P.-G. de Gennes (de Gennes, 1985) pour expliquer la dynamique de mouillage d'une surface par une goutte de liquide.

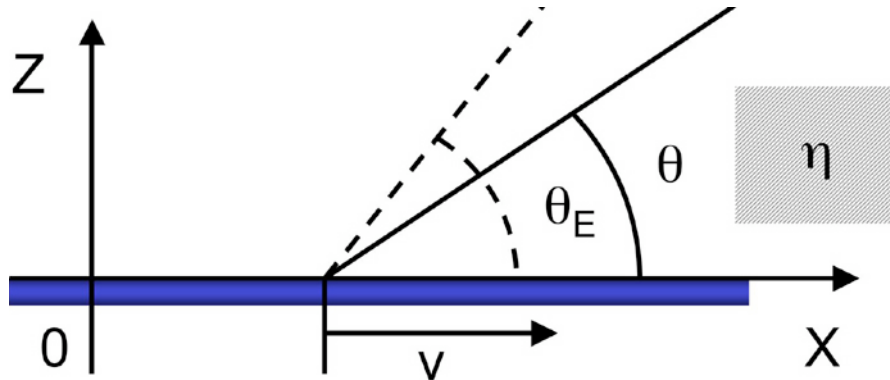


Figure IV.15. : Déplacement de la ligne de contact. V est la vitesse de la ligne

Nous reprenons ici les détails du calcul, car ceux-ci nous seront également utiles dans le chapitre V. En notant  $\eta$ , la viscosité de l'eau, la dissipation visqueuse,  $T\dot{S}$ , par unité de longueur dans la direction verticale z s'écrit :

$$T\dot{S} = \int_0^e dx \int_0^{\theta} \eta \left( \frac{dv}{dz} \right)^2 dz \quad \text{IV.4,}$$

où e est une hauteur caractéristique correspondant à l'épaisseur d'eau participant à la dissipation et v la vitesse du fluide dans le cône défini par la membrane et la surface. Après intégration en z, on obtient, dans la limite des petits angles de contact :

$$T\dot{S} = \frac{3\eta V^2}{\eta} \int_0^e \frac{dx}{x} \quad \text{IV.5,}$$

avec V, la vitesse de la ligne de contact.

L'intégrale dans l'expression précédente diverge aux deux bornes. Il est donc nécessaire d'introduire des limites physiques aux petites et grandes échelles, respectivement a, une distance moléculaire et  $R_v$ , rayon de la vésicule. Le coefficient  $\ln(R_v/a)$  résultant est noté  $\beta$ , et il est de l'ordre de 10.

En égalant la dissipation visqueuse et la puissance développée par la force motrice F (par unité de longueur), nous obtenons ainsi la relation liant F à la vitesse V:

$$T\dot{S} = FV \equiv \frac{3\eta V^2 l}{\eta} \quad \text{IV.6.}$$



## Partie 1 : Adhésion cellulaire

Cette force motrice  $F$ , d'origine capillaire, correspond à la différence d'énergie d'adhésion par unité de surface entre l'état d'équilibre et l'état dynamique, soit, d'après la relation de Young-Dupré, dans la limite des petits angles :

$$F = \frac{1}{2} \gamma \left[ \gamma_E^2 - \gamma^2 \right] \quad \text{IV.7,}$$

où  $\gamma$  est la tension de membrane.

Finalement, en remarquant que  $V = R_v(d\theta/dt)$ , nous obtenons l'équation différentielle suivante :

$$\frac{d\theta}{dt} = \frac{\gamma_E^2 - \gamma^2}{6l R_v} \gamma \quad \text{IV.8.}$$

Celle-ci est résolue facilement pour  $\theta$  s'approchant de  $\theta_E = \theta(t=t_\infty)$ :

$$\theta = \theta_E \left[ 1 - \exp\left(-\frac{\gamma \gamma_E^2}{3l R_v} t\right) \right] \quad \text{IV.9.}$$

Revenons à la courbe de l'évolution de l'angle de contact en fonction du temps dans le cas des vésicules saturées sur des surfaces « PEG-biotine ». La ligne continue sur le graphe de la figure IV.16) est l'ajustement aux données expérimentales avant la saturation en utilisant l'équation précédente. Le temps de montée  $\frac{\gamma \gamma_E^2}{3l R_v}$  attendu est de l'ordre de 3-4s pour  $R_v=10\mu\text{m}$ ,  $\gamma=2.5\text{N/m}$ , et  $\theta_E=0.6$ ,

comme il a été observé.

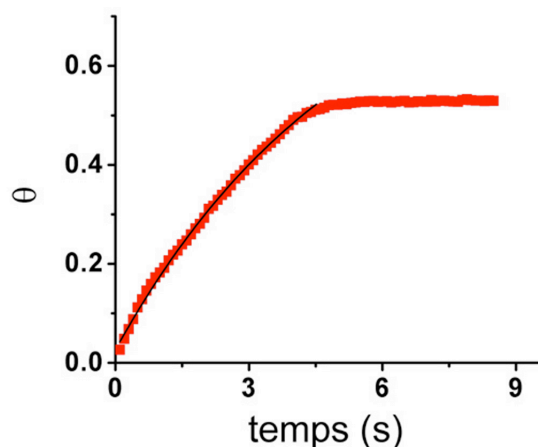


Figure IV.16. : Dynamique d'adhésion de vésicules saturées en streptavidine sur des substrats « PEG-biotine ». Les points rouges correspondent aux données expérimentales et la courbe noire est l'ajustement obtenu avec l'équation IV.9.

**IV.4.b.ii. Vésicules faiblement couvertes de récepteurs : dynamique d'étalement gouvernée par la diffusion**

Maintenant, que se passe-t-il pour des vésicules diluées en streptavidine adhérant sur des surfaces « PEG-biotine »?

Bien que cette situation ne corresponde exactement à aucun des scénarios proposés par P.-G. de Gennes et F. Brochard (Brochard-Wyart et de Gennes, 2002) (voir chapitre I), les arguments qui seront avancés ici sont similaires.

Nous avons vu au paragraphe IV.2.b que la densité de streptavidine à l'intérieur du patch d'adhésion est : i) indépendante de la densité initiale de streptavidine sur la vésicule, ii) de l'ordre de la densité maximale acceptée par les biotines greffées à la surface du verre, soit de l'ordre de  $\rho_{\text{sat}}$ . Cela suggère que les molécules de streptavidine sont « recrutées » vers le disque d'adhésion au cours de l'étalement et s'y lient à des biotines. Nous supposons que cet enrichissement du disque d'adhésion résulte de la diffusion des récepteurs dans la membrane. Le front d'adhésion peut avancer s'il y a apport de récepteurs libres de l'extérieur vers l'intérieur de la zone d'adhésion, où ceux-ci se lient aux ligands immobilisés sur le verre. Par ailleurs, le temps de formation de la liaison est supposé court par rapport aux temps de diffusion (voir introduction du paragraphe I.V.4.b).

Si l'on note  $\rho_0$ , la densité initiale de streptavidine à la surface des vésicules, la situation exposée ci-dessous supposera que, d'une part,  $\rho_0 \ll \rho_{\text{sat}}$  - c'est-à-dire que la diffusion des récepteurs est susceptible de dominer l'effet « goutte collante » - et, d'autre part, que le réservoir de récepteurs à la surface de la vésicule est suffisamment grand pour qu'il n'y ait pas d'appauvrissement – c'est-à-dire que  $\rho_0(t=0) \approx \rho_0(t=t_\infty)$ . La première condition est vérifiée car nous étudions les concentrations  $\rho_{\text{sat}}/10$  et  $\rho_{\text{sat}}/100$ . La deuxième hypothèse a été également validée en vérifiant que l'intensité de fluorescence des vésicules dans le plan équatorial n'avait pas significativement diminué à la fin de l'étalement (données non montrées).

En bref, la densité de streptavidine à l'intérieur du disque d'adhésion est constante (à l'exception d'une petite zone de déplétion au centre) et vaut  $\rho_{\text{sat}} = 3.10^{16} \text{ m}^{-2}$ , alors que la densité de streptavidine sur la portion libre de la vésicule est,  $\rho_0 \ll \rho_{\text{sat}}$ , considérée constante au cours du temps.

## Partie 1 : Adhésion cellulaire

En écrivant une équation de transport qui exprime la conservation des ligands au niveau de la ligne de contact et en supposant que l'apport de ligands au niveau de la ligne de contact ne s'effectue que par diffusion, nous obtenons la relation suivante:

$$(\Gamma_{sat} - \Gamma_0) R^2 = D \Gamma_0 t \quad \text{IV.10,}$$

où  $D$  est le coefficient des récepteurs extérieurs au contact et  $R$ , le rayon de contact. Le dessin de la figure IV.17 schématise le mécanisme proposé.

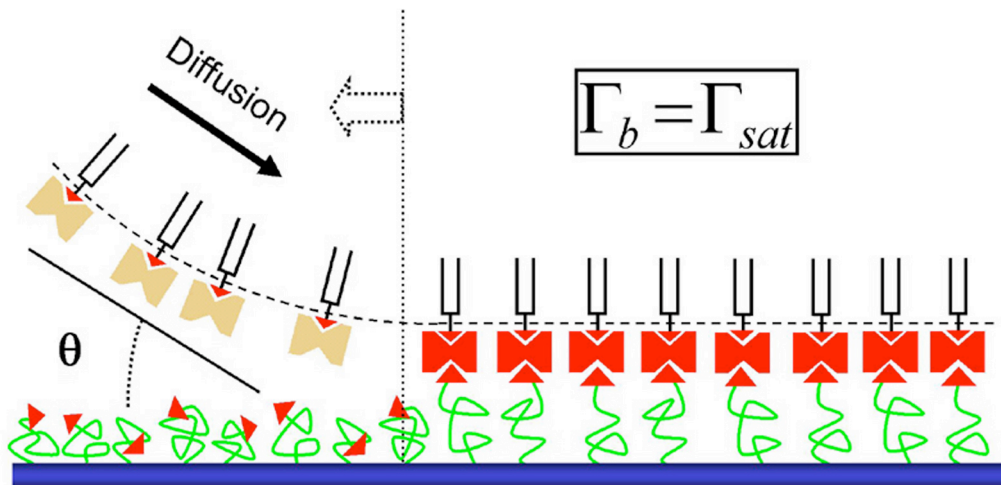


Figure IV.17. : Déplacement de la ligne de contact par diffusion de récepteurs libres au niveau de la ligne de contact. Les récepteurs translucides oranges sont non liés et les rouges sont liés. La concentration de récepteurs liés à la surface,  $\Gamma_b$ , est supposée égale à  $\Gamma_{sat}$ . (vérifié expérimentalement).

De l'équation précédente, on en déduit directement la variation de l'angle de contact avec le temps :

$$\cos \theta = \frac{\Gamma_0}{\Gamma_{sat}} \frac{D}{R_v^2} t^{1/2} \quad \text{IV.11.}$$

Comme  $\Gamma_{sat} \gg \Gamma_0$ , la relation précédente peut être simplifiée par :

$$\cos \theta = \frac{\Gamma_0}{\Gamma_{sat}} \frac{D}{R_v^2} t^{1/2} \quad \text{IV.12.}$$

La figure IV.18 montre deux courbes expérimentales représentatives (tronquées avant d'atteindre l'équilibre, et correspondant à des vésicules à  $\Gamma_{sat}/10$  et  $\Gamma_{sat}/100$ ) ajustées par l'équation (IV.2) en laissant flotter le préfacteur et l'exposant. Les données semblent bien décrites par l'expression théorique. Nous avons réalisé cette

## Chapitre IV : Dynamique d'adhésion de vésicules induites par des interactions spécifiques

comparaison sur 8 à 10 vésicules pour les deux taux de couverture en récepteur. L'exposant déduit de l'ajustement est  $0.48 \pm 0.06$ , ce qui est en bon accord quantitatif avec la variation attendue en  $t^{1/2}$ .

De plus, on peut noter que le préfacteur de la loi de puissance dépend de  $\rho_0$  et du coefficient de diffusion des récepteurs dans la membrane fluide. D'une part, on trouve que le préfacteur est divisé d'un facteur  $2,9 \pm 0,3 \times 10^{1/2}$ , lorsqu'on dilue les récepteurs d'un facteur 10. D'autre part, le coefficient de diffusion des récepteurs déduits de 18 ajustements est de  $5 \pm 1 \mu\text{m}^2/\text{s}$ . Dans notre cas, la vésicule est décorée de streptavidine via un lipide PEG-biotine. Par conséquent, le coefficient de diffusion estimé devrait correspondre à celui du lipide « portant » la streptavidine. La valeur trouvée est en effet cohérente avec les coefficients de diffusion de lipides dans une membrane fluide rapportés dans la littérature (Fujiwara et al, 2002).

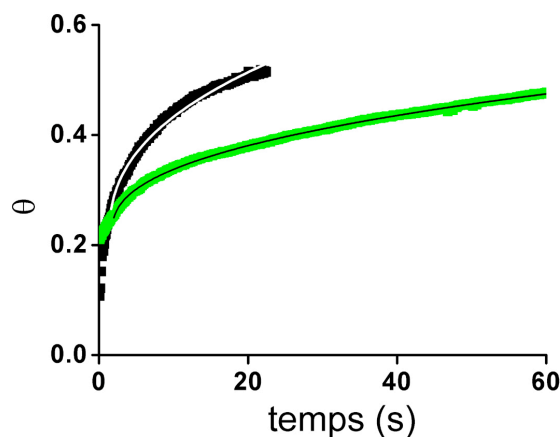


Figure IV.18 : Dynamique d'adhésion de vésicules diluées en streptavidine sur des substrats « PEG-biotine ». Les points correspondent aux données expérimentales (noir et vert pour des taux de couverture respectivement de 10% et 1% en streptavidine) et les courbes sont les ajustements obtenus en utilisant l'équation IV.2.

### IV.4.b.iii. Arrêt de l'étalement limité par la tension de membrane

Si la description précédente permet bien de rendre compte de la croissance du disque d'adhésion, nous n'avons rien dit, jusqu'à présent, sur le mécanisme qui stoppe l'étalement. En effet, on observe dans tous les cas que l'angle de contact ne dépasse pas des valeurs comprises entre 0.5 et 0.7. Ce phénomène de saturation de l'angle de contact a été expliqué, sous la forme d'une annexe à leur publication, par P.-G. de Gennes et F. Brochard (de Gennes *et al*, 2003). Nous reprenons ici les arguments proposés afin de les tester expérimentalement.

## Partie 1 : Adhésion cellulaire

Nous avons vu, à la fin du paragraphe IV.2.C, que la tension augmente exponentiellement avec l'excès d'aire généré par l'adhésion, et donc avec la puissance quatrième de l'angle de contact. La courbe IV.13 nous a montré que sur la plus grande partie du processus d'étalement, l'augmentation relative de tension était faible. A partir de quand cet effet ne deviendrait-il plus négligeable ? Ou, en d'autres termes, existe-t-il un angle de contact critique  $\theta_c$  au dessus duquel on ne peut plus considérer que  $\theta$  est constante ? Si oui, comment cela affecte-t-il la croissance de la zone d'adhésion ?

Si l'on se souvient de l'expression dérivée de la formule classique de Helfrich pour le dépliement des fluctuations thermiques :

$$\frac{\Delta A}{A} = \frac{\theta^4}{16} = \frac{k_B T}{8\gamma} \ln \frac{\theta}{\theta_0},$$

on peut supposer que l'étalement sera bloqué si  $\ln \frac{\theta}{\theta_0} \gg 1$ .

Cette condition définit un angle seuil pour  $\theta_c$  lequel  $\ln \frac{\theta}{\theta_0} = 1$ , soit :

$$\theta_c = \left( \frac{2k_B T}{\gamma} \right)^{1/4} \quad \text{IV.13.}$$

En prenant  $\gamma = 12k_B T$  (valeur mesurée dans la partie tube de membrane, chapitres III et V),  $\theta_c$  est évalué à 0.5rad. Cet angle seuil est la limite basse à partir de laquelle l'influence de l'augmentation de tension sur la dynamique d'étalement ne peut plus être négligée. C'est précisément les valeurs d'angle de saturation que nous avons observées expérimentalement. Au delà de cet angle critique, l'analyse théorique est plus complexe. Moyennant quelques approximations supplémentaires, P.-G. de Gennes et F. Brochard (de Gennes *et al*, 2003)) ont montré que l'angle de contact  $\theta$  augmente non plus avec une puissance du temps mais avec une puissance du logarithme du temps, c'est-à-dire beaucoup plus lentement. Cette variation peut être pratiquement assimilée à un plateau, ce que nous avons fait.

### **IV.4.c. Cas des surfaces « caséine-biotine » : le ligand est connecté à un court espaceur rigide**

Au paragraphe IV.3, nous avons constaté que la cinétique d'étalement de vésicules décorées de streptavidine sur des surfaces « caséine-biotine » est beaucoup plus lente que celle sur des surfaces « PEG-biotine ». Le mécanisme contrôlé par la diffusion proposé précédemment ne peut plus s'appliquer au cas des surfaces « caséine-biotine ». Nous allons montrer ici que la mobilité du ligand accroché à la surface du verre a une influence cruciale sur la dynamique d'étalement.

#### **IV.4.c.i. Evolution de l'énergie d'adhésion au cours de l'étalement**

Pour comprendre la dynamique d'adhésion des vésicules sur des substrats « caséine-biotine », commençons par déterminer l'énergie d'adhésion  $W(t)$  au cours de l'étalement. Il suffit pour cela d'appliquer la relation de Young-Dupré, en supposant une adhésion quasi-statique et en estimant l'angle de contact et la tension de membrane par les méthodes précédemment exposées.

Le graphe de la figure IV.19 est un exemple de variation  $W(t)$  sur substrat « caséine-biotine ». Si nous considérons le cas d'une surface de type « PEG-biotine », nous avons vu que la densité de streptavidine dans le patch d'adhésion est  $\rho_{\text{sat}}$ . En supposant que toutes ces molécules ont trouvé un ligand, l'énergie d'adhésion par unité de surface est simplement l'énergie chimique (car les ligands sont immobiles – voir chapitre I, I.B.2.a.ii), et s'écrit :  $W = \rho_{\text{sat}}U$ , où  $U$  est l'énergie d'une liaison streptavidine-biotine. En prenant la valeur du puits de potentiel énergétique de la liaison streptavidine-biotine pour  $U$ , soit  $30k_{\text{B}}T$  (Merkel *et al*, 1999), l'énergie d'adhésion maximale atteinte dans ce cas est de l'ordre de  $3 \cdot 10^{-3} \text{J} \cdot \text{m}^{-2}$ . Or, dans notre cas, l'énergie par unité de surface est de l'ordre de  $10^{-7}$ - $10^{-6} \text{J} \cdot \text{m}^{-2}$ . Cela signifie donc que toutes les molécules de streptavidine situées dans le disque d'adhésion ne sont pas engagées dans un complexe avec la biotine, ... loin de là ! Un groupe biotine sur 1000 à 10000 est effectivement occupé par une streptavidine de la vésicule.

## Partie 1 : Adhésion cellulaire

Cette « inefficacité » de l'adhésion nous impose donc de définir une densité de récepteurs liés effective,  $\Gamma_b$ , qu'il faudra expliciter.

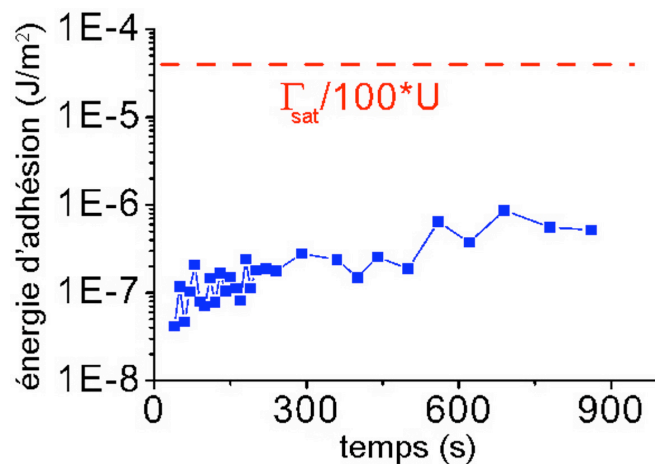


Figure IV.19. : Variation de l'énergie d'adhésion en fonction du temps pendant l'étalement d'une vésicule décorée de streptavidine sur une surface « caséine-biotine ». Les points bleus sont les données expérimentales. La courbe rouge donne une idée de l'énergie « chimique » qui serait associée à la formation de  $\Gamma_{\text{sat}}/100$  liaisons récepteur/ligand par unité de surface. U est l'énergie d'une liaison unique.

### IV.4.c.ii. Dynamique d'étalement contrôlée par une cinétique de réaction récepteur-ligand ralentie en géométrie bidimensionnelle

A la fin de l'étalement, qui dure plus de 10 minutes, moins de 0.1% des molécules de streptavidine ont pu formé une liaison avec une biotine de surface. Cela pourrait suggérer que le temps nécessaire à la formation d'une liaison est long, et limite la cinétique d'adhésion. Or nous avons vu, au paragraphe IV.4.b., que ce temps caractéristique pouvait être estimé à environ 1 ms ! Il semble donc y avoir une contradiction à ce niveau. Toutefois, il faut se rappeler que ce temps caractéristique a été déduit de données cinétiques d'association à 3D, en effectuant une simple conversion 3D-2D et en introduisant de façon arbitraire un facteur de gêne stérique de l'ordre de 10-100. Cette approche est celle proposée initialement par Bell (Bell, 1978) et reprise par le groupe de Sackmann (Boulbitch *et al*, 2001). Néanmoins, une simple intuition naïve pourrait nous faire penser que, lorsque des ligands et des récepteurs sont, fixés pour les uns, et mobiles pour les autres, sur deux surfaces en regard, en situation de confinement extrême (distance de séparation de l'ordre d'une dizaine de nanomètres), l'effet de gêne à la formation de liaisons pourrait être bien plus drastique. La formation d'une liaison spécifique du type streptavidine-biotine

## Chapitre IV : Dynamique d'adhésion de vésicules induites par des interactions spécifiques

requiert une adéquation géométrique, tant d'orientation que de translation, parfaite des deux partenaires. On peut alors concevoir que, pour un récepteur « orphelin » pris en sandwich entre la membrane et la surface à l'intérieur du disque d'adhésion, la probabilité de trouver un ligand pendant le cours de l'expérience est très faible. En revanche, ceux qui se situent sur le bord extérieur de la ligne de contact bénéficient de plus de mobilité (en z, car la membrane n'est pas encore adhéree), donc leur probabilité de trouver une biotine correctement orientée sur le verre sera plus grande.

Partant de cette vision « avec les mains » du mécanisme dominant la dynamique d'étalement, nous faisons maintenant les deux hypothèses (extrêmes) suivantes : i) Toutes les molécules de streptavidine non-liées se situant à l'intérieur du disque d'adhésion sont dans un état « figé ». Elles ne contribuent pas à augmenter la densité effective de liaisons formées,  $\rho_b$  ; ii) Seules les molécules de streptavidine situées sur la membrane « à proximité » (terme à expliciter) de la ligne de contact sont susceptibles de former des liaisons, donc d'augmenter l'énergie d'adhésion.

Les hypothèses de travail principales ayant été énoncées, nous décrivons maintenant le modèle théorique que nous a proposé P.-G. de Gennes pour interpréter nos expériences.

Soit  $\tau$  le temps de réaction moléculaire de formation d'un complexe streptavidine-biotine :



On suppose que cette réaction est du premier ordre et que la dissociation des liaisons formées est négligeable (liaison streptavidine-biotine stable + effet de confinement). La densité de liaisons formées,  $\rho_b$ , est donc reliée à la densité de récepteurs sur la membrane selon la relation classique :

$$\rho_b = \frac{\tau}{\tau_r} \rho_0 \quad \text{IV.15.}$$

Ecrite sous cette forme, cette relation peut cependant prêter à confusion pour deux raisons.

Tout d'abord, on vient de voir que « l'efficacité » de la réaction streptavidine-biotine sur substrat « caséine-biotine » est faible. En conséquence, il faut introduire



## Partie 1 : Adhésion cellulaire

un coefficient d'efficacité de liaison, noté  $\alpha$  compris entre 0 et 1, qui traduit que seule une fraction  $\alpha$  de  $\rho_0$  va participer à la formation des liaisons. Il existe donc une fraction  $(1-\alpha)\rho_0$  de récepteurs qui restent intercalés entre la membrane et le verre dans un état non lié. D'après la mesure de l'énergie d'adhésion, on peut estimer une limite supérieure de  $\alpha$  obtenue à  $\alpha_{\text{sat}}$ , car les dynamiques d'adhésion de vésicules plus diluées en récepteur ne sont pas différentes :  $\alpha < 0.01$ .

D'autre part, il faut noter que le temps  $t$  défini n'est pas le temps écoulé depuis le début de l'expérience, mais le temps pendant lequel le contact entre la membrane et la surface se produit (puisque les récepteurs libres à l'intérieur de la zone d'adhésion sont dans un état « gelé »).

Nous réécrivons donc l'équation précédente sous la forme :

$$\rho_b = \frac{t_c}{\tau_f} (\alpha \rho_0) \quad \text{IV.16,}$$

où  $t_c$  est le temps de mise en contact membrane-surface.

Pour expliciter  $t_c$ , nous devons définir la ligne de contact de manière plus microscopique. La figure IV.20 donne un dessin schématique de la situation. Une molécule de streptavidine ne peut se lier que si elle se trouve à une élévation propice à sa capture par une biotine de surface. Cette hauteur,  $a$ , de dimension moléculaire (typiquement 0.5nm) définit la "largeur" de la ligne de contact,  $L_c$ , sur laquelle la capture des récepteurs par la surface pourra avoir lieu, si l'on connaît le profil de la membrane adhéree. Par souci de simplification pour le calcul, on suppose un profil parabolique pour le raccord à la surface :  $z = x^2 \pi / 2\ell$ , où  $\ell$  est la longueur d'extrapolation. Alors, la distance de capture est donnée par :

$$L_c^2 = \frac{2\ell a}{\pi} \quad \text{IV.17.}$$

De plus, la vitesse  $V$  d'avancée du front est :

$$V = \frac{L_c}{t_c} = R_v \frac{d\ell}{dt} \quad \text{IV.18.}$$

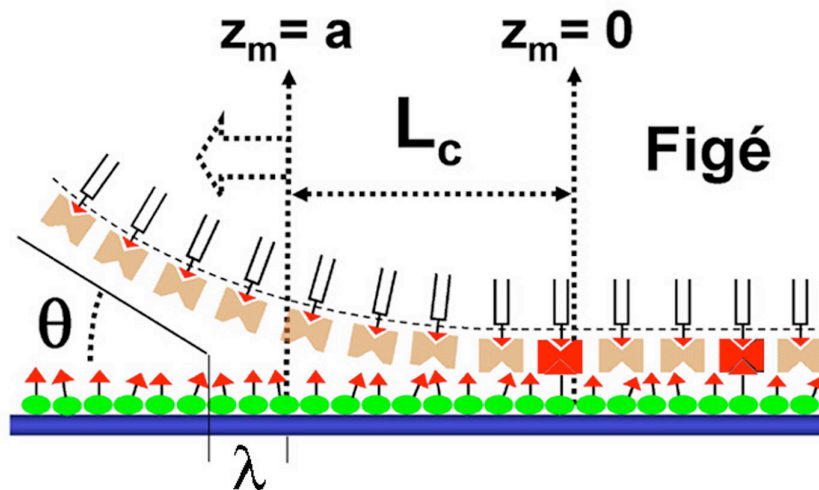


Figure IV.20. : Représentation schématique de notre vision de la ligne de contact dans le cas de surface « caséine-biotine ». La zone de « capture » des récepteurs membranaires par les ligands de surface est définie par une zone de hauteur,  $a$  et de largeur,  $L_c$ .

La combinaison des deux précédentes équations donne le temps de contact :

$$t_c = \frac{(2\lambda a)^{1/2}}{R_v \dot{\lambda}^{1/2}} \quad \text{IV.19.}$$

Finalement, en définissant la longueur  $k=(2\lambda a)^{1/2}$ , la densité  $\lambda_b$  de liaisons formées s'écrit :

$$\lambda_b = \lambda \lambda_0 \frac{k}{R_v \dot{\lambda}^{1/2}} \quad \text{IV.20.}$$

L'évolution de l'angle de contact est ensuite déduite en écrivant l'équilibre énergétique. Comme proposé par de Gennes (Brochard-Wyart et de Gennes, 2002), l'énergie d'adhésion est donnée par la loi de Young-Dupré et regroupe une contribution spécifique due aux molécules récepteurs et ligands et une composante non-spécifique (aussi faible soit-elle), qui initie l'établissement du contact :  $W = W_s + W_n = \lambda(1 - \cos \theta)$ . En supposant ensuite que i) l'énergie d'adhésion spécifique est égale à l'énergie « chimique » de formation des liaisons, soit  $W_s = \lambda_b U$ , et que ii) l'énergie d'adhésion non-spécifique correspond à l'énergie gagnée au cours de la formation d'un contact s'étendant jusqu'à un angle de contact  $\theta_b \ll \theta$ , soit  $W_n = \lambda(1 - \cos \theta_b)$ . Dans la limite des petits angles, on arrive donc à :

**Partie 1 : Adhésion cellulaire**

$$\cos \theta_b U = \frac{1}{2} \rho \left( \frac{d\theta}{dt} \right)^2 \cos^2 \theta_b \quad \text{IV.21.}$$

En introduisant l'expression de  $\cos \theta_b$ , nous obtenons une équation différentielle donnant  $\theta(t)$  :

$$\left( \frac{d\theta}{dt} \right)^2 \cos^2 \theta_b \left( \frac{d\theta}{dt} \right)^2 = \frac{1}{t^{*2}} \quad \text{IV.22,}$$

où  $t^*$  est un temps caractéristique défini par :

$$t^* = \frac{\rho R_v}{k \cos \theta_b} \quad \text{et} \quad \cos \theta_b = \frac{2 \rho \cos \theta_0 U}{\rho} \quad \text{IV.23.}$$

- Aux temps courts,  $t \approx \cos \theta_b$ , celle-ci peut-être résolue analytiquement, et on trouve :

$$\cos \theta_b \left( \frac{d\theta}{dt} \right)^2 + \frac{t}{t^*} \left( \frac{d\theta}{dt} \right)^2 = \frac{1}{t^{*2}} \quad \text{IV.24.}$$

- Aux temps longs,  $t \gg \cos \theta_b$ , on obtient une autre loi de puissance, avec un exposant plus « exotique » :

$$\left( \frac{d\theta}{dt} \right)^2 = \frac{t^{2/7}}{t^*} \quad \text{IV.25.}$$

Nous pouvons définir un temps de passage (« crossover »),  $t_p$ , d'un régime à l'autre en égalant les deux variations de l'angle de contact aux temps courts et longs, soit  $t_p = t^* \cos^{7/2}$ .

Nous avons ajusté nos données expérimentales de la figure IV.14 avec une loi de puissance du type  $(t/t^*)^n$ . Nous avons trouvé un exposant  $n=0.27 \pm 0.04$ , ce qui est proche de  $2/7=0,286$ , et  $t^*$  a été trouvé de l'ordre de  $5 \pm 1,5 \cdot 10^4$ s. De plus, l'angle de contact « non-spécifique »  $\cos \theta_b$  a été évalué à  $\sim 0.1$ rad, ce qui permet d'estimer le temps de changement de régime, soit  $t_p \sim 15 \pm 5$ s. Cela signifie donc que le premier régime en  $t^{1/2}$  a lieu sur moins d'une décade en temps. Nous n'avons pas été capable de dégager de nos expériences une loi de puissance fiable sur cette fenêtre temporelle.

**IV.4.c.iii Eléments de validation supplémentaires du modèle**

Dans le but de confirmer le modèle théorique précédent, des expériences supplémentaires ont été effectuées. Tout d'abord, nous avons électroformé les vésicules dans un mélange sucrose/glycérol 50/50:v/v, de sorte que la viscosité interne des vésicules soit 10 fois supérieure à celle de l'eau. Des vésicules de compositions lipidiques différentes (70%DOPC+30%cholestérol) ont été également étudiés sur ces substrats « caséine-biotine ». Le module de courbure de ce type de vésicule n'a pas été mesuré précisément, mais nous pouvons nous attendre à ce qu'il soit supérieur à celui de vésicules composées uniquement de DOPC, soit  $>20kBT$  (Evans et Rawicz, 1990), car l'ajout de cholestérol augmente la rigidité de la membrane (Needham et Zhelev, 1996). La figure IV.21 regroupe en échelle log des courbes représentatives brutes de toutes ces conditions expérimentales, le rayon de contact de la vésicule (non normalisé par la taille de celle-ci) est représenté en fonction du temps. Un guide pour l'œil avec un exposant  $2/7$  a été ajouté. Nous trouvons que l'accord est satisfaisant dans tous les cas.

Enfin, il faut reconnaître que nous avons fondé notre explication des différents mécanismes d'étalement sur un postulat que nous n'avons pas encore vérifié. En effet, nous avons supposé que, sur les substrats « PEG-biotine », le temps de formation des liaisons est beaucoup plus rapide que les temps de diffusion, du fait de la mobilité de la biotine en extrémité du PEG. A l'inverse, sur les substrats « caséine-biotine », la mobilité de la biotine est trop réduite, ce qui empêche la formation rapide et efficace des liaisons récepteur-ligands. Pour vérifier ce postulat, nous avons préparé des surfaces mixtes « caséine-PEG-biotine » : la caséine a d'abord été adsorbée, puis la biotine greffée sur cette couche de caséine via un espaceur PEG. Heureusement, nous avons bien retrouvé des dynamiques en  $t^{1/2}$  dépendant de la concentration de streptavidine sur les vésicules, comme sur les surfaces « PEG-biotine ».

## Partie 1 : Adhésion cellulaire

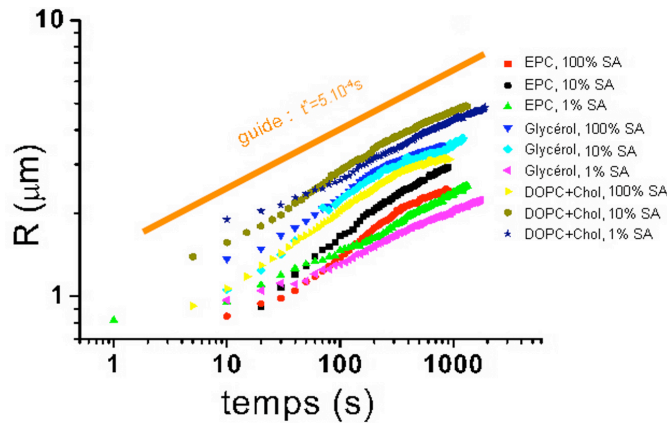


Figure IV.21. : Variation du rayon de contact en fonction du temps pour différents types de vésicules adhérant sur des surfaces « caséine-biotine ». La représentation est en échelle logarithmique et un guide visuel a été tracé en prenant comme  $t^*=5.10^{-4}$ s et l'exposant égal à  $2/7$  (SA=Streptavidine).

### IV.4.c.iv. Constante d'association récepteur-ligand à deux dimensions ?

Le temps  $t^*$  déduit de l'ajustement des expériences n'a pas de signification physique évidente (pour nous), mais il est relié au temps de réaction moléculaire  $\tau$ . D'après la valeur mesurée de  $t^*$ ,  $\tau$  peut être estimé de l'ordre de  $1700 \pm 500$ s, ce qui est bien supérieur, de six ordre de grandeur à la valeur au temps d'association de 1ms, déduit des données tridimensionnelles. En revanche, dans nos expériences d'adhésion sur substrat « PEG-biotine », l'étalement était limité par la diffusion et était achevé en 1 à quelques dizaines de secondes, ce qui suggère que, dans ce cas,  $\tau \ll 1$ s. Sur la base supplémentaire de la dernière expérience effectuée, le seul paramètre modifié est la longueur de l'espaceur entre la surface et la biotine. Par conséquent, nos expériences semblent montrer clairement que la taille (et la flexibilité) de l'espaceur joue un rôle crucial dans les cinétique de réaction à 2D : plus l'espaceur est long et flexible, plus le temps de capture du récepteur par le ligand est court. Cet effet avait déjà été remarqué par Carlos Marques (Jeppesen *et al*, 2001), qui avaient analysé des données de « Surface Force Apparatus » et montré que la probabilité de capture, pour une distance donnée, augmentait avec la longueur de l'espaceur.

De notre point de vue, cette discussion remet en question la possibilité de définir une constante d'association intrinsèque à un couple récepteur/ligand. Chaque configuration (préparation de la surface, longueur et flexibilité de l'espaceur,...)

## Chapitre IV : Dynamique d'adhésion de vésicules induites par des interactions spécifiques

définit un environnement spatial particulier qui détermine la cinétique d'attachement entre un ligand et son récepteur à l'échelle moléculaire. Il est à noter que ce point a déjà été évoqué par le groupe de P. Bongrand, qui préfère définir, à 2D, une fréquence de formation de liaison en fonction d'une distance  $d$  (Pierres et al, 2001). Nous pouvons d'ailleurs citer un extrait de l'article : « cette fonction  $k_{on}(d)$  (en  $s^{-1}$ ) doit dépendre de propriétés moléculaires telles que la longueur et la flexibilité ».

### IV.4.d. Résumé des comportements observés

Nous avons observé différents comportements de dynamique d'étalement pour des vésicules recouvertes de streptavidines sur des surfaces biotinylées. Nous avons résumé ces différences dans le tableau IV.2..

Espaceur	Concentration en streptavidine sur la vésicule	Comportement dynamique	Dynamique $R(t)$	
			Temps courts	Temps longs
court et rigide	Pas de dépendance observée $\Gamma_{sat}/100 < \Gamma < \Gamma_{sat}$	Réaction limitante entre récepteur et ligand (Temps de réaction $\approx 1000s$ )	$R\mu t^{1/2}$	$R\mu t^{2/7}$
			Saturée	
Long et flexible	Diluée $\Gamma_{sat}/10$ et $\Gamma_{sat}/100$	Goutte collante	$R\mu 1 - e^{-t/\tau} \approx t/\tau$	
		Limitation par la diffusion des récepteurs	$R\mu t^{1/2}$	

Tableau IV.2. : Récapitulatif des situations et dynamiques observées suivant la fonctionnalisation de surface, la concentration en récepteur (streptavidine) sur la vésicule.

### IV.5. Interprétation des données obtenues par le groupe de Sackmann

Nous avons déjà mentionné l'étude de la dynamique d'adhésion de vésicules induite par des interactions spécifiques qui a été réalisée par le groupe de E. Sackmann à Munich (Boulbitch *et al*, 2001).

## Partie 1 : Adhésion cellulaire

Le couple récepteur-ligand étudié est le couple intégrine-RGD. Le tri-peptide RGD est la partie active de la fibronectine qui établit une interaction spécifique avec les intégrines. Des lipides-RGD ont été synthétisés et les vésicules considérées ont été dopées avec ces lipides à des concentrations variables et des lipides PEG<sup>2000</sup> pour mimer le glycocalix. Pour ce qui est des surfaces, des intégrines purifiées ont été adsorbées sur des lamelles de verre, et les interactions non-spécifiques ont été inhibées par post-incubation dans une solution de BSA (albumine).

Notre système est très similaire au leur ; la différence essentielle résidant dans le choix du couple récepteur-ligand. Les dynamiques d'étalement de vésicules observées par le groupe allemand sont présentées sur les graphes de la figure IV.22. pour différentes concentrations en lipides RGD. La conclusion essentielle de leur étude est qu'au delà d'une concentration seuil comprise entre 0.1% et 0.2% en nombre, le rayon de la zone de contact, passe d'un régime de variation en  $t^{1/2}$  à un régime linéaire.

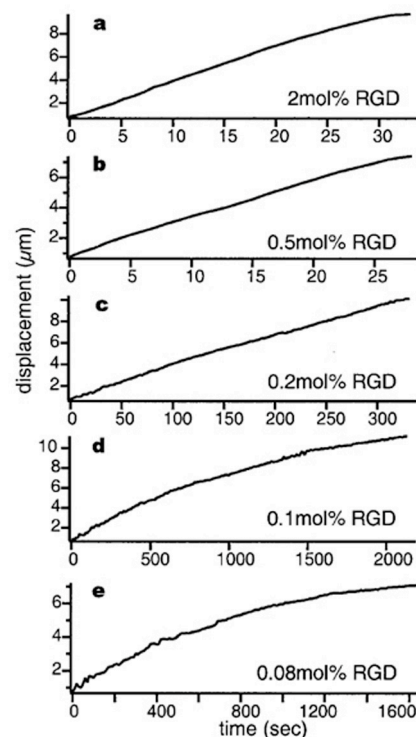


Figure IV.22. : Evolution du front d'adhésion en fonction du temps de vésicules adhérentes sur des substrats décorés d'intégrine, suivant la concentration de lipides RGD sur les vésicules. (Extrait de (Boulbitch *et al*, 2001))

L'approche théorique proposée par le partenaire théoricien, A. Boulbitch, a été présentée brièvement dans le chapitre I. Nous souhaitons voir ici si la description

## Chapitre IV : Dynamique d'adhésion de vésicules induites par des interactions spécifiques

que nous avons proposée pourrait également s'appliquer. Dans le cas où le nombre de ligands sur la vésicule est inférieur aux sites de liaisons fixes sur la surface, on se trouve dans la situation où la diffusion des ligands à la surface des vésicules limite la progression de la ligne de contact. Dans le cas contraire, la description par la goutte collante serait plus adaptée.

Nous pouvons estimer la densité de sites de liaison sur la surface. Après fonctionnalisation des lames, 40% des intégrines sont actives. L'aire d'une intégrine a été mesurée et vaut  $200 \text{ nm}^2 = 2 \cdot 10^{-16} \text{ m}^2$  (Hynes, 1992), ce qui correspond à une densité de sites de liaison actifs,  $\rho_s$ , de l'ordre de  $2 \cdot 10^{15} \text{ m}^{-2}$ . De plus, l'aire par lipides RGD est sensiblement équivalente à l'aire d'une tête polaire d'un lipide, soit  $10 \cdot 10^{-19} \text{ m}^2$ . Par conséquent, la densité de ligands RGD,  $\rho_0$ , sur les vésicules est de l'ordre :  $\rho_0 = c \cdot 10^{16} \text{ m}^{-2}$ , où  $c$  est la concentration de lipides RGD exprimée en %.

D'après notre approche, le passage entre le comportement de goutte collante et le comportement diffusif s'effectue lorsque  $\rho_0 = \rho_s$  soit pour  $c = 0,2\%$ , ce qui est approximativement le seuil observé entre les deux régimes (figure IV.22).

Plus précisément, pour  $c < 0,2\%$  ( $\rho_0 < \rho_s$ ), de l'équation (IV.2), on s'attend à ce que la variation du rayon de contact,  $R(t)$  soit donnée par :

$$R = \frac{\rho_0}{\rho_s} \frac{1}{\rho_0} \frac{1}{2} \sqrt{\frac{D}{\rho_0}} t^{1/2} \quad \text{IV.26,}$$

où  $D$  est le coefficient de diffusion des lipides RGD dans la membrane. En reprenant les données présentées dans la figure IV.22 pour  $c = 0,1\%$  et  $c = 0,08\%$ , nous en déduisons  $D \sim 0,1 - 1 \mu\text{m}^2/\text{s}$ . Cette valeur est légèrement inférieure au coefficient de diffusion d'un simple lipide au sein d'une membrane. Cependant, le lipide possède une tête RGD, et sa mobilité peut être gênée par le PEG-lipide (Devernal *et al*, 2005).

Dans le cas où  $c > 0,2\%$ , la dynamique est contrôlée par la dissipation visqueuse au niveau de la ligne de contact et la cinétique d'étalement, exponentielle, peut être approchée par une variation linéaire si les temps d'observation sont courts. D'après l'équation (IV.1), on peut en déduire que le rayon de contact est donné par :

$$R \approx \frac{\rho_E^3}{3l} t \quad \text{IV.27.}$$

Notons que la pente de cette droite dépend fortement de l'état d'équilibre, c'est-à-dire de l'angle de contact à l'équilibre. Pour les concentrations  $c = 0,5\%$  et  $2\%$ . En



## **Partie 1 : Adhésion cellulaire**

supposant  $\kappa \sim 10^{-6} \text{N/m}$ , et  $\epsilon_E \sim 0.3$  (plus faible que la valeur que nous avons trouvée pour streptavidine-biotine, car la densité d'intégrine et l'énergie de liaison intégrine-RGD sont plus faibles), on trouve que la vitesse de propagation du front d'adhésion est de l'ordre de  $0.3 \mu\text{m/s}$ , ce qui est effectivement observé expérimentalement.

Cette ré-interprétation des résultats obtenus par le groupe de Sackmann pour un couple récepteur-ligand différent permet de confirmer une fois de plus la validité de notre étude. Pour aller plus loin, nous avons voulu voir si ces mécanismes physiques (diffusion et temps de réaction ligand-récepteur) sont pertinents pour rendre compte de la dynamique d'étalement d'une cellule vivante.

## Bibliographie : Chapitre IV

- Bell GI, 1978.  
Models for the specific adhesion of cells to cells.  
*Science*,200:618-627.
- Bernard A-L, 1999.  
Perméabilité de bicouches lipidiques vésiculaires soumises à une déformation : perceuse moléculaire et autres exemples.  
Paris: Université de Paris VI.
- Boulbitch A, Guttenberg Z et Sackmann E, 2001.  
Kinetics of membrane adhesion mediated by ligand-receptor interaction studied with a biomimetic system.  
*Biophysical Journal*,81:2743-2751.
- Brochard-Wyart F et de Gennes PG, 2002.  
Adhesion induced by mobile binders: Dynamics.  
*Proceedings of the National Academy of Science U.S.A.*,99:7854-7859.
- Bruinsma R et Sackmann E, 2001.  
Bioadhesion and the dewetting transition.  
*Compte Rendu de l'Académie des Sciences Paris, Série IV, Biophysics*,2:803–815.
- de Gennes PG, 1985.  
Wettings : statics and dynamics.  
*Review of Modern Physics*,57:827-863.
- de Gennes PG, Puech PH et Brochard-Wyart F, 2003.  
Adhesion Induced by Mobile Stickers: A List of Scenarios.  
*Langmuir*,19:7112-7119.
- Devernal MA, Gindl E, Sinner E-K, Besir H, Ruehe J, Saxton MJ et Naumann R, 2005.  
Membrane lateral mobility obstructed by polymer-tethered lipids studied at the single molecule level.  
*Biophysical Journal*,88:1875-1886.
- Evans E et Rawicz W, 1990.  
Entropy-driven tension and bending elasticity in condensed-fluid membranes.  
*Physical Review Letters*,64:2094-2097.
- Fujiwara T, Ritchie K, Murakoshi H, Jacobson K et Kusumi A, 2002.  
Phospholipids undergo hop diffusion in compartmentalized cell membrane.  
*Journal of Cell Biology*,157:1071-1081.

## Partie 1 : Adhésion cellulaire

Green NM, 1975.

Avidin.

*Advances in Protein Chemistry*,29:85.

Hynes RO, 1992.

Integrins : versatility, modulation, and signalling in cell adhesion.

*Cell*,69:11-25.

Jeppesen C, Wong JY, Kuhl TL, Israelachvili JN, Mullah N, Zalipsky S et Marques CM, 2001.

Impact of polymer tether length on multiple ligand-bond formation.

*Science*,293:465-468.

Merkel R, Nassoy P, Leung A, Ritchie K et Evans E, 1999.

Energy landscapes of receptor-ligand bonds explored with dynamic force microscopy.

*Nature*,397:50-53.

Needham D et Zhelev DV, 1996.

The mechanochemistry of lipid vesicles examined by micropipet manipulation techniques. In: Vesicles. Rosoff M, Surfactant Science Series, Marcel Dekker, New York and Basel

Pierres A, Benoliel AM, Zhu C et Bongrand P, 2001.

Diffusion of Microspheres in Shear Flow Near a Wall: Use to Measure Binding Rates between Attached Molecules.

*Biophysical Journal*,81:25-42.

Pierres A, Eymeric P, Baloché E, Touchard D, Benoliel AM et Bongrand P, 2003.

Cell membrane alignment along adhesive surfaces : contribution of active and passive processes.

*Biophysical Journal*,84:2058-2070.

Puech PH, 2003.

Vésicules géantes décorées : adhésion et transport.

Paris: Université de Paris VI.

Sibarita JB, Magnin H et De Mey J, 2002.

Ultra-fast 4D microscopy and high throughput distributed deconvolution.

In: *IEEE International Symposium on Biomedical Imaging*. p 769-772.

Zuckerman DM et Bruinsma R, 1998.

Vesicle-vesicle adhesion by mobile lock-and-key molecules : Debye-Hückel theory and Monte-Carlo simulation.

*Physical Review E*,57:964-977.

# Chapitre V

## Dynamique d'adhésion de cellules

Dans ce chapitre, nous allons étudier les premières étapes de la dynamique d'étalement d'une cellule sur un substrat. Notre approche ne vise pas à détailler l'action de telle ou telle protéine ou voie de signalisation impliquée dans l'adhésion cellulaire. Nous souhaitons plutôt essayer de dégager les mécanismes physiques qui gèrent les étapes initiales de l'étalement d'une cellule, avant que tous les processus actifs intracellulaires n'entrent en jeu. Cela fixe le temps d'observation d'une dizaine de minutes à une heure environ. Après une brève revue bibliographique des rares résultats rapportés dans la littérature à ce sujet, nous montrerons que les modèles précédemment exposés et appliqués à l'étalement de vésicules lipidiques décorées ne sont en réalité pas pertinents lorsqu'on cherche à décrire la dynamique d'adhésion de cellules vivantes. Une étude de différents types cellulaires, différents types d'interactions - spécifiques ou non-spécifiques - semble révéler une dynamique d'adhésion universelle pendant les étapes initiales de l'étalement. Un modèle théorique, développé avec l'aide de L. Mahadevan (Harvard, USA), est proposé pour interpréter ces données et validé par des expériences supplémentaires dans lesquelles l'intégrité du cytosquelette est altérée.

### V.1. Travaux antérieurs et enseignements

Lorsqu'on effectue une recherche bibliographique des travaux portant sur la dynamique d'adhésion de cellules, on s'aperçoit qu'il y a en réalité deux approches de ce sujet. Il existe une multitude de travaux anciens et plus récents (Carter et al, 1981; Horbett et Schway, 1988; Hug et al, 2001), pour lesquels la dynamique d'adhésion cellulaire est obtenue en dénombrant le nombre de cellules restant attachées sur un substrat après lavage à différents intervalles de temps. Bien que vraisemblablement instructive, ce genre d'étude est radicalement différente de notre

## **Partie 1 : Adhésion cellulaire**

approche de la dynamique d'étalement de cellules, car elle ne permet de sonder que l'énergie de détachement des cellules au cours du temps. Notre étude vise à étudier les mécanismes physiques contrôlant la croissance de la zone d'adhésion de cellules individuelles. Des études de ce type sont en revanche plus rares et sont apparues seulement au cours des dernières années.

### **V.1.a. D'une adhésion passive à un étalement actif : découplage des échelles de temps ?**

A notre connaissance, les premières études tentant d'approcher ce problème de la dynamique d'adhésion cellulaire sont dues au groupe de D. Ingber (Mooney *et al*, 1995). La visualisation d'hépatocytes sur des surfaces couvertes de laminine par DIC (« Differential Contrast Microscopy ») a montré que les cellules restaient rondes pendant 1/2 h à 1 h suivant l'ensemencement, puis commençaient à s'aplatir et développer des lamellipodes à partir de 4h (voir photographies de la figure V.1a). Ensuite, la fixation des cellules et leur marquage au bleu de Coomassie a permis de mesurer l'aire projetée des cellules sur une durée de plus de deux jours pour des densités de laminine variables (voir graphes de la figure V.1b). Cette étude montre indéniablement que la cinétique d'étalement initial est d'autant plus rapide que la densité de récepteurs de la matrice extra-cellulaire est élevée. Le deuxième enseignement est que l'activité intracellulaire, conduisant à la formation de lamellipodes étendus, ne commence à se manifester qu'au delà de 1/2h (au minimum) après initiation du contact. Cela tend donc à signifier que, si on se limite à des temps d'observation de l'ordre de l'heure, l'hypothèse d'un étalement « passif » de la cellule semble valable. Cependant, la technique de visualisation utilisée dans cette étude ne permet pas de visualiser directement l'aire de contact entre la cellule et la surface, notamment aux temps courts.

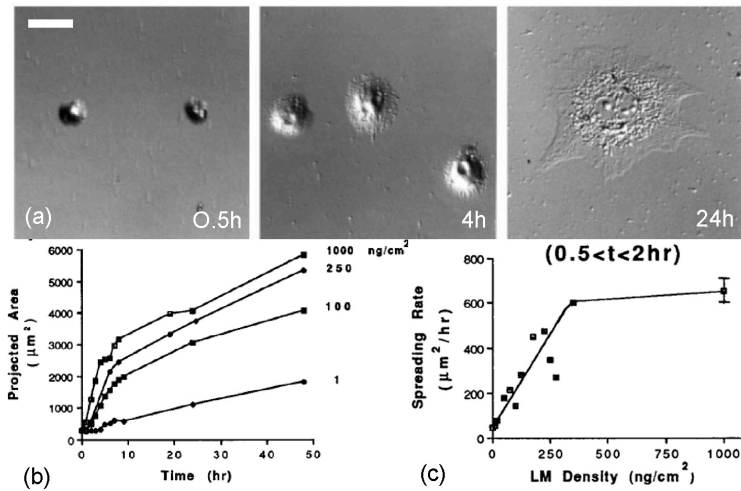


Figure V.1. : Etude de la dynamique d'étalement de cellules hépatocytes. (a) Images par vidéo microscopie. La barre d'échelle représente 20 µm. (b) Variation de l'aire de contact en fonction du temps suivant la densité de laminine sur la surface. (c) Variation de la vitesse d'adhésion suivant la densité de laminine (Extrait de (Mooney et al, 1995)).

### V.1.b. Adhésion cellulaire spécifique : la dynamique d'étalement n'est pas contrôlée par la diffusion des protéines d'adhésion

En 2004, le groupe de M. Sheetz (Dobereiner *et al*, 2004; Dubin-Thaler *et al*, 2004) a étudié l'étalement de fibroblastes d'embryon de souris sur des surfaces couvertes de fibronectine par microscopie de fluorescence à ondes évanescentes en marquant la membrane par de la calcéine. L'étude, très détaillée, effectuée par ce groupe met en évidence deux modes possibles d'étalement des cellules : un mode isotrope et un mode anisotrope. Le mode anisotrope, lié à la présence de périodes d'extension stochastiques et transitoires (« STEPs », abbréviation anglaise), visibles sur le graphe représentant un rayon de contact en fonction du temps (figure V.2.b), est surtout observé pour des cellules qui ont été cultivées en présence de sérum. Pour des cellules cultivées en milieu appauvri en sérum, la croissance est isotrope au départ, caractérisée par l'absence de « ruffles » (dentelles membranaires, en français) et par une vitesse d'étalement initiale plus élevée. Une transition vers un régime anisotrope est observée plus tardivement (après une dizaine de minutes). Les auteurs proposent que ces STEPs sont les prémices d'une polarisation et d'une migration de la cellule (« We propose that the highly activated state of spreading corresponds to activation of the signaling pathways leading to activation of motility. »).

## Partie 1 : Adhésion cellulaire

Notre étude ne se focalisera pas sur ces variations fines du front d'étalement, liées à la dynamique de polymérisation de l'actine. Nous aurons une approche plus intégrée dans le temps, essayant de rendre compte des lois de croissance de la zone de contact avec le temps. Ce travail nous permet de faire des remarques utiles pour nos propres expériences. Premièrement, les cellules utilisées sont des fibroblastes, qui ont l'air de se polariser rapidement (quelques minutes à une dizaine de minutes) après étalement. Pour obtenir une dynamique d'étalement plus étendue, il faudra utiliser d'autres types cellulaires, pour lesquels la machinerie biochimique de signalisation intracellulaire est plus lente à se manifester. Deuxièmement, le rayon final (avant polarisation de la cellule) est supérieur au rayon de la cellule en suspension, alors que pour des vésicules nous avons vu que le rayon de contact à l'équilibre était d'environ 0,5 fois le rayon de la vésicule; cela suggère que la tension initiale de la cellule est faible (proche de zéro) et que l'augmentation de tension ne limite pas l'étalement pendant les étapes initiales. Troisièmement, les auteurs indiquent que la densité de fibronectine sur le substrat ne modifie pas la vitesse d'étalement, mais influence seulement le retard à l'initiation de l'adhésion. Nous serons amenés à revenir sur ce problème de « retard » à l'étalement. Quatrièmement, malgré la présence de ces STEPs dans l'évolution du rayon de contact, le suivi de l'aire de contact en fonction du temps montre une augmentation linéaire de l'aire avec le temps pendant les premières minutes (figure V.2.b). De manière équivalente, le rayon de contact moyen augmente donc comme  $t^{1/2}$ . Au chapitre IV sur la dynamique d'adhésion de vésicules, nous avons vu qu'une telle loi de puissance pouvait être la signature d'un étalement contrôlé par la diffusion des récepteurs sur la membrane. Le préfacteur dépend alors du coefficient de diffusion. Pour tester si ce modèle diffusif serait applicable ici, nous pouvons essayer de déduire le coefficient de diffusion des ligands intégrines libres à la surface de la cellule. En supposant un facteur 10 entre la densité des intégrines liées à des récepteurs de surface et celles des intégrines libres, non engagées dans le contact adhésif (estimation optimiste), nous obtenons un coefficient de diffusion des intégrines de l'ordre de  $100 \mu\text{m}^2/\text{s}$ . Cette valeur est supérieure de 2 ordres de grandeur à la diffusion d'un lipide dans une membrane lipidique, et de 3 à 4 ordres de grandeur à celui d'une protéine dans une membrane plasmique (Choquet et al, 1997; Fujiwara et al, 2002; Munnelly et al, 1998). Par conséquent, il semble que le mécanisme gouvernant les étapes initiales de l'étalement d'une cellule soit

radicalement différent de celui prédominant pour des vésicules. Nous vérifierons cet effet à partir de nos propres données expérimentales et nous chercherons un modèle alternatif pour les interpréter quantitativement.

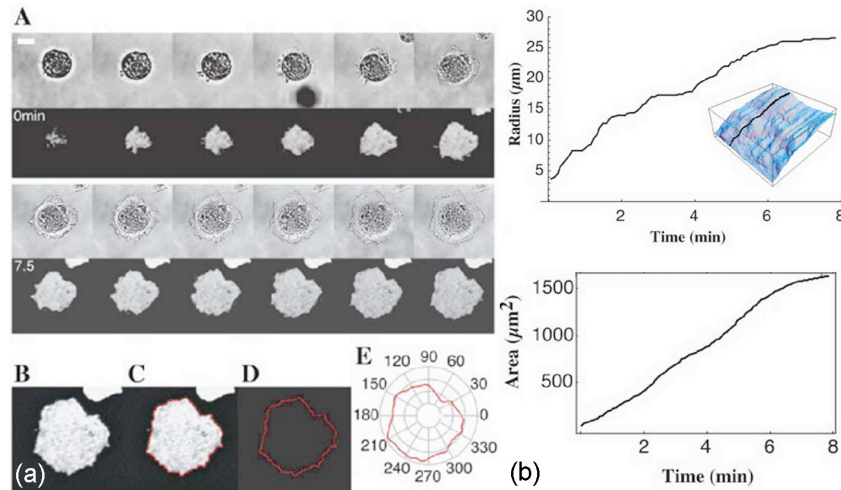


Figure V.2.a : Etallement de fibroblastes sur des substrats couverts de fibronectine. (a) Les photographies de la figure A montrent l'étalement de la cellule simultanément par DIC et par TIRF (microscopie de fluorescence par ondes évanescentes). La barre d'échelle représente 20 μm et l'intervalle de temps entre chaque image est de 75s. Les images B,C,D,E,F montrent l'analyse effectuée par repérage de contour. (b) Evolution d'un rayon de contact à un angle donné (haut) et de l'aire globale en fonction du temps (bas). La croissance du rayon présente de brusques variations (STEPS). L'insert du graphe R(t) montre l'évolution de l'ensemble des rayons de contact, la troisième coordonnée représentant l'angle dans le plan d'adhésion (Extrait de (Dubin-Thaler *et al*, 2004)).

### V.1.c. Etallement induit par des interactions spécifiques ou non-spécifiques : de fortes similitudes

Nous rapportons ici deux autres études détaillées de dynamique d'adhésion cellulaire.

- La première a été réalisée par un groupe de Singapore à travers deux articles traitant de la cinétique d'attachement *spécifique* d'hépatocytes HepG2 sur des surfaces couvertes de galactose (Yin *et al*, 2003) puis d'hépatocytes primaires sur des surfaces de collagène (Tan *et al*, 2005) par RICM. Dans le deuxième cas, le collagène est soit immobilisé directement sur du poly(éthylène téréphthalate), donnant lieu, pour un étalement inférieur à une heure, à une variation  $R \sim t^{1/4}$ , soit via une interaction électrostatique induite par une couche intermédiaire d'acide polyacrylique, donnant lieu à  $R \sim t^{1/2}$  (dédites du graphe de la figure V.3) Même si la



## Partie 1 : Adhésion cellulaire

spéculation des auteurs repose sur un modèle diffusif, que nous avons déjà exclu (on pourrait refaire ici le même genre d'estimation que précédemment), les données expérimentales brutes montrent bien une croissance linéaire de l'aire de contact pendant plus d'une heure, suivi d'un ralentissement net, voire d'un arrêt de l'étalement.

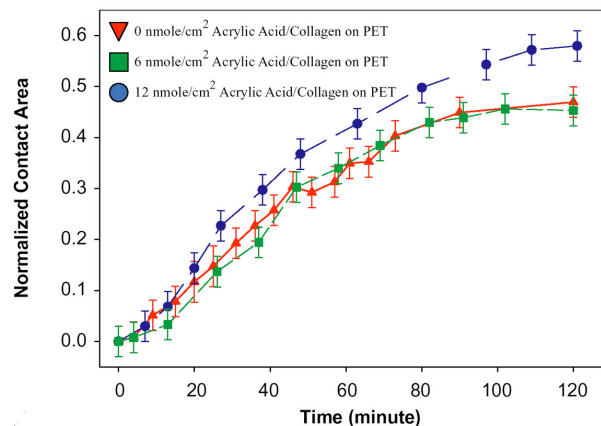


Figure V.3. : Variation de l'aire de contact de cellules hépatocytaires primaires s'étalement sur des surfaces recouvertes ou non de collagène (Extrait de (Tan *et al*, 2005)).

- La deuxième étude détaillée des phases initiales de l'adhésion de cellules est issue du groupe de P. Bongrand et traite de l'étalement de monocytes THP-1 sur des substrats de polylysine (Pierres *et al*, 2003). L'interaction moléculaire conduisant à l'adhésion est donc ici de nature non-spécifique. Dans ce travail, les auteurs insistent sur le fait que « l'alignement de la membrane le long de la surface » est un processus passif. La fixation de la cellule au paraformaldéhyde et l'altération des filaments d'actine par de la cytochalasine n'empêche pas la cellule de s'étendre. Le caractère passif du processus est confirmé par des expériences réalisées en l'absence de sérum. Notons ici que les auteurs font une distinction intéressante entre « interaction cellule-substrat » et « étalement ». Le premier terme signifie qu'il y a une zone de contact intime entre la cellule et la surface, comme cela est révélé par une tâche sombre en RICM. Le second terme est réservé au processus actif d'étalement qui se traduit par l'apparition de filopodes ou de lamellipodes, et qui est donc gouverné par la polymérisation d'actine. Par abus de langage, nous utilisons, depuis le début, le terme d'étalement pour désigner la propagation de la zone de contact, par analogie aux phénomènes d'étalement de gouttes rencontrés dans le domaine du mouillage. Mais, indépendamment de ces questions de terminologie, il

est important de remarquer, sur le graphe de la figure V.4 que les auteurs observent une augmentation linéaire de l'aire de contact sur une durée de 2-3 minutes, puis une saturation. A nouveau, le rayon de contact moyen varie comme  $t^{1/2}$ . Le fait que la cinétique soit rapide sur polylysine est bien connue des biologistes (communication privée : Y.-S. Chu et M. Théry, UMR 144 Institut Curie)

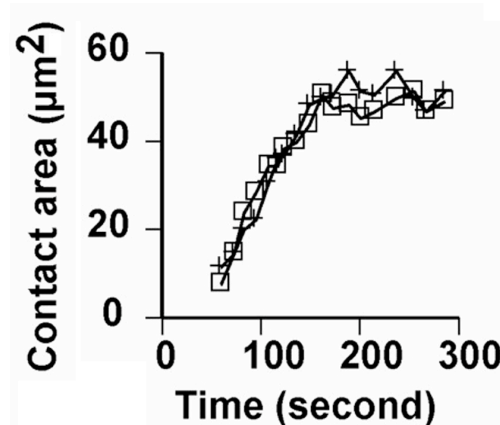


Figure V.4. : Evolution de l'aire de contact avec le temps durant l'étalement de deux types d'objets cellulaires, via des interactions non spécifiques. Cellules sur des surfaces couvertes de polylysine (extrait de (Pierres *et al*, 2003)).

En bref, nous venons de voir que tous les travaux antérieurs traitant de la dynamique d'adhésion de cellules mettent en évidence une variation  $R \sim t^{1/2}$  aux temps courts suivant le contact, quels que soient le type cellulaire et la nature de l'interaction moléculaire. Coïncidence ou Mécanisme universel ? C'est la question qui a motivé le travail rapporté dans ce chapitre.

### V.1.d. Modèle théorique existant

Frisch et Thoumine (Frisch et Thoumine, 2002) ont proposé une description théorique de la cinétique d'étalement de cellules. Il s'agit d'une application directe de la théorie du mouillage (de Gennes, 1985). Cette description a l'avantage d'être très générale, donc serait susceptible de s'appliquer indifféremment aux processus d'adhésion spécifiques et non-spécifiques. Bien que les auteurs aient résolu numériquement les équations du mouvement de la ligne de contact, nous pouvons en donner une dérivation approchée, analytique, pour les temps initiaux. En fait, cela a déjà été fait au chapitre IV (paragraphe IV.4.b.i). Notons cependant, comme on le voit sur la figure V.5, que l'angle de contact  $\theta$  défini par les auteurs est le

## Partie 1 : Adhésion cellulaire

complémentaire à  $\tau$  de celui que nous avons défini. L'argument retenu consiste à dire que la dissipation visqueuse, qui compense la force de Young, a lieu dans le coin de liquide. En adaptant les notations, on peut réécrire l'équation (IV.1) sous la forme :  $R/R_0 = (2w_a/\eta)^{1/2} [1 - \exp(-\eta 2w_a t / 3l\tau R_0)]$ , avec  $w_a$  l'énergie d'adhésion,  $\eta$  la tension corticale,  $\tau$  la viscosité cytoplasmique et  $R_0$  le rayon de la cellule en suspension, et  $l$  un coefficient logarithmique de l'ordre de 10. L'équation semble bien rendre compte des mesures (Figure V.5), et il semble que le rayon de contact augmente exponentiellement avec le temps au départ (c'est-à-dire linéairement aux temps très courts). Bien qu'attrayante, cette description ne rend absolument pas compte de toutes les observations expérimentales rapportées depuis la publication de cet article et montrant une dépendance de  $R$  avec la racine carrée du temps, même si les points expérimentaux de la figure V.5 pourraient apparemment être ajustés par une telle loi de puissance. Nous verrons que le modèle théorique que nous proposons est sensiblement différent de celui-ci.

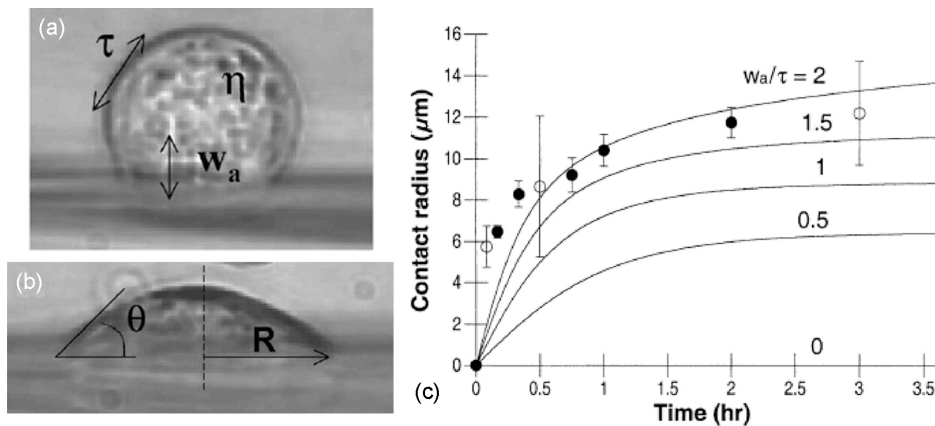


Figure V.5. : Etude dynamique de l'étalement de cellules. (a) et (b) Vue latérale de cellules adhérees. Les différents paramètres utilisés pour modéliser l'adhésion sont  $\eta$  la tension corticale,  $\tau$  la viscosité interne de la cellule,  $w_a$ , l'énergie d'adhésion par unité de surface,  $\theta$ , l'angle de contact et  $R$ , le rayon de contact. (c) Evolution temporelle du rayon de contact ajusté suivant le modèle de dissipation visqueuse à la ligne de contact (Extrait de (Frisch et Thoumine, 2002)).

## V.2. Matériaux et Méthodes

Le principe général des expériences de dynamique d'étalement de cellules est le même que celui suivi pour les vésicules lipidiques (chapitre IV). La technique

utilisée est la microscopie par réflexion à contraste interférentiel (RICM). Deux types d'interactions spécifiques sont étudiés : le couple intégrine-fibronectine et le couple cadhérine-cadhérine. Par souci de généralisation, nous avons également utilisé des substrats couverts de polylysine, conduisant à des interactions non-spécifiques. Enfin, dans la même optique, nous avons choisi différents types cellulaires.

La figure V.6 résume schématiquement les différentes situations envisagées au cours de cette étude.

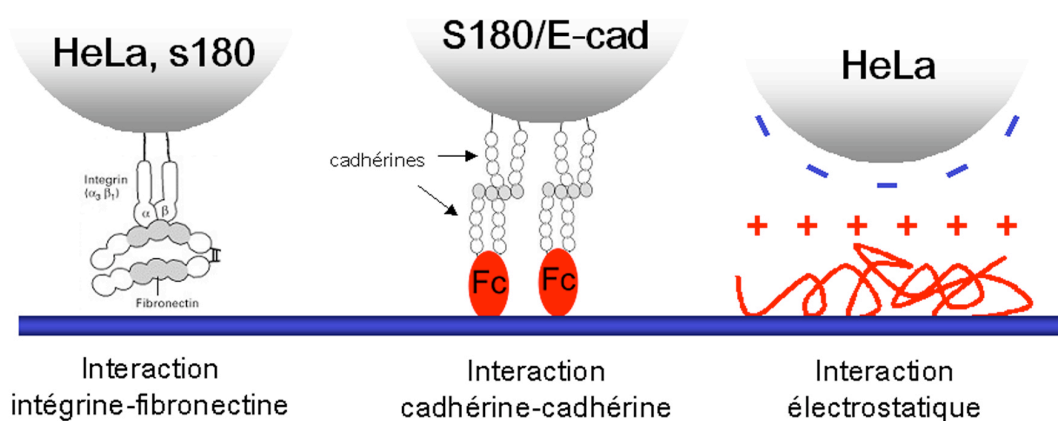


Figure V.6 : Représentation schématique des différents types de cellules (HeLa, S180, S180/E-cad) et des différents types de surfaces utilisés pour étudier la dynamique de l'étalement de cellules.

### V.2.a Surfaces spécifiques et non-spécifiques

La méthode de préparation des surfaces appliquée ici est moins « sophistiquée » que celle présentée au chapitre III. Nous nous contentons d'une fonctionnalisation par adsorption.

Les lamelles de verre sont d'abord nettoyées dans un mélange équimolaire méthanol/chloroforme.

La fibronectine (Fibronectine, F1141, Sigma) est ensuite directement immobilisée sur ces lames par incubation dans une solution de fibronectine (concentration 0.1-10 µg/ml) dans de l'eau ultra-pure pendant 30 min à 37°C. Après rinçage, les lames sont conservées dans une solution de PBS.

La polylysine est adsorbée par incubation des lames dans une solution de polylysine (poly-L-lysine, P1274, Sigma) à 10 mg/ml pendant 10 minutes à température ambiante. Après rinçage, les lames sont séchées et conservées dans un dessiccateur jusqu'à utilisation.

## **Partie 1 : Adhésion cellulaire**

Le protocole d'immobilisation des cadhérines est directement inspiré des travaux du groupe de Mège (Lambert *et al*, 2000). Les surfaces sont préalablement fonctionnalisées par un mercapto-silane (3-mercaptopropyltriméthoxysilane, SIM6476.0, Roth Sochie). Les cadhérines utilisées sont un dimère des parties extracellulaires de la E-cadhérine fusionnées sur la partie Fc d'un anti-corps. Cette protéine, Ecad-Fc, qui est commercialement disponible (Recombinant Human E-Cadherin/Fc Chimera, 648-EC, R&D system), est adsorbée sur les lamelles silanisées à une concentration de 5 µg/ml pendant 2 heures à température ambiante. Même si le mécanisme d'interaction cadhérine-cadhérine est encore incomplètement résolu, il semble que ce sont des dimères de cadhérines qui interagissent entre eux (Ozawa et Kemler, 1998; Takeda et al, 1999). L'utilisation de ces dimères pré-formés est maintenant largement utilisée sur des surfaces pour s'assurer une interaction efficace entre dimères de cadhérines. Après rinçage, les lames sont saturées en albumine (BSA) pour réduire les interactions non-spécifiques, puis rincées à nouveau et directement utilisées.

### **V.2.b Cellules : parentales, transfectées, « droguées » et énuclées**

Nous avons utilisé des cellules HeLa et S180. La cellule HeLa est une lignée de cellules tumorales issues d'un carcinome du col utérin (de Madame Henrietta Lacks, décédée en 1951) et nous a été fournie par Manuel Théry (groupe M. Bornens, Institut Curie). La cellule S180, qui est aussi une lignée de cellules tumorales issues d'un sarcome de souris, nous a été fournie par Yeh-Shiu Chu (groupe S. Dufour, J.-P. Thiery, Institut Curie). Cette dernière lignée a été choisie pour son incapacité à assembler d'elle-même une matrice de fibronectine, bien qu'elle exprime des intégrines à sa surface (tout comme les cellules HeLa). D'autre part, des transfectants stables de cellules S180 exprimant la E-cadhérine ont été produits et caractérisés par S. Dufour (Chu *et al*, 2004) et seront utilisés pour observer la dynamique d'adhésion spécifique sur des surfaces couvertes de Ecad-Fc.

Les cellules ont été cultivées dans du sérum adapté (Dulbecco Modified Eagle Medium, DMEM, avec 10% de sérum de veau foetal, 1% de pénicilline et streptomycine, et 1% de glutamine), à 37°C, dans une atmosphère saturée en eau

avec 5% de CO<sub>2</sub>. Afin d'éviter d'atteindre un état de confluence en culture, pour limiter les interactions entre les cellules, celles-ci sont redispersées et diluées un jour avant les expériences. Le détachement des cellules des boîtes de culture s'effectue par un traitement à la trypsine (solution à 0.25% dans EDTA 1mM, trypsin-EDTA, Invitrogen) pendant 2min. La trypsine est ensuite neutralisée par le sérum et les cellules sont récupérées par centrifugation, puis mises en suspension dans la solution utilisée pour l'expérience proprement dite. Suivant l'interaction mise en jeu, cette solution contiendra du serum comme précédemment (surface fibronectine) ou sans serum (surface polylysine) car le serum contient de la fibronectine qui s'adsorbe sur les surfaces chargées. De plus, pour empêcher la formation d'agrégats cellulaires, la suspension de cellules est constamment agitée sur un tourniquet.

Dans certaines expériences, nous avons partiellement altéré le cytosquelette des cellules par l'usage de drogues classiques. Un traitement de la suspension de cellules au nocodazole (NZ) à 1M pendant 30min à température ambiante permet de détruire (i.e. dépolymériser) le réseau de microtubules (Bornens et al, 1989). Un traitement à la cytochalasine D à 1µg/ml pendant 15min conduit à la dépolymérisation des filaments d'actine (Bailly et al, 1991), et en particulier du cortex. Dans ces deux cas, les filaments intermédiaires demeurent intacts.

Nous avons aussi étudié le comportement de cellules énucléées, appelées cytoplastes. Le protocole utilisé est inspiré des travaux de M. Piel (Piel *et al*, 2000), et de Prescott et al. (Prescott *et al*, 1972). Pour obtenir de telles cellules, on commence par les cultiver sur des lames de verre, puis on les traite avec de la cytochalasine D à 1.5µg/ml à 37°C pendant 30min. Ensuite, les lames sont centrifugées à 15000g pendant 40min à 37°C en présence de cytochalasine D. L'absence de réseau d'actine favorise ainsi l'éjection du noyau cellulaire, plus dense. Les cytoplastes sont enfin récupérés dans du sérum frais et ensemencés pendant quatre heures à 37°C en boîte de culture. Au début de l'expérience, ils sont remis en suspension par un traitement à la trypsine.

Enfin, afin d'explorer l'influence de l'activité filopodiale des cellules, nous avons également travaillé avec des cellules S180 transfectées transitoirement avec des vecteurs codant pour la forme dominant négatif de Cdc42 (fournies par Y.-S. Chu et S. Dufour - (Chu *et al*, 2004)). Cette protéine, Cdc42, est une GTPase qui stimule la

## Partie 1 : Adhésion cellulaire

formation de filopodes, lamellipodes et « ruffles ». Le dominant négatif a donc une action inhibitrice sur ces mêmes phénomènes induisant la polymérisation de l'actine. Plus précisément, pour information, il est admis que Cdc42 interagit avec un lipide, PIP2 (phosphatidyl-inositol-disphosphate), via un domaine de la protéine WASP. Cette interaction implique un changement de la conformation de la protéine WASP permettant l'interaction avec la protéine Arp2/3 nucléateur de filament d'actine dans les filopodes (Egile et al, 1999; Rohatgi et al, 1999). C'est ainsi que l'expression de Cdc42 régule la formation des filopodes notamment. La figure V.7 résume le mécanisme moléculaire de l'action de Cdc42.

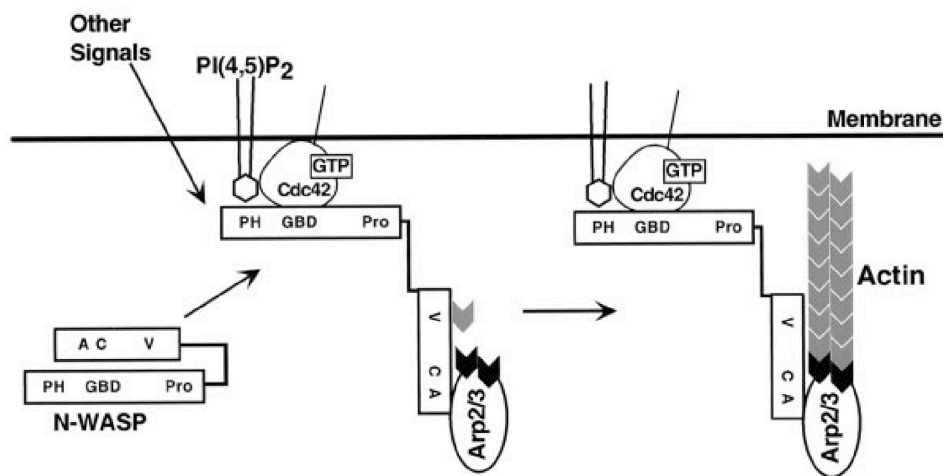


Figure V.7 : Représentation schématique de l'interaction de la protéine Cdc42 avec les lipides PIP2 et la protéine WASP résultant la nucléation de filaments d'actine via la protéine Arp2/3 (Extrait de (Rohatgi et al, 1999)).

### V.2.c Visualisation par microscopie à contraste interférentiel

Une membrane cellulaire (comprenant des protéines membranaires et un cortex d'actine collé intimement à la membrane) étant plus dense qu'une simple bicouche lipidique, l'indice de réfraction de la membrane cellulaire est supérieur à celui d'une membrane de vésicule, ce qui rend idéale et simple l'utilisation de la RICM pour observer la zone de contact entre la cellule et la surface adhérente. La figure V.8 montre une série d'images RICM prises au cours de l'étalement d'une cellule HeLa. Les images sont bien contrastées ; il n'est pas nécessaire d'améliorer le contraste par un processeur d'images en temps réel comme cela a été réalisé pour les vésicules (voir chapitre II.B.). Cependant, nous avons remarqué que les cellules supportent mal une illumination prolongée, sans doute le résultat de

réactions photo-chimiques parasites. Pour cette raison, sur une durée typique d'expérience de 30 minutes à 1 h, les cellules ne sont éclairées que lors de l'acquisition de chaque image, pendant 20ms toutes les secondes. Nous supposons que, dans ces conditions, l'effet d'illumination n'altère pas le comportement cellulaire.

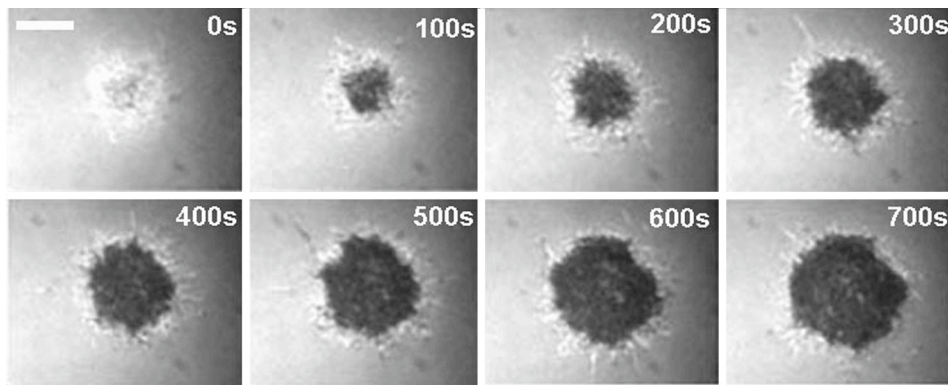


Figure V.8. : Séquence d'images RISM d'une cellule HeLa s'étalant sur une surface de verre recouverte de fibronectine. L'intervalle de temps entre chaque image est de 100s. La barre d'échelle représente 10  $\mu$ m.

Le dispositif expérimental utilisé dans le chapitre précédent a été légèrement modifié pour l'adapter aux contraintes de la manipulation de cellules. Les expériences sont conduites à 37°C. Le milieu utilisé est un milieu CO<sub>2</sub>-indépendant, c'est-à-dire que le pH de la solution ne varie pas même si il est en contact avec l'air pendant 2-3 heures ce qui est suffisant pour le temps de la manipulation (CO<sub>2</sub>-independent medium, Gibco-Invitrogen). De plus, la chambre d'observation étant ouverte pour permettre une observation rapide de la sédimentation des cellules, un couvercle imbibé d'eau recouvre grossièrement la chambre d'observation, pour limiter les effets d'évaporation, donc de choc osmotique.

Enfin, l'analyse des images consiste, après seuillage, à mesurer l'aire de contact « intime »,  $A_c$ , entre la cellule et la paroi (zone sombre en RISM). Les filopodes brillants qui apparaissent sur la figure V.8, et qui n'adhèrent pas, ne sont donc pas comptabilisés. La croissance du contact étant généralement isotrope, on peut ensuite en déduire un rayon de contact moyen  $R_c = \sqrt{A_c/\pi}$ .



## V.3. Résultats expérimentaux

### *Avertissement préalable :*

Il est utile de préciser d'emblée que les courbes qui seront présentées par la suite ne sont pas la moyenne de plusieurs expériences. Elles ont été obtenues sur des cellules uniques. Toutefois, pour chaque condition expérimentale (couple surface/cellule, en présence ou non de drogues), nous avons reproduit l'expérience entre 4 et 9 fois. Certaines dynamiques n'ont pas été suivies suffisamment longtemps, pour d'autres, des « accidents » dus à des variations de focalisation sont survenus. Mais, toutes les courbes rapportées sont représentatives des comportements observés. Plusieurs séries d'expériences conduites dans des conditions encore différentes ne seront pas présentées, car nous manquons de statistique pour pouvoir dégager un effet clair de façon fiable.

### **V.3.a. Adhésion de cellules exprimant des intégrines sur des surfaces couvertes de fibronectine**

Le graphe de la figure V.9 montre la variation du rayon de contact, déduit de l'aire, en fonction du temps pour les cellules HeLa et S180 pour deux densités de surface en fibronectine. Plus précisément, nous avons fait varier la concentration en fibronectine de la solution d'incubation des lames pour un même temps d'incubation. Cela suppose que sur la gamme de concentration étudiée et le temps d'incubation choisi, il n'y a pas saturation de la surface. Cela semble confirmé, puisque, pour un temps donné, le rayon de contact est d'autant plus grand que la concentration est élevée. Cet effet disparaît à une concentration de 10  $\mu\text{g/ml}$  de fibronectine ; la courbe d'étalement est indiscernable de celle à 1  $\mu\text{g/ml}$  (données non montrées). Notons également que le temps initial a été pris au moment où la zone de contact commence à croître. Le rayon de contact initial est ici de l'ordre de 1  $\mu\text{m}$ . Nous reviendrons plus loin sur l'initiation de l'étalement. Mais, on peut mentionner que, parfois, la croissance du contact peut mettre plusieurs dizaines de secondes pour démarrer après détection, c'est-à-dire que R peut rester constant pendant 10-100s avant de commencer à augmenter.

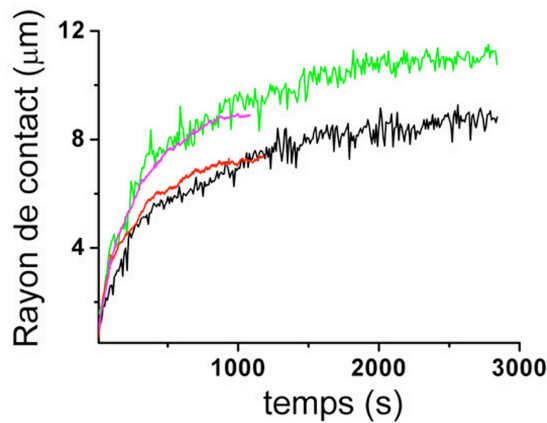


Figure V.9 : Variation du rayon de contact en fonction du temps pour deux types cellulaires, HeLa (rouge et magenta) et S180 (noir et vert), pour deux densités différentes de fibronectine, 0.1 µg/ml (rouge et noir) et 1 µg/ml (magenta et vert).

Les mêmes données (sur les cellules S180) représentées en échelle logarithmique sur la figure V.10 font apparaître distinctement deux lois de puissance. Dans un premier temps, le rayon de contact varie comme  $t^{1/2}$  jusqu'à environ 400-500s, correspondant à un rayon de contact de l'ordre du rayon de la cellule. Aux temps plus longs, on observe un ralentissement de la croissance caractérisé par  $R \sim t^{1/4}$ . Le premier régime rappelle la dynamique observée par les différents groupes que nous avons cités au paragraphe V.1.

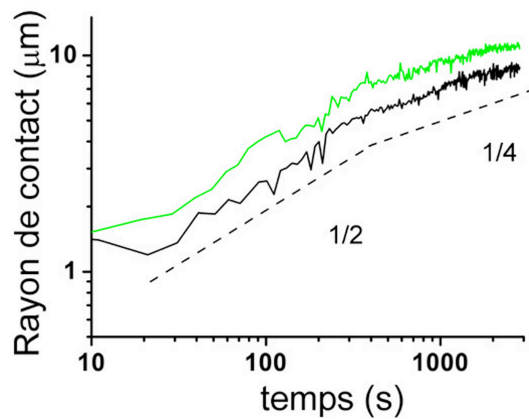


Figure V.10 : Variation du rayon de contact en fonction du temps en échelle logarithmique pour les cellules S180 suivant deux densités de fibronectine 0.1 µg/ml (noir) et 1 µg/ml (vert). Deux guides visuels représentent des lois de puissance d'exposants 1/2 et 1/4.

### V.3.b. Adhésion de cellules exprimant des cadhérines sur des surfaces décorées de cadhérines

Nous avons suivi la dynamique d'adhésion de cellules S180 exprimant de la E-cadhérine sur des surfaces couvertes de Ecad-Fc. En guise de contrôle, nous avons également utilisé la lignée parentale dépourvue de cadhérines sur les mêmes surfaces. Les graphes de la figure V.11 représentent les deux cinétiques obtenues. Nous observons que les cellules « sauvages » S180 s'étalent sur des substrats couverts de cadhérine, donc de manière non-spécifique. Toutefois, sur une la fenêtre temporelle d'observation, leur rayon de contact à un temps donné est toujours inférieur à celui d'une cellule exprimant des cadhérine. Cela signifie aussi que la vitesse de croissance du contact est plus faible. Mais, plus important encore, on remarque que l'étalement suit la même dynamique, en  $t^{1/2}$  puis, éventuellement en  $t^{1/4}$  dans les deux cas.

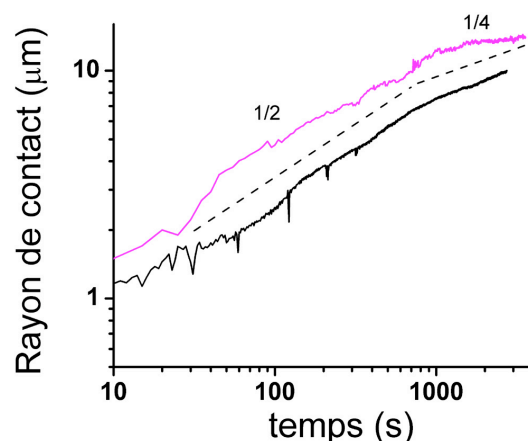


Figure V.11 : Variation du rayon de contact en fonction du temps en échelle logarithmique pour une cellule S180 exprimant la E-cadhérine (magenta) sur un substrat couvert de E-cad-Fc. Une expérience contrôle est réalisée avec une cellule S180 non transfectée (noir) sur le même substrat. Les deux guides visuels représentent des lois de puissance 1/2 et 1/4 suivant le temps.

A la différence des cellules HeLa, les cellules S180 ne sont pas capables de former une matrice de fibronectine, via les intégrines. Ce recrutement initie les contacts focaux de la cellule impliquant un réarrangement du cytosquelette, donc une activité dynamique de la cellule. Le fait que les dynamiques observées pour différents types cellulaires soient similaires semble valider notre hypothèse de

départ, à savoir que la cellule garde un comportement passif dans les premiers stades de l'étalement (i.e. pendant la première heure suivant l'ensemencement).

### V.3.c. Comportement de cellules énucléées

Enfin, nous avons utilisé des cellules HeLa énucléées et visualisé leur étalement sur un substrat couvert de fibronectine. Encore une fois, l'étalement suit la même dynamique en  $t^{1/2}$  (Figure V.12). Les cytoplastes, plus homogènes que des cellules intactes, et incapables de toute variation d'expression d'origine génétique, se comportent néanmoins comme les cellules eucaryotes précédemment utilisées à cette échelle de temps.

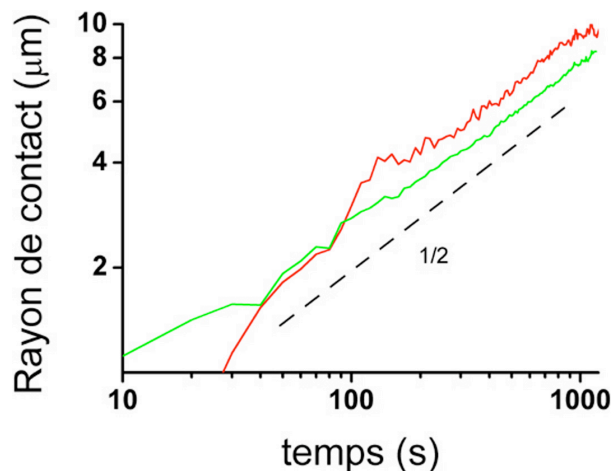


Figure V.12 : Variation du rayon de contact en fonction du temps en échelle logarithmique pour des cytoplastes de cellules HeLa sur des surfaces fibronectine 1 µg/ml. Le guide visuel représente une loi de puissance 1/2 avec le temps.

De cette première série d'expériences, il ressort que des cellules différentes, intactes, sans noyau adhérent sur des surfaces décorées de molécules d'adhésion variées selon une dynamique similaire. Deux régimes ont été identifiés : le premier correspond clairement à une variation  $R \sim t^{1/2}$ , en accord avec les résultats rapportés dans la littérature (voir paragraphe V.1) ; le second, moins évident, car mis en évidence sur moins d'une décade en temps dans la plupart des cas, correspond à  $R \sim t^{1/4}$ . Nous allons maintenant présenter un modèle théorique pour tenter de rendre compte de ce comportement apparemment universel. Ensuite, nous décrirons des expériences supplémentaires afin de valider ou infirmer cette prédiction.

## V.4. Modèle théorique

Nous avons vu que ni la nature « biochimique » du substrat, ni la diffusion des protéines d'adhésion à la surface de la cellule ne peuvent être invoqués comme facteurs limitant l'étalement de cellules. De plus, l'existence d'une dynamique d'adhésion  $R \sim t^{1/2}$  (aux temps courts) a été observée par nous et d'autres dans des conditions expérimentales très différentes. Ces deux indices nous ont conduit à rechercher un facteur intrinsèque au matériau « cellule » pour expliquer cette loi de puissance. La viscosité de la cellule pourrait être ce facteur déterminant. Le modèle que nous proposons, et qui nous a été suggéré par L. Mahadevan, consiste à écrire que la dissipation visqueuse dans la cellule est contre-balancée par l'énergie d'adhésion. Exprimée de cette façon, cette approche semble être exactement celle d'Olivier Thoumine (Frisch et Thoumine, 2002), que nous avons pourtant « rejetée » au paragraphe V.1. La différence essentielle réside dans l'expression de cette dissipation visqueuse.

Dans un premier temps, nous essaierons de justifier le fait qu'une cellule puisse être assimilée à une goutte à coque visqueuse. Puis nous exposerons les prédictions théoriques résultantes.

### V.4.a. La cellule : Une goutte à coque visqueuse ?

La viscosité interne d'une cellule est d'environ  $10^6$  fois celle de l'eau (Thoumine et Ott, 1997; Wang, 1998). Sa valeur élevée est due à la présence du cytosquelette. Si l'on souhaite traiter la cellule comme un matériau, est-ce réaliste de l'assimiler à une goutte homogène visqueuse ? Comme nous l'avons évoqué au chapitre II, le cytosquelette d'une cellule est composé de microtubules, partant du centre de la cellule vers la périphérie, de filaments intermédiaires, répartis de manière homogène, et d'actine, concentrée surtout à la périphérie de la cellule au niveau de la membrane.

En effet, le réseau d'actine est beaucoup plus dense au niveau de la membrane plasmique. Comme on le voit sur la reconstruction latérale par microscopie confocale de la figure V.14, l'épaisseur du cortex d'actine est de 500 nm à 1  $\mu$ m (Lang *et al*, 2000). Par des expériences d'aspiration par micropipette, Evans avait aussi montré

que le cortex d'actine est responsable de la « résistance » d'une cellule à entrer dans la pipette (Yeung et Evans, 1989). La figure V.15 montre la vision conceptuelle qu'Evans avait d'une membrane plasmique : une bicouche supportée par une couche de gel symbolisant le cortex d'actine.

En conséquence, il semblerait que la vision simplifiée la plus réaliste que l'on puisse avoir d'une cellule est celle d'une goutte visqueuse entourée d'une coque encore plus visqueuse.

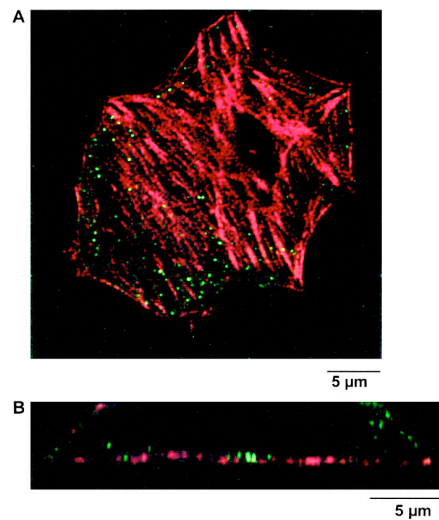


Figure V.14 : Localisation de l'actine filamenteuse d'une cellule adhérente par microscopie confocale de fluorescence. (A) Image de fluorescence au niveau de la surface d'adhésion. (B) Reconstruction latérale à partir de mesures en microscopie confocale. Les filaments d'actine sont marqués par de la phalloïdine fluorescente. En vert, les vésicules de sécrétion sont visibles. La surface est localisée sous la bande horizontale rouge (Extrait de (Lang *et al*, 2000)).

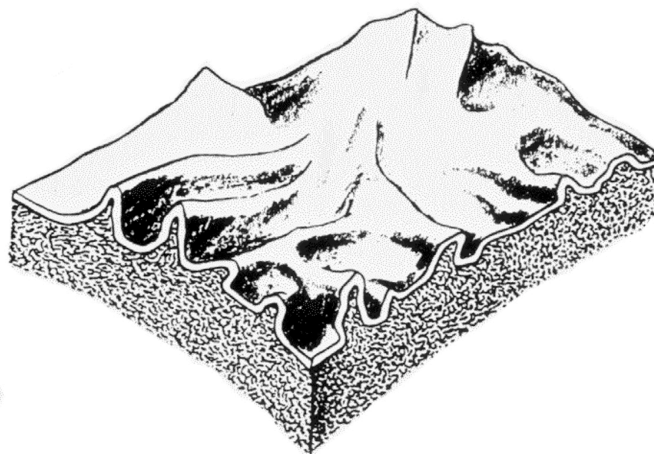


Figure V.15 : Représentation conceptuelle d'une membrane plasmique. La bicouche lipidique repose sur une couche de gel visqueux (Extrait de (Yeung et Evans, 1989)).

## **Partie 1 : Adhésion cellulaire**

De plus, nous supposerons que la tension de membrane ne joue pas un rôle prépondérant dans la dynamique d'étalement. La tension membranaire définie par la bicouche est difficile à estimer, sans doute très faible. Quant à la tension corticale, estimée à 0.2-0.4 mN/m (Thoumine *et al*, 1999) et engendrée par le réseau d'actine, elle sera supposée constante et n'influant que sur le rayon de contact à l'équilibre (si équilibre il y a !) lorsque l'étalement est stoppé (communication privée avec E. Raphaël).

De plus, nous supposerons que la concentration des protéines d'adhésion sur la membrane plasmique est homogène initialement. Cette hypothèse sous entend que les intégrines, qui étaient concentrées au niveau de la surface avant traitement à la trypsine, ont eu le temps de se re-disperser partout le long de la membrane avant le début de l'expérience.

Finalement, nous ne prendrons pas en compte l'élasticité de la cellule. Les cellules sont généralement caractérisées par un module élastique  $E$  de 1kPa (Thoumine et Ott, 1997). Le temps caractéristique définissant le passage d'un comportement élastique à un comportement visqueux est donné par  $\tau = \eta/E \approx 10s$  où  $\eta$  est la viscosité interne de la cellule. La résolution temporelle de nos expériences étant de l'ordre de la seconde, nous n'avons pas été capables de résoudre ce comportement élastique.

### **V.4.b. Dynamique d'étalement d'une coque visqueuse**

Les photographies de la figure V.16 montrent des cellules en cours d'étalement, fixées et visualisées par microscopie électronique à balayage (Fuhr et Shirley, 1999). Si l'on fait abstraction des « fils » et « pieds » précurseurs (filopodes et lamellipodes) observés, il apparaît nettement que la cellule ressemble à une sphère adhérente qui se déforme progressivement, jusqu'à atteindre la forme d'une « crêpe ».

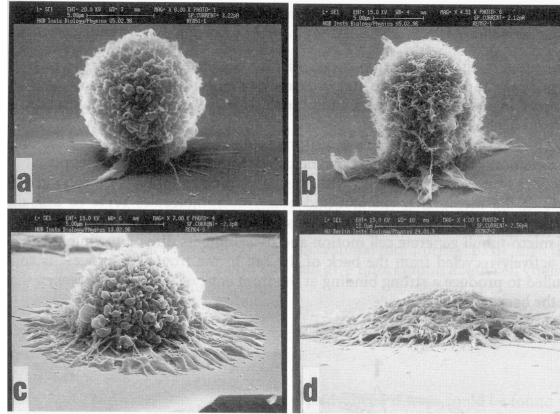


Figure V.16 : Images par microscopie électronique à balayage de cellules en cours d'étalement sur une surface de verre. La largeur d'une image représente 15  $\mu\text{m}$  (Extrait de (Fuhr et Shirley, 1999)).

#### V.4.b.i. Aux temps courts

Dans un premier temps, la cellule se déforme peu. La dissipation visqueuse est réalisée au voisinage de la surface. Par souci pédagogique, afin de montrer l'importance du cortex d'actine, nous allons envisager deux cas de figure, correspondant à deux représentations simplifiées d'une cellule. Soit la cellule sera vue comme une goutte visqueuse homogène, soit la cellule sera considérée comme une coque visqueuse. Les dessins de la figure V.17 schématisent ces deux situations. La description présentée ci-dessous repose sur des arguments en lois d'échelle. Nous « oublierons » systématiquement tous les coefficients numériques.

- Si la cellule en train de s'étaler se comporte comme une *goutte visqueuse homogène*, le volume de dissipation visqueuse est  $R^3$ , où  $R$  est le rayon de la zone de contact.

La dissipation visqueuse est donnée par :

$$T\dot{S} \propto \eta_c \dot{\gamma}^2 R^3 \quad \text{V.1,}$$

avec  $\eta_c$  la viscosité interne de la goutte et  $\dot{\gamma}$  le taux de cisaillement suivant l'axe

vertical  $z$ , défini par :  $\dot{\gamma} = \frac{\partial v}{\partial z}$ , où  $v$  est la vitesse de déplacement du fluide à l'intérieur

de la cellule. Dans le cadre de l'hypothèse de lubrification, la vitesse caractéristique du fluide correspond à la vitesse d'avancée de la ligne de contact,  $dR/dt$ , et la longueur caractéristique dans ce cas est  $R$ , l'épaisseur du fluide où l'énergie est



## Partie 1 : Adhésion cellulaire

dissipée par viscosité. Le taux de cisaillement s'écrit alors comme :  $\dot{\gamma} = \dot{R}/R$ , et l'équation (V.1) devient :

$$T\dot{S} = \eta_c \dot{R}^2 R \quad \text{V.2.}$$

La « puissance » chimique, résultant du gain d'énergie d'adhésion  $W$  à une vitesse de déplacement du front  $\dot{R}$  est donnée simplement par :

$$\dot{U}_{\text{chimique}} = W\dot{R} \quad \text{V.3.}$$

L'égalité des équations V.2 et V.3 traduisant que la puissance chimique est compensée par la dissipation visqueuse conduit à :

$$\dot{R} = \frac{W}{\eta_c} \quad \text{V.4.}$$

d'où une dépendance linéaire du rayon de contact avec le temps :

$$R = \frac{W}{\eta_c} t \quad \text{V.5.}$$

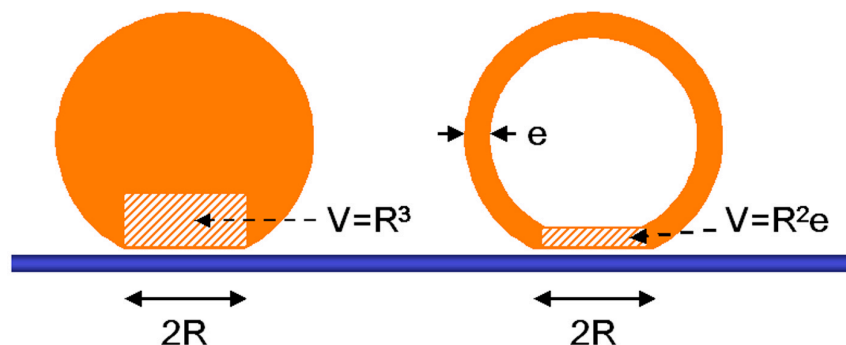


Figure V.17. : Représentation de deux visions simplifiées d'une cellule : la goutte visqueuse homogène ou la coque visqueuse d'épaisseur  $e$ . Les volumes,  $V$ , de dissipation visqueuse sont les zones hachurées.

- Si la cellule en train de s'étaler se comporte comme une *coque visqueuse* d'épaisseur  $e \ll R$ , le volume de dissipation visqueuse n'est plus  $R^3$  mais limité au disque de rayon  $R$  et d'épaisseur  $e$ , qui symbolise l'épaisseur du cortex d'actine, soit un volume  $R^2e$ .

L'épaisseur  $e$  devient la hauteur caractéristique du système et définit un nouveau taux de cisaillement :

$$\dot{\gamma} = \dot{R}/e \quad \text{V.6.}$$

L'expression de la dissipation visqueuse devient donc :

$$T\dot{S} = \eta_c \dot{R}^2 R^2 / e, \quad \text{V.7,}$$

alors que la puissance « chimique » reste inchangée.

L'égalité des équations (V.3) et (V.7) mène à :

$$R\dot{R} \propto \frac{W}{\eta_c} e, \quad \text{V.8,}$$

d'où une variation du rayon de contact, R :

$$R \propto \left( \frac{W e}{\eta_c} \right)^{1/2} t^{1/2} \quad \text{V.9.}$$

Cette dernière approche nous donne un régime en  $t^{1/2}$ . La présence de cette fine coque visqueuse modifie donc significativement la loi de puissance par rapport à ce que l'on obtenait pour une goutte visqueuse homogène. De plus, cette dépendance en  $t^{1/2}$  est en accord avec les observations expérimentales. Reste à voir si les ordres de grandeur du préfacteur sont corrects. Nous discuterons cela au paragraphe V.5.

#### V.4.b.ii. Aux temps longs

Au bout d'un certain temps, lorsque le rayon du disque d'adhésion est de l'ordre du rayon initial de la cellule, la cellule ne se déforme plus localement mais dans sa totalité (voir figure V.16). Dans ce cas, la plus petite dimension qui limite le volume de dissipation devient h, la hauteur de la cellule. On suppose ici que l'on ne peut plus considérer que la dissipation visqueuse a lieu principalement dans le cortex d'actine ; dans la limite des grandes déformations, toute la cellule est affectée. Le dessin de la Figure V.18 précise les notations utilisées.

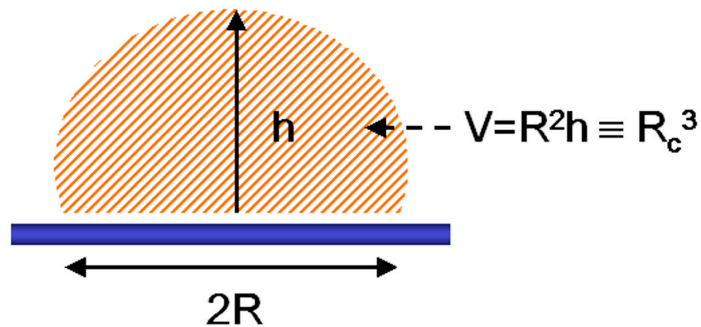


Figure V.18 : Cellule en étalement aux temps longs. Le volume de dissipation est  $R^2 h$ .  $R_c$  représente le rayon initial de la cellule avant adhésion. h est la hauteur de la cellule.

## Partie 1 : Adhésion cellulaire

Maintenant, le volume de dissipation est  $R^2h$  et le taux de cisaillement est donné par:  $\dot{\gamma} = \dot{R}/h$

La balance dissipation visqueuse/énergie d'adhésion conduit immédiatement à l'équation suivante:

$$R\dot{R} \approx \frac{W h}{\mu_c} \quad \text{V.10.}$$

Mais, en tenant compte de la conservation du volume durant l'étalement,  $R^2h \approx R_c^3$ , où  $R_c$  est le rayon initial de la cellule. L'équation (V.10) se réécrit :

$$R^3\dot{R} \approx \frac{W R_c^3}{\mu_c} \quad \text{V.11,}$$

d'où la variation du rayon de contact :

$$R \approx \left( \frac{W R_c^3}{\mu_c} t \right)^{1/4} \quad \text{V.12.}$$

On trouve donc ici une variation du rayon de contact en  $t^{1/4}$ , ce qui peut être compatible avec nos observations expérimentales (fragiles, car limitées à une décade ou moins en temps).

En résumé, la différence essentielle entre le modèle que nous venons d'exposer et celui de Thoumine (Frisch et Thoumine, 2002) réside dans le fait que nous avons supposé que la dissipation visqueuse est réalisée dans le volume de la cellule, alors que Thoumine considérait une dissipation au niveau de la ligne de contact, lieu de très grands gradients de vitesse.

## V.5. Discussion : validation du modèle et expériences supplémentaires

### V.5.a. Cellules possédant un cortex d'actine intact et interagissant spécifiquement avec une surface décorée de ligands

#### V.5.a.i. Cellules intactes : récapitulatif

Revenons sur les données obtenues avec les cellules HeLa, S180 parentales et transfectées, ainsi que sur les cytoplastes. Focalisons-nous sur les temps initiaux de l'étalement (premier régime), pour lesquels que le rayon de contact varie comme  $t^{1/2}$ , ce qui est en accord qualitatif avec notre description théorique. Qu'en est-il de l'ordre de grandeur du préfacteur?

Nous avons ajusté les courbes du paragraphe V.3. par une équation  $R = \alpha(t - t_0)^{1/2}$ . En supposant une épaisseur du réseau d'actine de  $1 \mu\text{m}$  et une viscosité de  $300 \text{Pa}\cdot\text{s}$ , nous avons déduit l'énergie d'adhésion des différents cas. Nous avons reporté les résultats dans le tableau V.1.. Les chiffres donnés sont une moyenne effectuée sur 3 à 4 cellules.

Objet cellulaire	Récepteur surfacique	Préfacteur $\alpha$ ( $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1/2}$ )	Energie d'adhésion ( $\mu\text{J}/\text{m}^2$ )
HeLa	fibronectine ( $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ )	$0.35 \pm 0.06$	37
	fibronectine ( $0.1 \mu\text{g}/\text{ml}$ )	$0.17 \pm 0.06$	8
S180	fibronectine ( $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ )	$0.28 \pm 0.08$	24
	fibronectine ( $0.1 \mu\text{g}/\text{ml}$ )	$0.16 \pm 0.05$	7
cytoplastes HeLa	fibronectine ( $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ )	$0.25 \pm 0.07$	19
S180/E-cad	cadhérine	$0.30 \pm 0.09$	27

Tableau V.1. : Energies d'adhésion de substrats couverts de fibronectine évaluées après ajustement des courbes expérimentales du paragraphe V.3 avec l'équation V.8.  $\alpha$  est le préfacteur dans la loi  $R \approx \alpha t^{1/2}$ .

## Partie 1 : Adhésion cellulaire

Tout d'abord, l'ordre de grandeur des énergies d'adhésion est bien dans la gamme attendue, c'est-à-dire entre  $1 \mu\text{J}/\text{m}^2$  et  $1 \text{ mJ}/\text{m}^2$  (Pierrat et al, 2004; Simson et al, 1998).

En ce qui concerne les substrats décorés de fibronectine incubés avec une solution de  $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ , l'énergie d'adhésion est de l'ordre de  $30 \mu\text{J}/\text{m}^2$ , indépendamment du type cellulaire. Lorsque la solution de fibronectine est diluée 10 fois ( $0,1 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) nous obtenons une énergie d'adhésion plus faible, de  $7 \mu\text{J}/\text{m}^2$ . Pour une solution de fibronectine 10 fois plus concentrée ( $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ ), nous n'avons pas observé de différence significative avec une solution à  $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ . Notre conclusion a été que les surfaces sont déjà saturées en fibronectine à  $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ .

Pour aller un peu plus loin dans la quantification, il nous faut connaître la densité de surface de fibronectine obtenue. N'ayant pas réalisé ces expériences de calibration nous-mêmes, nous avons repris des données de la littérature : sur la base d'un protocole de préparation des surfaces similaire au nôtre, la densité massique de fibronectine à saturation a été évaluée, par mesures de radioactivité sur de la fibronectine iodée, à  $300 \text{ ng}/\text{m}^2$  (Garcia et Boettiger, 1999). La masse molaire de la fibronectine étant de l'ordre de  $250 \text{ kDa}$ , la densité de fibronectine,  $\rho_f$ , vaut donc  $6 \cdot 10^{14} \text{ m}^{-2}$ . Les récepteurs sur la surface n'étant pas mobiles, l'énergie d'adhésion par unité de surface,  $W$ , est donnée par :  $W = \rho_f U_f$  (voir chapitre IV), où  $U_f$  est l'énergie de liaison fibronectine-intégrine. Il existe une multitude de types d'intégrines et les valeurs d'énergie de liaison des fibronectines rapportées dans la littérature varient entre  $15$  et  $20 k_B T$  (Li et al, 2003). Cela conduit à une énergie de liaison calculée  $W$  de  $36$  à  $48 \mu\text{J}/\text{m}^2$ . Cette valeur est en bon accord avec celle déduite des expériences d'étalement, de manière assez surprenante d'ailleurs, puisque tous les coefficients numériques ont été négligés dans l'équation (V.9). De plus, une dilution d'un facteur 10 de fibronectine en solution entraîne, d'après les données du groupe de A. Garcia (Garcia et Boettiger, 1999), une diminution d'un facteur 6 de la densité de sites de liaison. Expérimentalement, nous observons une diminution d'un facteur 4-5.

Sur le tableau V.1, on remarque également que l'énergie d'adhésion pour des cytoplastes de cellules HeLa est plus faible que pour des cellules intactes. Le mode de préparation de ces cellules énuclées peut en être la raison. En effet, les cellules

sont traitées par la cytochalasine D, dépolymérisant les filaments d'actine. Lors de l'extraction du noyau, il est possible qu'une partie de l'actine soit perdue, ou qu'elle reconstitue un cortex plus mince. Cela irait dans le sens d'une diminution apparente de  $W$ . Cependant, aucune mesure nous permet de confirmer cette spéculation.

Enfin l'énergie d'adhésion entre des cellules exprimant des cadhérines et des substrats couverts de cadhérines est trouvée de l'ordre de  $30 \mu\text{J}/\text{m}^2$ . Cette valeur est comparable au système intégrine-fibronectine, ce qui ne semble pas déraisonnable.

En ce qui concerne le deuxième régime, il semble que la dynamique d'étalement suive une loi de puissance en  $t^{1/4}$ . Mais une étude sur une plus longue durée (à supposer que la cellule garde un comportement passif) pourrait tout aussi bien révéler une loi de puissance différente. Par exemple, en mouillage classique, on s'attendrait à une variation en  $t^{1/10}$  (Hardy, 1919; Tanner, 1979), c'est-à-dire quasiment un plateau. Nous n'avons donc pas cherché à analyser quantitativement ce deuxième régime.

### V.5.a.ii. Influence des microtubules

Si, comme nous le proposons, la dissipation visqueuse dans le cortex d'actine contrôle la dynamique d'étalement, les microtubules ne devraient pas jouer de rôle significatif. Nous avons donc étudié la dynamique d'adhésion de cellules traitées au nocodazole (NZ), c'est-à-dire dépourvues de microtubules, sur des substrats couverts de fibronectine à  $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ . Le graphe de la figure V.19 montre l'évolution du rayon de contact en fonction du temps d'une cellule HeLa/NZ comparée à celle d'une cellule HeLa intacte sur la même surface.

Bien que l'allure des courbes brutes semble très différente, la représentation en échelle log-log révèle bien que  $R$  augmente comme  $t^{1/2}$  aux temps courts, en absence et en présence de nocodazole. Nous avons vu que ce premier régime se termine lorsque le rayon de contact atteint une valeur proche du rayon de la cellule. Ce point est également confirmé sur la courbe.

## Partie 1 : Adhésion cellulaire

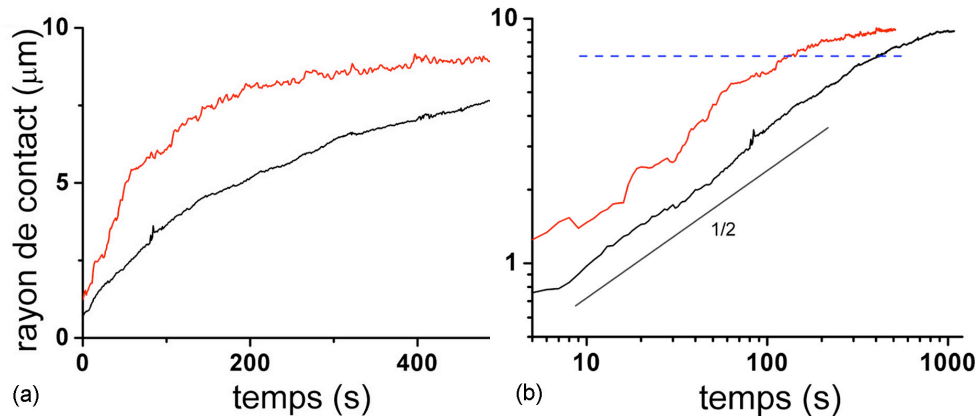


Figure V.19 : Evolution du rayon de contact en fonction du temps pour des cellules HeLa traitées au nocodazole (rouge) et pour des cellules HeLa intactes (noir) durant l'étalement sur des surfaces fibronectine incubées à 1 µg/ml. (a) Echelle linéaire. (b) Echelle logarithmique. Malgré les allures différentes en échelle linéaire, le rayon (rouge) suit une loi en  $t^{1/2}$ . La droite en pointillés bleus indique le changement de régime pour un rayon équivalent au rayon de la cellule.

La principale différence de comportement entre les cellules HeLa/NZ et HeLa intactes réside dans le fait que la croissance de la zone de contact est plus rapide lorsque le réseau de microtubules est absent. D'après notre équation (V.9), le préfacteur est  $(We/\eta_c)^{1/2}$ . Le réseau d'actine n'ayant pas été modifié, il n'y a pas de raison évidente pour laquelle l'épaisseur  $e$  du cortex serait modifiée. De même, les surfaces étudiées étant les mêmes et le même traitement à la trypsine ayant été appliqués aux deux types de cellules, l'énergie d'adhésion devrait être identique dans les deux cas. Si l'on suppose que cette vitesse de croissance de la zone de contact supérieure pour les cellules HeLa/NZ vient d'une réduction de la viscosité, un ajustement des courbes expérimentales, en prenant  $e=1 \mu\text{m}$  et  $W= 30 \text{ J/m}^2$ , la viscosité serait diminuée de 40% pour les cellules sans microtubule (180 Pa.s au lieu de 300 Pa.s). Cette diminution de viscosité correspond bien aux mesures effectuées par cytométrie magnétique de torsion dans le groupe de N. Wang, qui montrent que le traitement au nocodazole abaisse de 25 à 30% la viscosité de cellules endothéliales de capillaire de boeuf (Wang, 1998).

Si la dynamique d'étalement est bien conservée en l'absence de microtubules, la courbe  $R(t)$  cache cependant les différences de morphologie de la cellule en étalement qui résultent de ce traitement au nocodazole. Certes, la coque d'actine filamenteuse est maintenue, mais l'interaction entre les filaments d'actine et les myosines II n'est plus stabilisée par le réseau de microtubules (Mandato et al, 2000).

Nous observons, sur les cellules HeLa/NZ, la formation d'une multitude de « blebs » dus à une « hyperactivité » des moteurs concentrés au cortex d'actine. La figure V.20 montre quelques clichés RICM au cours de l'étalement d'une cellule HeLa/NZ. La cellule ne présente plus de filopodes et sa forme est « boursouflée ». Nous reviendrons plus en détail sur cette formation de blebs dynamiques dans le paragraphe V.7. et nous montrerons une observation étonnante (de notre point de vue) lorsque la drogue NZ est lavée.

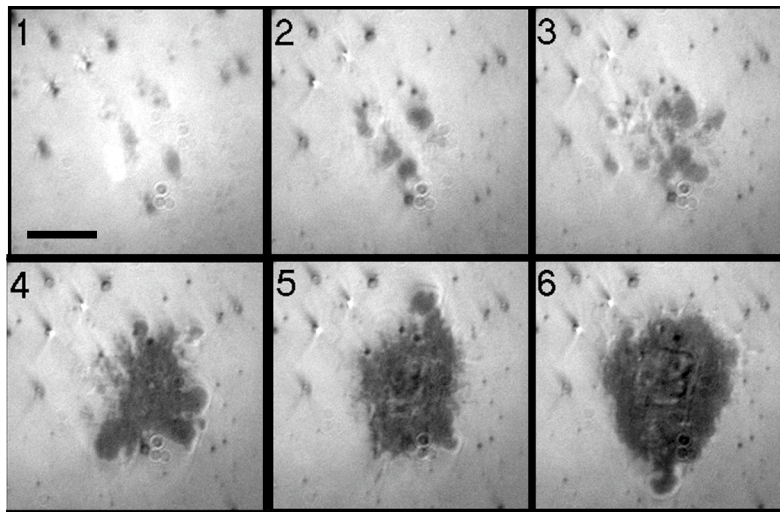


Figure V.20 : Séquence d'images par RICM d'une cellule HeLa en présence de nocodazole pendant l'étalement. L'intervalle de temps entre chaque image est de 30s et la barre d'échelle représente 10  $\mu$ m.

### V.5.a.iii. Influence des filopodes

Les photographies RICM de la figure V.8, introduites au début de ce chapitre, montrent que la zone d'adhésion sombre est entourée de nombreux filopodes. Ceux-ci ne contribuent pas ou très peu à la mesure de l'aire de contact (par seuillage). La présence de ces « fils » rendant la surface de la cellule rugueuse n'est pas pris en compte dans notre modèle de coque visqueuse. Afin de tester leur implication éventuelle dans l'étalement, nous avons utilisé des cellules S180/Cdc42DN. Le dominant négatif (DN) de Cdc42 a une action inhibitrice sur la formation de filopodes (Chu *et al*, 2004).

La séquence d'images RICM de la figure V.21 correspondant à l'étalement d'une cellule S180/Cdc42DN sur un substrat de fibronectine montre en effet une absence de filopodes. De plus, comme on le voit sur la courbe expérimentale brute



## Partie 1 : Adhésion cellulaire

(figure V.22.a), il y a une différence importante de comportement au tout début de l'adhésion. Alors qu'une cellule S180 sauvage commence à s'étaler une centaine de secondes après initiation du premier contact détectable en RICM, une cellule S180/Cdc42DN s'étale directement dès qu'elle touche la surface. Ce retard à l'étalement dans le cas des cellules présentant une activité filopodiale va bien dans le sens que cette « rugosité » ralentit l'alignement membrane-surface. Nous pouvons spéculer que « la cellule a besoin de se lisser » avant de commencer à s'étaler. Ce temps d'attente pourrait donc être dû à la dépolymérisation d'actine à l'intérieur des filopodes.

Malgré cette différence notable, il faut remarquer qu'une fois l'étalement démarré, la loi de croissance est identique pour les cellules S180 et S180/Cdc42DN. Le graphe en échelle log-log de la figure V.22.b, dans lequel nous avons soustrait ce retard, montre bien une dépendance de  $R$  en  $t^{1/2}$  comme précédemment. L'énergie d'adhésion déduite de l'ajustement avec l'équation (V.9) est de  $40 \mu\text{J}/\text{m}^2$ , c'est-à-dire du même ordre de grandeur que pour des cellules intactes.

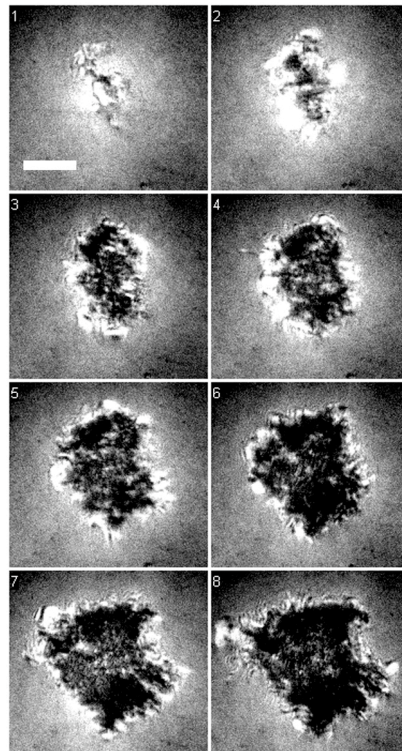


Figure V.21. : Séquence d'images par microscopie interférentielle d'une cellule S180 Cdc42 dominant négatif s'étalant sur une surface fibronectine ( $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ ). Remarquons l'absence de filopode autour de la zone de contact. L'intervalle de temps entre chaque image est de 200s et la barre d'échelle représente  $10 \mu\text{m}$ .

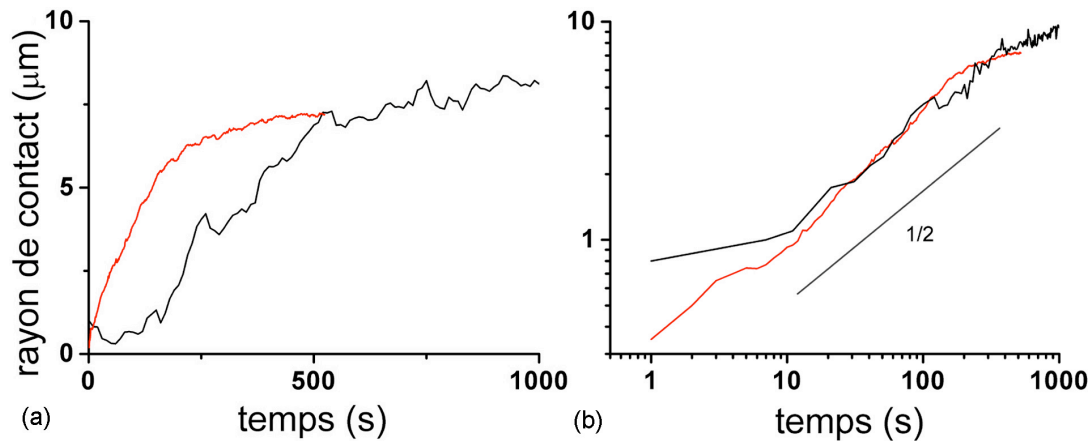


Figure V.22. : Evolution du rayon de contact en fonction du temps d'une cellule S180/Cdc42DN (rouge) et d'une cellule S180 intacte (noir) s'étalant sur une surface fibronectine (1 µg/ml). (a) En échelle linéaire. (b) En échelle logarithmique. La courbe noire a été volontairement déplacée vers la gauche de 150s. Seul le temps d'initiation change, la dynamique et la cinétique restent les mêmes.

### V.5.b. Cellules sans cortex d'actine interagissant spécifiquement avec une surface de verre modifiée

Un autre test critique de la validité du modèle de coque visqueuse proposé consisterait à supprimer le cortex d'actine. Dans ce cas, la cellule que nous avons modélisée comme une sphère visqueuse entourée d'une coque plus visqueuse deviendrait une boule visqueuse homogène. Cette situation a également été envisagée d'un point de vue théorique au paragraphe V.4. Nous nous attendons alors à ce que la dynamique passe d'une variation  $R \sim t^{1/2}$  à  $R \sim t$ .

Expérimentalement, nous avons utilisé des cellules HeLa traitées à la cytochalasine D. (HeLa/CD). En présence de cytochalasine D, le cortex d'actine est dépolymérisé et la polymérisation de nouveaux filaments d'actine est inhibée. Le graphe de la figure V.23. compare l'évolution du rayon de contact en fonction du temps pour une cellule HeLa/CD et pour une cellule HeLa intacte sur la même surface couverte de fibronectine.

## Partie 1 : Adhésion cellulaire

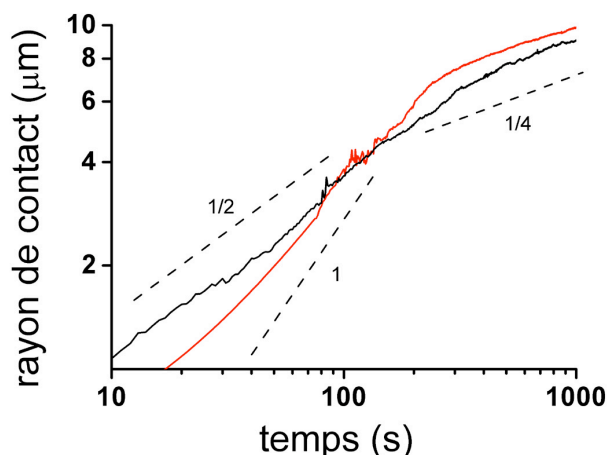


Figure V.23 : Evolution du rayon de contact en fonction du temps en échelle logarithmique d'une cellule HeLa/CD (rouge) et d'une cellule HeLa intacte (noir) adhérant sur une surface saturée en fibronectine. Des guides visuels de lois de puissance en  $t$ ,  $t^{1/2}$  et  $t^{1/4}$  ont été ajoutés en pointillés.

Nous constatons que les dynamiques sont ici radicalement différentes. Pour une cellule HeLa/CD, le rayon de contact commence à augmenter linéairement avec le temps, jusqu'à environ 250 s (et un rayon de 7-8  $\mu\text{m}$ ). Puis un ralentissement est observé, compatible qualitativement avec une loi de puissance en  $t^{1/4}$ . Le premier régime est donc bien celui prédit par notre modèle de la goutte visqueuse homogène. Le second régime n'est pas modifié, ce qui est conforme à ce que nous attendions, puisque ce régime ne dépend pas de l'épaisseur du cortex d'actine.

Plus quantitativement, la pente du régime linéaire est proportionnelle au rapport  $W/\eta_c$  (équation V.5). Or, le groupe de N. Wang (Wang, 1998) a également estimé par cytométrie magnétique de torsion que la cytochalasine D n'avait pratiquement aucun effet sur la viscosité de la cellule (mais un effet considérable sur son élasticité !). Moyennant cette hypothèse, nous déduisons une énergie d'adhésion par unité de surface  $10 \mu\text{J}/\text{m}^2$  pour les cellules HeLa/CD sur des surfaces saturées en fibronectine. Cette valeur donne un bon ordre de grandeur pour  $W$ , même si la valeur déduite du régime linéaire est 3 fois inférieure à celle déduite du régime en  $t^{1/2}$  avec cortex d'actine. Cette différence ne nous semble pas significative, car, encore une fois, l'approche théorique proposée repose sur des arguments de lois d'échelle. Les coefficients numériques négligés n'ont aucune raison d'être les mêmes pour les équations (V.5) et (V.9).

### V.5.c. Cellules interagissant avec des surfaces non-spécifiques

En biologie cellulaire, l'utilisation de boîtes de Pétri couvertes de polylysine est d'un usage très répandu pour étaler des cellules rapidement. La polylysine étant un polymère cationique, l'interaction cellule-surface est de nature essentiellement électrostatique et n'engage pas les récepteurs de la membrane cellulaire dans des contacts focaux. Puisque notre modèle théorique ne fait intervenir que la viscosité cytoplasmique, l'épaisseur du cortex d'actine et l'énergie d'adhésion, la description proposée devrait également, a priori, s'appliquer au cas des adhésions non-spécifiques. Nous avons testé ce point en observant la dynamique d'étalement de cellules HeLa et de cytoplastes sur des surfaces préalablement incubées dans une solution de polylysine.

Le graphe de la figure V.24 compare l'évolution  $R(t)$  pour des cellules HeLa (et des cytoplastes de cellules HeLa) sur des surfaces couvertes de polylysine et de fibronectine.

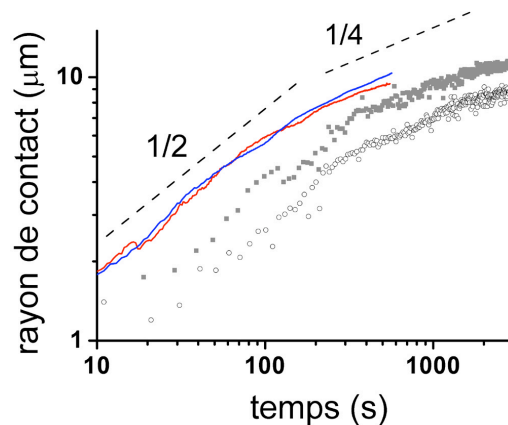


Figure V.24. : Evolution du rayon de contact en fonction du temps en échelle logarithmique d'une cellule HeLa (rouge) et d'un cytoplaste HeLa (bleu) s'étalant sur une surface polylysine. Les courbes obtenues pour des cellules HeLa sur des surfaces fibronectine 1  $\mu$ g/ml (points gris) et 0.1  $\mu$ g/ml (points blancs) sont rappelés pour comparaison.

Nous vérifions, d'une part, que la cinétique d'adhésion sur surface polylysine est plus rapide que sur fibronectine, et, d'autre part, que la dynamique d'étalement est identique. De nouveau, le régime en  $t^{1/2}$  (voire  $t^{1/4}$ , ensuite) est observé. De l'ajustement des courbes par l'équation (V.9), on déduit une énergie d'adhésion de

## Partie 1 : Adhésion cellulaire

l'ordre de  $100 \mu\text{J}/\text{m}^2$  sur les surfaces de polylysine. Dans la littérature, l'énergie d'adhésion sur des membranes sur des surfaces chargées est plutôt de l'ordre du  $\text{mJ}/\text{m}^2$  (Hategan et al, 2003). Le fait que notre valeur soit inférieure peut provenir du fait que, d'une part, le milieu est fortement salin (300mM) et, d'autre part, le milieu contient des protéines susceptibles de s'adsorber sur la surface chargée et donc de la passiver partiellement.

A ce niveau, il peut être intéressant de comparer nos données avec celles d'un groupe indépendant. Pour cela, revenons aux expériences effectuées par P. Bongrand (Pierres *et al*, 2003). Dans leur cas, d'après la figure V.4, la vitesse de croissance de l'aire de contact d'un monocyte THP-1 sur polylysine est de  $0.5 \mu\text{m}^2/\text{s}$ . D'après l'équation V.9, et en prenant les mêmes valeurs que précédemment pour  $e$  et  $\mu_c$ , l'énergie d'adhésion peut être estimée à  $150 \mu\text{J}/\text{m}^2$ , ce qui est en très bon accord avec nos résultats.

Enfin, nous avons étudié le comportement de cellules HeLa en présence de cytochalasine D sur ces surfaces polylysine. Le graphe de la figure V.25 montre à nouveau une variation linéaire du rayon de contact avec le temps dans les premiers stades de l'étalement. Comme sur les surfaces couvertes de fibronectine, ce comportement est compatible avec une dissipation visqueuse non restreinte à l'épaisseur du cortex d'actine.

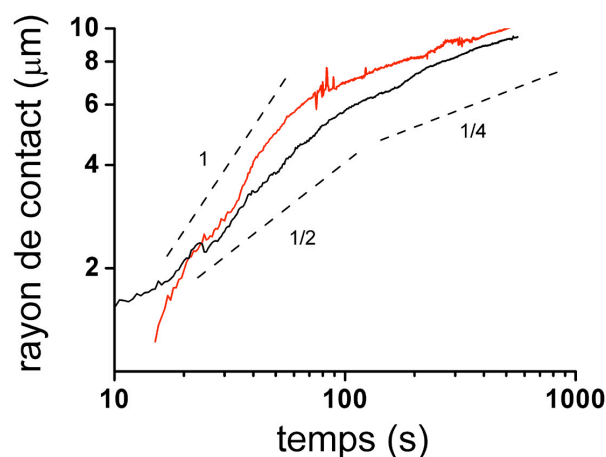


Figure V.25. : Evolution du rayon de contact en fonction du temps en échelle logarithmique d'une cellule en présence de cytochalasine D (rouge) et d'une cellule intacte sans CD (noir) adhérent sur une surface couverte de polylysine. Des guides visuels de loi de puissance en  $t$ ,  $t^{1/2}$  et  $t^{1/4}$  ont été représentés

Quantitativement, l'énergie d'adhésion déduite des ajustements, pour des surfaces polylysine, est de l'ordre  $40 \mu\text{J}/\text{m}^2$ . Comme au paragraphe V.5.b., cette valeur est 2 à 3 fois inférieure à celle obtenue sur cellules intactes. Cet écart est vraisemblablement dû à l'absence de coefficients numériques dans les équations (V.5) et (V.9). Cette raison purement mathématique nous semble plus probable que toute autre spéculation biologique liée à la perte de protéine d'adhésion au cours du traitement par la cytochalasine D.

## **V.6. Observations supplémentaires : influence du nocodazole sur l'activité de la cellule.**

Dans ce paragraphe, nous allons détailler davantage les observations effectuées sur les cellules traitées au nocodazole

### **V.6.a. Dynamique des « blebs »**

Nous avons évoqué au paragraphe V.5.a.ii la formation de boursoflures membranaires, ou blebs, sur une cellule traitée au nocodazole et étalée sur la surface (à la fin du premier régime). Les photographies de la figure V.26 ont été prises en vidéo-microscopie (fonds clair) et révèlent nettement ces blebs. On voit même l'apparition d'un « chapelet » de blebs (indiqué par la flèche) autour du noyau.

## Partie 1 : Adhésion cellulaire

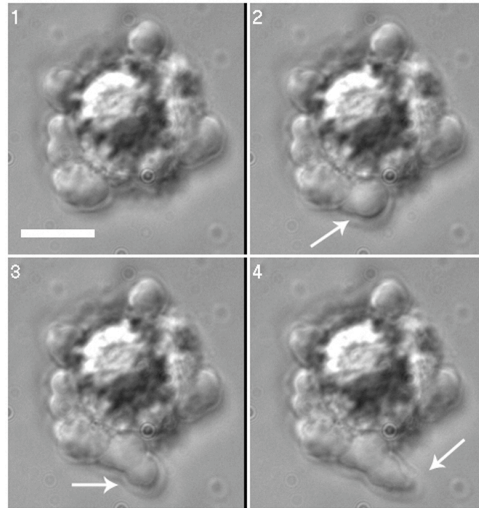


Figure V.26 : Séquence d'images par vidéo microscopie d'une cellule HeLa adhérente en présence de nocodazole. Les flèches blanches montrent l'apparition successive de blebs. L'intervalle de temps entre chaque image est de 2s et la barre d'échelle représente 10  $\mu$ m.

Ce phénomène est aussi visible sur les images RICM de la figure V.27. L'extrémité du chapelet de blebs adhère au substrat et apparaît sous la forme d'une tâche sombre. Sur cette séquence d'images, on dénombre jusqu'à six « perles » (blebs connectés) se formant successivement.

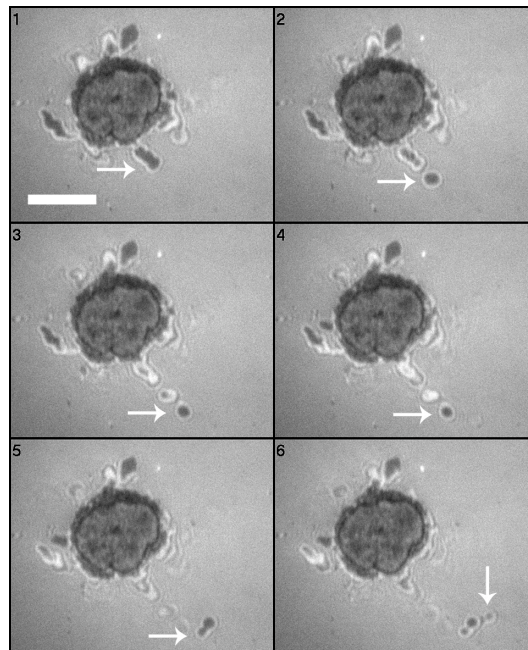


Figure V.27. : Séquence d'images par RICM d'une cellule HeLa adhérente en présence de nocodazole. Les flèches blanches montrent l'apparition successive de blebs. L'intervalle de temps entre chaque image est de 3s et la barre d'échelle représente 10  $\mu$ m.



Nous pouvons estimer taille de bleb (c'est-à-dire la « longueur d'onde de l'instabilité ») de l'ordre de 2-3  $\mu\text{m}$  et une fréquence temporelle d'apparition de l'ordre du Hz. Ewa Paluch au laboratoire a étudié ce phénomène en détail d'un point de vue biochimique sur des cellules non-adhérées. L'explication schématique qu'elle propose est représentée sur la figure V.28. Une interprétation théorique de cette instabilité est en cours d'élaboration par le groupe de théoriciens du laboratoire.

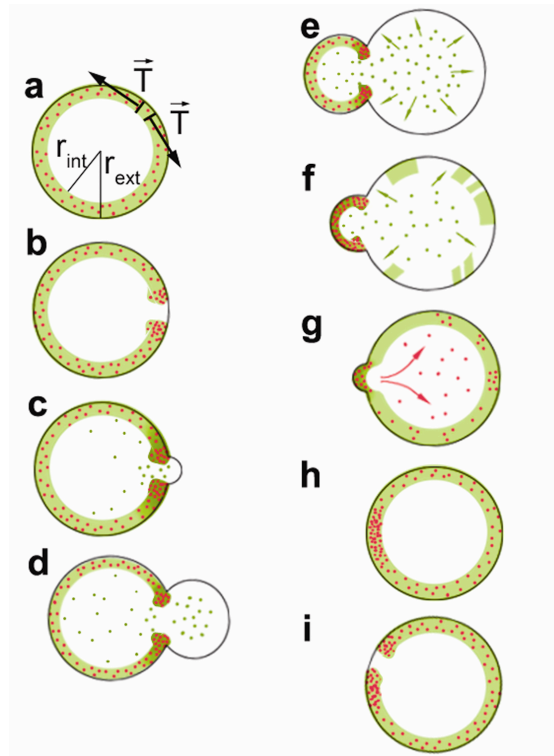


Figure V.28 : Représentation schématique de la formation de blebs montrant les différents changements morphologiques. (a) Initialement une répartition homogène des filaments d'actine (vert) et de myosine II (rouge). Une tension locale induite par une activité plus importante des moteurs génère une brisure du gel d'actine. (c), (d), (e) L'activité des moteurs rétracte le gel induisant sa dépolymérisation et l'apparition d'un bleb, membrane sans gel. (e), (f) L'actine libre repolymérise au niveau de la membrane. (g), (h) les moteurs se détachent pour se lier de nouveau au cortex et (i) finalement, une concentration importante de moteur re-génère le phénomène (Extrait de (Paluch et al, 2005)).

Enfin, nous pouvons remarquer que la zone d'adhésion n'est pas homogène dans le cas d'une cellule traitée au nocodazole. Sur les photographies RICM de la figure V.27, on voit une tâche centrale grise. Cela ne signifie pas que la membrane est surélevée par rapport à la surface, mais qu'il y a des réflexions multiples dues à la présence d'un « organelle » plus dense. En réalité, une observation simultanée en vidéo-microscopie classique révèle que cette tâche grise est l'empreinte du noyau qui repose sur la membrane. Dans son état normal, les microtubules maintiennent le



## Partie 1 : Adhésion cellulaire

noyau approximativement au centre de la cellule. Celles-ci étant dépolymérisées, le noyau, plus dense, sédimente dans le cytoplasme cellulaire.

### V.6.b. Restoration des microtubules...et « lévitation » du noyau

L'action du nocodazole sur le réseau de microtubules est réversible. Que se passe-t-il si on essaie de régénérer les microtubules sur une cellule adhérente traitée préalablement au nocodazole. Pratiquement, le milieu contenant le nocodazole est aspiré et du milieu frais est ajouté. L'opération est effectuée 3-4 fois toutes les minutes, afin que la cellule relargue la drogue. Après une minute environ, l'activité des blebs est stoppée et nous observons la séquence RICM représentée sur la figure V.29. Au cours du temps, la tâche grise correspondant au noyau diminue de taille, et au bout 1 à 2min, cette tâche disparaît. C'est un phénomène plutôt spectaculaire, qui n'avait pas été observé par nos collaborateurs biologistes auparavant, car ils n'observent en général que l'image projetée sur la surface de la cellule et n'ont pas la résolution verticale suffisante pour voir ce phénomène. Puisque la tâche grise disparaît, cela suggère que le noyau, qui était sédimenté sur la membrane en contact avec la surface, remonte dans le cytoplasme cellulaire. En éliminant le nocodazole, les microtubules repolymérisent et repositionnent le noyau vers le centre de la cellule.

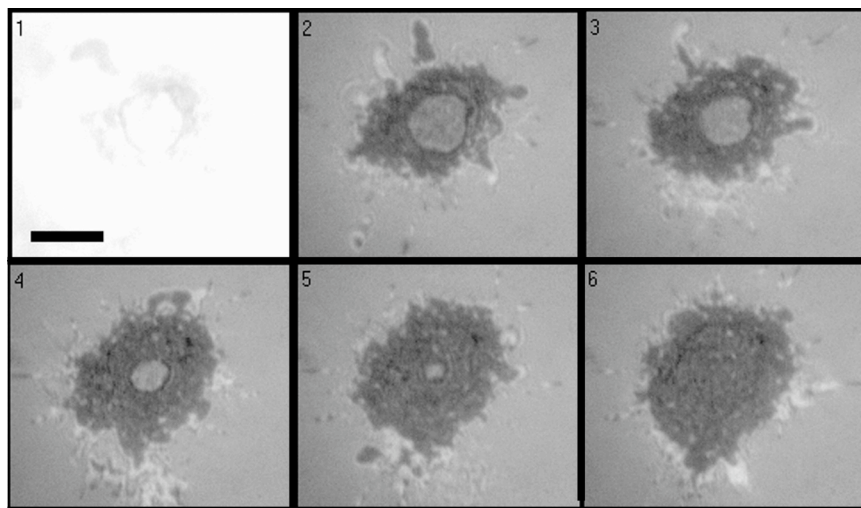


Figure V.29 : Séquence d'image par RICM d'une cellule adhérente après lavage du nocodazole. La première image complètement saturée correspond au dernier lavage effectué. La tâche grise centrale, correspondant au noyau, disparaît au cours du temps. L'intervalle de temps entre chaque image est de 20s et la barre d'échelle représente 10  $\mu$ m.

D'un point de vue semi-quantitatif, on peut estimer qu'une disparition du noyau par RICM s'effectue à une élévation de l'ordre de 1 à 2 microns (atténuation des franges d'interférences). Or, le temps de disparition pris du début de la diminution de la tache à sa disparition est de 100s, ce qui correspond à une vitesse de déplacement du noyau de l'ordre de 1  $\mu\text{m}/\text{min}$ . Or, il est connu que la vitesse de polymérisation de microtubules est d'environ 0,5  $\mu\text{m}/\text{min}$ . Notre observation est donc compatible avec un soulèvement du noyau par polymérisation des microtubules.

## **V.7. Le cas des globules rouges : cellule, vésicule ou hybride ?**

Le globule rouge est caractérisé par un cytosquelette bi-dimensionnel ancré dans la bicouche lipidique via des complexes protéiques. L'intérieur est composé principalement d'une solution d'hémoglobine concentrée. Comme le globule rouge est une de nos cellules favorites, nous avons effectué des expériences d'étalement de globules rouges décorés de molécules de streptavidine sur des surfaces biotinylées. Sa dynamique d'étalement sera-t-elle caractéristique d'une cellule ou d'une vésicule lipidique ?

### **V.7.a. Dynamique d'adhésion de globules rouges couverts de streptavidine sur des surfaces biotinylées**

Des globules rouges ont été biotinylés suivant le protocole décrit en annexe C, puis couverts de streptavidine en s'assurant que le taux de couverture n'atteint pas la saturation (ceci est réalisé en réduisant le temps de biotinylation). On les laisse ensuite s'étaler sur une surface fonctionnalisée avec un PEG<sup>3400</sup>-biotine (voir chapitre III). Les globules n'étant pas complètement gonflés osmotiquement (osmolarité 250 mOsm), leur forme est proche de la forme biconcave native, et la zone de contact, visualisée par RICM sur la figure V.30.a, n'est pas isotrope mais croît par nucléation et croissance. Nous avons représenté l'évolution de l'aire d'adhésion de différents globules en fonction du temps sur le graphe de la figure

## Partie 1 : Adhésion cellulaire

V.30.b. On constate que l'aire de contact varie linéairement avec le temps avec un vitesse moyenne de  $0.5 \mu\text{m}^2/\text{s}$ , c'est-à-dire que la « taille » (rayon) du contact augmente comme  $t^{1/2}$ , ... encore une fois. Nous avons vu dans ce chapitre qu'une telle loi de puissance pouvait être la signature d'un étalement d'une coque visqueuse. Dans le chapitre IV, nous avons également vu qu'une telle variation pouvait résulter d'un mécanisme de diffusion des récepteurs membranaires vers la zone de contact. Devons-nous alors concevoir le globule rouge comme une cellule vivante ayant un comportement de coque visqueuse ou comme une simple bicouche lipidique contenant des ligands mobiles à sa surface?

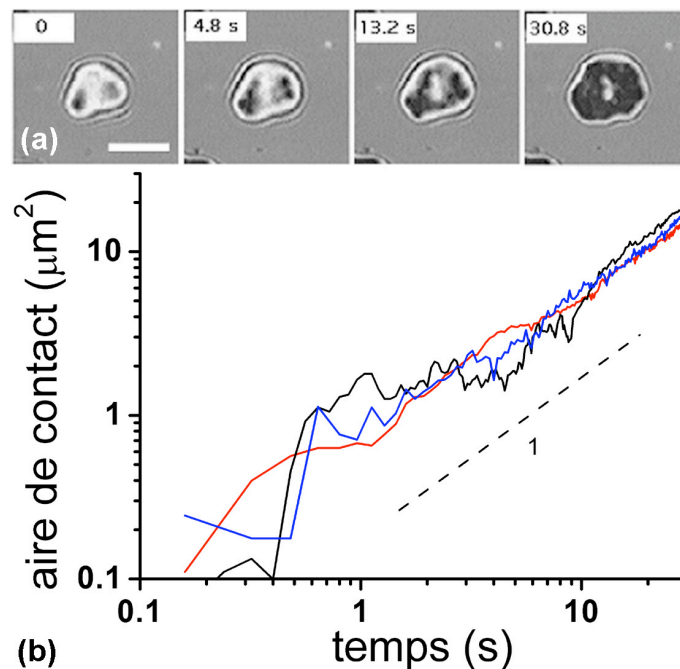


Figure V.30 : (a) Séquence d'images par microscopie interférentielle d'un globule rouge couvert de streptavidine adhérant sur une surface fonctionnalisée au PEG-biotine. La barre d'échelle représente  $5 \mu\text{m}$ . (b) Evolution de l'aire de contact en fonction du temps de trois globules rouges.

### V.7.b. Discussion

- Supposons tout d'abord que le globule rouge soit une simple bicouche lipidique. D'après le modèle exposé dans le paragraphe IV.4.b.ii., l'aire de contact,  $A$ , varie avec le temps suivant :

$$A \propto \frac{\ell_0}{\ell_{\text{sat}}} D t \quad \text{V.13.}$$

où  $\rho_0$  est la densité de streptavidine sur la membrane du globule rouge,  $\rho_{sat}$ , la densité de ligands liés sur la surface et  $D$ , le coefficient de diffusion des molécules de streptavidine le long de la membrane. En supposant le rapport  $\rho_0/\rho_{sat}$  de l'ordre de 0.1 à 0.01, nous obtenons  $D \sim 1 \text{ } \mu\text{m}^2/\text{s}$ , ce qui est typiquement le coefficient de diffusion d'un lipide dans une bicouche.

Cependant, lors de la fonctionnalisation du globule rouge, la biotine est greffée sur les protéines transmembranaires de la bicouche et non sur des lipides. Ces protéines sont reliées au cytosquelette de spectrine (voir partie "tubes de membranes", chapitre VII), donc leur diffusion est réduite. Dans la littérature, des valeurs de  $D$  comprises entre  $10^{-1}$ - $10^{-3} \text{ } \mu\text{m}^2/\text{s}$  sont rapportées pour les protéines membranaires de globules rouges sains (Tomishige et al, 1998). Ainsi le modèle assimilant un globule rouge à une simple bicouche lipidique ne paraît pas satisfaisant pour décrire la dynamique d'étalement.

- Supposons maintenant que le globule rouge dissipe l'énergie d'adhésion par dissipation visqueuse au niveau de son réseau de spectrine. L'épaisseur de la membrane composée de la bicouche et du réseau de spectrine a été évaluée à 50nm (Heinrich et al, 2001). Reste à estimer la viscosité apparente de ce réseau. Evans a montré que, lorsqu'un globule rouge est aspiré puis rejeté par une micropipette, la viscosité du système membrane+squelette domine la relaxation du globule (ref evans). En notant  $t_r$  le temps de relaxation, et  $\tau$  le module de cisaillement du globule, une viscosité intrinsèque,  $\eta_e$ , peut être définie par :  $\eta_e = \tau t_r$ . Cette viscosité de surface est exprimée en Pa.s.m. En introduisant l'épaisseur  $e$  du système membrane+squelette, nous pouvons définir la viscosité volumique  $\eta_v$  :

$\eta_v = \frac{\eta_e}{e}$ . Expérimentalement,  $t_r \sim 0.1\text{s}$ ,  $\tau = 6.10^{-6}\text{N/m}$ ,  $e = 50 \text{ nm}$ , donc  $\eta_v = 10 \text{ Pa.s}$ .

En reprenant l'expression V.8., la vitesse de croissance de l'aire est donnée par:

$$\frac{dA}{dt} \approx \frac{We}{\eta_v} \quad \text{V.14.}$$

L'énergie d'adhésion d'un globule rouge décorée de streptavidine sur une surface biotinylée similaire a été mesurée à partir de la force nécessaire à l'arrachement par Pierrat et al. (Pierrat et al, 2004), et vaut  $W \sim 100 \text{ } \mu\text{J}/\text{m}^2$ . Le modèle de coque visqueuse prédirait donc une vitesse d'augmentation d'aire de contact

## **Partie 1 : Adhésion cellulaire**

constante et de l'ordre  $0.5 \mu\text{m}^2/\text{s}$ . Expérimentalement, nous trouvons, à partir des courbes de la figure V.30.b,  $dA/dt \sim 0.5 \mu\text{m}^2/\text{s}$ . Il semblerait donc qu'un érythrocyte se comporte plutôt comme une goutte à coque visqueuse que comme une simple bicouche lipidique fluide.

## **V.8. Conclusion**

Tous nos résultats tendent à montrer qu'aux échelles de temps courts, la cellule se comporte comme une goutte visqueuse entourée d'une coque, visqueuse également. Dans les premiers temps de l'adhésion, la cellule adhère de manière passive et dissipe l'énergie d'adhésion dans le cortex d'actine (ou de spectrine pour le globule rouge). Lorsque le contact adhésif est plus important, la cellule se déforme macroscopiquement, le volume total de la cellule participe à la dissipation visqueuse.

## Bibliographie : Chapitre V

- Bailly E, Celati C et Bornens M, 1991.  
the cortical actomyosin system of cytochalasin D-treated lymphoblasts.  
*Experimental Cell Research*,196:287-293.
- Bornens M, Paintrand M et Celati C, 1989.  
The cortical microfilament system of lymphoblasts displays a periodic oscillatory activity in the absence of microtubules : implications for cell polarity.  
*Journal of Cell Biology*,109:1071-1083.
- Carter W, Rauvala H et Hakomori SI, 1981.  
Studies on cell adhesion and recognition. II. The kinetics of cell adhesion and cell spreading on surfaces coated with carbohydrate-reactive proteins (glycosidases and lectins) and fibronectin.  
*Journal of Cell Biology*,88:138-148.
- Choquet D, Felsenfeld DP et Sheetz MP, 1997.  
Extracellular matrix rigidity causes strengthening of integrin-cytoskeleton linkages.  
*Cell*,88:39-48.
- Chu Y-S, Thomas WA, Eder O, Pincet F, Perez E, Thiery JP et Dufour S, 2004.  
Force measurements in E-cadherin-mediated cell doublets reveal rapid adhesion strengthened by actin cytoskeleton remodeling through Rac and Cdc42.  
*Journal of Cell Biology*,167:1183-1194.
- de Gennes PG, 1985.  
Wettings : statics and dynamics.  
*Review of Modern Physics*,57:827-863.
- Dobereiner HG, Dubin-Thaler BJ, Giannone G, Xenias HS et Sheetz MP, 2004.  
Dynamic phase transitions in cell spreading.  
*Physical Review Letters*,93:108105.
- Dubin-Thaler BJ, Giannone G, Dobereiner HG et Sheetz MP, 2004.  
Nanometer analysis of cell spreading on matrix-coated surfaces reveals two distinct cell states and STEPs.  
*Biophysical Journal*,86:1794-806.
- Egile C, Loisel TP, Laurent V, Li R, Pantaloni D, Sansonetti PJ et Carlier M-F, 1999.  
Activation of the CDC42 Effector N-WASP by the Shigella flexneri IcsA Protein Promotes Actin Nucleation by Arp2/3 Complex and Bacterial Actin-based Motility.

## Partie 1 : Adhésion cellulaire

*Journal of Cell Biology*,146:1320-1332.

Frisch T et Thoumine O, 2002.

Predicting the kinetics of cell spreading.  
*Journal of Biomechanics*,35:1137-1141.

Fuhr G et Shirley SG, 1999.

Biological application of microstructures. In: Microsystem technology in chemistry and life sciences. Manz A, Becker H, Springer-Verlag, Berlin

Fujiwara T, Ritchie K, Murakoshi H, Jacobson K et Kusumi A, 2002.

Phospholipids undergo hop diffusion in compartmentalized cell membrane.  
*Journal of Cell Biology*,157:1071-1081.

Garcia AJ et Boettiger D, 1999.

Integrin-fibronectin interactions at the cell-material interface : initial integrin binding and signaling.  
*Biomaterials*,20:2427-2433.

Hardy WB, 1919.

The spreading of fluids on glass.  
*Philosophical magazine*,38:49.

Hategan A, Law R, Kahn S et Discher DE, 2003.

Adhesively-Tensed Cell Membranes: Lysis Kinetics and Atomic Force Microscopy Probing.  
*Biophysical Journal*,85:2746-2759.

Heinrich V, Ritchie K, Mohandas N et Evans E, 2001.

Elastic thickness compressibility of the red cell membrane.  
*Biophysical Journal*,81:1452-1463.

Horbett TA et Schway MB, 1988.

Correlations between mouse 3T3 cell spreading and serum fibronectin adsorption on glass and hydroxyethylmethacrylate-ethylmethacrylate copolymers.  
*Journal of Biomedical Materials Research*,22:763-793.

Hug TS, Prenosil JE et Morbidelli M, 2001.

Optical waveguide lightmode spectroscopy as a new method to study adhesion of anchorage-dependent cells as an indicator of metabolic state.  
*Biosensors and Bioelectronics*,16:865-874.

Lambert M, Padilla F et Mège RM, 2000.

Immobilized dimers of N-cadherin-Fc chimera mimic cadherin-mediated cell contact formation : contribution of both outside-in and inside-out signals.  
*Journal of Cell Science*,113:2207-2219.

Lang T, Wacker I, Wunderlich I, Rohrbach A, Giese G, Soldati T et Almers W, 2000.

- Role of actin cortex in the subplasmalemmal transport of secretory granules in PC-12 cells.  
*Biophysical Journal*,78:2877-2863.
- Li F, Redick SD, Erickson HP et Moy VT, 2003.  
Force Measurements of the  $\alpha_5\beta_1$  Integrin–Fibronectin Interaction.  
*Biophysical Journal*,84:1252-1262.
- Mandato CA, Benink HA et Bement WM, 2000.  
Microtubule-actomyosin interactions in cortical flow and cytokinesis.  
*Cell Motility and the Cytoskeleton*,45:87-92.
- Mooney DJ, Langer R et Ingber DE, 1995.  
Cytoskeletal filament assembly and the control of cell spreading and function by extracellular matrix.  
*Journal of Cell Science*,108:2311-2320.
- Munnely HM, Roess DA, Wade WF et Barisas BG, 1998.  
Interferometric fringe fluorescence photobleaching recovery interrogates entire cell surfaces.  
*Biophysical Journal*,75:1131-1138.
- Ozawa M et Kemler R, 1998.  
The Membrane-proximal Region of the E-Cadherin Cytoplasmic Domain Prevents Dimerization and Negatively Regulates Adhesion Activity.  
*Journal of Cell Biology*,142:1605-1613.
- Paluch E, Piel M, Prost J, Bornens M et Sykes C, 2005.  
Cortical actomyosin breakage triggers shape oscillations in cells and cell fragments.  
*Biophysical Journal*:in press.
- Piel M, Meyer P, Khodjakov A, Rieder CL et Bornens M, 2000.  
The respective contributions of the mother and daughter centrioles to centrosome activity and behavior in vertebrate cells.  
*Journal of Cell Biology*,149:317-329.
- Pierrat S, Brochard-Wyart F et Nassoy P, 2004.  
Enforced detachment of red blood cells adhering to surfaces: statics and dynamics.  
*Biophysical Journal*,87:2855-69.
- Pierres A, Eymeric P, Baloché E, Touchard D, Benoliel AM et Bongrand P, 2003.  
Cell membrane alignment along adhesive surfaces : contribution of active and passive processes.  
*Biophysical Journal*,84:2058-2070.
- Prescott DM, Myerson D et Wallace J, 1972.  
Enucleation of mammalian cells with cytochalasin B.  
*Experimental Cell Research*,71:480.



## Partie 1 : Adhésion cellulaire

Rohatgi R, Ma L, Miki H, Lopez M, Kirchhausen T, Takenawa T et Kirschner MW, 1999.

The interaction between N-WASP and the Arp2/3 complex links Cdc42-dependent signals to actin assembly.  
*Cell*,97:221-231.

Simson R, Wallraff E, Faix J, Niewöhner J, Gerisch G et Sackmann E, 1998.  
Membrane bending modulus and adhesion energy of wild-type and mutant cells of dictyostelium lacking talin or cortexillins.  
*Biophysical Journal*,74:514-522.

Takeda H, Shimoyama Y, Nagafuchi A et Hirohashi S, 1999.  
E-cadherin functions as a cis-dimer at the cell-cell adhesive interface in vivo.  
*Nature Structural Biology*,6:310-312.

Tan WJ, Teo GP, Liao KL, Leong KW, Mao H-Q et Chan V, 2005.  
Adhesion contact dynamics of primary hepatocytes on poly(ethylene terephthalate) surface.  
*Biomaterials*,26:891-898.

Tanner LH, 1979.  
The spreading of silicone oil drop on horizontal surfaces.  
*Journal of Physics D : Applied Physics*,12:1473-1484.

Thoumine O, Cardoso O et Meister J-J, 1999.  
Changes in the mechanical properties of fibroblasts during spreading : a micromanipulation study.  
*European Biophysics journal*,28:222-234.

Thoumine O et Ott A, 1997.  
Time scale dependent viscoelastic and contractile regimes in fibroblasts probed by microplate manipulation.  
*Journal of Cell Science*,110:2109-2116.

Tomishige M, Sako Y et Kusumi A, 1998.  
Regulation Mechanism of the Lateral Diffusion of Band 3 in Erythrocyte Membranes by the Membrane Skeleton.  
*Journal of Cell Biology*,142:989-1000.

Wang N, 1998.  
Mechanical interactions among cytoskeletal filaments.  
*Hypertension*,32:162-165.

Yeung A et Evans E, 1989.  
Cortical shell-liquid core model for passive flow of liquid-like spherical cells into micropipets.  
*Biophysical Journal*,56:139-149.

Yin C, Liao K, Mao H-Q, Leong KW, Zhuo R-X et Chan V, 2003.  
Adhesion contact dynamics of HepG2 cells on galactose-immobilized  
substrates.  
*Biomaterials*,24:837-850.

## **Partie 1 : Adhésion cellulaire**

## **Partie 2**

# **Tubes de membrane**



# Chapitre I

## Introduction aux tubes de membrane

L'action d'une force extérieure sur une membrane permet d'extraire des nanotubes membranaires. Les caractéristiques statiques et dynamiques de ces tubes sont maintenant bien connues pour des vésicules lipidiques. Paradoxalement, d'un point de vue chronologique, les tubes membranaires ont d'abord été observés et étudiés sur des globules rouges. Ensuite, les vésicules ont permis d'affiner les connaissances déjà acquises et de valider les modèles théoriques développés. Dans un premier temps, nous rappellerons brièvement l'historique et les résultats théoriques obtenus depuis 1970 sur les tubes de membranes. Nous insisterons notamment sur la définition de la force statique nécessaire pour maintenir un tube. Une partie de ce chapitre évoquera les réalisations expérimentales permettant de faire de tube de membrane. Finalement, nous évoquerons la pertinence biologique des tubes de membrane.

### I.1. Première observation reportée

Le mot anglais "tether" a été introduit par Blackshear et Hochmuth dans les années 70 du siècle dernier pour décrire les fines structures tubulaires extraites de globules rouges sous flux hydrodynamique. Initialement, ce terme désigne la corde reliant l'homme placé au centre d'une scène de cirque au cheval qui tourne, ou un morceau de viande de porc caractérisé par sa structure filamenteuse. Au delà de ce rappel sportif ou culinaire, la figure I.1 montre la première photographie de tube de globule rapportée dans la littérature à notre connaissance (Hochmuth et al, 1973). Un tube clairement visible relie une portion d'érythrocyte adhérente (à droite) et une portion d'érythrocyte emportée par le flux. Cette déformation impliquant un changement de forme drastique du globule a conduit à de multiples expériences de plus en plus fines pour mesurer le rayon du tube et la force requise pour former et

## Partie 2 : Tubes de membrane

maintenir un tube. Il est à noter qu'à cette époque, la composition du tube n'était pas connue et une hypothèse, qui est maintenant évidente, a été émise, à savoir qu'il contient : "perhaps the phospholipids".

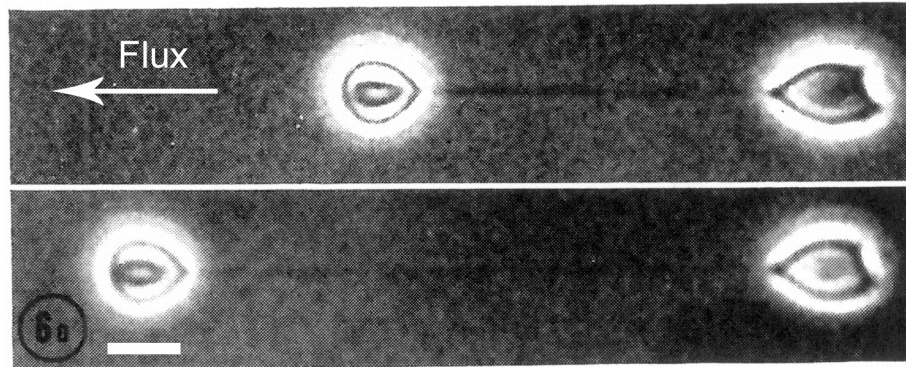


Figure 1.1. : Image par vidéo microscopie d'extraction d'un tube de globule rouge par flux hydrodynamique. La barre d'échelle représente 5  $\mu$ m (Extrait de (Hochmuth et al, 1973)).

## 1.2. De la théorie des tubes de globules rouges aux tubes de vésicules

### 1.2.a. Détermination du rayon d'un tube de membrane à tension contrôlée

Si les expériences d'extrusion de tubes à partir de globules rouges ont permis de déduire des mesures du module de cisaillement (Evans, 1973), du module d'élasticité (Evans et al, 1976), de la viscosité intrinsèque (Evans et La Celle, 1975) de la membrane, elles n'ont pas permis en définitive de décrire précisément la mécanique des tubes de membrane, majoritairement lipidiques, la cause venant des effets dynamiques observés. L'utilisation de vésicules lipidiques géantes comme système modèle a permis d'exploiter le cadre théorique des membranes lipidiques pour l'appliquer à la formation de ces structures tubulaires lipidiques, stables et fortement courbées (Waugh, 1982). Alors que les techniques de mesure de force ultra-faible n'étaient pas encore développées dans les années 1970-80, les études ont été surtout focalisées sur la détermination du rayon du tube, invisible optiquement donc difficilement mesurable. Une mesure originale a consisté à i)

extraire un tube d'une vésicule aspirée dans une pipette à tension constante, et ii) suivre la réduction de longueur de la langue dans la micropipette au cours de l'allongement du tube. La conservation d'aire de membrane impose que l'aire perdue dans la pipette soit gagnée dans le tube de longueur  $L_t$  (Hochmuth et al, 1982), comme cela est schématisé sur le dessin de la figure I.2. Le rayon  $R_t$  s'écrit alors :

$$R_t = R_p \frac{dL_p}{dL_t} \quad \text{I.1}$$

où  $R_p$  et  $dL_p/dL_t$  sont respectivement le rayon de la pipette et la variation de la longueur  $L_p$  de la membrane interne à la pipette en fonction de la longueur du tube. Cette formule est vérifiée si la longueur de la langue est au moins supérieure au rayon de la pipette (voir paragraphe II.B.)

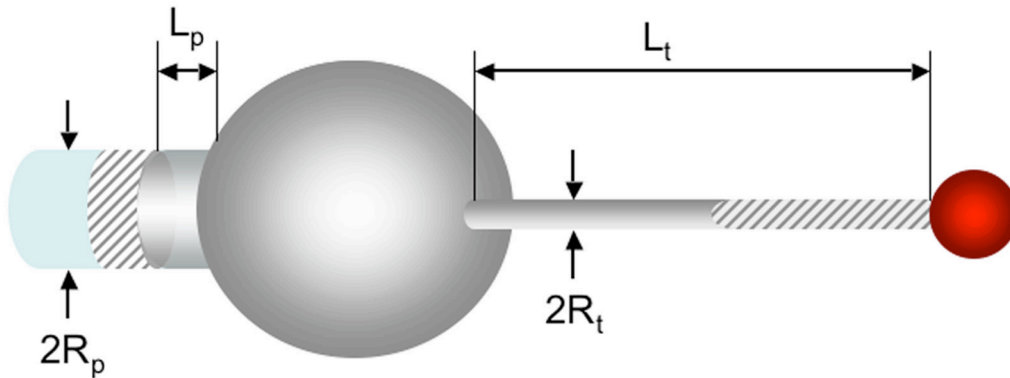


Figure I.2. : représentation schématique de l'égalité d'aire gagné dans le tube par rapport à l'aire perdu dans la pipette (zone hachurée).

### I.2.b. Détermination de la force pour maintenir un tube de membrane

L'expression analytique de la force en fonction des paramètres principaux de la membrane - la tension de membrane  $\sigma$ , et la rigidité de courbure  $\kappa$  - n'a finalement été proposée qu'au milieu des années 1990 (Evans et Yeung, 1994). Différents modèles permettent d'obtenir l'expression de la force statique,  $f_s$ , nécessaire au maintien d'un tube, en fonction de ( $\sigma$ ,  $\kappa$ ). Le modèle le plus rigoureux consiste à utiliser le modèle ADE (Area Difference Elasticity), en ajoutant la force appliquée à la membrane d'une vésicule pour tenir compte d'une possible asymétrie entre les deux feuillettes de la bicouche (Svetina et al, 1998). Cependant cet effet est en général très



## Partie 2 : Tubes de membrane

faible pour des vitesses d'extrusion faible. Nous présentons donc ici une approche moins lourde d'un point de vue calculatoire, et qui consiste à minimiser l'énergie libre du tube (Derényi et al, 2002b).

Soit  $F_{\text{tube}}$ , l'énergie libre du tube de rayon  $r$  et de longueur  $l$ . En supposant la différence de pression entre l'extérieur et l'intérieur du tube nulle, nous pouvons écrire :

$$F_{\text{tube}} = \frac{\pi \gamma^2}{r} l + 2\pi r l \Delta p \quad 1.2$$

où le premier terme est la contribution de la courbure, qui tend à grossir le tube, le deuxième terme, contrôlé par la tension de membrane, tend à le réduire, et le troisième terme est le travail mécanique de la force extérieure appliquée.

En minimisant  $F_{\text{tube}}$  par rapport à  $r$  :

$$\frac{\partial F_{\text{tube}}}{\partial r} = 0 = \pi \frac{\gamma^2}{r^2} l + 2\pi l \Delta p \quad 1.3,$$

on obtient le rayon du tube  $r_t$ , à l'équilibre :

$$r_t = \sqrt{\frac{\gamma^2}{2\Delta p}} \quad 1.4$$

De même en minimisant  $F_{\text{tube}}$  par rapport à  $l$ :

$$\frac{\partial F_{\text{tube}}}{\partial l} = 0 = \frac{\pi \gamma^2}{r_t} + 2\pi r_t \Delta p f_s \quad 1.5,$$

et, en remplaçant le rayon,  $r_t$ , par l'expression 1.4, on obtient l'expression de la force statique  $f_s$  :

$$f_s = 2\pi \sqrt{2\pi \gamma^2} \quad 1.6.$$

Par conséquent à  $\gamma$  constant, quelle que soit la longueur du tube, la force reste constante durant l'élongation. Cette expression a pu être vérifiée expérimentalement par Heinrich et Waugh (Heinrich et Waugh, 1996) par des mesures de force extrêmement fines au moment de l'émergence des capteurs de force ultra-faible. Un contrôle de la tension est réalisé par un système de micro aspiration, secondé par une deuxième micropipette-contrôle pour observer les dérives de pression de la chambre de manipulation. Le capteur de force utilisé est une pince magnétique. Ils

ont ainsi validé une nouvelle méthode de détermination de la rigidité de courbure en variant la tension de membrane. Expérimentalement pour des rigidités de courbure de  $10k_B T$ , des tensions de membrane de l'ordre de  $10^{-5} \text{N/m}$ , la force statique pour le maintenir de l'ordre de  $10 \text{pN}$  et le rayon du tube est estimé à  $20 \text{nm}$ .

Dans le cas des vésicules, en dynamique, c'est-à-dire, pendant l'extrusion d'un tube, la force  $f$  pour maintenir le tube comporte des termes supplémentaires à la force statique. En effet, lorsqu'un tube est tiré, la différence d'aire entre le feuillet interne et externe est non négligeable. Pratiquement pour un tube de  $100 \mu\text{m}$ , connaissant l'épaisseur de la membrane  $e$  (de l'ordre de  $5 \text{nm}$ ), cette différence est de l'ordre de  $3 \mu\text{m}^2$ . Plusieurs groupes ont étudié l'influence de cette différence d'aire en prenant compte la courbure non locale. Nous pouvons citer les travaux de Svetina (Bozic et al, 1992), et Waugh (Raphael et Waugh, 1996). La force supplémentaire,  $f_c$ , s'exprime par :

$$f_c = \frac{2\kappa\kappa_r}{e} \quad (1.7)$$

où  $\kappa_r$  est la module de courbure non locale de la membrane et  $\kappa$ , l'excès d'aire entre les deux feuillets. Expérimentalement  $\kappa_r \approx 3 \mu\text{m}$  (Svetina et al, 1998). Mais cela contribue à une force qui reste faible devant  $f_s$ , de l'ordre du  $\text{pN}$ . De plus, cet effet est transitoire du fait du mouvement de flip-flop des lipides, qui va rééquilibrer le nombre de lipides.

De plus si la vitesse d'extrusion est suffisamment rapide, une friction visqueuse peut apparaître entre les deux feuillets de la membrane du fait du gradient de vitesse des lipides se trouvant dans la monocouche inférieure et supérieure. Le flux de lipide étant constant dans le tube, les lipides internes parcours plus de chemin en un temps donné par rapport aux lipides externes. Evans et Yeung (Evans et Yeung, 1994) ont montré qu'une force supplémentaire  $f_v$  traduit cet effet et peut s'exprimer par:

$$f_v = \eta_m e^2 \ln \left( \frac{R}{r_t} \right) v_{\text{pull}} \quad (1.8)$$

où  $\eta_m$  est la viscosité entre les deux membranes,  $R$ , le rayon de la vésicule et  $v_{\text{pull}}$ , la vitesse d'élongation du tube. De même, nous montrerons que ce terme est négligeable devant la force statique aux vitesses d'étirement utilisées dans nos manipulations.

### I.2.c. Forme d'un tube de membrane et courbe force-extension.

#### I.2.c.i. Le tube est pratiquement un cylindre parfait.

L'étude analytique de la forme du tube et de la courbe force-extension a conduit à une situation anecdotique. Imre Derényi et Thomas Powers ont respectivement décrit le phénomène d'extrusion d'un tube de membrane analytiquement au même moment dans deux laboratoires différents (Derényi et al, 2002b; Powers et al, 2002) conduisant à un "erratum" (Derényi et al, 2002a). Même si la méthode ADE permet de décrire la forme des vésicules, elle ne semble pas s'adapter pour décrire des formes trop courbées. Une paramétrisation différente permet de tirer profit de l'axisymétrie du tube (Figure I.3.A). Sans entrer dans les détails des calculs, on peut, connaissant l'expression de l'équation d'Helfrich pour un tube, remonter à la forme exacte du tube (Figure I.3.B).

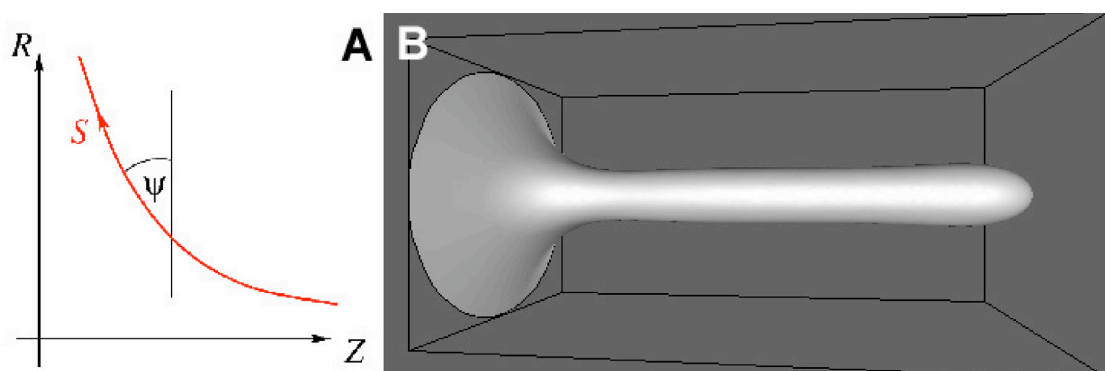


Figure I.3. : Forme des tubes de membrane : (A) Paramétrisation de la membrane : comme la membrane est axisymétrique d'axe Z (axe du tube), on peut se ramener au plan RZ. Trois paramètres sont définis en fonction de l'abscisse curviligne,  $S$ ,  $R(S)$ ,  $\psi(S)$  et  $Z(S)$ .  $R$  et  $Z$  sont les coordonnées du point d'abscisse curviligne  $S$  et  $\psi$  est l'angle que fait la tangente à la membrane au point  $S$  avec la verticale. (B) Forme 3D du tube. Remarquons le très léger pincement à sa base ainsi qu'un peu en arrière de l'extrémité. L'extrémité n'est pas sphérique (Derényi et al, 2002b).

La forme calculée présente des caractéristiques inattendues. Elle n'est pas parfaitement cylindrique car deux pincements, de quelques pourcents plus faibles seulement que le rayon moyen, sont prévus à la base et un peu en arrière de l'extrémité (figure 3.B. et I.4.). Surtout, l'extrémité n'est pas sphérique, mais relativement plus longue sur l'axe Z que sur l'axe R.

Il est également possible de calculer la densité d'énergie le long du tube (c'est-à-dire la quantité d'énergie par unité de surface en chaque point du tube). Il est

montré notamment une divergence au bout du tube, signifiant que ce bout est un endroit particulièrement favorable pour la rupture de la membrane. Cependant, dans ce modèle, l'extraction est effectuée ponctuellement sur la membrane alors qu'expérimentalement le tube est attaché via une zone d'adhésion.

**I.2.c.ii. L'extraction d'un tube peut être vue comme une transition du premier ordre.**

Il est possible de calculer la relation force-extension, pour une force ponctuelle à tension constante. Nous avons vu que ni la force, ni le rayon du tube ne dépendaient de la longueur du tube (voir éq. I.6), lorsque le tube est déjà formé. Cependant, pour de faibles extensions, le tube n'est pas encore formé, et les déformations que l'on observe ont la forme d'une caténoïde, comme pour film de savon (Figure I.4.a). Pour ces faibles longueurs, la force augmente linéairement avec la longueur selon  $f = kL$ , où  $k$  est la constante élastique du système (Figure I.4.b). Pour une certaine longueur, d'environ 7,5 fois le rayon du tube, la force passe par un maximum, de 13% plus important que  $f_s$ , pour les conditions étudiées, puis redescend brutalement pour des longueurs de tube supérieures, et reste constante et égale à  $f_s$  (figure I.4.b.).

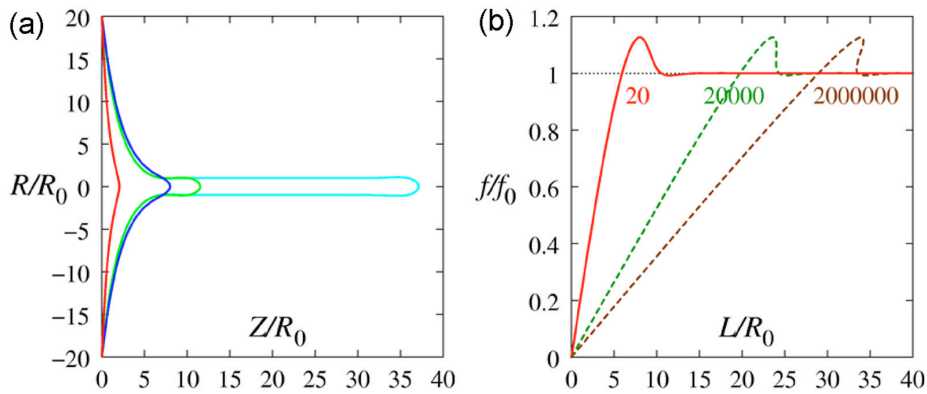


Figure I.4. : (a) Forme d'un tube tiré à partir d'une membrane de tension,  $\sigma=10^{-5}$ N/m et rigidité de courbure,  $\kappa=10k_B T$ . Différentes extensions ont été représentées.  $R_0$  et  $f_0$  représentent le rayon et la force du tube à l'équilibre. (b) Force appliquée en fonction de l'extension depuis la surface de la membrane pour différentes tailles de membrane. La hauteur du seuil de force ne dépend que de  $(\sigma, \kappa)$  (Derényi et al, 2002b).

La formation de tubes de membrane lorsqu'une vésicule est étirée peut être comprise comme une transition du premier ordre à un certain seuil,  $f_s$ , entre la forme

## Partie 2 : Tubes de membrane

sphérique et la forme tubulaire de longueur,  $\ell$ , et de rayon,  $r$ . En supposant le volume,  $V=\pi r^2 \ell$  constant et la tension constante, la force  $f$  est déduite de la relation (1.2) en supprimant le travail de la force et en calculant directement  $f=dF/d\ell$  :

$$f = \frac{3\pi\sigma}{2r} + \pi\sigma r \quad 1.9.$$

La figure 1.5 représente la variation de  $f$  en fonction de  $\ell$ , avec  $\sigma=(V/\pi r^2)^{1/2}$  et montre typiquement une courbe de transition du premier ordre en force avec un plateau de force  $f_s$ . Le seuil de force décrit précédemment correspond à la partie métastable de la première montée en force (Rossier et al, 2003).

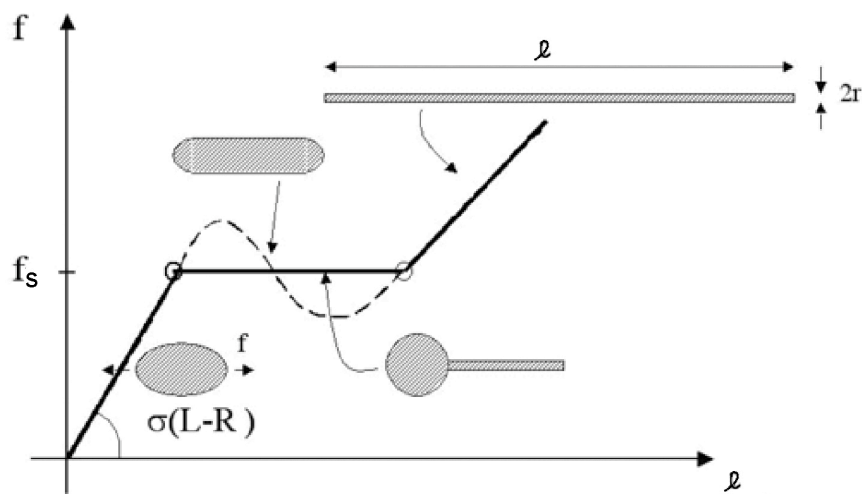


Figure 1.5. : Représentation schématique de la variation de la force  $f$  en fonction de l'élongation  $\ell$  d'une vésicule de rayon initial  $R$  à tension constante  $\sigma$ . Aux forces faibles, la vésicule a une forme d'ellipsoïde et la force est proportionnelle à  $(L-R)$ . Aux forces élevées, la forme devient un cigare de rayon  $r$  et de longueur  $\ell$ . De cet état limite, si la force  $f$  décroît avec  $\ell$ , la région atteinte devient instable. A l'état intermédiaire  $f=f_s$ , la vésicule quasi sphérique et le tube coexistent (Rossier et al, 2003).

Les résultats énoncés ci-dessus seront utilisés tout au long de notre étude, notamment l'expression du rayon à l'équilibre des tubes  $r_t=(\sigma/2\pi)^{1/2}$  et de la force statique  $f_s=2\pi(2\pi\sigma)^{1/2}$ .

### 1.3. Comment extraire un tube de membrane?

De nombreuses techniques expérimentales ont été utilisées pour extraire des tubes de membranes à partir de vésicules ou de cellules. Si, historiquement, le flux

hydrodynamique permet d'extraire des tubes en emportant une partie de l'objet membranaire, l'utilisation de micropipettes est sûrement la technique qui est la plus couramment employée.

Tout d'abord une micropipette est utile pour maintenir un objet membranaire et la micro-manipuler, voire pour maintenir sa tension de membrane constante dans le cas d'une vésicule ou d'un globule rouge (voir Chapitre II.B). L'application d'une force sur la membrane, dans le but d'extraire un tube, se réalise simplement en collant la membrane sur une petite surface puis de séparer bille et vésicule (ou cellule). Pratiquement une bille collante de taille micrométrique est mise en contact avec la membrane, soit en utilisant une autre micropipette (Hochmuth et al, 1982; Rossier et al, 2003), ou en s'en servant comme traceur de position d'un capteur de force. Les capteurs principalement utilisés sont les pinces magnétiques (Heinrich et Waugh, 1996), ou optiques (Cuvelier et al, 2005), les microplaques ou microcantilevers (Waugh et al, 2001). Ou encore, la "Biomembrane Force Probe" d'Evans composée d'un globule rouge peut être utilisée (Heinrich et al, 2005) (Figure I.6).

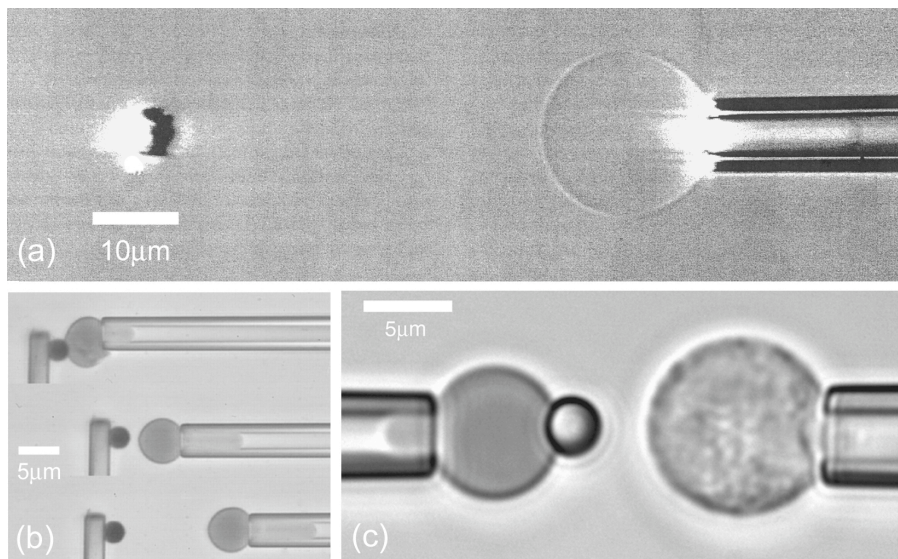


Figure I.6. : Image par vidéo microscopie d'extraction de tubes de membrane comportant une pipette de maintien de la vésicule/cellule et une bille faisant partie d'un capteur de force qui peut être : (a) une pince magnétique (Extrait de (Heinrich et Waugh, 1996)), (b) une microplaque (extrait de (Waugh et al, 2001)), (c) la "Biomembrane Force Probe" (extrait de (Evans et al, 2005)).

L'utilisation de bille pour extraire un tube n'est pas forcément nécessaire (seulement suffisant). En effet, par exemple, une pince optique concentre suffisamment de membrane pour extraire un tube (Powers et al, 2002) (Figure I.7.a). Remarquons que cette technique n'est utilisable que pour des systèmes de tension

## Partie 2 : Tubes de membrane

de membranes extrêmement faible pour permettre l'accumulation de membrane dans le centre du piège. De même, des moteurs moléculaires, des kinésines, liés à la membrane génèrent une force suffisante pour former un tube le long de rail de microtubules (Koster et al, 2003; Roux et al, 2002) (Figure I.7.b). Enfin, lorsqu'une vésicule chargée se meut sur une bicouche chargée inversement, elle laisse des tubes de membrane adhérents sur la surface (Figure I.7.c).

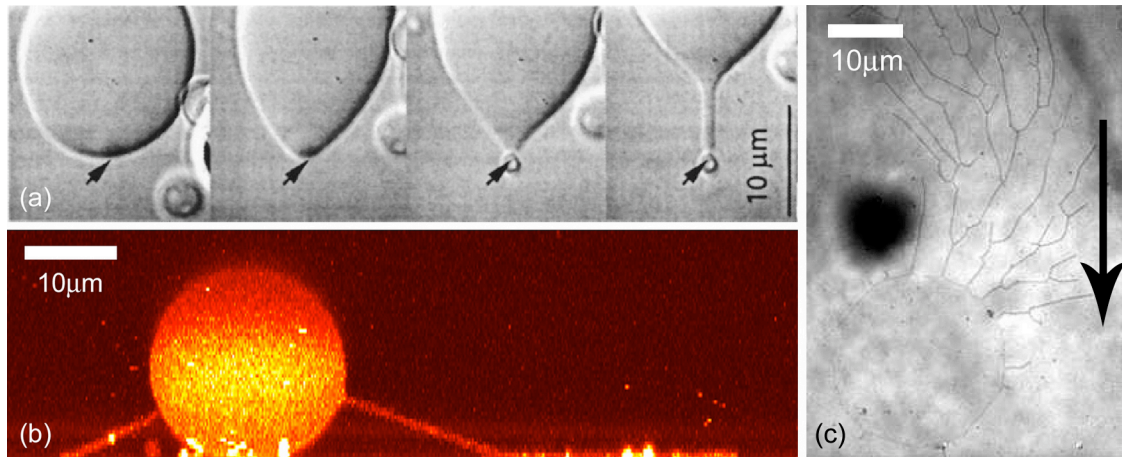


Figure I.7. : Exemples d'extraction de tubes sans utilisation de pipette. (a) Images de vidéo microscopie d'extraction de tubes par pince optique. Le faisceau (flèche noire) concentre la membrane et un tube est extrait lorsque le piège optique est déplacé (Extrait de (Powers et al, 2002)). (b) Vue latérale d'une reconstruction 3D par microscopie confocale d'une vésicule sur un tapis de microtubules. Des tubes y sont formés par des kinésines "marchant" le long de ces rails de polymères (Extrait de (Leduc et al, 2004)). (c) Image par microscopie interférentielle d'une vésicule chargée se déplaçant (suivant la flèche) sur une surface de charge opposée. Après son passage, la vésicule laisse des tubes adhérents sur la surface (Extrait de (Solon, 2004)).

Une autre technique que nous rappellerons au chapitre VI est celle développée par le groupe d'Owe Orwar (Karlsson et al, 2001). Elle consiste à utiliser les pipettes de "patch-clamp" pour construire un réseau de tubes interconnectés à des vésicules. En s'insérant dans une vésicule multilamellaire, la rétraction de la pipette permet d'extraire un tube. En injectant du fluide dans le tube, une nouvelle vésicule, ici unilamellaire, est produite, ceci étant permis par le réservoir de lipide de la vésicule mère. En répétant cette opération, un réseau est établi (Karlsson et al, 2001).

Finalement des tubes de membranes ont aussi été extraits de cellules adhérentes sur des surfaces de verre (Dai et Sheetz, 1995; Dai et Sheetz, 1999). Le but est de sonder la résistance de la membrane à l'extraction de tube ce qui doit permettre de remonter à son association avec le cytosquelette. Dans le cas de ces expériences,

les tubes sont extrudés de manière mécanique, par une contrainte externe, les cellules semblent aussi être aptes à former seules des tubes.

#### **I.4. Les tubes de membranes: objet d'étude pour biophysiciens ou réalité biologique ?**

De nombreuses observations ont montré l'existence de tubes de membrane dans l'environnement cellulaire. Qu'ils soient intra- ou inter-cellulaires, les tubes de membranes cellulaires existent bien et ne sont pas associés à un dérèglement de la cellule.

Les différents compartiments d'une cellule ayant des fonctions distinctes, ils doivent communiquer et échanger de façon permanente des protéines, lipides ou nutriments. Si des intermédiaires de transport vésiculaires ont été découverts relativement tôt avec l'avènement de la microscopie électronique (Ceccarelli et al, 1972), les premières images d'intermédiaires tubulaires ont été observées au niveau des cis- et trans-Golgi (Rambourg et al, 1979). D'autres compartiments sont aussi le lieu de trafic tubulaire, notamment le reticulum endoplasmique (Terasaki et al, 1986) (Figure I.8.a). La dynamique de formation de tubes de membrane a pu être observée in vivo le long de microtubules partant de la membrane du reticulum en marquant par fluorescence la membrane et les microtubules (Waterman-Storer et Salmon, 1998) (Figure I.8.b), sans surexpression de protéine fluorescente. Il a été en effet montré que la surexpression de protéines impliqués dans le transport pouvait entraîner une augmentation de la formation de ces tubes (White et al, 1999). Ces structures tubulaires sont impliquées dans différentes voies de transport intracellulaire. Leur rôle dans le tri des lipides et des protéines, par exemple, est encore débattu.



## Partie 2 : Tubes de membrane

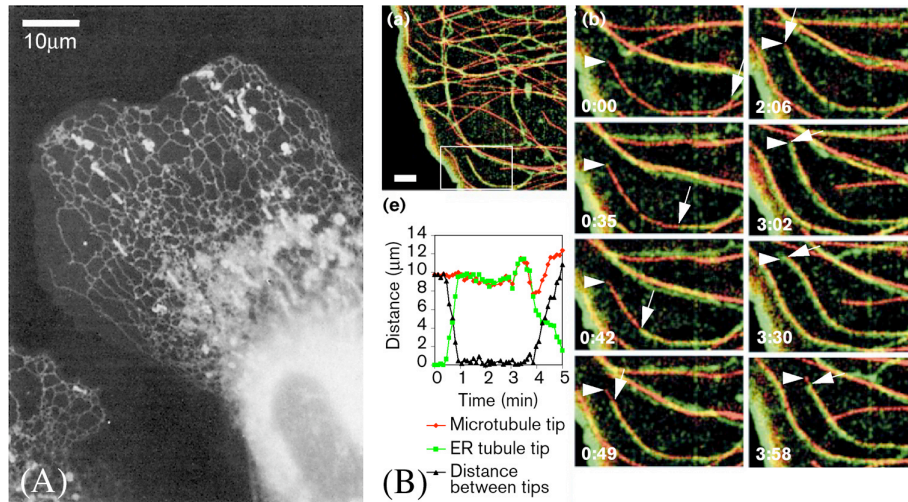


Figure 1.8. : Image par microscopie de fluorescence de tubes de membrane présents dans le reticulum endoplasmique. (a) Observation sur cellule fixée CV-1. La membrane du reticulum est marquée par DiOC<sub>6</sub>. Un large réseau de tubes est distribués suivant le réseau de microtubules (marqué par fluorescence, non montré) (Extrait de (Terasaki et al, 1986)). (b) Croissance d'un tube de membrane(vert) le long de microtubule (rouge). La couleur jaune correspond à la colocalisation du tube et du microtubule. La barre d'échelle représente 5 μm (Extrait de (Waterman-Storer et Salmon, 1998))

Certaines hypothèses concernant la formation des intermédiaires de transport vésiculaires proposent la formation de tubes de membrane avant la fission (Corda et al, 2002) (Figure 1.9.a). Cette fission peut être engendrée soit par coupure spontanée, soit par intervention de protéines de fission, comme la dynamine (Sweitzer et Hinshaw, 1998). Aurélien Roux a montré à partir d'un système modèle de membrane complexe purement lipidique qu'une simple transition de phase dans un tube homogène peut induire une fission (Roux et al, 2005) (Figure 1.9.b).

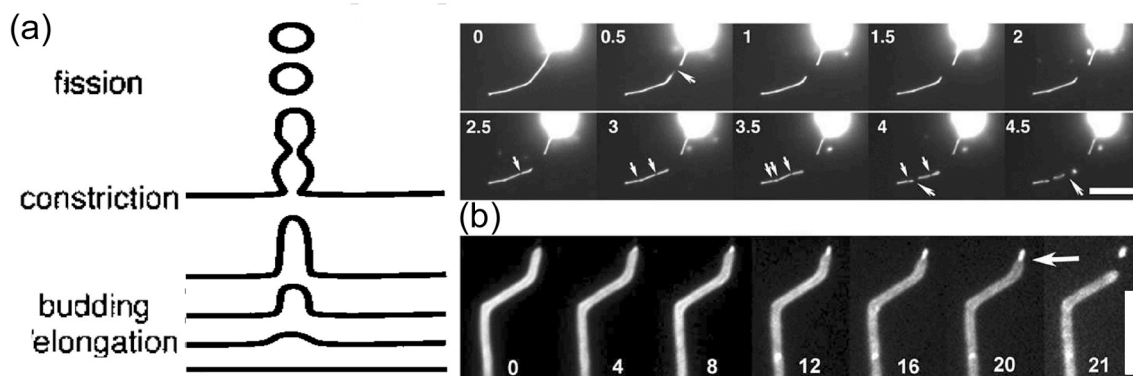


Figure 1.10. : Formation d'intermédiaires de transport vésiculaires via formation de tube de membrane. (a) Schéma des étapes menant à ces intermédiaires (Extrait de (Corda et al, 2002)). (b) Fission de tubes de membrane (flèches blanches) induit par séparation de phase dans des vésicules à trois composants (Cholestérol+DOPC+Sphingomyéline). Les temps sont en secondes et les barres d'échelle représentent 10 μm (Extrait de (Roux et al, 2005)).

Les cellules, comme nous l'avons pu observer dans la partie "adhésion" au chapitre V, sont capables de pousser des tubes vers l'extérieur, les filopodes. Ils sont constitués en grande majorité d'actine polymérisée entourée d'une bicouche lipidique. Ce mécanisme de croissance ne s'effectue pas de l'extérieur du tube mais de l'intérieur du fait de la polymérisation de l'actine et de l'action de moteurs, les myosines. Si un de ces tubes trouve une cellule voisine, une communication peut s'établir entre deux cellules (Rustom et al, 2004) (Figure I.10.).

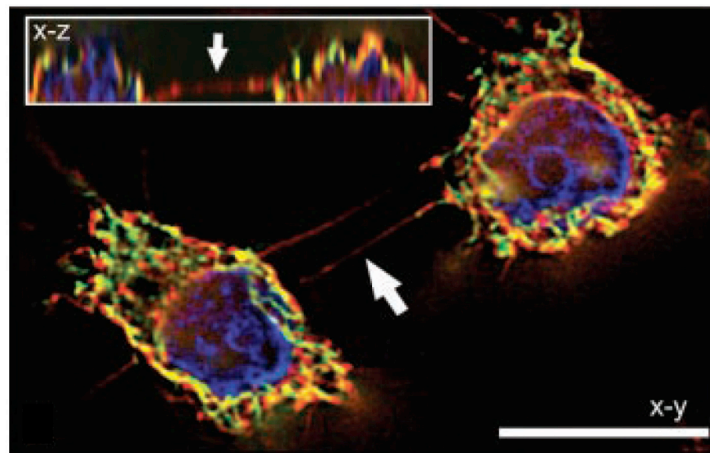


Figure I.10. : Observation d'un tube de membrane (flèche blanche) contenant de l'actine polymérisée (rouge) reliant deux cellules (noyau marqué en bleu et microtubule en vert). L'insert propose une vision latérale des deux cellules d'une reconstruction 3D par microscopie confocale. La barre d'échelle représente 15  $\mu$ m (Extrait de (Rustom et al, 2004)).

Un autre phénomène moins relevant biologiquement mais observable en culture est la formation de tubes de cellule lors de la mitose (Figure I.11). En boîte de culture ou sur un substrat, Lors de l'entrée en mitose d'une cellule adhérente, une réorganisation du cytosquelette se produit, conduisant à l'arrondissement de la cellule, les réseaux d'actine et de microtubules étant plus « souples ». Cependant, la cellule conserve les contacts adhésifs (points focaux), ce qui génère l'extraction d'une multitude de tubes de membrane remplis d'actine. Nous reviendrons au chapitre VI sur l'importance de ces filaments d'actine à l'intérieur des tubes.

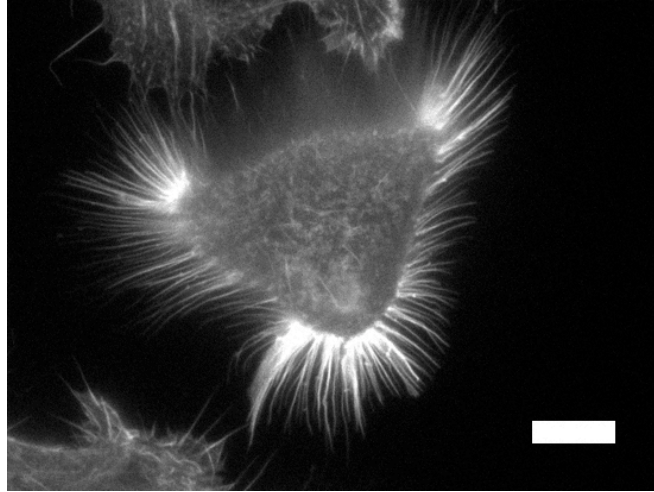


Figure I.11. : Image en microscopie de fluorescence d'une cellule préalablement adhérente sur une surface de verre, entrant dans la phase mitotique. La cellule arrondie extrait des tubes de membrane remplis d'actine fluorescente. La barre d'échelle représente 10  $\mu$ m (Image prise par Manuel Théry, UMR 144, Institut Curie).

## **I.5. Conclusion**

Biologiquement, les tubes de membranes apparaissent comme étant des éléments qui interviennent dans la communication intra et inter cellulaire. Ces tubes ont été étudiés de manière extensive sur de simples bicouches lipidiques à la fois théoriquement et expérimentalement. L'utilisation de cette déformation propre aux membranes permet d'obtenir la rigidité de courbure d'un type unique de lipide, ou intégré à un cytosquelette. L'extraction de tubes permet donc de sonder l'environnement de la membrane. Après avoir décrit notre dispositif expérimental, nous exposerons, dans les chapitres suivants, des expériences d'extraction de tubes de membranes lipidiques qui tenteront de compléter les connaissances sur des tubes uniques mais aussi multiples. Ensuite, nous revisiterons la mécanique et la rhéologie des tubes de globules rouges. Enfin, nous évoquerons un projet qui vient juste de débuter et qui vise à sonder, à l'aide de tubes, la stabilité des cavéoles (petites invaginations impliquées dans l'endocytose et la réparation des membranes) initiées par l'agrégation d'une protéine, la cavéoline.

## Bibliographie : Chapitre I

- Bozic B, Svetina S, Zeks B et Waugh RE, 1992.  
Role of the lamellar membrane structure in tether formation from bilayer vesicles.  
*Biophysical Journal*,61:963-973.
- Ceccarelli B, Hulburt W et Mauro A, 1972.  
Depletion of vesicles from frog neuromuscular junctions by prolonged tetanic stimulation.  
*Journal of Cell Biology*,54:30.
- Conrad D, Carcedo CH, Bonazzi M, Luini A et Spano S, 2002.  
Molecular aspects of membrane fission in the secretory pathway.  
*Cellular and Molecular Life Sciences*,59:1819.
- Cuvelier D, Derényi I, Bassereau P et Nassoy P, 2005.  
Coalescence of membrane tethers : experiments, theory, and applications.  
*Biophysical Journal*,88:2714-2726.
- Dai J et Sheetz MP, 1995.  
Mechanical properties of neuronal growth cone membranes studied by tether formation with laser optical tweezers.  
*Biophys. J.*,68:988-996.
- Dai J et Sheetz MP, 1999.  
Tether formation from blebbing cells.  
*Biophysical Journal*,77:3363–3370.
- Derényi I, Jülicher F et Prost J, 2002a.  
Erratum : Formation and Interaction of Membrane Tubes.  
*Physical Review Letters*,89:209901.
- Derényi I, Jülicher F et Prost J, 2002b.  
Formation and Interaction of Membrane Tubes.  
*Physical Review Letters*,88:238101.
- Evans E, 1973.  
New membrane concept applied to the analysis of fluid shear and micropipet deformed red blood cells.  
*Biophysical Journal*,13:941-954.
- Evans E, Heinrich V, Leung A et Kinoshita K, 2005.  
Nano- to Microscale Dynamics of P-Selectin Detachment from Leukocyte Interfaces. I. Membrane Separation from the Cytoskeleton.  
*Biophysical Journal*,88:2288-2298.

## Partie 2 : Tubes de membrane

- Evans E et La Celle PL, 1975.  
Intrinsic material properties of the erythrocyte membrane indicates by mechanical analysis of deformation.  
*Blood*,45:29-43.
- Evans E, Waugh RE et Melnik L, 1976.  
Elastic area compressibility modulus of red cell membrane.  
*Biophysical Journal*,16:585-595.
- Evans E et Yeung A, 1994.  
Hidden dynamics in rapid changes of bilayer shape.  
*Chemistry and Physics of Lipids*,73:39-56.
- Heinrich V, Leung A et Evans E, 2005.  
Nano- to Microscale Dynamics of P-Selectin Detachment from Leukocyte Interfaces. II. Tether Flow Terminated by P-Selectin Dissociation from PSGL-1.  
*Biophysical Journal*,88:2299-2308.
- Heinrich V et Waugh RE, 1996.  
A piconewton force transducer and its application to measurement of the bending stiffness of phospholipid membranes.  
*Annals of Biomedical Engineering*,24:595-605.
- Hochmuth RM, Mohandas N et Blackshear PL, 1973.  
Measurement of the Elastic Modulus for Red Cell Membrane Using a Fluid Mechanical Technique.  
*Biophysical Journal*,13:747-762.
- Hochmuth RM, Wiles HC, Evans EA et McCown JT, 1982.  
Extensional flow of erythrocyte membrane from cell body to elastic tether. II. Experiment.  
*Biophysical Journal*,39.
- Karlsson A, Karlsson R, Karlsson M, Cans AS, Stromberg A, Ryttsen F et Orwar O, 2001.  
Networks of nanotubes and containers.  
*Nature*,409:150-152.
- Koster G, VanDuijn M, Hofs B et Dogterom M, 2003.  
Membrane tube formation from giant vesicles by dynamic association of motor proteins.  
*Proceedings of the National Academy of Science U.S.A.*,100:15583–15588.
- Leduc C, Campas O, Zeldovich C, Roux A, Jolimaitre P, Bourel-Bonnet L, Goud B, Joanny JF, Bassereau P et Prost J, 2004.  
Cooperative extraction of membrane nanotubes by molecular motors.  
*Proceedings of the National Academy of Science U.S.A.*,101:17096-17101.

- Powers TR, Huber G et Goldstein RE, 2002.  
Fluid-membrane tethers: Minimal surfaces and elastic boundary layers.  
*Physical Review E*,65:041901.
- Rambourg A, Clermont Y et Hermo L, 1979.  
Three dimensional architecture of the Golgi apparatus in Sertoli cells of the rat.  
*American Journal of Anatomy*,154:455.
- Raphael RM et Waugh RE, 1996.  
Accelerated inter-leaflet transport of phosphatidylcholine molecules in membranes under deformation.  
*Biophysical Journal*,71:1374.
- Rossier O, Cuvelier D, Borghi N, Puech PH, Derényi I, Buguin A, Nassoy P et Brochard-Wyart F, 2003.  
Giant Vesicles under Flows: Extrusion and Retraction of Tubes.  
*Langmuir*,19:575-584.
- Roux A, Capello G, Cartaud J, Prost J, Goud B et Bassereau P, 2002.  
A minimal system allowing tubulation using molecular motors pulling on giant liposomes.  
*Proceedings of the National Academy of Science U.S.A.*,99:5394-5399.
- Roux A, Cuvelier D, Nassoy P, Prost J, Bassereau P et Goud B, 2005.  
Role of curvature and phase transition in lipid sorting and fission of membrane tubules.  
*EMBO Journal*:publié on-line.
- Rustom A, Saffrich R, Markovic I, Walther P et Gerdes H-H, 2004.  
Nanotubular Highways for Intercellular Organelle Transport.  
*Science*,303:1007-1010.
- Solon J, 2004.  
Interactions entre membranes lipidiques chargées : instabilités, déformations et mouvement.  
Paris: Université de Paris VI.
- Svetina S, Zeks B, Waugh RE et Raphael RM, 1998.  
Theoretical analysis of the effect of the transbilayer movement of phospholipid molecules on the dynamic behavior of a microtubule pulled out of an aspirated vesicle.  
*European Biophysics Journal*,27:197-209.
- Sweitzer SM et Hinshaw JE, 1998.  
Dynamin undergoes a GTP-dependent conformational change causing vesiculation.  
*Cell*,93:1021-1029.
- Terasaki M, Chen LB et Fujiwara K, 1986.

## Partie 2 : Tubes de membrane

Microtubules and the endoplasmic reticulum are highly interdependent structures.

*Journal of Cell Biology*,103:1557.

Waterman-Storer C et Salmon E, 1998.

Endoplasmic reticulum membrane tubules are distributed by microtubules in living cells using three distinct mechanisms.

*Current Biology*,8:798.

Waugh RE, 1982.

Surface viscosity measurements from large bilayer vesicle tether formation.

*Biophysical Journal*,38:19-37.

Waugh RE, Mantalaris A, Bauserman RG, Hwang WC et Wu JHD, 2001.

Membrane instability in late-stage erythropoiesis.

*Blood*,97:1869-1875.

White J, Johannes L, Mallard F, Girod A, Grill S, Reinsch S, Keller P, Tzschaschel B, Echard A, Goud B et Stelzer EHK, 1999.

Rab6 coordinates a novel Golgi to ER retrograde transport pathway in live cells.

*Journal of Cell Biology*,147:743-760.

# Chapitre II

## Pince optique et micromanipulation

Depuis une quinzaine d'années, le nombre de constructions de pinces optiques et d'articles publiés utilisant leurs applications a considérablement augmenté. Une pince optique est obtenue simplement en focalisant un faisceau laser à l'aide d'un objectif de microscope. Une grande variété d'expériences, allant du simple positionnement d'une particule jusqu'à une mesure sophistiquée de force, peut être accomplie à l'aide de ce dispositif. Nous rappellerons dans ce chapitre le principe du piégeage optique et l'origine des forces engendrées. Ensuite, nous détaillerons plus particulièrement le système expérimental que nous avons utilisé et qui consiste en une pince optique fixe couplée à un système de micromanipulation par micropipette.

### II.A. Construction d'une pince optique adaptée

#### II.A.1. Rappels théoriques et expérimentaux

##### II.A.1.a. La pince optique est un micromanipulateur.

Les pinces optiques utilisent les propriétés de la lumière pour piéger des particules diélectriques. Les forces mises en jeu sont les forces reliées à la pression de radiation d'un faisceau de lumière,  $F_s$  et les forces dues au gradient de champ électrique,  $F_g$ . Historiquement, Ashkin a été le premier à déplacer des objets à l'aide d'un faisceau laser (Ashkin, 1970) puis à les faire léviter en utilisant les effets de pression de radiation (Ashkin et Dziedzic, 1971). L'étude de ces interactions peut être divisée en deux régimes, dépendant de la taille de la particule comparée à la longueur d'onde utilisée pour la pince. Lorsque les dimensions de la particule sont



## Partie 2 : Tubes de membranes

inférieures (resp. supérieures) à la longueur d'onde utilisée, nous parlons du régime de Rayleigh (resp. Mie).

Puisque les applications des pinces optiques qui nous concerneront plus particulièrement sont en rapport avec des objets biologiques ou des particules de taille micrométrique ou supérieure, nous focaliserons la discussion qui suit sur le régime de Mie. Le modèle suppose les particules diélectriques transparentes à la lumière incidente, avec un indice de réfraction plus important que celui du milieu environnant. De plus, pour simplifier la présentation, les particules seront supposées sphériques.

Lorsque la lumière est focalisée à l'intérieur de la particule, deux types de force agissent sur elle. La première,  $F_s$ , résulte de la réflexion des photons sur la surface de la particule, poussant la particule à s'éloigner de la source de lumière. La seconde force,  $F_g$ , résulte de la réfraction de la lumière à travers la particule. Pour un objet sphérique, ces forces rappellent la particule vers les zones de fort gradient, c'est-à-dire, au point de focalisation du faisceau laser. La figure II.1 schématise les interactions agissant sur une bille au centre d'un piège optique. Dans le régime de Mie, l'action « pince optique » peut être comprise simplement en traçant les rayons de lumière réfléchis et réfractés par la bille.

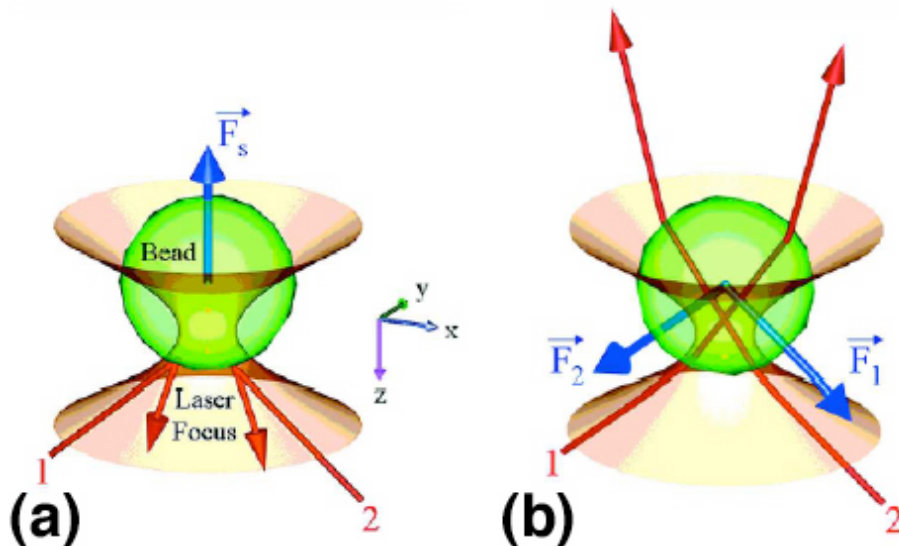


Figure II.1. : (a) Effet de la force due à la pression de radiation sur une bille. La force globale tend à soulever la bille dans la direction verticale. (b) Effet de la force due à la réfraction des faisceaux incidents. La force globale tend à ramener la bille au centre du piège.

Pratiquement, nous utilisons comme source un laser avec un faisceau gaussien. Que se passe-t-il lorsqu'un objet sphérique s'écarte du centre du faisceau? Si nous traçons deux rayons d'énergie différente (figure II.2.) traversant une bille, une force tend à ramener l'objet vers les zones de champ les plus fortes.

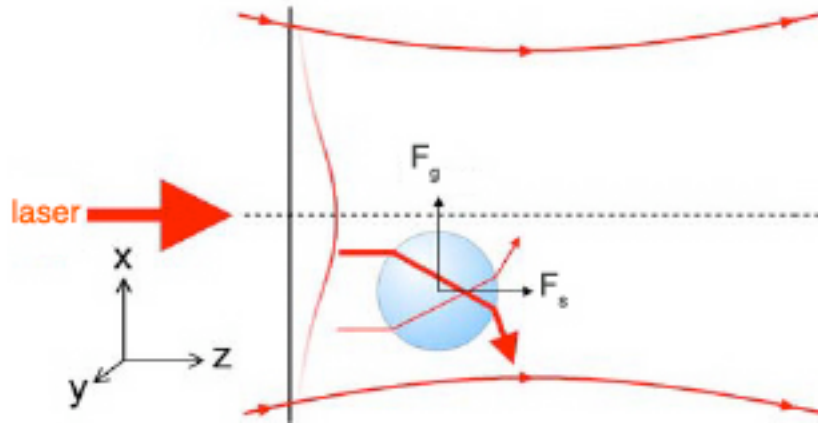


Figure II.2. : Visualisation des forces agissant sur une bille écartée du centre du faisceau laser.

Il est à noter que les forces de gradient peuvent l'emporter sur les forces dues à la pression de radiation si le gradient appliqué est suffisamment fort. Dans la pratique, l'effet de gradient est contrôlé par deux phénomènes, l'allure gaussienne du faisceau et la focalisation du faisceau par l'objectif. On remarquera aussi que la focalisation sera d'autant plus efficace que l'objectif sera de plus fort grossissement.

### II.A.1.b. La pince optique est un capteur de force.

Le puits de potentiel énergétique dans lequel se trouve la bille piégée peut être décrit en première approximation par un profil harmonique. Il s'en suit que la force de rappel agissant sur la bille est proportionnelle au déplacement de la bille. Le piège optique peut donc être décrit par une constante de raideur  $K$ . Si la bille s'écarte de  $\Delta X$  du centre du piège (Figure II.3.), la force de rappel s'écrit :

$$F = K \Delta X$$

II.1.

## Partie 2 : Tubes de membranes

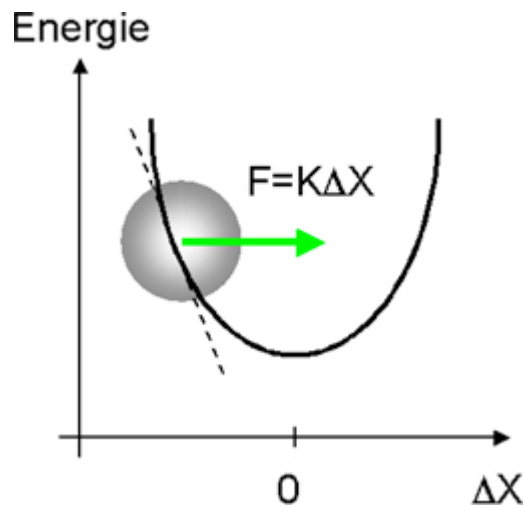


Figure II.3. : Schéma d'une bille dans le puits de potentiel défini par le piège optique. Lorsque la bille s'écarte du minimum d'énergie, une force de rappel définie par la pente du potentiel d'énergie tend à la ramener au centre.

Plusieurs facteurs agissent sur la raideur  $K$  du piège. Le premier est la puissance  $P_{\text{laser}}$  du laser utilisé.  $K$  est proportionnel à  $P_{\text{laser}}$ . D'autres paramètres interviennent de manière moins triviale. Le passage à une bille plus grande, à une différence d'indice entre le milieu et la bille plus petite, ou à une ouverture numérique de l'objectif plus petite, induisent une raideur plus faible de la pince optique. Dans nos expériences, seule la puissance du laser a été modifiée. La détermination de la constante de raideur sera discutée dans le paragraphe "calibration" (II.2.c.). Pour une discussion complète de ces effets et une revue générale des pinces optiques, on pourra se reporter à (Sheetz, 1998).

La gamme des forces accessibles pour un piège optique est typiquement comprise entre 0.2pN et 200pN. Nous verrons que cette gamme est en effet bien adaptée aux expériences effectuées. Pour information, nous indiquons, dans le tableau II.1, les gammes de force des différents capteurs de force qui sont couramment utilisés.

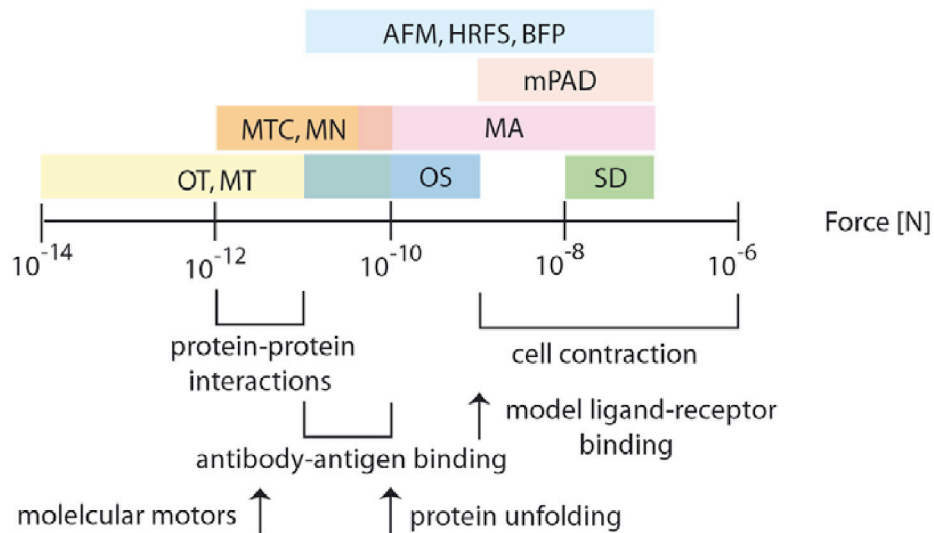


Tableau II.1. : Récapitulatif de l'ensemble de la gamme de forces produites par différentes techniques comparée à la gamme de force d'événements biologiques. De la plus petite force produite ou détectée à la plus importante, sont représentées les pinces optiques (OT : "Optical Tweezer") et magnétiques, (MT : "Magnetic Tweezer"), les micro-pointes (MN : "Micro Needle") et les cytomètres de torsion magnétiques (MTC : "Magnetic Twisting Cytometry"), la microscopie à force atomique (AFM : "Atomic Force Microscopy", HRFSs : "High Resolution Force Spectroscopy") et la "Biomembrane Force Probe" (BFP), les étireuses optiques (OS : "Optical Stretcher"), les pipettes d'aspiration (MA : "Micropipette Aspiration"), les pilotes d'élastomère (mPAD : "microfabricated Post Array Detector"), et les substrats homogènes déformables (SD : "Substrate Deformation"). Extrait de (Van Vliet et al, 2003)

Notre choix d'un piège optique s'est fondé essentiellement sur l'encombrement faible au niveau du statif du microscope. En effet, nous verrons par la suite qu'une micropipette, et parfois deux, ont été installées sur notre microscope.

### II.A.1.c. Réalisation pratique d'un piège optique

Matériellement, la construction d'une simple pince optique nécessite un laser, des miroirs optiques, et un objectif de grande ouverture numérique. Le choix du laser, sa puissance et la longueur d'onde émise sont guidés par le type d'expériences qu'on souhaite réaliser. Tout d'abord, la puissance laser généralement utilisée est de l'ordre du watt suivant la gamme et la précision de force voulues. Grossièrement, une puissance de 1W permet de sonder une gamme de force de 1pN à 50pN. Le choix de la longueur d'onde est plus subtil et fait intervenir un phénomène pas encore mentionné qu'est l'échauffement du milieu au point de focalisation. Dans les manipulations d'objets biologiques, il convient d'utiliser une longueur d'onde adéquate afin de minimiser l'absorption de l'objet piégé ou du milieu

## Partie 2 : Tubes de membranes

environnant (eau, protéines...). Les lasers émettant dans l'infrarouge ( $\lambda=1064$  nm) pallient à ce problème si le milieu extérieur est aqueux (Svoboda et Block, 1994). Il est à noter que la focalisation même du faisceau laser induit un échauffement du milieu de l'ordre de  $3^\circ/100\text{mW}$  pour des lasers infra-rouge au niveau du point de focalisation en tenant compte de la présence d'une bille de polystyrène de  $2\mu\text{m}$  (Peterman *et al*, 2003).

Afin de garantir une bonne couverture de la pupille arrière de l'objectif par le faisceau, un jeu de deux lentilles est utilisé pour étendre le faisceau. De plus, ces lentilles permettent de rendre parallèle le faisceau laser et donc d'obtenir le point de focalisation dans le plan de visualisation du microscope. Les miroirs sont placés de telle sorte que le faisceau suive l'axe optique de l'objectif. Toutes ces optiques sont traitées à la longueur d'onde du laser pour diminuer les pertes de puissance.

Dans la majorité des cas, l'objectif est à la fois utilisé pour le piège optique et la visualisation. Comme nous l'avons déjà mentionné, il est préférable d'utiliser un objectif de grande ouverture numérique ( $\text{N.A.}>1.2$ ) pour garantir un bon piégeage. Toutefois, les lentilles internes de l'objectif n'ayant pas de traitement spécifique, la principale source de perte de puissance de la pince a lieu au niveau de l'objectif.

La figure II.4 montre le schéma de principe minimal permettant la mise en place d'un piège optique. Dans ce cas, le piège est fixe par rapport au microscope.

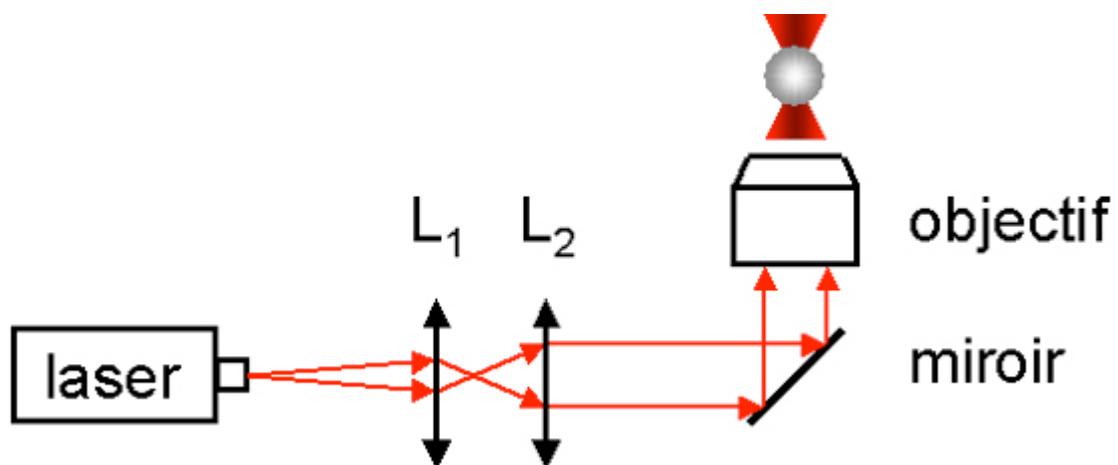


Figure II.4. : Schéma d'un piège optique simple. Les lentilles L1 et L2 permettent de corriger la divergence du faisceau laser et d'agrandir celui-ci.

Des montages plus complexes ont été ensuite imaginés et réalisés. Un déflecteur acousto-optique peut dévier le faisceau laser par rapport à l'axe optique. Cette déviation implique un mouvement du centre du piège dans le plan de

focalisation du microscope (figure II.5.). Ainsi, un piège mobile peut être réalisé. De plus, si ce changement s'effectue plus rapidement que le temps de diffusion de la bille piégée et alternativement, le piège se dédouble et, alors, deux billes peuvent être captées. Des miroirs parallèles actionnés par des galvanomètres est une alternative moins rapide (mais moins coûteuse) au déflecteur. Le groupe de David Grier a quant à lui développé des pièges multiples (HOT : "Holographic Optical Tweezer") en plaçant un élément de diffraction représentant l'image du piège dans le plan réciproque de Fourier afin d'obtenir l'image réelle au niveau de la chambre d'observation (Dufresne et D., 1998).

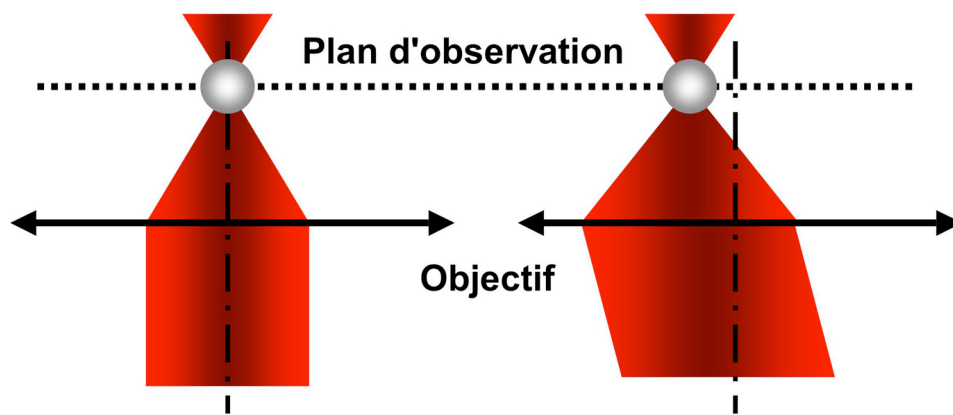


Figure II.5. : Principe de déplacement du piège optique dans le plan d'observation. Le déplacement du piège optique dans le plan d'observation s'effectue en déviant le faisceau par rapport à l'axe optique.

### II.A.1.d. Quelques applications des pinces optiques en biologie et biophysique

Les pinces optiques ont permis diverses applications dans différents domaines. Premièrement un piège optique peut être utilisé comme un simple manipulateur d'objets uniques. Il est possible, par exemple, de tenir un seul microtubule (Felgner et al, 1997), mais également des asters de microtubules comme cela a été réalisé dans le groupe de Marileen Dogterom, qui a pu montrer à l'aide de ce dispositif le rôle de dépolymérisation soudaine des microtubules dans le positionnement de ces asters dans un système confiné (Faivre-Moskalenko et Dogterom, 2002).

La focalisation du faisceau engendrant une énergie importante peut servir de ciseaux optiques ce qui a permis par exemple, de détruire sélectivement des organelles intracellulaires (Khodjakov et al, 1997).

## Partie 2 : Tubes de membranes

Les pinces optiques mesurent aussi des forces moléculaires de l'ordre du pN. De nombreuses manipulations de molécules uniques ont été réalisées afin de sonder l'interaction entre biomolécules ; comme l'interaction protéine-ADN (Gijs et al, 2000), antigène-anticorps fixés sur un substrat (Stout, 2001), cadhérine-cadhérine directement sur la cellule (Baumgartner et al, 2003). Nous pouvons citer en particulier le système de d'Heslot et al., dont le montage a une résolution de l'ordre de 0.1pN (Bockelmann et al, 2004). Le déplacement de moteur moléculaire comme pour la kinésine (Svoboda et al, 1993) ou pour le moteur du flagelle d'*Escherichia coli* peut être suivi précisément avec un dispositif ayant de telles performances (Berry et Berg, 1997).

L'application de forces est une autre possibilité permettant d'obtenir des informations mécaniques et rhéologiques. On peut ainsi, à l'aide d'une pince optique, traîner une particule fixée à une protéine transmembranaire (Tomishige et al, 1998), étirer un globule rouge (Sleep et al, 1999) ou un unique filament de titine (Leake et al, 2004).

Pour terminer par une note ludique cette revue très partielle des applications des pinces optiques, le groupe de Christoph Schmidt a développé à ma connaissance le plus petit jeu de Tetris (25x25µm) au monde à partir d'un piège multiple utilisant des billes de 1µm (voir [www.nat.vu.nl/compl/](http://www.nat.vu.nl/compl/)).

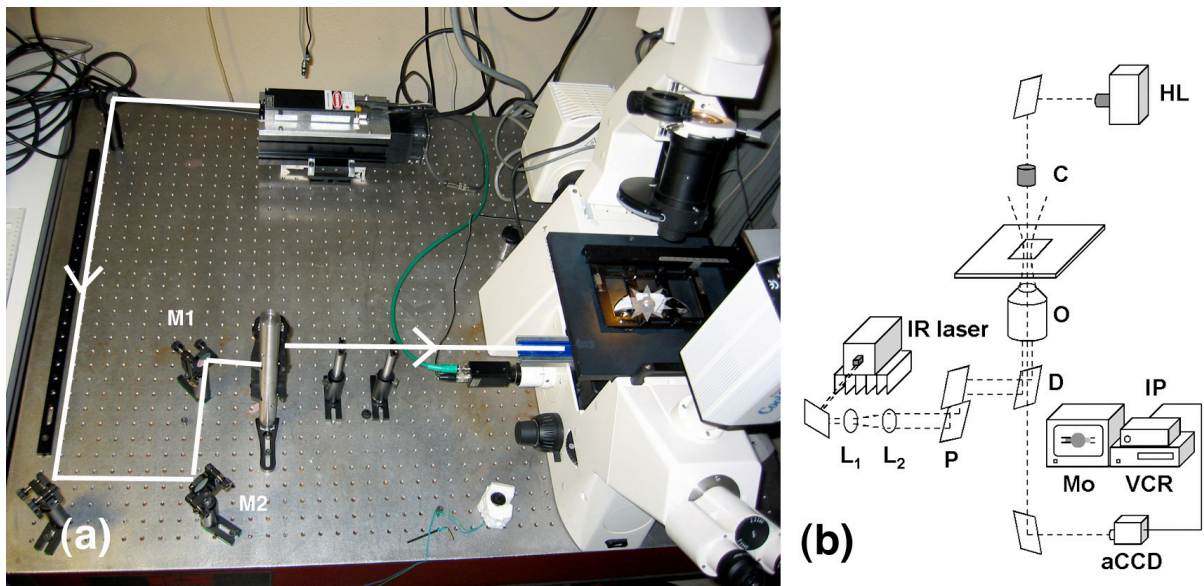
## II.A.2. Notre pince optique

### II.A.2.a. Dispositif expérimental : piège unique et fixe

Pour nos expériences, nous avons choisi de construire un piège unique et fixe. Le montage expérimental final est montré sur la photographie de la figure II.6.a et sur le schéma de la figure II.6.b. Le laser (Coherent), qui émet dans le proche infrarouge ( $\lambda=1064$  nm), est de puissance variable (0.01W à 2.5W). Le faisceau émis diverge avec un angle de  $2 \cdot 10^{-3}$  rad. Il est corrigé et agrandi par une paire de lentilles ( $L_1=+30$ mm et  $L_2=+100$ mm) montées en télescope. Les lentilles sont traitées pour l'infrarouge. Une série de miroirs permet de diriger le faisceau et le périscope surélève l'axe optique dans le but de faire entrer le faisceau dans le microscope



(Axiovert 200, Zeiss). A l'intérieur du microscope, une pièce supplémentaire a été fabriquée et ajoutée pour pouvoir adapter un miroir chaud (Melles Griot) sur le chemin optique de l'objectif, dans l'emplacement prévu pour un analyseur tournant, et ceci afin de permettre à la fois la visualisation et le piégeage de bille. L'objectif utilisé pour le piégeage est un x100 Neofluar (ouverture numérique=1.3). Les miroirs M1 et M2 sont utilisés pour dévier le faisceau de l'axe optique pour placer à notre convenance le piège dans le champ de visualisation.



L'alignement de la pince s'effectue dans un premier temps avec une carte sensible à l'infra-rouge. Pour un réglage plus fin, nous avons choisi d'utiliser une propriété des caméras CCD, qui est leur grande sensibilité aux infrarouges. Ainsi, la condition pour régler notre piège est d'obtenir un faisceau homogène dans le plan de focalisation. La figure II.7.a montre le faisceau dissymétrique suivant l'axe Y alors que la figure II.7.b montre un faisceau plus homogène.



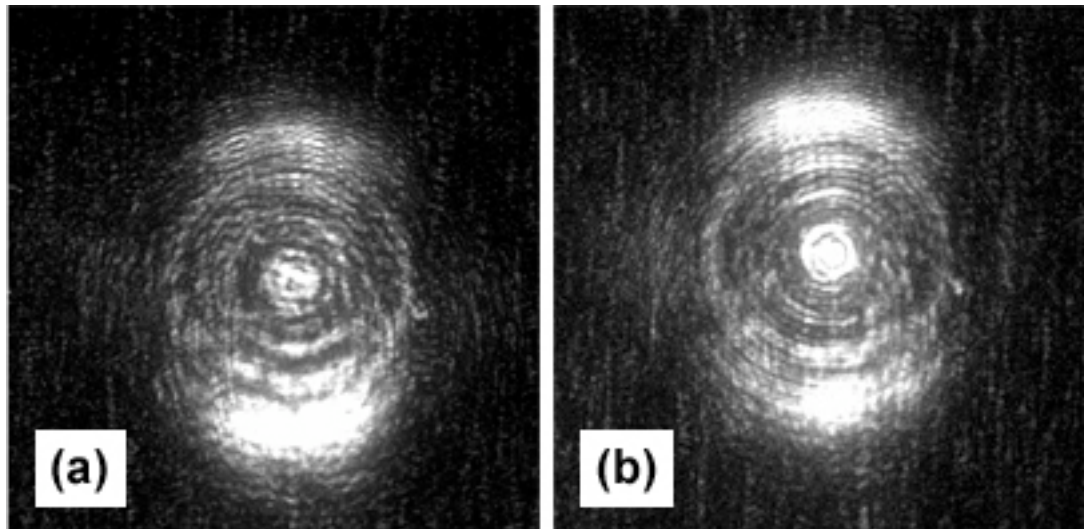


Figure II.7. : Image du faisceau laser prise par une caméra numérique (HQ, Ropper). (a) Cas d'un faisceau non parallèle à l'axe optique (axe perpendiculaire au plan de d'observation). (b) Cas d'un faisceau laser parallèle.

### II.A.2.b. Choix de la méthode de mesure de force

Si l'on connaît la raideur de la pince, la mesure de force exercée sur la bille piégée est obtenue en suivant le déplacement relatif de la bille par rapport au centre du piège optique. Classiquement, deux solutions sont proposées pour la détection du mouvement de la particule : la première est basée sur la simple visualisation de la bille par vidéo microscopie tandis que la seconde repose sur l'utilisation d'une photodiode. Dans cette dernière méthode, l'image de la bille est projetée sur une diode quatre-quadrants via un système de miroirs et de lentilles. Chacun des quatre quadrants convertit l'intensité lumineuse en un signal électrique. Des valeurs proportionnelles aux déplacements  $\Delta X$  et  $\Delta Y$  de la bille par rapport au centre sont obtenues en effectuant des opérations arithmétiques à partir des quatre zones via un circuit électronique et en amplifiant le signal de sortie.

Les avantages de la méthode de détection par photodiode sont la précision de la mesure de déplacement (de l'ordre de 0.1nm) et la vitesse d'acquisition. Ainsi, des dynamiques de l'ordre de quelques centaines de kHz peuvent être étudiées (Bockelmann *et al*, 2004; Gijs *et al*, 2000). Cependant, nos études portent sur des dynamiques plutôt lentes, inférieures au Hz en général. De plus, dans la plupart des expériences, nous avons ajouté une micropipette, dont les vibrations sont déjà supérieures au nanomètre. Pour ces deux raisons, il nous a semblé inutile d'implémenter une détection par photodiode.

Partant de cette constatation, nous avons préféré suivre le déplacement de la bille par vidéo microscopie. Pour cela, nous avons toujours opéré de la façon suivante. Dans un premier temps, une séquence d'images de la bille piégée est capturée par une caméra analogique (Sony, XC-ST70CE) ; le contraste est amplifié par un processeur d'images (Argus, Hammamatsu) ; les images sont enregistrées à l'aide d'un magnétoscope (Sony, SVO-9500MDP). Dans un deuxième temps, « hors-ligne », cette série d'images est numérisée à l'aide d'une carte video (Scion LG3) puis traitée par un logiciel donnant les coordonnées de la bille à tout moment. Celui-ci a été conçu au laboratoire par Konstantin Zeldovich. Le principe est de seuiller l'image de l'ensemble de la bille et d'en déterminer son centre de gravité, pour chaque image. La résolution spatiale obtenue ainsi est de l'ordre de 30nm (i.e. meilleure que la taille du pixel). Au final, nous sommes limités par la cadence vidéo, c'est-à-dire, à des dynamiques ayant des fréquences caractéristiques inférieures à 25Hz.

A ce niveau, il ne reste plus qu'à connaître la raideur du piège,  $K$ , pour obtenir la force.

### II.A.2.c. Calibration

La calibration d'une pince optique peut s'effectuer de différentes manières : soit en mesurant les fluctuations de la bille piégée sans action de force extérieure, soit en mesurant le déplacement relatif de la bille du centre, lorsqu'une force extérieure connue est appliquée (Bockelmann *et al*, 2004; Sheetz, 1998; Soni *et al*, 2002).

#### II.A.2.c.i. Mesure des fluctuations

A une puissance donnée, en supposant l'harmonicité du piège optique, la bille fluctue à l'intérieur du piège sans force extérieure. L'amplitude des fluctuations ne dépend que de la viscosité du milieu  $\eta$ . Le spectre des fluctuations de position de la bille est alors assimilable à une lorentzienne. La fréquence de coupure caractéristique  $\omega_c$  est directement donnée par l'expression suivante  $\omega_c = \frac{K}{6\eta R}$  où  $R$  est le rayon de la bille. Connaissant  $\omega_c$ ,  $K$  est directement déterminée.

## Partie 2 : Tubes de membranes

Cette technique est abondamment utilisée pour les systèmes munis d'un détecteur de position de type diode quatre quadrants, car la gamme de fréquence accessible va jusqu'au MHz, sachant que les fréquences de coupure communément obtenues sont de l'ordre d'une centaine de Hz pour les puissances laser communément utilisées.

Dans notre cas, nous sommes limités à 25Hz ; il n'est donc pas possible d'atteindre la fréquence de coupure. Cependant, pour de faibles puissances de laser, nous sommes encore sensibles aux fluctuations de la bille. Le théorème d'équipartition relie la moyenne quadratique des fluctuations  $\langle \Delta r^2 \rangle$ , la raideur K et l'énergie thermique  $k_B T$  par :

$$\frac{1}{2} K \langle \Delta r^2 \rangle = \frac{1}{2} k_B T \quad \text{II.2}$$

Ainsi, K peut être déterminée en fonction de la puissance laser incidente P. Le graphe de la figure II.8. montre une dépendance linéaire de K en fonction de P jusqu'à 160mW (pente :  $K_P = 0.055 \text{ pN/nm/W}$ ), puis une saturation à partir de 160mW. A ces puissances élevées, les fluctuations de la bille dues au piégeage sont plus faibles que celles dues aux bruits de manipulation (cadence vidéo, bruit du magnétoscope...). Toutefois, en supposant que la linéarité de la raideur de la pince avec P est conservée sur toute la gamme de puissances laser, nous pouvons extrapoler la valeur trouvée dans la gamme de puissances faibles. Cependant, on peut anticiper que cette méthode est peu précise car, à ces faibles puissances de calibration, la stabilité du faisceau est moins bonne, ce qui peut engendrer des problèmes de répétabilité.

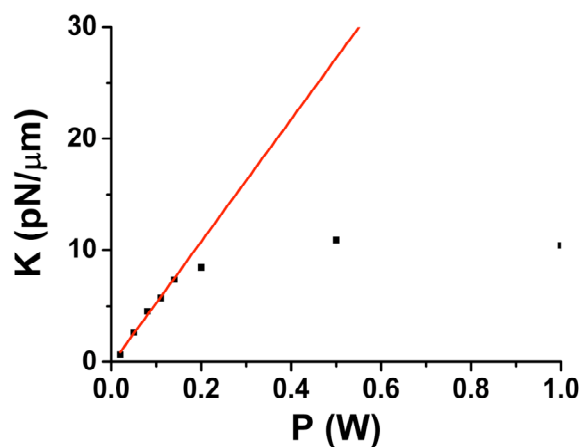


Figure II.8. : Variation de la constante de raideur du piège optique en fonction de la puissance du laser. La valeur de la pente pour des puissances inférieures à 160mW vaut  $55 \text{ pN/nm/W}$ .

De plus, il est à noter que cet étalonnage est effectué dans les directions X et Y, combinées. Qu'en est-il de la raideur du piège dans chaque direction X et Y ? Nous définissons un déplacement  $\Delta r$  de la bille du centre du piège par les coordonnées cartésienne  $\Delta X$  et  $\Delta Y$ . Pour une puissance P donnée, la force total  $F_{bille}$  s'écrit à partir de ses composantes  $F_{bille,X}$  et  $F_{bille,Y}$ , les forces s'exerçant respectivement sur la bille suivant l'axe X et Y (Figure II.9.)  $F_{bille} = \sqrt{F_{bille,X}^2 + F_{bille,Y}^2}$  soit  $F_{bille} = \sqrt{(K_{P,X} \cdot P \cdot \Delta X)^2 + (K_{P,Y} \cdot P \cdot \Delta Y)^2}$  où  $K_{P,X} \cdot P$  et  $K_{P,Y} \cdot P$  sont les raideurs du piège suivant les axes X et Y, pour une puissance P.

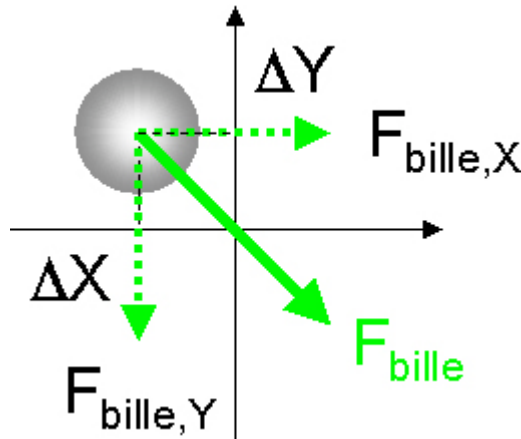


Figure II.9. : Force de rappel de la bille dans une direction quelconque. La force globale est déterminée par les raideurs  $K_X$  et  $K_Y$  suivant les axes respectifs X et Y.

Pour un faisceau laser à section circulaire homogène, nous pouvons supposer que la raideur ne change pas quelle que soit la direction de sollicitation dans le plan d'observation et  $F_{bille}$  s'écrit comme :

$$F_{bille} = K_P \cdot P \sqrt{\Delta X^2 + \Delta Y^2} = K_P \cdot P \Delta r \quad \text{II.3.}$$

Pour un faisceau à section elliptique, il convient d'étalonner le piège dans deux directions. Dans notre cas, les raideurs  $K_X$  et  $K_Y$  se sont révélées équivalentes ( $K_X=0.07\text{pN/nm/W}$  et  $K_Y=0.065\text{pN/nm/W}$ ). Il est donc important de vérifier la forme quasi circulaire du faisceau laser en début d'expérience. Les méthodes utilisées dans la suite déterminent la valeur de la constante de raideur dans une seule direction. Nous verrons dans le chapitre V l'importance de l'expression II.3, car l'action de la force ne s'appliquera pas dans une seule direction.

## Partie 2 : Tubes de membranes

Les méthodes de calibration de pince optique suivantes reposent sur la mesure du déplacement relatif de la bille lors de l'application d'une force extérieure contrôlée. La manière la plus commune d'appliquer une force extérieure sur bille sans perturber son environnement est l'utilisation d'un flux hydrodynamique. Ainsi la force agissant sur la bille dans un liquide de viscosité connue  $\eta$  est la force visqueuse donnée par la formule de Stokes:

$$F_{\text{visqueuse}} = 6\eta Rv \quad \text{II.4.}$$

où  $v$  est la vitesse du fluide au niveau de la bille (figure II.10.). Le bilan des forces agissant sur la bille est alors donné par :  $F_{\text{visqueuse}} = F_{\text{piège}}$

soit

$$K = \frac{6\eta Rv}{\eta X} \quad \text{à une puissance donnée} \quad \text{II.5.}$$

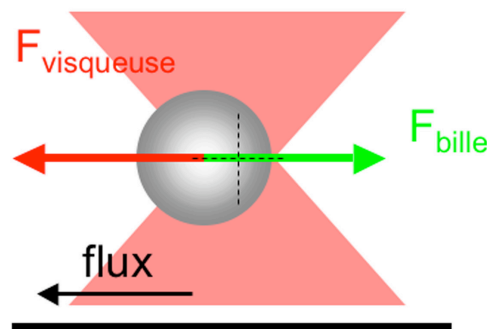


Figure II.10. : Bilan des forces agissant sur une bille piégée dans un flux hydrodynamique.

### II.A.2.c.ii. Force d'échappement

La méthode est simple de conception. A une puissance de laser donnée, une bille est piégée et soumise à un flux de liquide de vitesse  $v$ , que l'on augmente progressivement jusqu'à l'échappement de la bille de piège lorsque la force appliquée est trop forte. Connaissant la force appliquée et la position finale de la bille par rapport à sa position initiale, nous déduisons  $K$  à la puissance donnée  $P$ , d'après la relation précédente II.5. L'expérience est répétée pour différentes puissances afin d'obtenir une relation  $K(P)$  comme précédemment.

Expérimentalement, la vitesse du fluide est déterminée par la hauteur de la bille par rapport à la surface, les caractéristiques géométriques de la chambre

d'observation, le débit appliqué et en considérant qu'aux environs de la surface, le profil de vitesse est linéaire. La hauteur de la bille est fixée par un élément piézo-électrique (Jena) solidaire de l'objectif.

Pratiquement la manipulation est délicate pour plusieurs raisons. Tout d'abord, le changement de débit, imposé par un pousse-seringue, ne se fait pas de manière continue et provoque souvent un accoup, ce qui entraîne l'échappement prématuré de la bille. La deuxième raison vient de la possibilité de collision de la bille piégée avec d'autres billes emportées par le flux. Enfin, et surtout, si ces deux premières difficultés peuvent être résolues techniquement, il demeure une difficulté intrinsèque à cette méthode, à savoir que, pour de grands déplacements de la bille dans le piège, l'hypothèse de l'harmonie de la pince optique n'est plus valide (voir figure II.3.) et la mesure de la force d'échappement tend à surestimer la raideur du piège.

### II.A.2.c.iii. Mesure du déplacement de la bille en fonction du flux appliqué

Cette méthode est similaire à la précédente mais la bille cette fois ne s'échappe plus de la pince ; le flux du liquide est varié et l'augmentation du flux se traduit par une augmentation du déplacement de la bille relativement au centre du piège. Cette variation  $\Delta X$ - $F_{\text{visqueuse}}$  est représentée sur la figure II.11. Pour un accroissement linéaire de flux, donc de la force appliquée, le déplacement de la bille est linéaire. Dans ce cas, pour  $P=0.6W$ , on trouve  $K=42pN/\mu m$ .

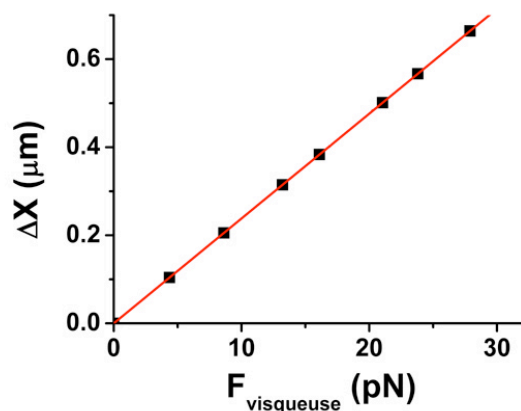


Figure II.11. : Variation du déplacement relatif de la bille au centre du piège en fonction de la force visqueuse appliquée. La pente de cette variation est inversement proportionnelle à la raideur du piège, ici  $K=42pN/\mu m$  pour  $P=0.6W$ .

## **Partie 2 : Tubes de membranes**

La détermination de  $K$  à puissance laser fixée est alors plus précise que précédemment. Cette calibration peut être répétée à différentes puissances laser pour obtenir  $K(P)$ . Cependant pour des problèmes de collisions, l'expérience est un peu longue et délicate à réaliser. La durée d'expérience étant de l'ordre de la minute pour une puissance donnée, nous sommes alors sensibles aux problèmes de dérive de la focalisation du microscope. La bille étant dans le plan d'observation, la vitesse perçue par la bille varie pendant l'expérience ce qui conduit à une augmentation de l'erreur sur la raideur.

### **II.A.2.c.iv. Mesure du déplacement de la bille par oscillation de la chambre d'observation**

Dans cette méthode, la chambre d'observation est fixée à un élément piézo-électrique dans une direction du plan d'observation. La force visqueuse n'est plus appliquée en mettant uniquement le fluide en mouvement mais en déplaçant la chambre entière. Ainsi, à une hauteur supérieure à la taille de la bille, le flux vu par la bille est un écoulement type bouchon. Un signal triangulaire est appliqué au piézo, l'amplitude est fixée à une centaine de micron. La fréquence d'oscillation est fixée. La bille adopte alternativement deux positions d'équilibre (séparées d'une distance  $2 \times X$ ) en fonction du sens de déplacement de la chambre d'observation. De plus à intervalle régulier, la puissance du laser est augmentée afin de sonder des raideurs différentes. Enfin, nous répétons l'expérience à diverses fréquences, c'est-à-dire à différentes vitesses du fluide afin d'augmenter la force visqueuse. Cette manipulation constitue la méthode de calibration que nous avons choisie.

Pour chaque position d'équilibre, la force de piégeage est égale à la force visqueuse. De la même manière que précédemment, la raideur de la pince est déterminée à une puissance donnée. Nous avons étudié sa variation en fonction de la puissance (figure II.12.).

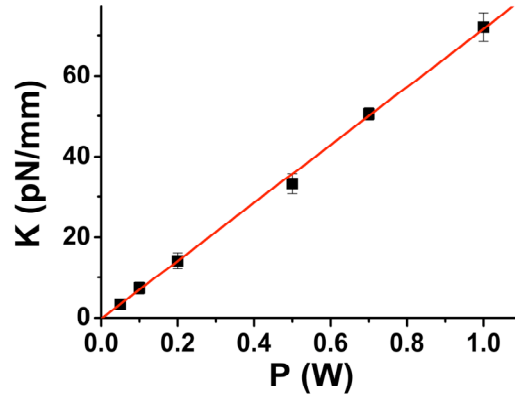


Figure II.12. : Variation de la raideur du piège optique en fonction de la puissance appliquée du laser. La valeur de la pente vaut  $K_p=70\pm 5\text{pN}/\mu\text{m}/\text{W}$ .

La figure II.12. montre la linéarité de la raideur du piège optique avec la puissance du laser sur une plus grande gamme de puissance (0.05W à 1W). La valeur de la pente  $K_p$  est de  $0.07\text{pN}/\text{nm}/\text{W}$  qui est proche de la valeur obtenue par les méthodes précédentes. L'étalonnage de la pince a été réalisé à des élévations  $h$  par rapport à la lamelle, comprises entre 5 et  $50\mu\text{m}$  et nous n'avons pas observé de variation significative de la force de piégeage en fonction de la hauteur. Dans les expériences à venir, les mesures de forces s'effectueront pour des élévations supérieures à  $5\mu\text{m}$ . Pour les distances inférieures, nous utiliserons la pince comme un simple micromanipulateur et nous effectuerons une calibration supplémentaire. Finalement, pour une puissance du laser  $P$  fixée, nous obtenons une expression de la force  $F_{\text{bille}}$  agissant sur la bille déplacée de  $\Delta X$  du centre du piège :

$$F_{\text{bille}} = K_p P \Delta X \quad \text{II.6.}$$



## II.B. Micromanipulation par micropipettes

Comme cela a été mentionné au début de ce chapitre, nous avons installé, en plus du piège optique, un système de micromanipulation par micropipette, couplé à un système d'aspiration contrôlée. Ce dernier va nous permettre de maintenir dans certains cas les vésicules ou globules rouges à tension de membrane constante.

### II.B.1. Fabrication des micropipettes

Les micropipettes sont obtenues à partir de capillaires de borosilicate, d'un diamètre extérieur de 1mm et un diamètre intérieur de 0.8mm. Après fabrication, les micropipettes utilisées ont un rayon intérieur compris entre 0.7 $\mu$ m (pour les globules ou le maintien de billes) et 2.5 $\mu$ m (pour les vésicules géantes).

Pour préparer ces micropipettes, on utilise une étireuse (P-2000, Sutter Instrument Co.) (figure II.14.) qui permet de chauffer le capillaire par un faisceau laser tout en exerçant une traction sur chacune des extrémités.

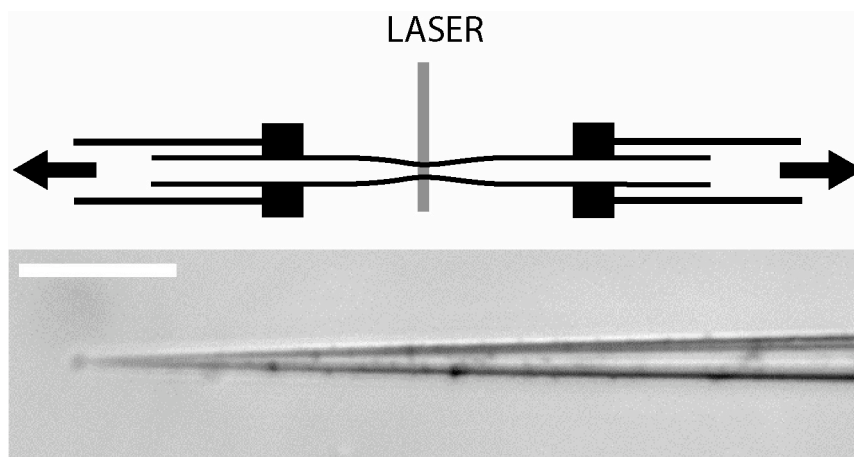


Figure II.14. : Principe de fonctionnement de l'étireuse et micropipette obtenue. La barre d'échelle représente 5 $\mu$ m.

Il s'agit ensuite de couper l'extrémité fine de ces pipettes qui peut, suite à cette opération d'étirage, être close ou inférieure au  $\mu$ m. On utilise alors une forge (figure II.15.) qui est constituée d'une bille de verre chauffée par un filament de titane. La température de fusion de la bille est inférieure à celle du verre de la micropipette. La

pipette est enfoncée dans cette bille fondue sur une distance voulue. La bille est alors refroidie en arrêtant le chauffage du filament, et la pipette cassée par traction.

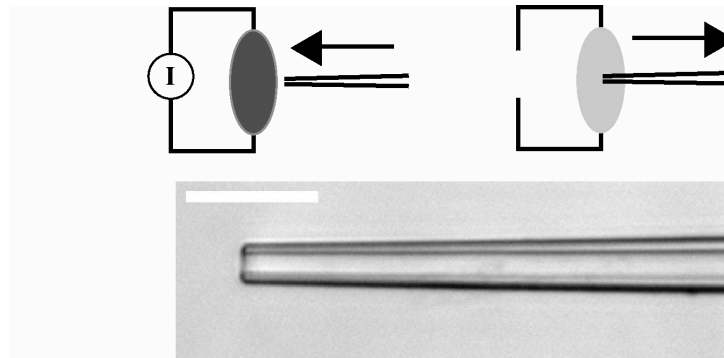


Figure II.15. : Principe de la forge et micropipette forgée. Un filament traversé par un courant permet de faire fondre la bille dans laquelle la pipette est enfoncée. Une fois la bille refroidie, la pipette est cassée par simple traction. La barre d'échelle représente 5  $\mu$ m.

Les pipettes sont finalement remplies par la solution de la chambre d'observation à l'aide de capillaires d'électrophorèse, connectés à des seringues en plastique. Les micropipettes sont ensuite fixées à des micromanipulateurs. Dans ce travail, deux types de manipulateur ont été utilisés. L'un est commercial (Leica) et non solidaire de la platine du microscope. Il est employé uniquement pour micromanipuler des billes (voir chapitre V). L'autre a été assemblé à partir de trois déplacements micrométriques (M105, PI) pour les trois axes X, Y et Z, par l'atelier de mécanique du laboratoire. Ce système est solidaire de la platine du microscope afin de limiter les vibrations. De plus, un élément piézo-électrique de 300  $\mu$ m de course (P-783.ZL, 300  $\mu$ m, Physiks Instrumente) a été monté en série sur un des axes (ici, l'axe X) pour contrôler plus précisément le mouvement. Chaque pipette est reliée à un système d'aspiration que nous décrivons dans le paragraphe suivant.

### II.B.2. Système de pression

Deux systèmes d'aspiration sont utilisés. Le premier, rudimentaire, est une simple seringue qui nous permet de maintenir une bille, par exemple, dans une

## Partie 2 : Tubes de membranes

micropipette. L'autre, qui permet un contrôle précis de la pression de succion, est basé sur le principe des vases communicants. Il a été mis au point à l'origine dans le groupe de E. Evans. Un réservoir d'eau est relié à la pipette via un tube silicone. Ce vase est fixé à un déplacement vertical micrométrique (M105, PI). Le tout est installé sur une crémaillère (figure II.16.) (Needham et Zhelev, 1996).

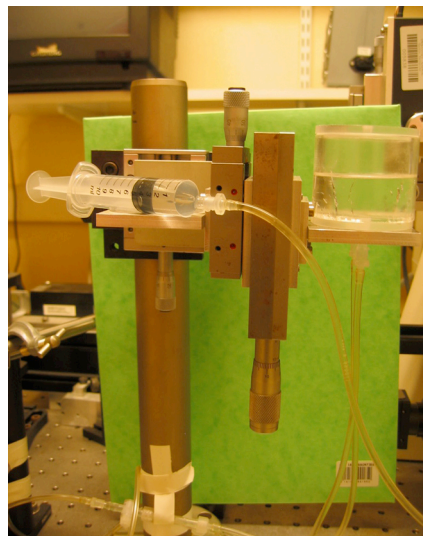


Figure II.16. : Photographie des deux systèmes d'aspiration. Le réservoir est fixé sur des déplacements micrométriques montés sur une crémaillère. Une seringue est reliée au système via un connecteur triple permettant une aspiration contrôlée ou non.

La différence de pression  $\Delta P$  appliquée à l'entrée de la pipette entre la chambre d'observation et l'extérieur est déterminée par la hauteur d'eau  $\Delta h$  relative au zéro de pression par :

$$\Delta P = \rho g \Delta h \quad \text{II.7.}$$

où  $\rho$  est la densité volumique du milieu ( $\rho_{\text{eau}}=10^3\text{kg.m}^{-3}$ ) et  $g$ , l'accélération de pesanteur. La gamme de pression utilisée est comprise entre 0.1Pa et 100Pa. Notons que pour de faibles pressions d'aspiration, correspondant à quelques dizaines de micromètres d'eau, cette différence de pression peut être mesurée précisément grâce à un capteur de pression. Ceci n'a pas été nécessaire dans nos expériences.

Aspirons une vésicule de rayon  $R_v$  à l'aide d'une micropipette de rayon interne  $R_p$  à une différence de pression  $\Delta P$  fixée (Figure II.17.). Soit  $R_l$  le rayon de courbure de la membrane suivant l'axe de la pipette. De façon générale, la formule de Laplace appliquée à la langue et à la vésicule détermine la tension de membrane  $\sigma$  de la vésicule par (Kwok et Evans, 1981) :

$$\sigma = \frac{\Delta P R_l}{2 \left[ \frac{R_l}{R_v} \right]} \quad \text{II.8.}$$

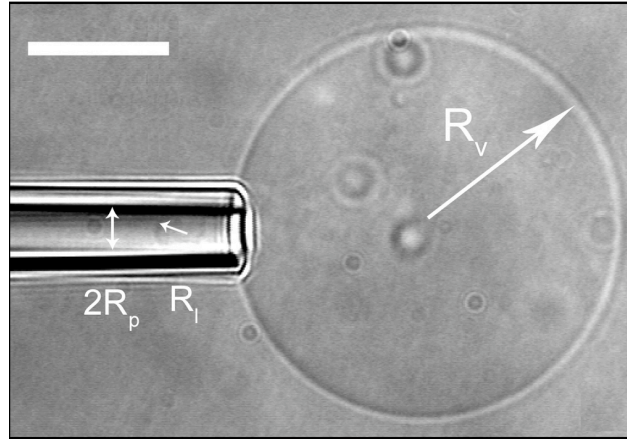


Figure II.17. : Image par vidéo microscopie d'une vésicule aspirée dans une micropipette.  $R_v$ ,  $R_p$ ,  $R_l$ , représentent respectivement le rayon de la vésicule, le rayon de la pipette et le rayon de courbure. La barre d'échelle correspond à  $10\mu\text{m}$ .

Si la longueur de la langue,  $L$ , qui joue le rôle de réservoir de membrane, est au moins supérieure au double du rayon de la pipette, alors le rayon de courbure de la langue correspond au rayon de la pipette. Par conséquent,  $\sigma$  est s'exprime par :

$$\sigma = \frac{\Delta P R_p}{2 \left[ \frac{R_p}{R_v} \right]} \quad \text{si } L > 2R_p \quad \text{II.9.}$$

Avec notre dispositif, nous pouvons appliquer des tensions variant de  $10^{-7}$  N/m à  $10^{-3}$  N/m. Dans la majorité des cas, les déformations mécaniques appliquées à la vésicule ne changent pas son rayon. Si la condition sur la langue est respectée, la tension est fixée par la relation II.9 et dépend simplement de  $\Delta P$ . Dans le cas contraire, la tension de membrane dépend de la forme précise de la langue qui peut varier. Dans ce cas, la tension n'est pas constante et elle est déterminée par la relation II.8. Ce phénomène peut conduire à des effets inattendus (voir chapitre VI).

## Bibliographie : Chapitre II

- Ashkin A, 1970.  
Acceleration and trapping of particles by radiation pressure.  
*Physical Review Letters*,24:156-159.
- Ashkin A et Dziedzic JM, 1971.  
Optical levitation by radiation pressure.  
*Applied Physics Letters*,19:283-285.
- Baumgartner W, Schütz GJ, Wiegand J, Golenhofen N et Drenckhahn D, 2003.  
Cadherin function probed by laser tweezer and single molecule fluorescence in vascular endothelial cells.  
*Journal of Cell Science*,116:1001-1011.
- Berry R et Berg HC, 1997.  
Absence of a barrier to backwards rotation of the bacterial flagellar motor demonstrated with optical tweezers.  
*Proceedings of the National Academy of Science U.S.A.*,94:14433–14437.
- Bockelmann U, Thomen P et Heslot F, 2004.  
Dynamics of the DNA duplex formation studied by single molecule force measurements.  
*Biophysical Journal*,87:3388-3396.
- Dufresne ER et D. G, 1998.  
Optical tweezer arrays and optical substrates created with diffractive optical elements.  
*Review of Scientific Instruments*,69:1974-1977.
- Faivre-Moskalenko C et Dogterom M, 2002.  
Dynamics of microtubule aster in microfabricated chambers : The role of catastrophes.  
*Proceedings of the National Academy of Science U.S.A.*,99:16788-16793.
- Felgner H, Frank R, Biernat J, Mandelkow EM, Mandelkow E, Ludin B, Matus A et Schliwa M, 1997.  
Domains of Neuronal Microtubule-associated Proteins and Flexural Rigidity of Microtubules.  
*Journal of Cell Biology*,138:1067–1075.
- Gijs JL, Wuite R, Davenport J, Rappaport A et Bustamante C, 2000.  
An Integrated Laser Trap/Flow Control Video Microscope for the Study of Single Biomolecules.  
*Biophysical Journal*,79:1155–1167.
- Khodjakov A, Cole RW et Rieder CL, 1997.

- A synergy of technologies : combining laser microsurgery with green fluorescent protein tagging.  
*Cell Motility and the Cytoskeleton*,38:311-317.
- Kwok R et Evans E, 1981.  
Thermoelasticity of large lecithin bilayer vesicles.  
*Biophysical Journal*,35:637-652.
- Leake MC, Wilson D, Gautel M et Simmons RM, 2004.  
The Elasticity of Single Titin Molecules Using a Two-Bead Optical Tweezers Assay.  
*Biophysical Journal*,87:1112-1135.
- Needham D et Zhelev DV, 1996.  
The mechanochemistry of lipid vesicles examined by micropipet manipulation techniques. In: Vesicles. Rosoff M, Surfactant Science Series, Marcel Dekker, New York and Basel
- Peterman EJG, Gittes F et Schmidt CF, 2003.  
Laser-Induced Heating In Optical Traps.  
*Biophysical Journal*,84:1308-1316.
- Sheetz MP, 1998.  
Laser Tweezers in Cell Biology.  
Editor, San Diego: Academic Press.
- Sleep J, Wilson D, Simmons R et Gratzer W, 1999.  
Elasticity of the Red Cell Membrane and Its Relation to Hemolytic Disorders: An Optical Tweezers Study.  
*Biophysical Journal*,77:3085–3095.
- Soni GV, Hameed FM, Roopa T et Shivashankar GV, 2002.  
Development of an optical tweezer combined with micromanipulation for DNA and protein nanobioscience.  
*Current Science*,83:1464-1470.
- Stout AL, 2001.  
Detection and Characterization of Individual Intermolecular Bonds Using Optical Tweezers.  
*Biophysical Journal*,80:2976–2986.
- Svoboda K et Block SM, 1994.  
Biological applications of optical forces.  
*Annual Review of Biophysical and Biomolecular Structures*,23.
- Svoboda K, Schmidt CF, Schnapp BJ et Block SM, 1993.  
Direct observation of kinesin stepping by optical trapping interferometry.  
*Nature*,365:721-727.
- Tomishige M, Sako Y et Kusumi A, 1998.

**Partie 2 : Tubes de membranes**

Regulation Mechanism of the Lateral Diffusion of Band 3 in Erythrocyte Membranes by the Membrane Skeleton.  
*Journal of Cell Biology*,142:989–1000.

Van Vliet KJ, Bao G et Suresch S, 2003.  
The biomechanics toolbox : experimental approaches for living cells and biomolecules.  
*Acta Materialia*,51:5881-5905.

## Chapitre III

# Extraction de tube de membrane modèle à tension constante : validation du dispositif expérimental

L'extraction de tube de vésicule à tension contrôlée n'est pas un phénomène nouveau (Bo et Waugh, 1989; Heinrich et Waugh, 1996). Cependant nous avons commencé par reproduire ces expériences. L'obtention de la courbe typique force-extension d'un tube de membrane à tension contrôlée nous a permis de valider notre dispositif expérimental. Le schéma de principe est exposé ci-dessous sur la figure III.1. La tension de membrane,  $\sigma$ , la force mesurée  $F_t$ , le rayon des tubes,  $r_t$ , et la vitesse d'extraction du tube,  $v$ , seront les grandeurs importantes qui interviendront dans les études qui vont suivre.

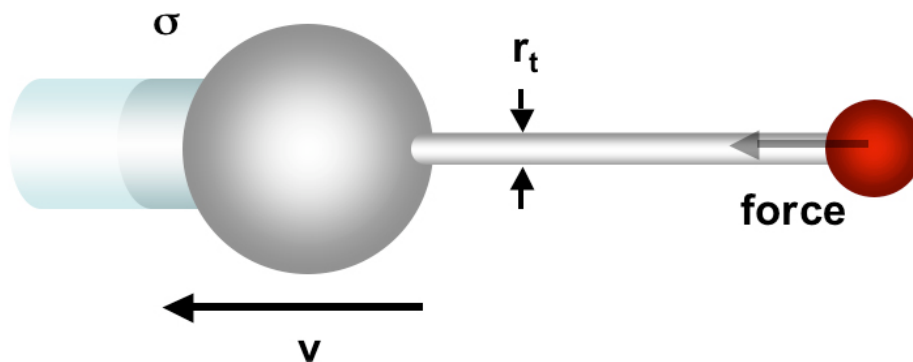


Figure III.1. : Représentation schématique de l'extraction d'un tube de membrane à partir d'une vésicule géante. La vésicule est maintenue à tension de membrane,  $\sigma$ , constante par un système de micropipette. Le tube est fixé une bille maintenue par un capteur de force (piège optique dans notre cas).

### III.1. Expériences et résultats

Le principe de l'expérience est simple. Une bille est piégée par pince optique et, dans le même temps, une vésicule de composition lipidique connue (donc de



## Partie 2 : Tubes de membrane

propriétés mécaniques connues) est aspirée de façon contrôlée à l'aide d'une micropipette, puis collée à la bille. La pipette est ensuite éloignée de la bille à vitesse constante, ce qui conduit à la formation d'un tube de membrane. La force de rappel exercée par le tube de membrane sur la bille piégée est obtenue par l'analyse du déplacement relatif de la bille et la connaissance de la raideur du piège.

### III.1.a. Montage expérimental

L'expérience décrite ci-dessus nous impose une structure de chambre à deux ouvertures pour y introduire une micropipette (puis une deuxième dans la chapitre V.). Nous avons choisi de fabriquer un portoir du type "plongeur" double. Deux lamelles de verre nettoyées préalablement avec un mélange eau/éthanol sont collées (colle SADER pour bois, ou graisse à vide plus vernis à ongle) sur les faces inférieures et supérieures du "plongeur" fixé sur la platine du microscope (figure III.2.). Le plongeur a été usiné sur mesure dans l'atelier de mécanique de l'Institut Curie. Le volume de la chambre ainsi confectionnée est d'environ 200  $\mu\text{l}$ .

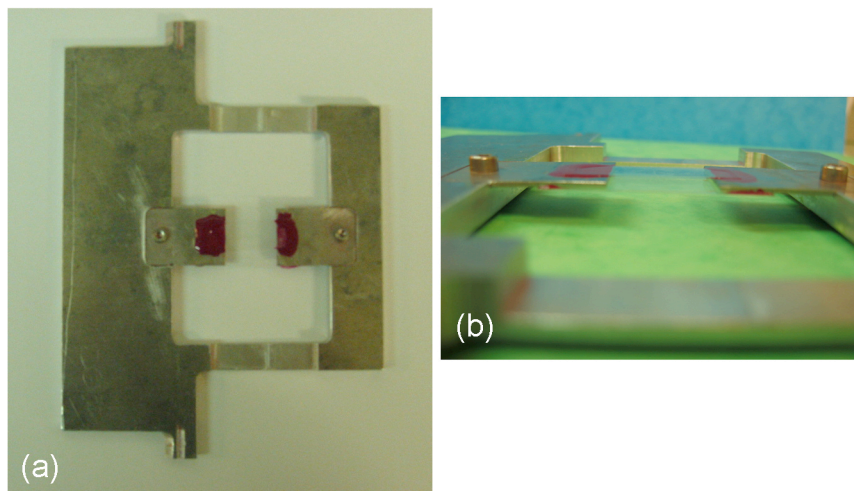


Figure III.2. : Photographie du "plongeur" utilisé pour former la chambre. (a) Vue de dessus. (b) Vue de côté. Les lamelles sont collées de part et d'autre des deux « plongeurs » scellées par du vernis à ongle.

Les vésicules sont formées selon la méthode d'électroformation dans une solution de sucrose à 160mOsm (voir annexe B) (Angelova et al, 1992). Dans cette partie, elles sont composées de 95% de EPC (Egg PhosphatidylCholine), de 4.995% de DOPE-PEG<sub>2000</sub> (1,2-DiOleoyl-sn-Glycero-3-Phosphoethanolamine-N-(Methoxy(Polyethylene Glycol)-2000)) et de 0.005% de DSPE-PEG<sub>2000</sub>-biotin (1,2-

### **Chapitre III : Extraction de tubes de membrane modèle à tension constante : Validation du dispositif expérimental**

DiStearoyl-sn-Glycero-3-Phosphoethanolamine-N-(Biotinyl(Polyethylene Glycol)-2000)). Les lipides proviennent de chez Avanti Polarlipids (voir annexe A). Les vésicules sont injectées dans une solution de PBS contenant de la  $\beta$ -caséine à 0.5 mg/ml (170mOs).

Les billes injectées dans la chambre sont recouvertes de streptavidine afin d'adhérer aux vésicules biotinylées. Elles sont commerciales (Bangs Laboratories, Carmel, IN) et de diamètre 3.53 $\mu$ m. Pour ce type de bille, la raideur du piège optique liée à ces billes est de  $(0.07 \cdot P)$  pN/nm, avec P, la puissance du laser. Ici,  $P=0.6W$ .

La pipette d'aspiration est finalement introduite dans le milieu. Elle a été remplie préalablement avec la même solution PBS+caséine, d'une part, pour éviter les problèmes de pression osmotique, et d'autre part pour limiter l'adhésion non-spécifique de la vésicule à l'intérieur de la pipette (effet de passivation de la caséine – voir partie "adhésion" chapitre III). Une fois l'installation de l'ensemble terminée, la chambre d'observation est « scellée » avec de l'huile minérale pour éviter l'évaporation.

Expérimentalement, la pipette est tenue par un porte-pipette lié de manière rigide au manipulateur décrit (II.B.2) et connecté au système de contrôle de pression (II.B.3). Pour piloter l'élément piézo-électrique, nous avons ajouté un générateur de fonction (TGA1241, Thurlby Thandar Instruments, UK). Dans cette expérience, une rampe aller-retour est appliquée, imposant à la pipette un déplacement à vitesse constante de 0.24 $\mu$ m/s sur une distance de 15 $\mu$ m.

Pour la mesure de la force, l'acquisition des images et leur analyse sont effectuées de la même manière qu'au II.A.2.b. Le schéma du dispositif expérimental global est résumé sur la figure III.3.

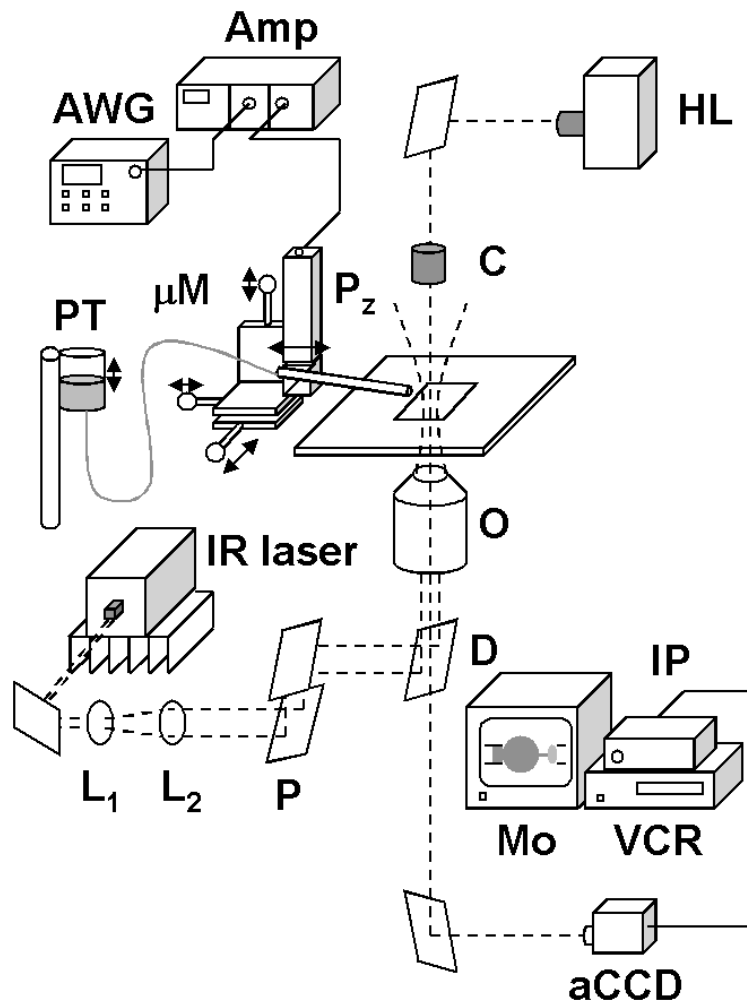


Figure III.3. : Schéma du dispositif expérimental global. Il a été rajouté au dispositif du piège optique un micromanipulateur comprenant un système trois axes micrométriques ( $\mu M$ ), un cristal piézo électrique ( $P_z$ ), un système de contrôle de pression (PT), un amplificateur de commande du piézo (Amp) et un générateur de fonction (AWG).

### III.1.b Résultats

La figure III.4 montre l'extrusion d'un tube de vésicule à  $\sigma = 3 \cdot 10^{-5} \text{N/m}$ . Le tube de membrane est clairement visible entre le corps de la vésicule et la bille tenue par la pince optique. La trace force-extension obtenue est représentée sur la figure III.5.

**Chapitre III : Extraction de tubes de membrane modèle à tension constante :**  
*Validation du dispositif expérimental*

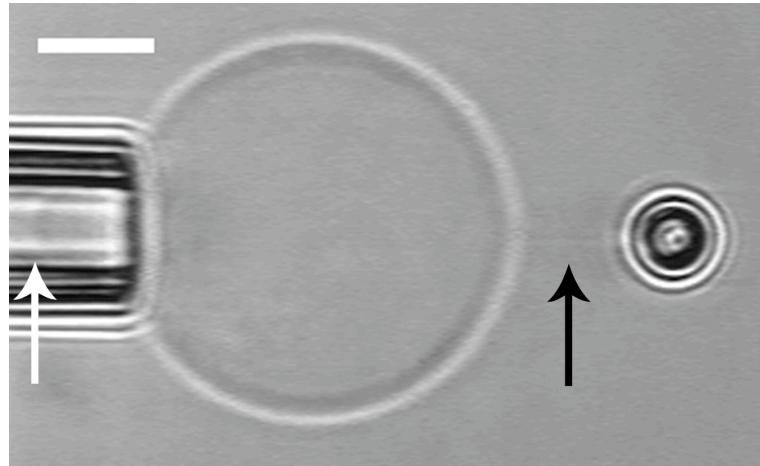


Figure III.4. : Photographie par vidéo-microscopie de l'extrusion d'un tube de vésicule tenue par une micropipette. Le tube formé est clairement visible entre la bille piégée (à droite) et la vésicule (flèche noire). De plus, la langue à l'intérieur de la micropipette est suffisamment grande pour considérer la tension de membrane constante (flèche blanche). La barre d'échelle représente 5  $\mu\text{m}$ .

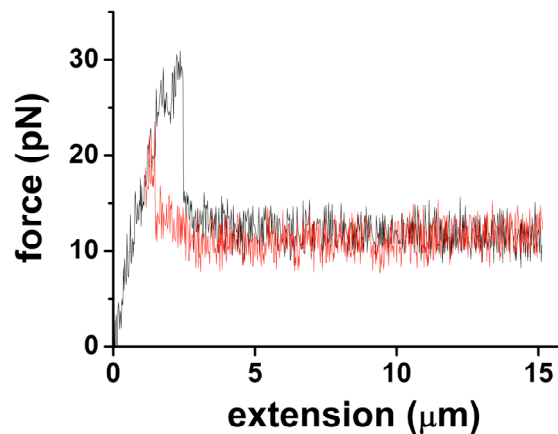


Figure III.5. : Courbe force-extension lors de l'extraction (noir) et rétraction (rouge) d'un tube d'une vésicule EPC(95%) + lipides PEG<sub>2000</sub>(5%) à  $\sigma = 3 \cdot 10^{-5} \text{ N/m}$ .

Avant la formation du tube, l'élasticité de l'ensemble du système est sondée, c'est-à-dire la déformation de la vésicule en extension et l'élasticité propre du piège, qui joue le rôle du capteur de force. Nous pouvons schématiser la situation suivante par deux ressorts en série  $K_{\text{vésicule}}$  et  $K$ , les raideurs respectives de la vésicule et du piège optique (voir figure III.6.). Ce système a donc pour raideur globale  $K_{\text{globale}}$  :

$$K_{\text{globale}} = \frac{K_{\text{vésicule}} \cdot K}{K_{\text{vésicule}} + K} \quad \text{III.1.}$$

## Partie 2 : Tubes de membrane

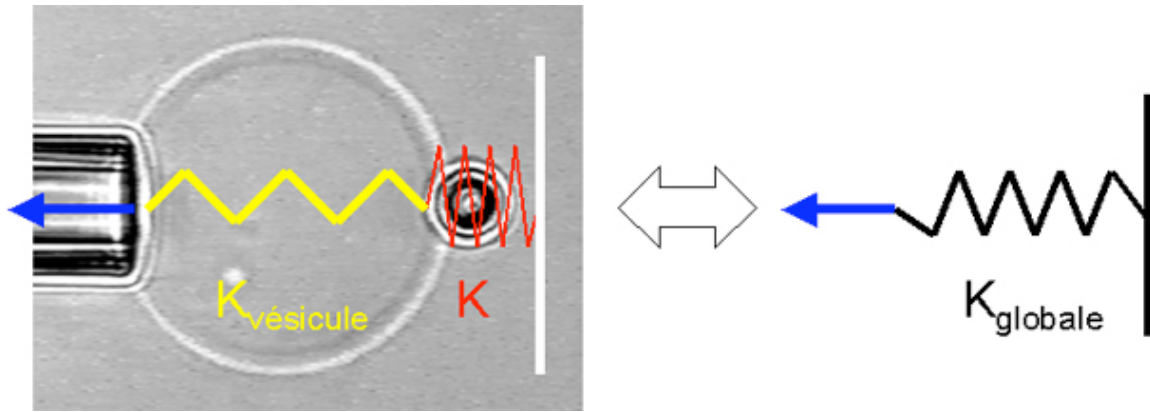


Figure III.6. : Déformation d'une vésicule avant extraction d'un tube modélisée par deux ressorts en série de raideur  $K_{\text{vésicule}}$  et  $K$  assimilable à un ressort unique de raideur  $K_{\text{globale}}$  (éq. III.1).

La raideur globale est donnée par la pente de la partie initiale de l'extrusion soit  $15\text{pN}/\mu\text{m}$  environ. Or  $K = 42\text{ pN}/\mu\text{m}$ , donc  $K_{\text{vésicule}} = 23\text{ pN}/\mu\text{m}$  d'après III.1. Evans et al. (Evans et al, 1991; Ritchie, 1998) ont montré que, dans la limite des faibles déformations, sous l'effet d'une force axiale exercée sur une zone de taille  $R_c$ , la déformation d'une membrane est proportionnelle à la force, avec une constante d'élasticité  $K_{\text{membrane}}$  dépendant de sa tension de membrane :

$$K_{\text{membrane}} = \frac{2\sigma}{\ln\left(\frac{4R_v^2}{R_p R_c}\right)} \quad \text{III.2,}$$

où  $R_v$  est le rayon de la membrane et  $R_c$ , le rayon de la zone de contact entre la bille et la vésicule.

En prenant  $R_v=10\mu\text{m}$ ,  $R_p=1.7\mu\text{m}$  et  $R_c=0.2\mu\text{m}$  (valeur estimée),  $K_{\text{membrane}}$  est estimé à  $30\text{pN}/\mu\text{m}$ , à une tension de  $3.10^{-5}\text{N/m}$ , ce qui est du même ordre de grandeur avec la valeur mesurée expérimentalement.

Au-delà d'un seuil de force de  $29\text{pN}$ , la force d'extrusion du tube chute brutalement puis suit un plateau de force égal à  $12\text{pN}$ . L'allure générale est similaire à celle simulée par (Derényi et al, 2002; Powers et al, 2002). Cependant la valeur du seuil de force représente  $140\%$  de la valeur du plateau de force alors qu'Imre Dérenyi l'ont estimé à  $13\%$  (Derényi et al, 2002). Mais cette estimation a été obtenue en supposant une force extérieure ponctuelle. Gerbrand Koster (Koster et al, 2005) a montré que le seuil de force est en réalité proportionnel au rayon de contact entre la bille et la membrane qui est ici microscopique et non ponctuel, ce qui explique la forte différence entre la valeur expérimentale et simulée.

### Chapitre III : Extraction de tubes de membrane modèle à tension constante : Validation du dispositif expérimental

Comme nous l'avons déjà évoqué (chapitre I), l'élongation du tube à force constante est attendue si la tension de la membrane est constante, et la valeur du plateau dépend de la tension imposée et de la rigidité de courbure de la membrane (éq. I.6.). Nous reviendrons sur ce point au paragraphe III.2 suivant.

Au cours de la rétraction, nous observons que la force reste constante, à cette même valeur, sauf aux courtes séparations bille-vésicule (de l'ordre du micron). A ce moment, la force augmente brusquement. Gerbrand Koster et ses collaborateurs (Koster, 2005) ont construit la courbe théorique force-extension pour la formation d'un tube en indiquant les états stables et instables en prenant en compte la taille de la zone de contact entre la bille et la vésicule (figure III.7.). Ils prévoient ainsi l'hystérésis qu'ils observent, tout comme nous.

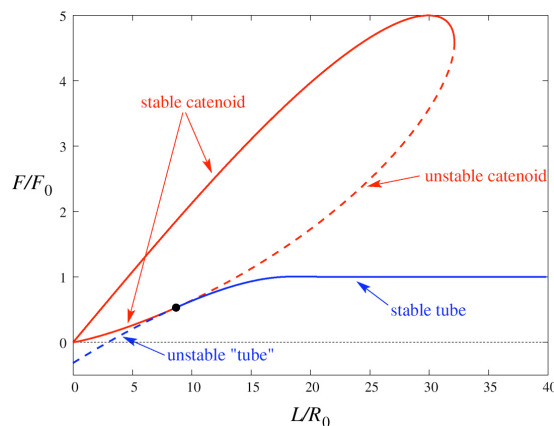


Figure III.7. : Courbe de stabilité d'un tube à travers la variation de la force en fonction de l'élongation.  $f_0$  est la force au plateau et  $R_0$ , le rayon du tube au plateau. Les parties stables sont représentées en trait continu et les parties instables en trait pointillé (extrait de (Koster, 2005)).

Lorsque la vésicule est éloignée de la zone de contact, la branche correspondant à la caténoïde "stable" est suivie, et la force augmente jusqu'à ce que cette force ne soit plus stable. Si la déformation excède une longueur critique, un tube est formé, et la force retombe sur la branche correspondant au tube stable. Pendant la rétraction, le tube suit encore cette courbe jusqu'au point critique (croix noire), différent du point critique à l'extraction. Le tube n'est alors plus stable et la force saute sur la ligne de la caténoïde stable, au seuil de force à la rétraction. Ce seuil de force est plus faible que celui à l'extraction, ce qui est observé aussi dans nos expériences.

### III.2. Validation : détermination de la rigidité de courbure de membranes lipidiques

A partir de la relation I.6, la mesure de la force du tube en fonction de la tension doit nous permettre de mesurer la rigidité de courbure des vésicules. Nous avons fait varier la tension entre  $10^{-5}$ N/m à  $10^{-4}$ N/m et les mesures ont été réalisées sur une vingtaine de vésicules. Nous avons pris la valeur du plateau de force comme force d'extrusion de tube  $F_t$ , et tracé la courbe de la force  $F_t$  en fonction de  $\sigma^{1/2}$  (Figure III.8.).

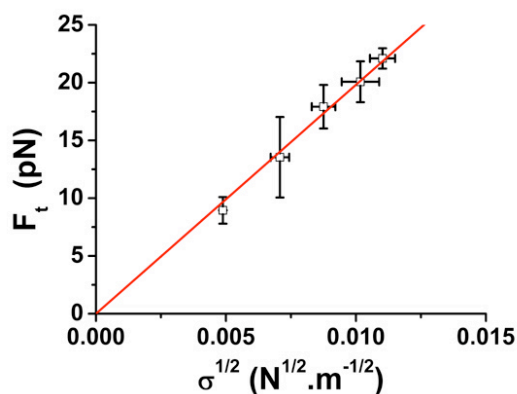


Figure III.8. : Variation de la force d'extraction d'un tube  $F_t$  en fonction de la racine carrée de la tension de membrane  $\sigma$  pour des vésicules EPC(95%) + lipides PEG(5%).

La variation de la force avec  $\sigma^{1/2}$  est bien linéaire comme attendu. Nous obtenons ainsi comme rigidité de courbure de ces vésicules  $\kappa = 12.3 \pm 1 k_B T$ . Cette valeur est effectivement proche des valeurs rapportées généralement dans la littérature avec d'autres techniques pour une simple bicouche de EPC, soit  $\kappa = 10 k_B T$  (Duwe et al, 1990; Pécréaux et al, 2004). En fait, nos vésicules contiennent 5% de lipides fonctionnalisés avec un PEG<sub>2000</sub>. Evans et al. (Evans et Rawicz, 1997) ont montré que l'ajout de tels lipides « chevelus » dans la membrane a des effets, faibles mais détectables sur la rigidité de courbure dès que la fraction molaire atteint quelques pourcents. Plus précisément, une augmentation du module de courbure de 1 à  $2 k_B T$  est attendue pour des concentrations de lipides PEG de 5%, ce qui est en accord avec notre mesure. Cet effet peut être compris de la manière intuitive suivante. Le polymère PEG en conformation champignon a un rayon de giration d'environ 2-3nm. Supposons une membrane strictement plane, l'ensemble de la

**Chapitre III : Extraction de tubes de membrane modèle à tension constante :  
Validation du dispositif expérimental**

surface est saturé en pelotes PEG à cette concentration (équivalente à  $c^* \approx 5\%$ ) sans que celui-ci soit comprimé. Au contraire, si la membrane est courbée, les polymères se gênent stériquement et résistent à la déformation. En conséquence, il faut fournir une énergie plus importante pour courber la membrane, d'où une augmentation du module de courbure.

Nous avons encore voulu valider notre mesure à l'aide d'une technique classique : l'aspiration par micropipette (Kwok et Evans, 1981). Celle-ci consiste à sonder le régime de fluctuations de la vésicule à l'aide d'une micropipette. L'excès de surface,  $\Delta A/A_0$ , est relié directement à la tension de membrane,  $\sigma$ , par la relation d'Helfrich que nous rappelons (Helfrich, 1973) :

$$\frac{\Delta A}{A_0} = \frac{k_B T}{8\kappa} \ln \frac{A}{A_0} \quad \text{III.3.}$$

La figure III.9.a. montre en échelle semi-log que cette relation ajuste bien la variation entre la tension appliquée et l'excès de surface récupéré. Nous ne détaillerons pas davantage cette technique. 30 vésicules ont été étudiées et la valeur obtenue de la rigidité de courbe est de  $11.8 \pm 2.8 k_B T$  (Figure III.9.b.), ce qui est comparable à la valeur obtenue par la technique des tubes. Ceci confirme également que le contrôle de la tension par micropipette dans notre montage est effectivement opérationnel.

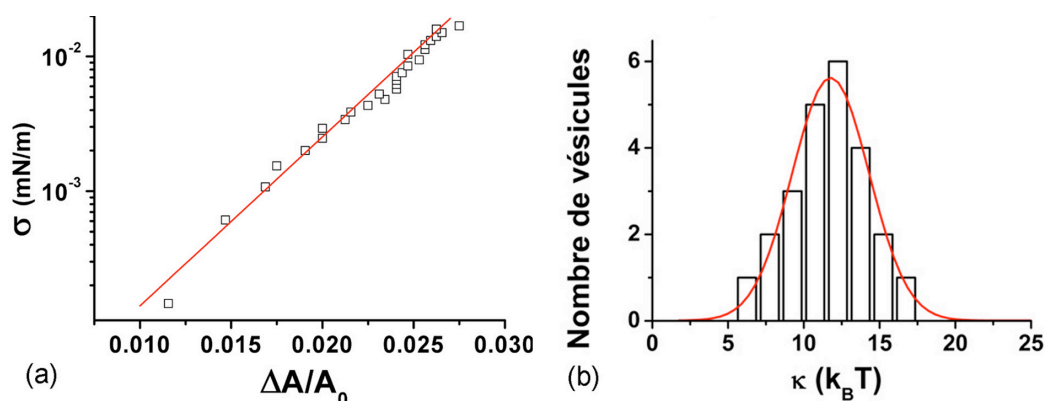


Figure III.9. : (a) Variation typique de la tension de membrane en fonction de l'excès de surface en échelle semi-logarithmique pour une vésicule EPC(95%) + lipides PEG<sub>2000</sub>(5%). La pente de la variation est directement proportionnelle à la rigidité de courbure,  $\kappa$  (Helfrich, 1973). (b) Histogramme des modules de courbure pour ces vésicules, obtenus par la technique d'aspiration par micropipette (30 vésicules). Les valeurs sont centrées sur  $11.8 k_B T$ .



### **III.3 Conclusion**

Dans cette partie, nous avons validé notre dispositif expérimental en reproduisant des résultats déjà rapportés dans la littérature. D'un point de vue technique, nous avons associé une pince optique et un système de micromanipulation par micropipette muni de contrôle de pression. Nous avons ainsi pu définir les performances atteintes. Puis, d'un point de vue expérimental, nous avons extrait un tube unique de membrane à tension contrôlée. Nous avons montré l'existence d'un plateau de force après le passage d'un seuil de force pour des extractions à tension constante. De plus, à partir de la force au plateau, nous avons pu déterminer la rigidité de courbure de la composition lipidique utilisée. Ainsi, on a pu vérifier que, si la tension de membrane est constante et connue, la technique d'extraction de tube peut se substituer à la technique d'aspiration par micropipette pour déterminer avec précision la rigidité de courbure d'une membrane.

Dans le cas où la tension de membrane n'est pas maintenue constante, quelle est la signature de la courbe force-extension d'un tube extrait d'une vésicule? Cette question va être abordée dans le chapitre suivant.

## Bibliographie : Chapitre III

- Angelova MI, Soléau S, Méléard P, Faucon JF et Bothorel P, 1992.  
Preparation of giant vesicles by external AC electric fields. Kinetics and applications.  
*Progress in Colloid & Polymer Science*,89:127-131.
- Bo L et Waugh RE, 1989.  
Determination of bilayer membrane bending stiffness by tether formation from giant, thin-walled vesicles.  
*Biophysical Journal*,55:509-517.
- Derényi I, Jülicher F et Prost J, 2002.  
Formation and Interaction of Membrane Tubes.  
*Physical Review Letters*,88:238101.
- Duwe H-P, Käs J et Sackmann E, 1990.  
Bending elasticity moduli of lipid bilayers: modulation by solutes.  
*Journal de Physique France*,51:945-962.
- Evans E, Berk D et Leung A, 1991.  
Detachment of agglutinin-bonded red blood cells.  
*Biophysical Journal*,59:838-848.
- Evans E et Rawicz W, 1997.  
Elasticity of fuzzy membranes.  
*Physical Review Letters*,79:2379-2382.
- Heinrich V et Waugh RE, 1996.  
A piconewton force transducer and its application to measurement of the bending stiffness of phospholipid membranes.  
*Annals of Biomedical Engineering*,24:595-605.
- Helfrich W, 1973.  
Elastic properties of lipid bilayers : theory and possible experiments.  
*Zur Naturforschung*,28c:693-703.
- Koster G, 2005.  
Membrane tube formation by motor proteins.  
Amsterdam: Universiteit Leiden.
- Koster G, Cacciuto A, Derényi I, Frenkel D et Dogterom M, 2005.  
Force Barriers for Membrane Tube Formation.  
*Physical Review Letters*,94:068101.
- Kwok R et Evans E, 1981.

## **Partie 2 : Tubes de membrane**

Thermoelasticity of large lecithin bilayer vesicles.  
*Biophysical Journal*,35:637-652.

Pécréaux J, Döbereiner H-G, Prost J, Joanny J-F et Bassereau P, 2004.  
Refined contour analysis of giant unilamellar vesicles.  
*The European Physical Journal E*,13:277-290.

Powers TR, Huber G et Goldstein RE, 2002.  
Fluid-membrane tethers: Minimal surfaces and elastic boundary layers.  
*Physical Review E*,65:041901.

Ritchie K, 1998.  
Probing nanoscale adhesion and structure at soft interfaces.  
Vancouver: University of British Columbia.

## Chapitre IV

# Extraction de tube de membrane à surface constante

Dans la pratique (en biologie, biophysique, nanotechnologie), l'extrusion de tubes de membrane s'effectue le plus souvent à des tensions non contrôlées sur des systèmes cellulaires (Sheetz et Dai, 1996). Des systèmes artificiels sont aussi utilisés (Karlsson et al, 2001; Koster et al, 2003). Connaissant la valeur de la rigidité de courbure d'une membrane, la mesure de la force d'extrusion d'un tube peut permettre de déduire la tension de membrane pour un objet (cellule, vésicule) adhérent sur une surface (Upadhyaya et Sheetz, 2004). Cependant cette mesure ne peut être valide que si la quantité de membrane récupérée dans le tube est suffisamment faible pour ne pas provoquer d'augmentation significative de la tension, ou si la cellule est pourvue d'un réservoir de lipides important permettant de "tamponner" la tension.

Dans ce chapitre, nous allons nous focaliser sur le cas limite pour lequel la situation précédente de tension fixe n'est plus valable. Nous ne travaillons donc plus à tension constante mais à surface constante. Pour cela nous allons extraire des tubes longs, grands devant le rayon de la vésicule, et quantifier la variation de force avec la longueur du tube extrait.

### **IV.1. Introduction et résumé de l'article : "Pulling long tubes from firmly adhered vesicles" (soumis à Europhysics Letters)**

Il convient de rappeler que ces expériences ont été inspirées d'un modèle théorique développé par Udo Seifert (Smith et al, 2003; Smith et al, 2004). Ce

## Partie 2 : Tubes de membranes

modèle, faisant le "pont" entre adhésion (première partie) et tubes (deuxième partie) nous est apparue fort attrayant. Nous verrons ensuite que les résultats obtenus se sont sensiblement écartés des prédictions théoriques.

Prenons une vésicule adhéree sur une surface en régime d'adhésion forte (Seifert et Lipowsky, 1990; Tordeux et al, 2002). La vésicule est supposée à l'équilibre et ne possède plus d'excès de membrane macroscopique. La loi de Young-Dupré qui lie l'énergie d'adhésion, l'angle de contact, et la tension de membrane est vérifiée. Dans ce cas, si la tension de membrane augmente, l'angle de contact doit diminuer, et si la vésicule est à l'équilibre, pour remplir les différentes conditions de surfaces et de volumes constants, on peut s'attendre à ce qu'elle se décolle de la surface. Pratiquement, si un tube est extrait de cette vésicule, la vésicule se détache de la surface et l'aire de membrane récupérée dans le tube est exactement égale à l'équilibre à l'aire perdue au niveau de la zone de contact. La figure IV.1.a montre schématiquement l'évolution de la zone de contact entre la vésicule et la surface avec la longueur du tube formé.

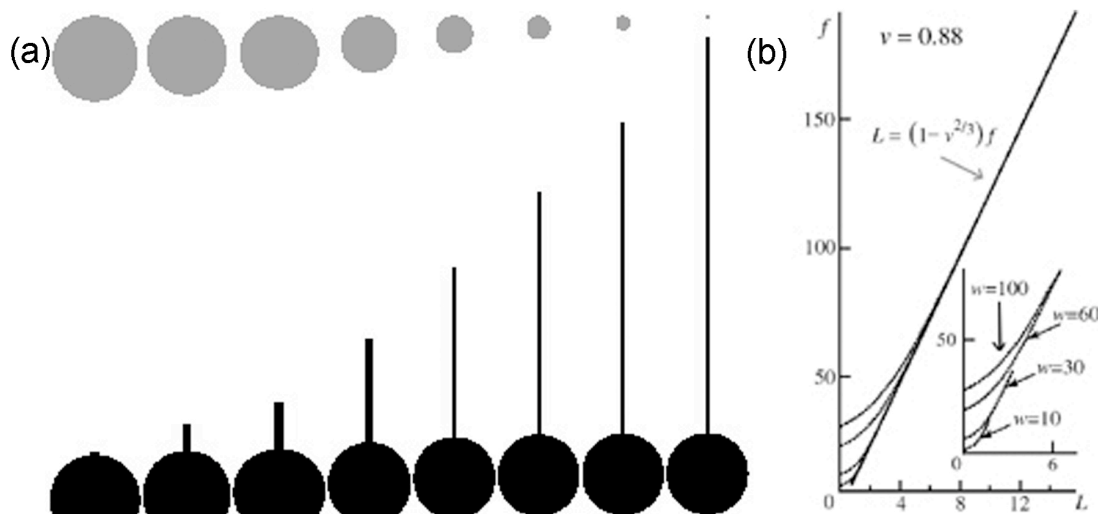


Figure IV.1. : (a) Evolution de la zone de contact d'une vésicule avec une surface avec la longueur d'un tube extrait. La surface grise (en haut) représente la zone de contact de la vésicule avec la surface. On voit le profil (en bas) de la vésicule correspondant durant l'extraction (extrait de (Smith *et al*, 2004)). (b) Evolution attendue de la force en fonction de la longueur du tube extrait dans le cas d'une adhésion forte. Les grandeurs sont, ici, sans dimension.  $v$  est le volume réduit de la vésicule. La force,  $f$ , et l'énergie d'adhésion,  $w$ , sont adimensionnées par le rayon de la vésicule et le module de courbure, et la longueur,  $L$ , par le rayon de la vésicule (adapté de (Smith *et al*, 2004)).

Dans ce papier, il est prévu que l'évolution de la force avec la longueur est linéaire et dépend essentiellement du volume réduit de la vésicule. Aux faibles longueurs, on peut noter une déviation à cette relation linéaire car l'énergie

## Chapitre IV : Extraction de tube de membrane à surface constante

d'adhésion doit être prise en compte (Figure IV.1.b.). Les valeurs attendues de détachement pour une énergie d'adhésion de  $6.10^{-6} \text{ J/m}^2$  et un volume réduit de 0.88 sont de l'ordre de 40pN.

Cet article a inspiré les expériences suivantes où on a extrait des tubes de vésicules biotinylées adhérees sur une surface couverte de streptavidine. Pour favoriser l'adhésion, nous adsorbons (non spécifiquement) la streptavidine sur une surface préalablement couverte d'un polymère chargé positivement (Poly-Ethylène-Imine, PEI). Le dispositif expérimental a été modifié par rapport à celui décrit au chapitre précédent. La vésicule n'est plus maintenue dans une micropipette et les tubes sont formés, après fixation de la bille piégée, en déplaçant à vitesse constante la chambre d'observation, fixée de manière solidaire à l'élément piézo électrique afin de tirer des tubes à vitesse contrôlée (Figure IV.2.). Nous exposons ici brièvement les résultats décrits dans l'article soumis.

Des tubes de membrane longs de  $250 \mu\text{m}$  ont été extraits à une vitesse de  $2 \mu\text{m/s}$ . La force mesurée à l'aide du piège optique augmente avec la longueur du tube, mais avec une croissance de moins en moins forte au fur et à mesure de l'élongation du tube. De plus, nous avons visualisé l'aire de contact entre la vésicule et la surface par RICM et montré que celle-ci ne varie pas au cours de l'extraction.

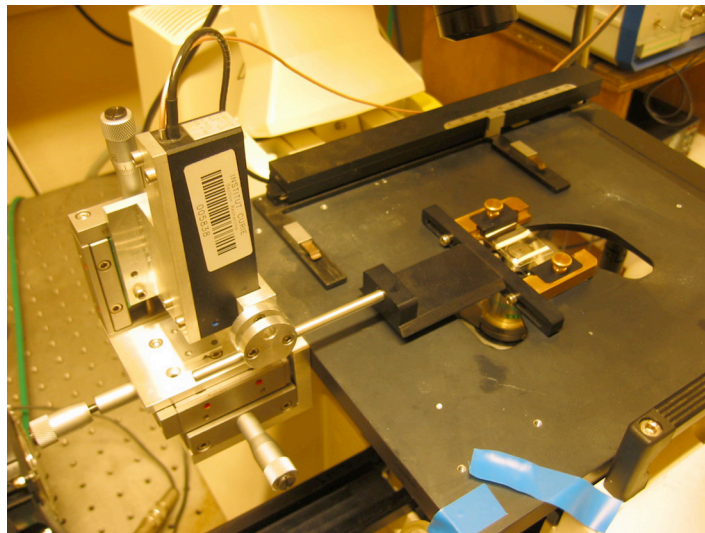


Figure IV.2. : Photographie du dispositif expérimental comportant la chambre d'observation et le portoir fixé solidairement à un déplacement trois axes micrométrique couplé à un élément piézo électrique dans l'axe de la chambre.

## Partie 2 : Tubes de membranes

Nous avons pu modéliser la variation de force avec la longueur du tube en appliquant la relation entre la tension de membrane,  $\sigma$ , et l'excès d'aire,  $\Delta A$ , récupérée (voir partie "adhésion", relation II.10). Deux régimes sont clairement identifiables. Le premier, à faible force, correspond au régime de fluctuation : la force augmente linéairement avec la longueur du tube (si l'on néglige une correction logarithmique). On retrouve la rigidité de courbure mesurée précédemment. Le deuxième régime, atteint pour des tubes plus longs (ou de manière équivalente, pour des forces plus élevées) correspond au régime élastique de la membrane. La force varie alors comme la longueur du tube à la puissance  $1/3$ . D'une part, nous montrons par la présente expérience qu'il est possible d'étirer élastiquement la membrane d'une vésicule fermement adhéree à un support en extrudant un tube de membrane. D'autre part, ce ralentissement dans l'augmentation de la force avec la longueur du tube pouvait paraître contre-intuitif dans un premier temps. A priori, on aurait pu s'attendre à ce qu'une dilatation de membrane soit plus « coûteuse » énergétiquement qu'un dépliement des ondulations thermiques et se traduise par une augmentation plus rapide de la force avec la longueur du tube. Toutefois, ce passage entre un régime où la force varie comme  $L$  à un régime où la force varie comme  $L^{1/3}$  peut s'expliquer qualitativement par le fait que, plus la tension augmente, plus le rayon du tube devient petit et donc plus l'excès d'aire par unité de longueur récupéré dans le tube est faible. Puisque c'est l'excès d'aire qui fixe l'augmentation de tension, donc de force, l'observation d'une augmentation de force plus lente devient naturelle. Nous avons également vérifié que les valeurs de la constante d'élasticité d'une membrane lipidique, déduites des ajustements, sont en accord avec celles données par le groupe d'Evans (Evans et Rawicz, 1990) et obtenues par la technique de micropipette. Cette méthode peut donc être une alternative intéressante à la technique délicate des micropipettes pour mesurer le module élastique d'étirement.

Plusieurs remarques importantes sont à noter car notre système est sensiblement différent de celui proposé par Seifert.

La première différence vient du fait que la zone d'adhésion entre la vésicule et la surface n'est pas à l'équilibre, car nous avons volontairement bloqué l'étalement des vésicules par une injection d'une solution de caséine s'adsorbant sur la surface et limitant l'étalement de la vésicule (jusqu'à l'éclatement). C'est la raison pour laquelle, bien que la vésicule adhéree ait une forme de sphère tronquée, comme

c'est attendu en régime d'adhésion forte, toutes les fluctuations de membrane n'ont pas été nécessairement « consommées » au cours du processus d'adhésion. Cela conduit à l'observation du régime entropique de la membrane lors de l'extrusion de tubes.

A partir de ce que nous avons vu dans la première partie de cette thèse, on s'attendrait à ce que si la tension augmente, l'angle de contact augmente également et que la surface de contact décroisse. Nous n'avons jamais observé aucune variation de l'aire de contact. Cette observation peut s'expliquer grâce au phénomène de canthotaxie (Casagrande et al, 1989; Raphael, 1990). Rappelons brièvement en quoi consiste ce phénomène rapporté pour la première fois dans le contexte de l'étalement d'une goutte sur une surface solide. Soit une surface comportant deux zones caractérisées par des énergies de surface, ou dans notre cas, des énergies d'adhésion différentes,  $W_1$  et  $W_2$ , telle que  $W_1 > W_2$ . Que se passe-t-il quand un objet adhérent se trouve à la frontière des deux zones ? Comment est défini l'angle de contact de l'objet avec la surface à la frontière ? La figure IV.3. schématise la situation.

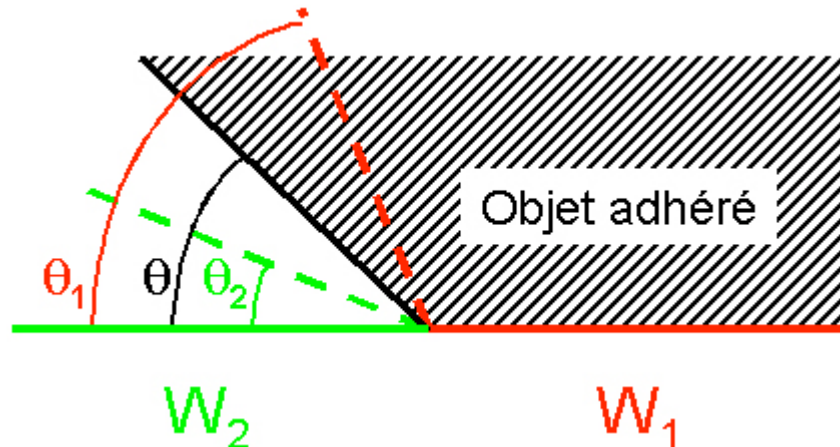


Figure IV.3. : Adhésion d'un objet (goutte ou vésicule) de tension de surface  $\gamma$  à la frontière de deux zones d'énergie d'adhésion différente ( $W_1 > W_2$ ).  $\theta$  représente l'angle de contact de l'objet dans cette situation,  $\theta_1$ , l'angle à l'équilibre pour une surface d'énergie d'adhésion  $W_1$  et  $\theta_2$ , pour une surface d'énergie d'adhésion  $W_2$  à une tension de surface donnée,  $\gamma$ .

Dans le cas d'une goutte de tension de surface  $\gamma$ , les angles de contact,  $\theta_1$  et  $\theta_2$ , pour des énergies d'adhésion respectives,  $W_1$  et  $W_2$ , données sont définis par relation de Young-Dupré :



## Partie 2 : Tubes de membranes

$$W_1 = \gamma (1 - \cos \theta_1) \quad \text{IV.1.}$$

$$W_2 = \gamma (1 - \cos \theta_2) \quad \text{IV.2.}$$

Au niveau de la frontière entre ces deux zones, les relations IV.1. et IV.2. ne sont plus définies du fait de la discontinuité de l'énergie d'adhésion.  $W$  peut prendre des valeurs comprises entre  $W_1$  et  $W_2$  ; en conséquence,  $\theta$  est compris entre  $\theta_2$  et  $\theta_1$ .

Dans le cas d'une vésicule de tension de membrane,  $\sigma$ , nous définissons de la même manière les relations IV.1. et IV.2. en remplaçant  $\gamma$  par  $\sigma$ . Comme  $W$  varie fortement à la frontière et comme  $\sigma$  peut aussi varier, l'angle de contact de la vésicule peut garder la même valeur ou prendre d'autres valeur sans mouvement de la ligne de contact tant que  $\theta_2 < \theta < \theta_1$ . Dans notre cas,  $W_2$  est faible (passivation par la caséine) et  $W_1$  est élevé (interaction streptavidine-biotine). C'est donc l'angle de contact qui peut varier durant l'extraction du tube, et non la surface de contact. La ligne de contact représente donc une zone de largeur sub-optique caractérisé par un fort gradient d'énergie d'adhésion.

Parfois, nous n'avons pas pu tirer des tubes aussi longs qu'on le souhaitait (<250microns). Les tubes se détachent au niveau de la bille au cours de l'extraction pour des forces de l'ordre de 50pN. Nous devons remarquer que nous avons utilisé un substrat couvert de streptavidine pour induire l'adhésion des vésicules et des billes couvertes également de streptavidine pour disposer d'une « poignée » afin d'extraire un tube. Notre système est donc symétrique : le même couple récepteur/ligand est utilisé aux interfaces bille/vésicule et vésicule/substrat. De manière évidente, si un détachement se produit entre la membrane et une surface, la probabilité est plus grande qu'il s'effectue au niveau de la bille plutôt qu'au niveau de la lamelle de verre car la taille de la zone de contact sur la bille, estimée à  $0.1\mu\text{m}^2$ , est beaucoup plus petite que celle sur la surface de verre, de l'ordre de quelques  $\mu\text{m}^2$ . Cependant, une analyse prenant en compte le taux de charge agissant sur la bille a montré que le détachement du tube était dû, non pas à la rupture de la liaison streptavidine-biotine, mais à l'arrachement des lipides biotinylés, liés à la bille via la streptavidine, de la membrane de la vésicule.

De ces résultats, nous avons pu définir un cahier des charges qui permettrait la réalisation de l'expérience décrite par le groupe de Seifert. Deux types de couples

#### **Chapitre IV : *Extraction de tube de membrane à surface constante***

récepteur-ligand différents doivent être utilisés pour éviter un détachement au niveau de la bille. L'un, d'énergie de liaison faible, servira à l'adhésion de la vésicule sur la surface de verre, l'autre couple, d'énergie de liaison plus forte, à l'attachement de la bille sur la vésicule pour extraire le tube. De plus, le détachement de la vésicule au niveau de la surface doit se produire avant l'arrachement des lipides au niveau de la bille. Ceci constitue une deuxième condition pour le choix des couples récepteur-ligand. Pour résoudre ce problème, nous proposons comme récepteur-ligand de faible force adhésive, le couple lectine-sucre (étudié parallèlement en collaboration avec le groupe de Annie Viallat à Grenoble et de Véronique Rosilio à Chatenay-Malabry).

## IV.2. Article soumis à *Erophysics Letters*

### **Pulling long tubes from firmly adhered vesicles**

Damien Cuvelier, Nicolas Chiaruttini, Patricia Bassereau, and Pierre Nassoy\*

Laboratoire de Physico-Chimie Curie, UMR 168 (CNRS), Institut Curie, F-75005 Paris, France.

Running title: Long tubes from adhered vesicles

*PACS numbers*: 87.14.Cc; 87.15.La ; 87.16.Dg

#### Abstract:

We used optical tweezers to measure the force-extension curve for the elongation of nanotubes from adhered giant vesicles. We show that the force increases significantly with the length of the tube, which is drastically different from what is observed when vesicles are pressurized in a micropipette. The absence of any force plateau is quantitatively analysed in the framework of the material model of membranes. In particular, we rationalize a counter-intuitive weaker force rise for long tubes and demonstrate that the measured force-length trace allows us to probe both the entropic regime (characterised by the bending rigidity) and the elastic regime (characterised by the area expansion modulus) of the lipid membrane.

\*Corresponding author: Dr. Pierre Nassoy ([pierre.nassoy@curie.fr](mailto:pierre.nassoy@curie.fr))

### Introduction

A large variety of cellular processes (such as membranous tails left by migrating cells [1], intracellular trafficking pathway [2], intercellular organelle transport [3]) involve the formation of thin tubular structures, known as tethers. Formation of these nanotubes either results from global cell motion in culture dish or is triggered by membrane-anchored molecular motors, which slide along cytoskeletal filaments. Tethers can also be extracted from living cells or synthetic vesicles by the application of an highly localized external force to a bead using hydrodynamics flows [4], micropipettes [5], magnetic tweezers [6] or optical traps [7]. Although recent studies have reported dynamic effects that occur when pulling tubes at high speeds [8] or the presence of a significant force barrier for the nucleation of the tube [9], most experimental studies have focused on the static tether force,  $f_0$ , which was first surprisingly observed to be independent of the tube elongation.

From a theoretical point of view, the physical origin of tubular membranes is relatively well understood and the finding of a static force  $f_0$  can be rationalized as follows [8, 10]. The free energy of a tube of length  $L$  and radius  $r_t$ , pulled with a force  $f$  is the sum of a surface tension term, which acts to reduce the surface area of the tube, a bending rigidity term, which tends to increase the radius of the tube, and the negative mechanical work of the external force. Minimization of the free energy of the tube with respect to  $L$  and  $r_t$  readily yields the equilibrium tether radius and force:

$$r_0 = (\kappa/2\sigma)^{1/2}, \quad (1)$$

$$f_0 = 2\pi(2\kappa\sigma)^{1/2} \quad . \quad (2)$$

This dependence of  $r_0$  and  $f_0$  upon  $s$  has been verified by tuning the pressure applied inside the vesicle-holding micropipette and measuring either the reduction of the tongue length in the micropipette [5] or the restoring force with magnetic tweezers [6]. Whereas  $r_0$  is usually in the 10-100 nm range, and thus too small to be measured optically,  $f_0$ , typically of the order of few tens of pN, can be easily measured with various ultra-weak force probes. It is now well accepted that the sole measurement of  $f_0$  permits a direct determination of either the bending rigidity  $\kappa$  or the tension  $s$  of the membrane. Note however that the above expression for the tube free energy implicitly assumes an ensemble in which the surface tension  $\sigma$  is fixed rather than the surface area or the volume of the vesicle. As a consequence, the validity of eq. (1) fits with the paradigmatic cases where synthetic vesicles are aspirated in micropipettes at constant pressure  $\Delta P$  (which then sets  $\sigma$ ) or where a membrane reservoir is available and “buffers”  $\sigma$  [11]. Yet, in many situations of technological and biological

## Partie 2 : Tubes de membranes

relevance, the membrane tension is likely to vary upon tube extraction. For instance, the Orwar's group has fabricated tubular networks for nanofluidics applications from adhered lipid vesicles [12]. While the geometry of the network was well-controlled, the radius of the nanotubes was not tunable due to the absence of any precise membrane tension control. When long tubes are extruded from living cells, Sheetz and coworkers [11] have reported the occurrence of a seemingly "exponential" increase of the tether force.

In this Letter, our purpose is to investigate the mechanics of tether pulling when the membrane tension is free to accommodate the total area constraints during the elongation. Force versus extension traces monitored during tube extraction from irreversibly adhered giant vesicles are shown to exhibit two distinct regimes characterized by a significant tube length dependence and a counter-intuitive slow-down in force increase at large lengths. Experimental data are quantitatively analyzed in relation with the well-known entropic and elastic properties of lipid membranes.

### Experimental

Giant vesicles were grown using the electroformation technique [13] in a solution of sucrose (170 mOsm) from egg-phosphatidylcholine (EPC) doped with 5% of a 9:1 mixture of 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[methoxy(polyethyleneglycol)-2000] (mPEG-DOPE) and 1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[biotinyl(polyethylene glycol) 2000] (DSPE-PEG-biotin). All lipids were purchased from Avanti Polar Lipids. The biotinylated lipid has a two-fold purpose: first, it serves to make vesicles adhering to streptavidin-coated beads (radius 1.76  $\mu\text{m}$ , from Bangs Laboratories), which act as handles to pull out tethers; second, because of the high affinity of the biotin-streptavidin complex [14], it is used to promote irreversible anchorage (over the time scale of our experiments) of vesicles onto streptavidin-coated substrates. The PEG-lipid was used to reduce non-specific adhesion of the vesicle to the substrate.

Sample chambers were made of two glass coverslips glued to an aluminium support. The bottom slide was first coated with polyethylene-imine (Sigma), and subsequently covered either with b-casein (Sigma) to prevent vesicle adsorption with streptavidin (Pierce) or to promote adhesion of biotinylated vesicles.

The chamber was placed on the stage of an inverted microscope (Axiovert 200, Zeiss) equipped with a 100x immersion oil objective (1.3 N.A.) and a 546 nm interference filter to perform both transmission bright field imaging (BF) and reflection interference contrast

## Chapitre IV : Extraction de tube de membrane à surface constante

microscopy (RICM). Images were collected by a CCD camera (XC-ST70CE, Sony) and recorded at 25 frames per second after contrast enhancement (Argus image processor, Hamamatsu).

As a force transducer to monitor the tether force during elongation, we used a classical optical tweezer, generated by steering into the microscope the infrared light from a solid-state, diode-pumped Nd :YAG laser (1064 nm, 2.5 W, Coherent). Video images of trapped beads were analyzed using a custom-made tracking software (provided by K. Zeldovitch) with a sub-pixel spatial resolution of 35 nm. Trapping stiffness,  $k_f$ , was calibrated by measuring the fluctuations of a captured bead for incident laser power lower than 200mW ( $k_f = k_B T / \langle \Delta x^2 \rangle$ ) and against Stokes' drag force for laser power higher than 200mW ( $k_f \cdot \Delta x = 6\pi\eta R v$ , where  $\Delta x$  is the displacement of the bead in the trap,  $\eta$  is the water viscosity and  $v$  is the velocity of the moving specimen chamber) [15]. From these two methods, the stiffness of the tweezers was found of the order of  $0.07 \pm 0.01$  pN/nm/W. Typical laser powers used here were in the 0.5-1W range.

To validate our experimental set-up, we started with performing control experiments at fixed membrane tension. Vesicles were held at constant aspiration pressure  $\Delta P$  in micropipettes. The basics of the micropipette technique were described in [16]. Briefly, glass capillaries were pulled into needles, cut open and microforged at desired inside radii ( $R_p \sim 2\mu\text{m}$ ). The micropipette was then filled with phosphate buffered saline (PBS) 180mOsm +  $\beta$ -casein 0.5% w/w, and connected to 3-axis micromanipulator. A long scanning range (300  $\mu\text{m}$ ) piezoelectric translator (P-783.ZL, Physik Instrumente) was placed in series with the coarse x-axis, and its motion was controlled through a waveform generator (TGA1241, Thurlby Thandar Instruments). The suction pressure in the pipette was set by adjusting the height of a water-filled reservoir connected to the back of the pipette. Membrane tension  $\sigma$  was computed from the Laplace formula  $\sigma = \Delta P \cdot R_p / 2(1 - R_p / R_v)$  [17], where  $R_v$  is the radius of the portion of the vesicle outside of the pipette. A bead was biochemically glued at the apex of the vesicle by micromanipulation, and the tether was extracted by moving the pipette backwards at constant speed ( $v = 2 \mu\text{m/s}$ ).

Most of our experiments were aimed to investigate the force-elongation response of tethers extracted from vesicles in the absence of any tension control. To do so, biotinylated vesicles were allowed to sediment onto streptavidin-coated slides. Once the contact with the surface was initiated, spreading of the vesicles readily occurred. In most cases, in spite of the sparse surface density of biotinylated lipids, vesicles were observed to burst upon completion

## Partie 2 : Tubes de membranes

of the spreading process. This tension-induced lysis was checked to be due to residual non-specific (electrostatic) interactions arising from the underlying polyethylene-imine layer. In order to circumvent this problem, we injected few microliters of  $\beta$ -casein isotonic solution (0.5% w/w) into the chamber when vesicles started to spread. This injection led to a passivation of the surface around the growing adhesion patches by rapid adsorption of casein. In this pipette-free geometry, the sample chamber was rigidly connected to the previously used micromanipulator. Streptavidin beads were first glued to vesicles in their equatorial plane. Then, tethers were pulled out by moving the whole chamber away from the trapped bead at constant speed ( $v=2 \mu\text{m/s}$ ).

Even though our primary objective was to measure the tether force as a function of tube length, quantitative analysis also required to monitor the area of the adhesion disk during elongation. However, because of the maximal length of the tubes (typically  $250 \mu\text{m}$ ), bead and adhesion patch could not be visualized simultaneously in the same field of view. We thus carried out complementary experiments in the same conditions as those described above. Instead of keeping the trapped bead centered and moving the observation chamber, we kept the vesicle centered and pulled tubes with a moving micropipette. RICM visualization allowed us to monitor the size of adhesion patches.

## Results and Discussion

Fig. 1a displays a video-micrograph of the tension-controlled tether pulling experiment. The extruded tether can be seen between the vesicle body and the bead. Bead position tracking allowed us to measure the force on the bead as a function of the extension imposed by the pipette displacement. As shown in Fig. 1b, the force-extension curve exhibits the classical features for membrane tube formation, as reported both theoretically and experimentally [9, 10]. At zero length, the bead is brought in contact with the vesicle, which induces a negative compression force. Upon pulling, the vesicle gets deformed, which leads to a significant increase in force up to a maximum value. As analyzed in [9], this overshoot force is related to the size of the adhesion patch between the bead and the vesicle. At this point, corresponding to a extension of about  $2 \mu\text{m}$ , the deformed vesicle suddenly relaxes into a spherical shape connected to a tube, and concomitantly, the force drops to a plateau value  $f_0$ . More precisely, it is worthwhile to note that, given the imposed membrane tension,  $\sigma=0.06\text{mN/m}$ , and the bending rigidity of a “fuzzy” (PEG-decorated) EPC vesicle,  $\kappa=12k_B T$

## Chapitre IV : *Extraction de tube de membrane à surface constante*

[18], the static tether force was expected to be  $f_0=15\text{pN}$ , and was experimentally found to be  $16\pm 1\text{pN}$ . Finally, this plateau was always observed to be remarkably flat up to  $50\mu\text{m}$  in tube length at least. This observation reveals that the corrections to the static force proposed by Yeung and Evans [8] for finite pulling speed and tube length are negligible (i.e. estimated at less than  $0.1\text{pN}$ ) in our experimental conditions.

Next, we investigated how this force-extension curve was altered in the absence of tension-buffering reservoir. As can be seen in Fig. 2a, the experiment was very similar to the previous one, except that the vesicle was adhered onto the surface. Fig. 2b shows representative force-extension data for three different vesicles. As previously, initial vesicle deformation led to a rapid increase in force, followed by a sudden drop when tube formation was initiated. More important, the force variation during tube elongation was strikingly different. The tether force was always observed to increase significantly with tube length over the whole range of lengths that we explored. In most cases (curves 2 and 3), we were able to extract tubes up to  $250\mu\text{m}$ , corresponding to the maximal scanning range of our device. Sometimes (curve 1), tube detachment at the bead junction occurred at shorter lengths for measured forces of the order of  $50\text{-}60\text{pN}$ . Immediately, we may anticipate two possible scenarios for explaining such a force increase. One could argue that residual free area is consumed by tube elongation, which leads to a membrane tension increase, and concomitantly to a force rise. Alternatively, following a theoretical proposal by Udo Seifert [19], which initially inspired the present work, tether formation may induce unbinding of adhered vesicles, providing the total membrane area remains constant (i.e. the excess area is fully consumed in the adhesion plate in a situation of strong adhesion).

A critical test for distinguishing between these two mechanisms consisted in determining whether the adhesion patch between vesicle and substrate was affected by tube elongation. Fig. 3a shows a snapshot of a typical RCM pattern for an adhered vesicle ( $R_v=7\mu\text{m}$ ) during tether extraction. The dark disk represents the contact area, while the interference fringes are indicative of the vesicle shape in the vicinity of the surface [20]. As seen in Fig. 3b, the contact area was found to remain constant over the time course of the experiment. The observed irregularities could be assigned to slight defocusing or illumination variations, which may affect image binarization. This observation suggests that the tether force was not sufficient to initiate detachment of the vesicle from the surface. Since the vesicles were firmly bound during the whole extrusion process, we propose that the tether force increase was solely due to an increase in excess area  $\Delta A$ , which was collected into the



## Partie 2 : Tubes de membranes

growing tube. As shown by Evans and Rawicz [21], the apparent area expansion,  $\Delta A/A_0 = \alpha_0 - \alpha$ , ( $A_0$  being the projected area of the adhered vesicle, and  $\alpha_0$  an unknown constant that accounts for the excess area at zero tension) is related to the membrane tension by :

$$\alpha_0 - \alpha \approx \left( \frac{k_B T}{8\pi\kappa} \right) \ln \left( \frac{\sigma}{\sigma_0} \right) + \frac{\sigma - \sigma_0}{K_a} \quad (3)$$

where  $\sigma_0$  is the initial membrane tension, and  $K_a$  is the elastic modulus for direct area expansion. The first term in eq. (3) is the lead contribution for small area strains and describes the entropic regime, in which bending ripples are progressively smoothed out. The second term is dominant at large strains and describes the elastic regime, in which the membrane exhibits a microscopic extensibility [22].

By assuming that the relative excess area is given by the ratio of the tether surface area to the spherical vesicle area, i.e.  $\alpha_0 - \alpha \approx r_t L / 2R_v^2$ , combination of eq. (2) and (3) gives the following relation:

$$L \approx R_v \frac{f \cdot R_v}{16\pi\kappa} \left[ \frac{k_B T}{\kappa} \ln \left( \frac{f}{f_0} \right) + \frac{(f^2 - f_0^2)}{\pi\kappa K_a} \right] \quad (4)$$

with  $f_0$  the tether force at lowest tube length, expected to be of the order of  $2\pi\sqrt{2\kappa\sigma_0}$ .

From eq.(4), we may remark that : i) for short tubes, the tether force grows roughly linearly with  $L$  (if one neglects the logarithmic correction) and the slope yields the bending rigidity  $\kappa$ , and ii) for long tubes, the tether force only increases as  $L^{1/3}$ , and the prefactor depends upon both  $\kappa$  and the lipid area dilation modulus  $K_a$ . Qualitatively, these scaling law are consistent with the force slow down observed in fig. 2b, as the tube becomes longer. At first sight, these findings could seem to be counter-intuitive, because direct elastic stretching of the membrane is more “costly” (from an energetic point of view) than smoothing of thermal undulations. However, a simple rationale can be found as follows: since the membrane tension strongly increases during elongation, long tubes are thinner than short tubes (eq. (1)), and their surface area per unit length is subsequently reduced.

More quantitatively, the force-extension traces were fitted with eq.(4). Fig. 4a shows the same data points in a log-log plot of  $L$  versus  $f$ , and the lines are the best fits by taking  $K_a$  and  $f_0$  as floating parameters. As can be seen, the agreement is excellent, and the derived elastic moduli  $K_a$  (respectively 0.28, 0.25, 0.27 N/m for curves 1, 2 and 3) are consistent with reported values [16]. As shown in fig. 4b, which represents the expected variation of  $\sigma$  as a

## Chapitre IV : Extraction de tube de membrane à surface constante

function of  $\Delta\alpha$ , all the curves are associated with variations in  $\sigma$  that span both the entropic and elastic regimes. In consequence, the complete version of eq.(4), which describes the crossover between both limit situations, was required to fit our data.

In cases of high initial vesicle tension (e.g. curve 1), tube-bead detachments were observed at forces of 50-60pN. The order of magnitude of rupture forces can be understood by considering that the unbinding mechanism involves uprooting of a patch of biotinylated lipids from the membrane under dynamic loading. As defined in [23], the dimensionless loading parameter is  $r_f \equiv k_f v_b x_\beta / k_B T v_0 \approx 20$ , with  $k_f=0.07$ pN/nm the stiffness of the force transducer,  $v_b \sim 20$ nm/s the displacement speed of the optically trapped bead during tube elongation,  $x_\beta=2$ nm the location of the activation barrier in the energy profile of the unbinding pathway (here equal to the length of a lipid chain), and  $v_0 \sim 1/30$ s<sup>-1</sup> the spontaneous extraction rate of a lipid from a membrane [23]. Then, by assuming that the diameter of the bead-tube patch is about 100 nm, and that the biotinylated lipids contained in this patch ( $N_0 \approx 300 \geq r_f \geq 1$ ) are loaded in parallel (i.e. the force is equally distributed on each lipid), the cooperative rupture force is:  $f^* = (k_B T / x_\beta) \cdot r_f \cdot \ln(N_0 / r_f) \approx 100$  pN, according to the description proposed by Seifert [24], which is in good agreement with the measured unbinding forces.

Finally, we need to return to the observation of what happens at the adhesion patch between the vesicle and the substrate in order to clarify an apparent contradiction. In case of strong adhesion, the tension of the vesicle and its equilibrium contact angle with the surface,  $\theta = \arcsin(R_c / R_v)$  (where  $R_c$  is the contact radius) are known to be related to the adhesion energy  $W$  by the Young-Dupré equation:  $W = \sigma(1 - \cos\theta)$  [25]. One could thus anticipate that, as  $\sigma$  is increased during tube elongation,  $\theta$  and thus the contact radius decrease for a given adhesion energy. Yet, under our experimental conditions,  $R_c$  was found to remain constant (see fig. 3b). As described in the Experimental section, the adhesion patch was controlled by blocking vesicle spreading with casein. Doing so, a chemical passivation of the surface was performed around the adhesion disk. The vesicle/substrate contact line then lies at the border between a substrate of high energy and a substrate of low energy. This situation, known as canthotaxis, has been studied in detail by Raphael in the context of liquid wetting [26], and was shown to be a case for which the Young-Dupré relation is broken down. The vesicle is no longer adhered on a substrate of constant  $W$ , but the contact line is pinned in a highly localized region of strong energy gradient. In consequence, the contact angle is free to vary between the two limits for the adhesion energy.

## **Partie 2 : Tubes de membranes**

### **Concluding remarks**

We have investigated the mechanics of nanotubes pulled from vesicles that are firmly adhered to a substrate. The force was observed to exhibit a significant dependence upon the tube length, in contrast with the force plateau observed when the membrane tension is kept constant. The force-extension signature was theoretically described in the classical framework of membrane mechanics. Quite important, we demonstrated that tube extrusion allows us to probe not only the entropic regime but also the elastic regime of lipid membranes and thus to provide an alternative method to the classical micropipette manipulation for measuring the bending and stretching moduli of lipid membranes.

Under the peculiar experimental conditions used to bind the vesicles to the substrate and to extract the tube (same biotin-streptavidin bonds on each side), direct stretching of the membrane followed by tube-bead detachment was preferentially observed, instead of vesicle unbinding from solid substrates as recently predicted [19]. This latter mechanism could be evidenced by selecting a receptor-ligand pair of weaker affinity than streptavidin-biotin.

We thank J.-F. Joanny, O. Campas, C. Leduc, M. Dogterom, G. Koster, A. Cacciuto and A. Fera for enlightening discussions. This work was supported by the Human Frontier Science Program (RG#52/2003) and by the Curie Institute (PIC).

References

- [1] Correia J. et al., *J. Cell. Biol.*, 146 (1999), 831.
- [2] White J. et al., *J. Cell Biol.*, 147 (1999) 743.
- [3] Rustom A. et al., *Science*, 303 (2004), 1007.
- [4] Waugh R., *Biophys. J.*, 38 (1982) 29.
- [5] Hochmuth R.M., Wiles H.C., Evans E.A., McCown J.T., *Biophys. J.*, 39 (1982) 83.
- [6] Heinrich V., Waugh R. E., *Ann. Biomed. Eng.*, 24 (1996) 595.
- [7] Dai J., Sheetz M. P., *Biophys. J.*, 68 (1995) 988.
- [8] Evans E., Yeung A., *Chem. Phys. Lipids*, **73** (1994) 39.
- [9] Koster G. et al., *Phys. Rev. Lett.*, **94** (2005) 068101.
- [10] Derényi I., Jülicher F., Prost J., *Phys. Rev. Lett.*, 88 (2002) 238101; Powers T. R., Huber G., Goldstein R. E., *Phys. Rev. E*, 65 (2002) 041901.
- [11] Raucher D., Sheetz M.P., *Biophys. J.*, 77 (1999) 1992.
- [12] Karlsson A. et al., *Anal. Chem.*, 75 (2003) 2529.
- [13] Angelova M.I., Dimitrov D., *Progr. Colloid Polym. Sci.*, 76 (1988) 59.
- [14] Green, N. M., *Adv. Protein Chem.*, 29 (1975) 85.
- [15] Bockelmann U. et al., *Biophys. J.*, 82 (2002) 1537.
- [16] Needham D., Zhelev D.V. In *Vesicles*, edited by M. Rossof (Marcel Dekker, New York, Basel, and Hong Kong) 1996, pp. 373-444.
- [17] Waugh R., Evans E. A., *Biophys. J.*, 26 (1979) 115.
- [18] Evans E., Rawicz W., *Phys. Rev. Lett.*, 79 (1997) 2379; Cuvelier D., Derényi I., Bassereau P., Nassoy P., *Biophys. J.* in press, 2005.
- [19] Smith A.-S., Sackmann E., Seifert U., *Phys. Rev. Lett.*, 92 (2004) 208101; U. Seifert (private communication).
- [20] Bruinsma R., Sackmann E., *C. R. Acad. Sci. Paris. Série IV.*, 2 (2001) 803.
- [21] Evans E., W. Rawicz, *Phys. Rev. Lett.*, 64 (1990) 2094.
- [22] Note that we neglect here the corrections provided in the refined description by Fournier J.B., Ajdari A., Peliti L., *Phys. Rev. Lett.*, 86 (2001) 4970.
- [23] Evans E., *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 30 (2001) 105.
- [24] Seifert U., *Phys. Rev. Lett.*, 84 (2000) 2750.
- [25] Seifert U., Lipowsky R., *Phys. Rev. A*, 42 (1990) 4768; Tordeux C., Fournier J.B., *Phys. Rev. E*, 65 (2002) 041912.
- [26] Raphaël E., Thèse de doctorat de l'Université Paris VI (1989).

## Partie 2 : Tubes de membranes

### Figure captions

Fig. 1: (a) Micrograph of the tether extraction experiment at constant membrane tension (set by micropipette aspiration). Scale bar  $5\mu\text{m}$ ; (b) Tether force as a function of extension as measured by optical tweezers.  $\sigma=0.06\text{ mN/m}$  and  $\kappa=12\text{ k}_B\text{T}$ .

Fig. 2: (a) Micrograph of the tether extraction experiment when vesicles are adhered to the substrate. Scale bar  $5\mu\text{m}$ ; (b) Examples of force-extension curves as measured by optical tweezers for three different vesicles (radii  $7.7$ ,  $11.5$  and  $13.5\mu\text{m}$ ).

Fig. 3: (a) Micrograph of the vesicle-substrate adhesion patch as visualized by RICM. Scale bar  $5\mu\text{m}$ ; (b) Contact area as a function of time during tube elongation.

Fig. 4: (a) Log-log representation of length-force curves displayed in Fig. 2b (i.e. for membrane tubes extracted from adhered vesicles. Initial length is taken after the force overshoot corresponding to tube formation. Curves 1, 2 and 3 refer to the different vesicles. Lines are fits to the data points using eq.(5); (b) Generic plot of tension versus apparent excess area. The lines 1, 2 and 3 show the range of membrane tensions spanned during tube elongation for each vesicle.

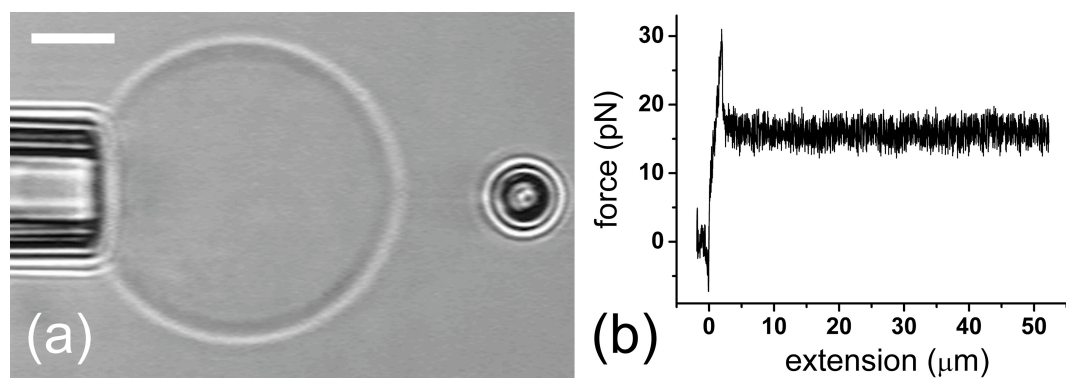


Figure 1

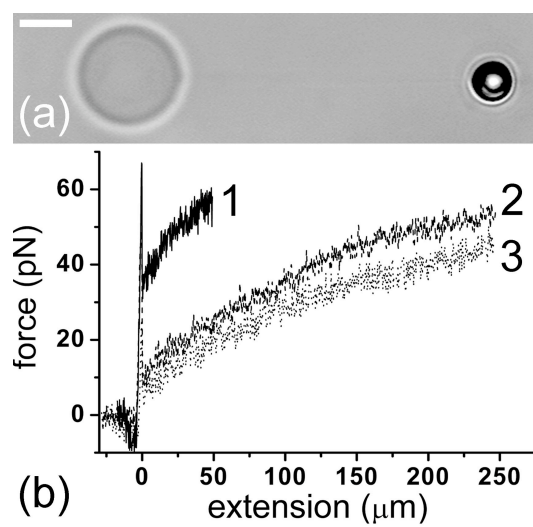


Figure 2

Partie 2 : Tubes de membranes

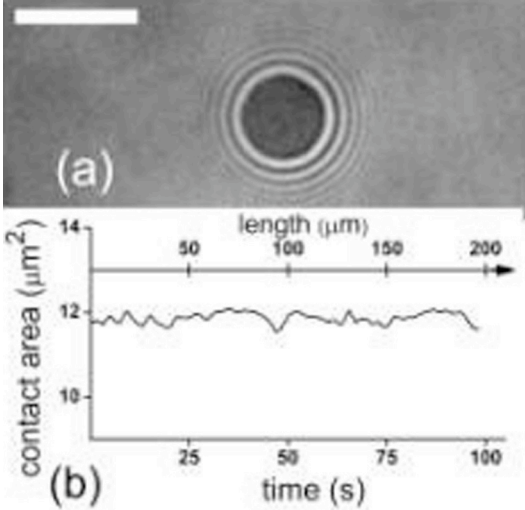


Figure 3

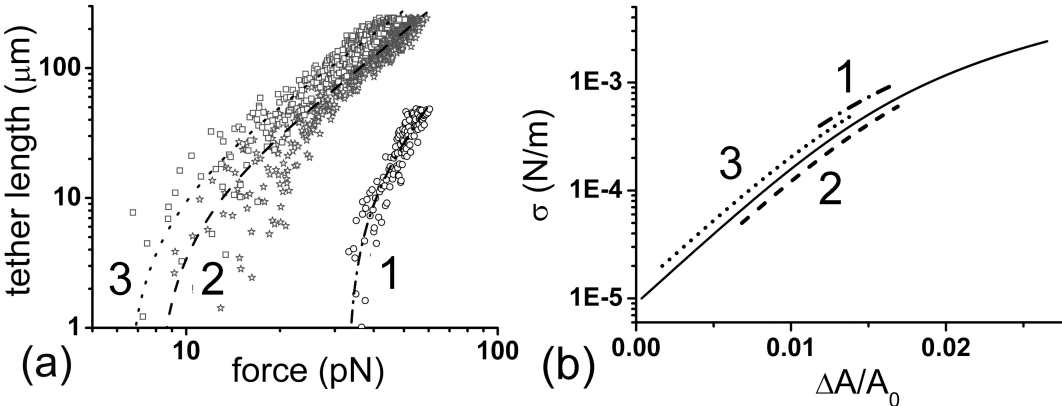


Figure 4

### IV.3. Application de l'extraction de tube à la détermination de tension de membrane

Ce dispositif expérimental nous a permis d'estimer la tension de membrane d'une vésicule attachée sur une surface (Leduc et al, 2004) dans les conditions particulières correspondant aux expériences menées par Cécile Leduc au laboratoire. Le principe de l'expérience consiste à extraire des tubes de membrane à l'aide de moteurs moléculaires, les kinésines, liés à une vésicule et marchant le long de rails de microtubules (figure IV.4.).

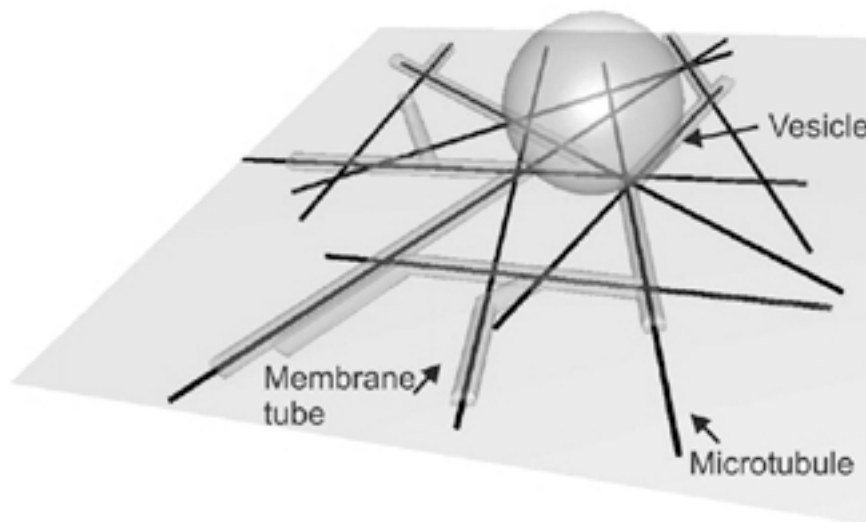


Figure IV.4. : Schéma d'extraction de tube de membrane via des moteurs moléculaires marchant sur des rails de microtubules (Extrait de (Koster *et al*, 2003)).

Un des objectifs de Cécile était de déterminer le nombre moyen de moteurs tirant effectivement le tube. Un modèle théorique a été développé prenant en compte la dynamique d'attachement-détachement des moteurs. A priori, le nombre de moteur tirant le tube n'est pas donné de façon triviale par le rapport de la force nécessaire à tirer le tube par la force que peut exercer un moteur unique. Il fallait donc pouvoir mesurer dans ces conditions la force pour étirer un tube, donc la tension de membrane. Nous avons donc mesuré par pinces optiques la force d'extrusion de tubes dans les mêmes conditions des expériences avec moteurs moléculaires (même pression osmotique, même traitement de la surface, présence de moteurs avec ATP). La membrane était constituée d'EPC(95%) + lipides PEG<sub>2000</sub>(5%).



## Partie 2 : Tubes de membranes

La figure IV.5. montre l'évolution de la force en fonction du temps. Le tube de membrane a été extrait à une vitesse de  $2 \mu\text{m/s}$ , sur une longueur de  $10 \mu\text{m}$ . Remarquons la forme typique du seuil de force. Un plateau est observé correspondant à une force de  $28\text{pN}$  ; en supposant que les lipides biotinylés influent peu la rigidité de courbure (dans ce cas  $\kappa = 12 \text{ k}_B\text{T}$ ), la tension est alors estimée à  $2 \cdot 10^{-4} \text{ N/m}$ . A partir de cette valeur, Cécile Leduc a estimé une valeur absolue du nombre de moteurs actifs qui extrait le tube.

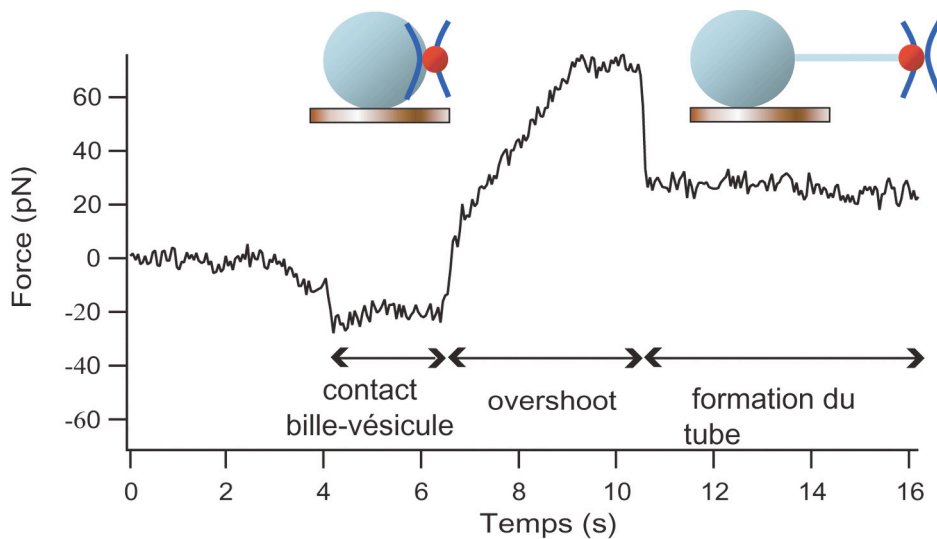


Figure IV.5. : Variation de la force agissant sur la bille tirant le tube extrait d'une vésicule décorée de kinésines et mise en contact de microtubules, dans des conditions identiques aux expériences de Cécile Leduc (Leduc *et al*, 2004). Trois parties caractéristiques sont discernables : la vésicule est mise en contact de la bille (force négative), la vésicule se déforme jusqu'au seuil de force, et finalement un tube est extrait. Le plateau de force est égale à  $28\text{pN}$ .

Toutefois, il peut paraître surprenant, par rapport à ce que nous venons de voir dans ce chapitre, que la force reste constante au cours de l'extrusion. Cela signifierait donc que nous pouvons considérer que la tension reste constante durant l'extraction du tube. D'après l'étude effectuée précédemment, nous aurions pu nous attendre à une augmentation de force de l'ordre de  $2\text{pN}$  sur  $10 \mu\text{m}$ . Cette variation est effectivement faible et dans la limite des barres d'erreur. Il faut tirer des tubes beaucoup plus longs, ou dans le cas des moteurs, avoir des réseaux suffisamment étendus, pour que cet effet soit appréciable.

## IV.4. Conclusion

Extraire des tubes à surface constante nous a permis de montrer une autre utilisation de notre système expérimental. Au chapitre III, nous avons vu qu'on pouvait estimer une rigidité de courbure connaissant la tension de membrane. Ici, nous avons montré qu'il était possible de déduire la tension d'une membrane connaissant son module de courbure. De plus, l'extraction de tubes longs nous permet de sonder le régime élastique d'une membrane et d'en estimer son module.

Cependant, ces deux approches présupposent la connaissance d'un des deux paramètres physiques fondamentaux des membranes, à savoir  $\kappa$  ou  $\sigma$ . Nous allons décrire, dans le chapitre suivant, une technique originale basée sur des mesures de forces et de micromanipulation permettant une mesure simultanée et indépendante de la tension et de la rigidité.

## Bibliographie : Chapitre IV

- Casagrande C, Fabre P, Raphael E et Veyssie M, 1989.  
"Janus Beads" : Realization and Behaviour at Water/Oil Interface.  
Europhysics Letters, 9: 251-255.
- Evans E et Rawicz W, 1990.  
Entropy-driven tension and bending elasticity in condensed-fluid membranes.  
Physical Review Letters, 64: 2094-2097.
- Karlsson A, Karlsson R, Karlsson M, Cans AS, Stromberg A, Ryttsen F et Orwar O, 2001.  
Networks of nanotubes and containers.  
Nature, 409: 150-152.
- Koster G, VanDuijn M, Hofs B et Dogterom M, 2003.  
Membrane tube formation from giant vesicles by dynamic association of motor proteins.  
Proceedings of the National Academy of Science U.S.A., 100: 15583–15588.
- Leduc C, Campas O, Zeldovich C, Roux A, Jolimaitre P, Bourel-Bonnet L, Goud B, Joanny JF, Bassereau P et Prost J, 2004.  
Cooperative extraction of membrane nanotubes by molecular motors.  
Proceedings of the National Academy of Science U.S.A., 101: 17096-17101.
- Raphael E, 1990.  
Mouillage de surfaces hétérogènes et polymères confinés.  
Paris, Université de Paris VI.
- Seifert U et Lipowsky R, 1990.  
Adhesion of vesicles.  
Physical Review A, 42: 4768-4771.
- Sheetz MP et Dai J, 1996.  
Modulation of membrane dynamics and cell motility by membrane tension.  
Trends in Cell Biology, 6: 85-89.
- Smith A-S, Sackmann E et Seifert U, 2003.  
Effects of a pulling force on the shape of a bound vesicle.  
Europhysics Letters, 64: 281-287.
- Smith AS, Sackmann E et Seifert U, 2004.  
Pulling tethers from adhered vesicles.  
Physical Review Letters, 92: 208101.
- Tordeux C, Fournier JB et Galatola P, 2002.

## **Chapitre IV : *Extraction de tube de membrane à surface constante***

Analytical characterization of adhering vesicles.  
Physical Review E, 65: 041912.

Upadhyaya A et Sheetz MP, 2004.  
Tension in tubulovesicular networks of Golgi and endoplasmic reticulum  
membranes.  
Biophysical Journal, 86: 2923-8.

## Partie 2 : Tubes de membranes

## Chapitre V

# Coalescence de tubes de membrane

Dans les chapitres précédents, un tube unique de membrane a été tiré d'une vésicule. Nous allons montrer, dans cette partie, l'intérêt d'extraire deux tubes d'une même vésicule. Lorsque les cols de deux tubes sont suffisamment proches, ils interagissent et coalescent. Dans un premier temps, nous mettrons en évidence et analyserons les interactions mises en jeu conduisant à la coalescence des deux tubes. Dans un deuxième temps, nous appliquerons ce phénomène à la détermination de la tension de membrane ou de la rigidité de courbure de manière indépendante.

Cette partie a donné lieu à une publication : « Coalescence of membrane tethers : experiments, theory and applications ». Damien Cuvelier, Imre Dérenyi, Patricia Bassereau et Pierre Nassoy, *Biophysical Journal*, 88 : 2714-2726.

### V.1. Introduction

L'extraction de tubes multiples d'une même vésicule a été imaginée pour produire des réseaux de nano-canaux. Le groupe d'Evans (Evans et al, 1996) a montré pour la première fois l'existence du phénomène de coalescence sur des vésicules. Evans avait envisagé d'utiliser ce phénomène et de polymériser les tubes obtenus pour produire des réseaux de nano-canaux. Sur les photographies de la figure V.1, on voit deux tubes de membrane issus d'une même vésicule qui ont finalement fusionné pour former une jonction à 3 tubes. L'angle à l'embranchement est un angle caractéristique de  $120^\circ$ . A l'équilibre, la tension de membrane le long des tubes est uniforme. Ainsi, l'équilibre des forces au croisement des trois tubes impose un angle de  $120^\circ$ . On peut remarquer que cet angle est connu dans le domaine des mousses : lorsque trois bulles sont accolées, l'énergie de surface constante impose la valeur de l'angle à  $120^\circ$ .

## Partie 2 : Tubes de membranes

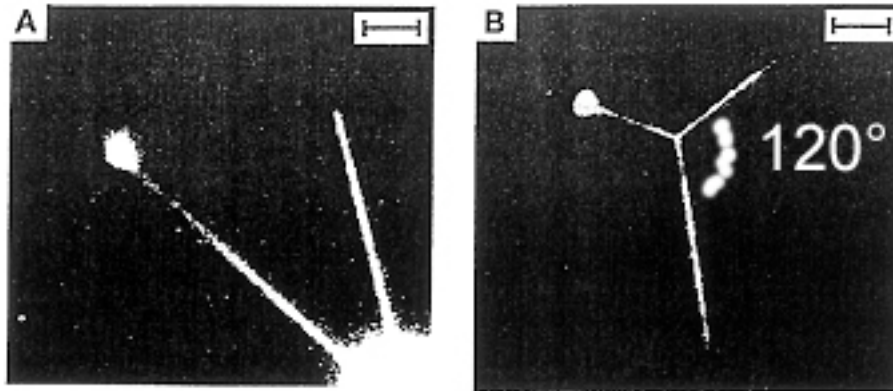


Figure V.1. : Photographie par microscopie de fluorescence de deux tubes de membrane issus d'une même vésicule. (A) Avant coalescence. (B) après coalescence. L'angle à l'embranchement est de  $120^\circ$ . La barre d'échelle vaut  $10\ \mu\text{m}$  (extrait de (Evans *et al*, 1996)).

Le groupe d'Owe Orwar a ensuite utilisé cette propriété pour former des réseaux de tubes de membrane de topologie contrôlée (Karlsson *et al*, 2002; Karlsson *et al*, 2003). La figure V.2. montre qu'on peut atteindre un niveau de complexité plus élevé et créer, par micromanipulation, des géométries de réseaux de nanotubes très bien contrôlés. Six vésicules sont reliées entre elles par des tubes. Lorsque deux tubes coalescent, le réarrangement correspondant induit la formation de plusieurs embranchements.

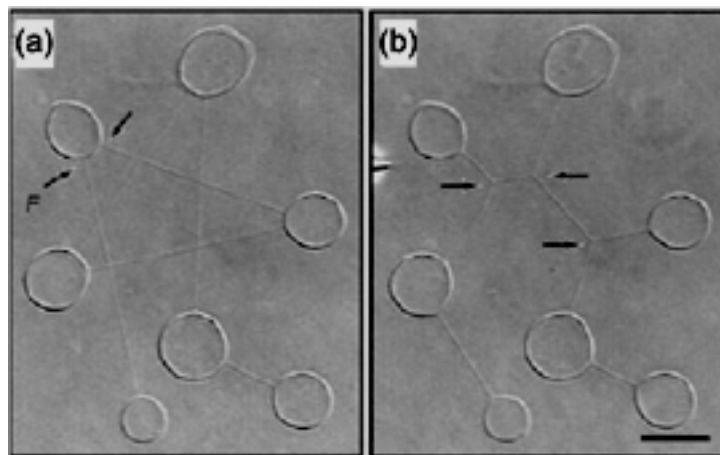


Figure V.2. : Formation d'un réseau de tubes par coalescence. (a) Avant coalescence. Les flèches indiquent l'endroit où la coalescence démarre. (b) A l'équilibre. Les embranchements sont indiqués par les flèches. La barre d'échelle représente  $5\ \mu\text{m}$  extrait de (Karlsson *et al*, 2002).

Si les tubes reliant initialement les vésicules sont extraits dans un ordre précis, le réarrangement des tubes peut conduire à une situation topologique plus complexe où un noeud de tubes de membrane s'établit (Figure V.3.) (Lobovkina et al, 2004). L'angle final obtenu entre les différents tubes correspond à la situation où les forces sont équilibrées : chaque tube est la bissectrice des deux tubes opposés. Le groupe suédois a ensuite utilisé ces réseaux connectés à des vésicules qui jouent le rôle de micro-réacteurs pour effectuer des réactions chimiques en milieu confiné et déplacer des molécules de façon contrôlée dans ces canaux en jouant sur la tension des vésicules (Davidson et al, 2005; Dommersnes et al, 2005).

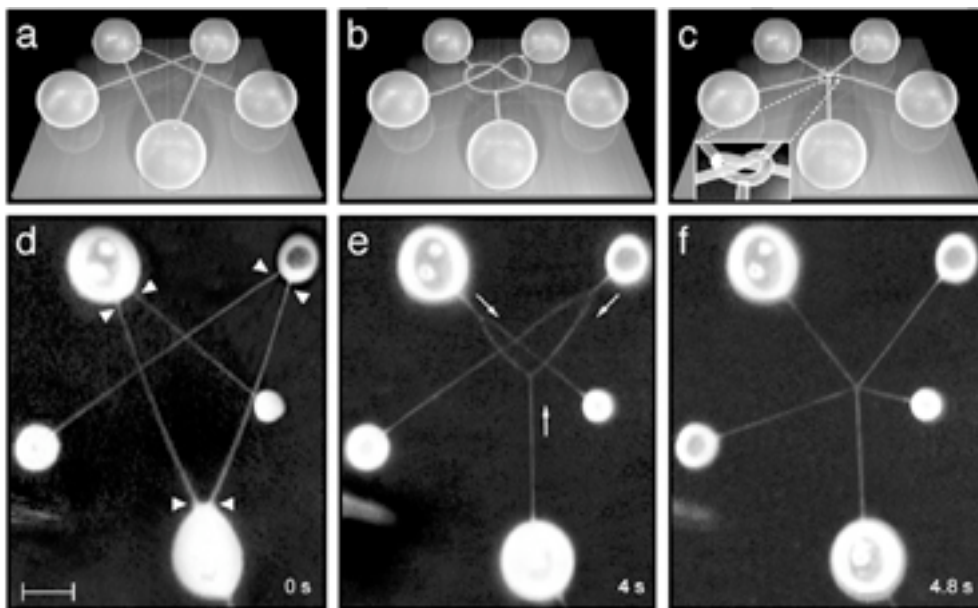


Figure V.3. : Réarrangement de tubes de vésicule conduisant à la formation d'un noeud. Les figures (a), (b), (c) schématisent respectifs des situations (d), (e), (f), visualisées par microscopie de fluorescence. La barre d'échelle représente  $15\ \mu\text{m}$  (extrait de (Lobovkina et al, 2004)).

Malgré ces prouesses technologiques, aucune analyse quantitative de la coalescence n'a été réalisée d'un point de vue expérimental. Seuls Derényi et al. (Derényi et al, 2002) ont étudié par simulation l'interaction entre deux tubes issus d'une membrane plane. Pour cela, il est possible de calculer la forme d'énergie minimale quand deux tubes sont tirés (Figure V.4.A) à partir d'une membrane plane. Pour éviter que les deux tubes ne coalescent, une expérience virtuelle consiste à placer une tige très fine ( $\text{taille} \ll R_0$ , rayon du tube) entre les deux tubes, empêchant ainsi la membrane de remonter, et les tubes de fusionner. En faisant varier la hauteur  $h$  de cette tige, les auteurs ont pu calculer la force appliquée par les deux



## Partie 2 : Tubes de membranes

tubes en train de fusionner sur la tige (voir figure V.4.). Cette force varie de  $f_0/2$  à  $f_0$ , où  $f_0$  est la force statique du tube, ce qui veut dire qu'il est particulièrement favorable pour les deux tubes de coalescer.

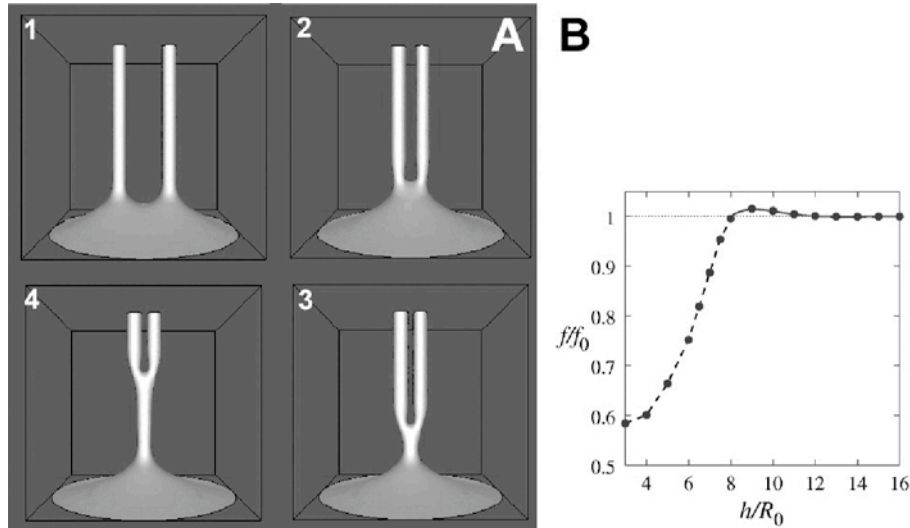


Figure V.4. : Coalescence de deux tubes. (A) Formes d'énergie minimale prises par deux tubes dont la réorganisation est empêchée par une tige (non visible) placée à différentes hauteurs  $h$ . Ces différentes images donnent une idée de la dynamique de coalescence. (B) Evolution de la force en fonction de la hauteur  $h$  de la tige (extrait de (Derényi *et al*, 2002)).

Dans cette situation, où la membrane est plane, on peut comprendre intuitivement qu'il existe une force attractive à longue portée entre les deux tubes, et donc qu'aucune barrière énergétique ne bloque le processus de coalescence. Cependant, pour des systèmes sphériques, on voit bien en particulier dans le cas où deux tubes seraient diamétralement opposés, que ce ne serait pas possible !

## V.2. Expérience préliminaire

Le principe de l'expérience décrite dans ce chapitre consiste à extraire deux tubes d'une même vésicule à tension de membrane et vitesse d'extrusion contrôlées, afin d'étudier quantitativement le processus de coalescence. Le dispositif expérimental utilisé ici est le même que celui exposé dans le chapitre III, si ce n'est qu'on a ajouté un deuxième micromanipulateur trois axes (Leica) (Figure V.5.).

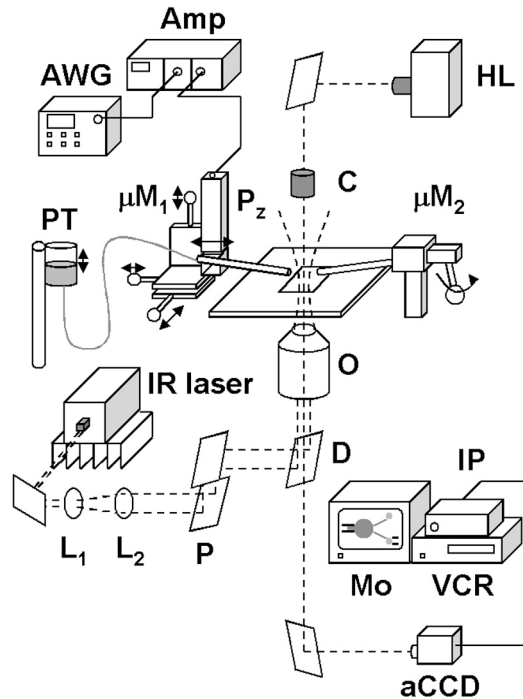


Figure V.5. : Schéma global du dispositif expérimental utilisé pour la coalescence. Le micromanipulateur supplémentaire est noté ( $\mu M_2$ ).

### V.2.a. Observation de la coalescence

Le micromanipulateur supplémentaire est utilisé pour manipuler une deuxième micropipette. Cette dernière permet d'aspirer et maintenir une bille couverte de streptavidine (à l'aide d'une seringue). Un contact de cette bille avec une vésicule contenant des lipides biotinylés peut donc conduire, par rétraction, à la formation d'un tube (pour lequel aucune force n'est mesurée).

Les vésicules, les billes, la solution et la chambre d'observation sont les mêmes que celles utilisées dans la partie III. Cependant, comme dans le chapitre III, pour mieux visualiser les tubes formés, les video-micrographies exposées par la suite ont été obtenues avec des vésicules plus rigides (que celles composées d'EPC) donnant des tubes plus gros (paragraphes V.5.a. et VI.2.a).

Une première expérience préliminaire consiste à extraire deux tubes de membrane simultanément à partir d'une vésicule tenue à tension constante par une micropipette. Ensuite, le recul de la vésicule entraîne le rapprochement progressif des tubes au niveau de la surface de la vésicule, jusqu'à la coalescence. La figure V.6. représente les états des deux tubes non coalescés ((a), configuration V) et

## Partie 2 : Tubes de membranes

coalescés ((b), configuration Y). La photographie (a) représente la situation *juste* avant la coalescence. Une rétraction supplémentaire de la vésicule de 50 nm, correspondant à une variation d'angle de l'ordre de  $10^{-4}$  rad, conduit à la situation de la photographie (b). En d'autres termes, la distance minimale avant coalescence entre les tubes au niveau de la jonction avec la vésicule est non nulle (de l'ordre du micron). D'autre part, comme attendu, l'angle à l'équilibre entre les trois tubes est de  $120^\circ$ . Cela permet d'expliquer a posteriori que la configuration Y est bien la plus stable énergétiquement pour des distances entre les tubes plus faibles qu'une valeur critique. En effet, la force agissant sur la vésicule est double dans la configuration V par rapport à la configuration Y.

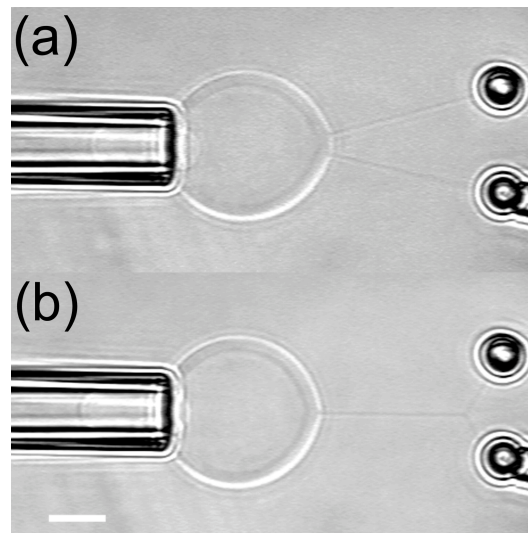


Figure V.6. : Photographie par vidéo microscopie des différents états observés. (a) Configuration V avant la coalescence. (b) Configuration Y suivant la coalescence. La barre d'échelle représente  $5\mu\text{m}$ .

L'expérience est complètement reproductible. Après recul de la vésicule et la coalescence, si nous déplaçons la vésicule dans l'autre direction jusqu'à l'embranchement, les tubes « décoalescent ». Nous pouvons répéter l'expérience à différentes vitesses. Quelle que soit la vitesse, l'angle entre les deux tubes juste avant la coalescence reste inchangé.

On peut aussi remarquer sur la figure V.6 que le passage de la configuration V à Y, qui se traduit par une réduction de l'aire totale de membrane dans les tubes, s'accompagne d'une récupération de membrane au niveau de la langue de la vésicule (la longueur de la langue augmente). Par un raisonnement semblable à celui proposé par le groupe d'Evans (Bo et Waugh, 1989; Waugh et Hochmuth,

1987), nous pouvons estimer le rayon du tube, soit  $r_t=150\pm 10\text{nm}$ . Nous montrerons (paragraphe V.5.a.) que cette mesure est cohérente avec la tension appliquée et la rigidité de courbure de la vésicule utilisée.

### V.2.b. Mesure de force

L'utilisation du piège optique nous permet la mesure de force pendant l'extrusion et la coalescence des tubes. Compte tenu de la géométrie de l'expérience, la force exercée par le tube sur la bille piégée n'agit pas dans l'axe de la micropipette tenant la vésicule. Pour obtenir la force totale exercée sur la bille, il faut donc mesurer les deux composantes de force  $f_x$  et  $f_y$  agissant respectivement suivant l'axe X et Y (voir II.7). La figure V.7. montre l'évolution de cette force,  $f$ , en fonction du temps et l'insert montre la variation temporelle de  $f_x$  et  $f_y$  à tension constante ( $\sigma=5.10^{-5}\text{ N/m}$ ).

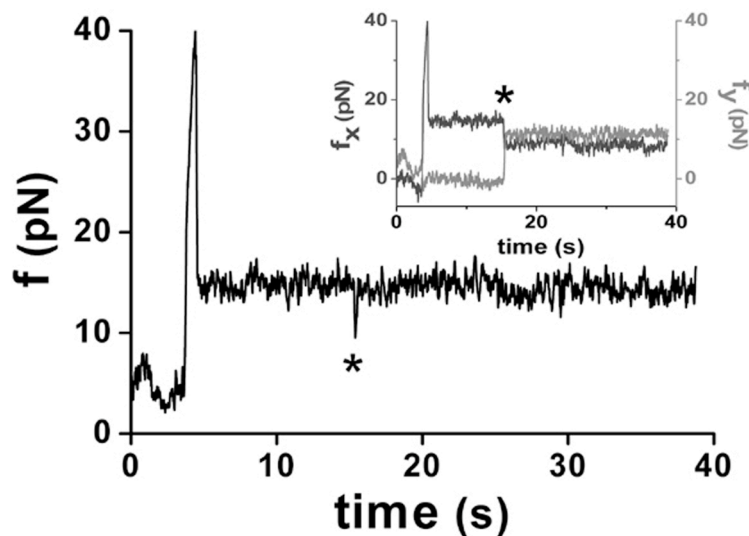


Figure V.7. : Evolution de la force agissant la bille piégée en fonction du temps durant l'éloignement de la vésicule à une vitesse de  $1\mu\text{m/s}$ . L'évolution des forces  $f_x$  et  $f_y$  est donnée dans l'insert. La tension appliquée est de  $5.10^{-5}\text{N/m}$ . L'étoile indique l'événement de coalescence.

Globalement, l'allure de la courbe force-extension est la même que celle d'un tube unique à tension constante, excepté à la coalescence. Après le passage du seuil de force correspondant à la formation du tube, la force atteint un plateau de  $15\text{pN}$ , compatible avec la rigidité de courbure ( $\kappa\approx 12k_B T$ ) et la tension des vésicules ( $\sigma=5.10^{-5}\text{ N/m}$ ), d'après la relation  $f=2\kappa(2\sigma\kappa)^{1/2}$ .

## Partie 2 : Tubes de membranes

Alors que la signature de la coalescence correspond à une brève chute de la force totale, elle est beaucoup plus claire sur les variations de  $f_x$  et  $f_y$  du fait du changement de direction des tubes. Même s'il est difficile de rationaliser l'amplitude de la diminution de force au cours de la coalescence, l'observation d'une diminution transitoire (et non d'une augmentation !) est cohérente avec le fait que la réorganisation des tubes conduit à une diminution d'aire, donc de tension de membrane de manière transitoire. Au niveau de la dynamique, le temps de passage entre les configurations V et Y est, dans le cas rapporté ici, inférieur à 80ms (soit 2 images). A la fin de ce chapitre, nous chercherons à ralentir et analyser cette cinétique de coalescence.

### V.2.c. Explication intuitive du phénomène de coalescence

L'attraction entre deux tubes de membrane extraits d'une même vésicule peut se comprendre par des arguments de mouillage. Par analogie, prenons deux tiges de verres plongées partiellement dans de l'eau (figure V.8.) (Kralchevsky et Nagayama, 2001). La surface de l'eau est déformée au voisinage des tiges de verre, et forme un ménisque. Pour minimiser l'énergie de surface, la surface doit être minimale : les tiges s'attirent. C'est le principe de base de l'attraction capillaire.

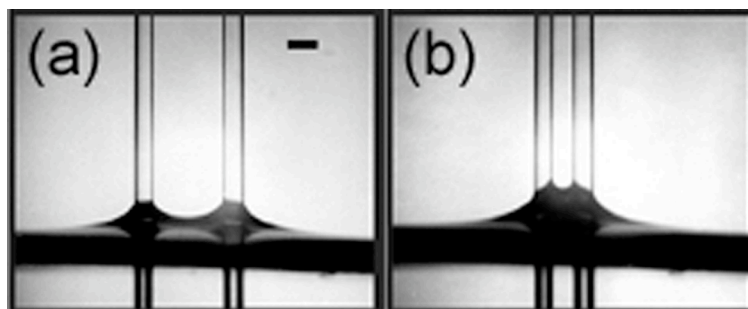


Figure V.8. : Observation de l'attraction capillaire entre deux tiges de verre immergées dans l'eau. L'aire de surface déformée en (b) est inférieure à la situation (a). La barre d'échelle représente 1mm (extrait de (Kralchevsky et Nagayama, 2001)).

Revenons maintenant aux tubes lipidiques. La forme d'un tube de membrane au voisinage de la vésicule est une caténoïde. Cette forme a été calculée par Derényi et Powers (figure V.9.) (Derényi *et al*, 2002; Powers *et al*, 2002). De la même manière, les déformations induites par les tubes sur la surface de la vésicule vont conduire à une attraction de type capillaire entre les deux tubes.

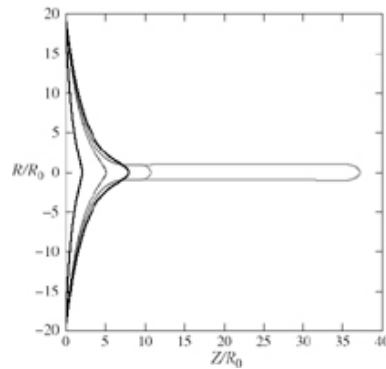


Figure V.9. : Evolution de la forme d'un tube pendant l'extraction d'un tube.  $R_0$  représente le rayon du tube (Extrait de (Derényi *et al*, 2002)).

Cette explication simpliste ne prend pas en compte de l'effet de courbure de la membrane. Le paragraphe suivant en donne une explication plus quantitative

### V.3. Analyse théorique de la coalescence de tubes de membrane

Le modèle théorique exposé ci-dessous a été développé par Imre Derényi (Département of Biological Physics, Eötvös University, Budapest, Hongrie). Nous avons proposé dans l'article (Cuvelier *et al*, 2005) une description géométrique rigoureuse et détaillée. Ici, nous donnerons une explication alternative basée sur une analyse purement énergétique, plus approchée peut-être, mais plus "physique" de notre point de vue. La figure V.10. montre un schéma qui indique les différents paramètres géométriques utilisés par la suite.

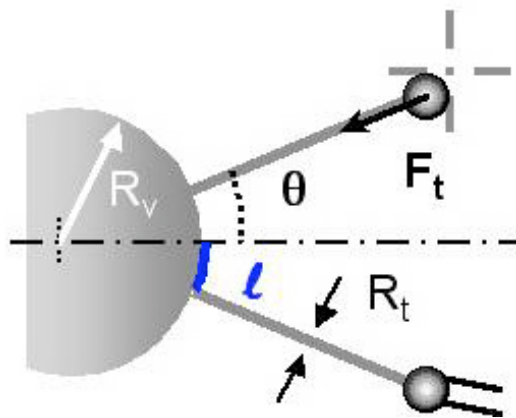


Figure V.10. : Schéma de la configuration V.  $R_v$  représente le rayon de la vésicule,  $R_t$ , le rayon des tubes,  $F_t$ , la force d'un tube.  $\theta$  est l'angle des tubes avec le plan de symétrie et  $l$ , la distance du col du tube à ce plan.

## Partie 2 : Tubes de membranes

L'expression de l'énergie correspond à l'attraction capillaire est (Derényi *et al*, 2002) :

$$E_{\text{attraction}} = 2R_t F_t \ln(2l) \quad \text{V.1.}$$

Notons que la dépendance logarithmique vient du fait que la force d'attraction capillaire entre deux cylindres partiellement immergés dans l'eau prend une forme équivalente à la loi de Coulomb en électrostatique, c'est-à-dire que la force varie comme l'inverse de la séparation entre tubes (Kralchevsky et Nagayama, 2001).

Cette énergie attractive est contre-balançée par une contribution répulsive d'origine géométrique. Lorsque, sous l'action de cette attraction, la longueur,  $l$ , dévie de la valeur  $l=R_V \cos \theta$ , pour laquelle les tubes sont les plus courts, la longueur de chaque tube augmente de  $(R_V \cos \theta - l)^2 / (2R_V)$ , alors que la distance entre la vésicule et les billes est fixe. En conséquence, il en résulte un travail supplémentaire. Pour deux tubes, cette énergie s'écrit :

$$E_{\text{répulsion}} = 2 \frac{(R_V \cos \theta - l)^2}{2R_V} F_t \quad \text{V.2.}$$

L'énergie totale s'exprime alors sous la forme :

$$E_{\text{totale}} = 2 \frac{(R_V \cos \theta - l)^2}{2R_V} F_t + 2R_t F_t \ln(2l) \quad \text{V.3.}$$

Nous avons tracé, pour différentes valeurs de  $\theta$ , l'énergie totale en fonction de la longueur  $l$ , en prenant  $R_t=50\text{nm}$  et  $F_t=10\text{pN}$  (Figure V.11). Pour des angles  $\theta$  suffisamment grands, les deux tubes n'interagissent pas et peuvent être traités indépendamment. Une barrière énergétique de quelques dizaines de  $k_B T$  empêche les deux tubes de coalescer (situation (1)). Lorsque  $\theta$  diminue, la barrière énergétique diminue. Lorsqu'elle devient plus faible que  $k_B T$  (situation (2)), elle peut être franchie sous l'effet des fluctuations thermiques. Si  $\theta$  diminue encore, le seul minimum énergétique correspond à  $l=0$  soit à la configuration Y (situation (3)).

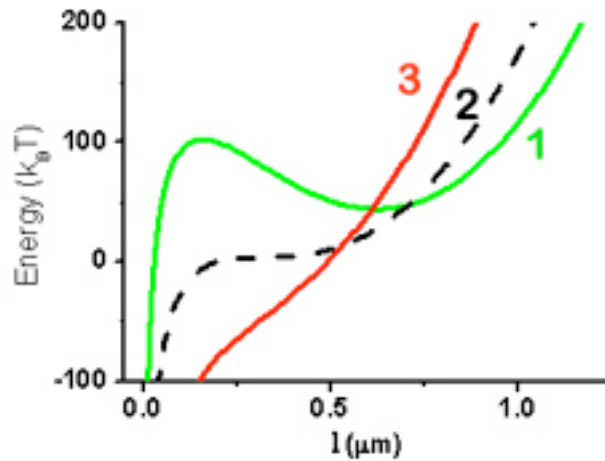


Figure V.11. : Courbe énergétique de l'interaction entre deux tubes. situation (1)  $\theta=8^\circ$ , situation (2)  $\theta=6^\circ$ , situation (3)  $\theta=4^\circ$ .

Revenons à l'expression V.3. Les deux tubes coalescent pour une distance de séparation non-nulle si l'énergie totale a un minimum non-trivial (autre que  $l=0$ ), soit :  $dE_{\text{totale}}/dl=0$ , ou encore :

$$\cos^2(\theta) \left( \frac{F_t}{R_V} + \frac{2R_t F_t}{l} \right) = 0 \quad \text{V.4.}$$

L'expression V.4. peut être simplifiée :

$$\frac{1}{R_V} l^2 \cos^2(\theta) + R_t = 0 \quad \text{V.5.}$$

Le minimum non-trivial existe si le discriminant de V.5 est positif :

$$D = \cos^2(\theta) \geq 4 \frac{R_t}{R_V} \quad \text{V.6.}$$

Dans ce cas, nous nous trouvons dans la situation (1). Les deux tubes coalescent lorsque  $D=0$  ce qui veut dire :

$$\cos(\theta) = \cos(\theta_c) = 2 \sqrt{\frac{R_t}{R_V}} \quad \text{V.7.}$$

Nous définissons  $\theta_c$ , l'angle critique de coalescence. En reportant son expression dans V.5., la longueur  $l_c$  à laquelle les deux tubes coalescent s'écrit :



## Partie 2 : Tubes de membranes

$$l = l_c \equiv \frac{1}{2} R \sqrt{\Delta} \quad \text{V.8.}$$

On remarque que cette longueur  $l_c$  correspond à la situation où les deux tubes se croisent à la moitié du rayon de la vésicule. Avant la coalescence, les deux tubes se croisent au centre de la vésicule.

### V.4. Résultats expérimentaux

#### V.4.a. Confrontation avec les prédictions théoriques

Tout d'abord, nous pouvons regarder l'orientation des tubes au moment de la coalescence (équation V.8). La figure V.12 montre un agrandissement de la surface d'une vésicule juste avant la coalescence. Si nous prolongeons les tubes, ils se croisent effectivement à la moitié du rayon de la vésicule.

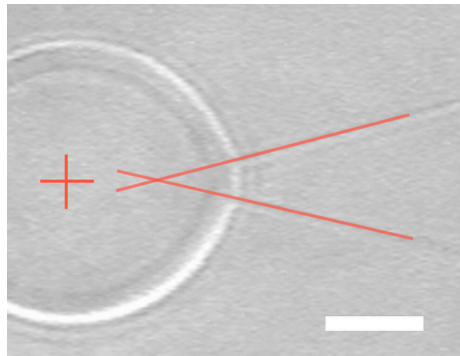


Figure V.12. : Agrandissement d'une photographie en vidéo microscopie de la surface d'une vésicule juste avant la coalescence. La croix rouge indique le centre de la vésicule et les lignes rouges, les prolongements des deux tubes. La barre d'échelle représente 5  $\mu$ m.

D'après l'équation V.7, l'angle de coalescence dépend du rayon du tube donc de la tension de membrane et de la rigidité de courbure. Nous pouvons réécrire cette équation sous la forme :

$$l_c = 2 \left[ \frac{\Delta}{2R_V^2} \right]^{1/4} \Delta^{1/4} \quad \text{V.9.}$$

Nous nous attendons donc à une variation de l'angle critique de coalescence avec la tension de la membrane selon une loi de puissance d'exposant -1/4.

Concrètement, la détermination de l'angle de coalescence s'effectue à partir de la position des deux billes et de la vésicule. La figure V.13 définit les notations géométriques principales. Soit  $d$  la demi-distance entre les billes,  $D$  la distance projetée du tube avant coalescence sur l'axe X.  $\theta_c$  s'écrit alors :

$$\theta_c = \arctan\left[\frac{d}{D + R_V/2}\right] \quad \text{V.10.}$$

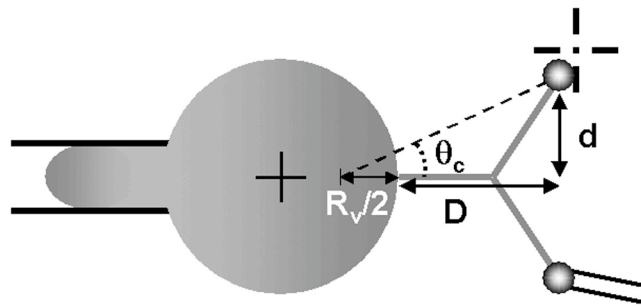


Figure V.13. : Paramètres utilisés pour le calcul de l'angle de coalescence.

Nous avons étudié la variation de l'angle de coalescence en fonction de la tension appliquée sur une même vésicule (Figure V.14.).  $\theta_c$  est calculé à partir de l'éq. V.10. juste après la coalescence. La vitesse de rétraction de la pipette étant très faible ( $0.5 \mu\text{m/s}$ ), l'erreur sur la longueur  $L$  est inférieure à 2%. La tension de membrane est fixée par la pression de succion.

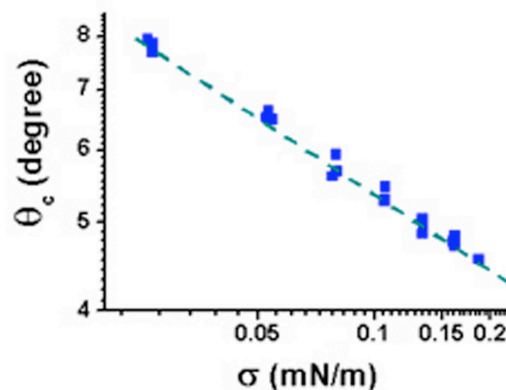


Figure V.14. : Variation de l'angle critique de coalescence,  $\theta_c$ , avec la tension appliquée à la membrane,  $\sigma$ . L'échelle est logarithmique. La droite en pointillée a pour pente -1/4.

## Partie 2 : Tubes de membranes

La gamme de tension est comprise entre  $2 \cdot 10^{-5}$  et  $2 \cdot 10^{-4}$  N/m. Sur cette gamme, l'angle de coalescence décroît comme  $\theta_c^{-1/4}$ , ce qui est en bon accord avec la prédiction théorique V.9, même si nous ne couvrons qu'une décade en tension. Notons également que, dans ce cas,  $\theta_c$  ne varie que de 4 à 8° ! Pour que ces mesures soient fiables, il faut être vigilant sur le positionnement des différents composants du système. En particulier, il est important que, d'une part, les positions des billes soient symétriques par rapport à l'axe de la pipette et, d'autre part, les billes soient situées à une même altitude et dans le plan de l'équateur de la vésicule. Une différence trop marquée d'altitude (de l'ordre du micron) entre les deux billes engendre, pour des raisons purement géométriques de détermination de la distance  $d$ , une erreur importante, de l'ordre de 10% sur la mesure de  $\theta_c$ .

### V.4.b. Mesures indépendantes de la tension et de la rigidité de courbure d'une membrane

Le point principal de notre travail expérimental n'était cependant pas de valider uniquement le modèle théorique prédisant la loi de puissance reliant  $\theta_c$  et  $\theta$ . L'utilisation de notre pince optique pour tirer un des deux tubes nous permet d'avoir un élément d'information supplémentaire sur les forces d'extrusion mises en jeu. D'après l'éq. V.9, on vient de voir que  $\theta_c$  dépend du rapport de la rigidité de courbure et de la tension de membrane de la vésicule. D'autre part, nous savons, d'après l'éq. I.6 que la force  $F_t$  d'un tube dépend du produit de ces deux mêmes grandeurs. Ainsi en réalisant le produit et le rapport de  $F_t$  par  $\theta_c^2$ , qui sont les deux paramètres mesurables (avec des facteurs numériques adéquats), nous pouvons obtenir les valeurs de  $\kappa$  et de  $\sigma$  de manière indépendante.

En effet, on obtient la rigidité de courbure par :

$$\frac{F_t \kappa R_v \theta_c^2}{8\sigma} = \kappa \quad \text{V.11.}$$

et la tension de membrane à la coalescence par :

$$\frac{F_t}{R_v \theta_c^2} \frac{1}{\theta_c} = \kappa$$

V.12

Pour valider cette approche, nous avons mesuré la valeur de l'angle de coalescence et la force du tube à la coalescence sur dix vésicules constituées d'EPC(95%)+lipides PEG(5%) de rigidité de courbure connue ( $\kappa=12k_B T$ ) sur une gamme de tension comprise entre  $2 \cdot 10^{-5}$  et  $2 \cdot 10^{-4}$  N/m et nous avons tracé les variations des expressions V.11 et V.12 en fonction de la tension de membrane imposée par micropipette (Figure V.15.).

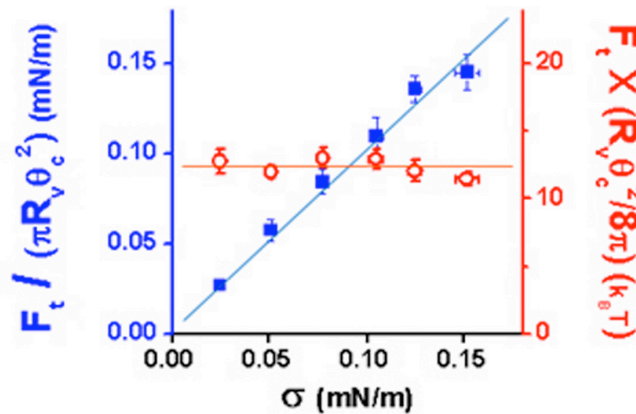


Figure V.15. : Variation du produit et du rapport de la force et du carré de l'angle de coalescence pour des vésicules constituées d'EPC(95%)+lipides PEG(5%). La droite bleue a une pente de 1,06 et la valeur du plateau rouge est de  $12k_B T$ .

La courbe maîtresse (Figure V.15.) montre, d'une part, que la tension appliquée par micropipette correspond exactement à la tension calculée par l'expression V.12 et, d'autre part, que l'expression V.11 donne précisément la valeur de la rigidité de courbure trouvée par différentes méthodes (voir chapitre III) sur toute la gamme de tension étudiée.

En conséquence, les mesures simultanées de l'angle de coalescence et de la force à la coalescence nous permettent de déterminer indépendamment la tension de membrane et le module de courbure.

En d'autres termes, nous pensons que l'approche proposée ici pourrait constituer une nouvelle méthode de détermination de la rigidité de courbure de membranes. L'avantage de notre méthode sur les autres techniques de manipulation (aspiration (Evans et Needham, 1986) ou force de tube à tension constante (Heinrich

et Waugh, 1996)) réside dans le fait qu'un contrôle de la tension de membrane n'est plus nécessaire.

### V.5. Applications

Dans ce paragraphe, nous montrons deux applications de la coalescence. L'une consiste à déterminer une rigidité de courbure (inconnue jusqu'alors) pour une composition lipidique correspondant à une phase liquide ordonnée. L'autre est d'estimer l'énergie d'adhésion d'une vésicule adhérente sur une surface en couplant une mesure d'angle par microscopie interférentielle et une mesure de tension de membrane par la technique de coalescence.

#### V.5.a. Détermination du module de courbure pour des vésicules rigides

Lorsqu'on étudie des vésicules de rigidité de courbure élevée (plusieurs dizaines de  $k_B T$ ), la technique traditionnelle d'aspiration par micropipette est souvent inadaptée, car l'excès de surface dans le régime entropique est réduit pour des vésicules rigides et il est souvent difficile de les rendre fluctuantes par dégonflement, car leur perméabilité peut être également plus faible que pour des vésicules EPC. Nous illustrerons très concrètement cette limitation au chapitre VI dans le cadre de l'extraction de tubes uniques de membranes de compositions complexes. Pour surmonter cette difficulté, et montrer que notre approche est applicable à tout type de vésicules (i.e. en phase liquide désordonné ou liquide ordonné), nous avons utilisé la méthode précédente pour étudier les propriétés mécaniques de vésicules rigides.

Les vésicules que nous avons sélectionnées sont composées pour moitié (en nombre) de lipides sphingomyéline (BSM) et de cholestérol (annexes A et B). A température ambiante, cette composition forme une phase liquide ordonnée. Nous avons réalisé des expériences de coalescence à des pressions d'aspiration fixées par micropipette mais non mesurées. De la mesure des forces à la coalescence et des angles de coalescence, nous avons déduit les valeurs de  $\kappa$  selon l'éq.V.11. La figure V.16 montre l'histogramme des valeurs obtenues.

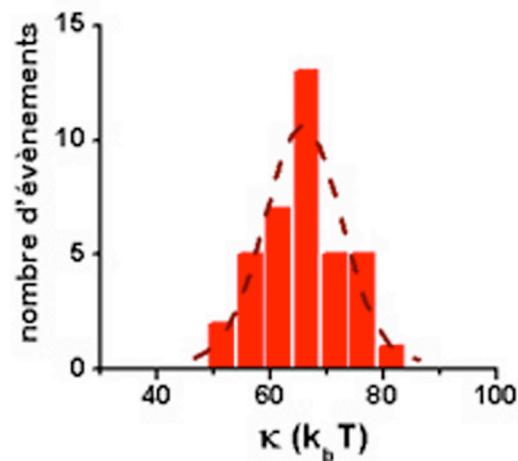


Figure V.16. : Histogramme des valeurs de la rigidité de courbure obtenues par coalescence pour des vésicules BSM:cholestérol (1:1). La gaussienne en traits rouges est centrée sur  $65k_B T$ .

La rigidité de courbure moyenne de ces vésicules rigides est de  $65 \pm 5 k_B T$ , ce qui est une valeur bien supérieure au module de rigidité d'une simple bicouche de EPC par exemple ( $\kappa = 10 k_B T$ ). La largeur relativement importante de la distribution pourrait s'expliquer par des inhomogénéités de composition lipidique résultant de la préparation par électroformation.

A ce niveau, il faut noter que des mesures de  $\kappa$  pour des vésicules rigides sont rares, car difficiles à effectuer par les techniques classiques.

La rigidité de courbure pour des vésicules rigides est souvent mesurée autour de la transition gel/liquide. Peu de mesures ont été effectuées sur des phases liquide ordonné. La seule mesure fiable de rigidité de courbure de vésicules rigides que nous ayons trouvée dans la littérature par la technique de micropipette est rapportée dans (Evans et Rawicz, 1990). Pour un mélange équimolaire de SOPC et de cholestérol, à  $15^\circ C$ , les auteurs ont trouvé  $\kappa = 60 k_B T$ , tout en indiquant que ces expériences étaient délicates, car le dégonflement osmotique de ces vésicules provoquait une déstabilisation de la forme sphérique et conduisait à l'expulsion de « cordons ombilicaux » lipidiques ou de chapelets de petites vésicules (ce que nous avons aussi observé).

Une estimation très indirecte de  $\kappa$  pour des phases fluides rigides a été récemment obtenue par l'équipe de W. Webb (Baumgart et al, 2003). En formant des

## Partie 2 : Tubes de membranes

vésicules composées de mélanges ternaires (BSM/cholestérol/DOPC) et présentant une séparation de phase entre les phases liquide désordonné et liquide ordonné, les auteurs ont visualisé par microscopie à 2-photons la formation de « bourgeons ». L'analyse des formes a permis d'estimer la tension de ligne entre les domaines des deux phases, ainsi que le rapport des modules de courbure des deux phases à l'équilibre :  $1.25 \pm 0.60$ . On peut dire que les deux phases en équilibre auront des rigidités intermédiaires entre celles de BSM:cholestérol (1:1) ( $65k_B T$ ) et cholestérol:DOPC (1:1) ( $30k_B T$ ) (Roux *et al*, 2005). Le rapport des rigidités est donc raisonnable mais on ne peut rien conclure sans connaître le diagramme de phase du mélange.

Par une étude de dynamométrie optique, Dimova *et al.* ont mesuré la raideur effective de membranes constituées de DMPC autour de la transition de phase gel-fluide (Dimova *et al*, 2000). En supposant cette élasticité de membrane proportionnelle à  $\kappa/a^2$  (avec  $a$  la taille de la bille insérée dans la membrane), ils ont rapporté une chute de  $\kappa$  de 700 à 10  $K_B T$  dans les 4°C précédant la température de transition.

D'autres mesures indirectes de  $\kappa$  peuvent être obtenues si l'on suppose, comme proposé initialement par Evans, que le module élastique et le module de courbure sont reliés selon l'expression :  $\kappa = K_a h^2 / b$ , où  $h$  est l'épaisseur de la membrane (typiquement 4 nm) et  $b$  est une constante qui dépend du couplage entre les deux feuilletts de la bicouche ( $b=4$  si couplage total et  $b=48$  pour découplage complet - cas généralement rencontré pour des lipides « standards »). Par exemple, une étude de calorimétrie sur des suspensions de vésicules a permis à Heimburg *et al.* (Heimburg, 1998) de mesurer  $K_a$  et d'estimer  $\kappa$  à proximité d'une transition de phase liquide/gel.

Une méthode de mesure directe de rigidités de courbure élevées a été proposée par un groupe taiwanais (Lee *et al*, 2001). Cette technique repose sur l'utilisation d'un microscope confocal différentiel, qui permet d'appliquer des forces de l'ordre du femtonewton sur une vésicule et de détecter des déformations avec une sensibilité du nanomètre. Puisque de telles forces ne génèrent pas de variation d'aire, seul le régime entropique est sondé. Ce faisant, ce groupe a mesuré des rigidités de courbure de l'ordre de  $100k_B T$  avant la transition gel/fluide pour des vésicules de DPPC. Toutefois, à notre connaissance, cette méthode n'a pas été

reprise par d'autres groupes.

### V.5.b. Détermination d'énergie d'adhésion vésicule-substrat

Une deuxième potentialité de notre technique de coalescence de tubes est de mesurer la tension d'une vésicule lipidique à partir de l'expression V.12. En mesurant par ailleurs l'angle de contact d'une vésicule adhérente par microscopie à contraste interférentiel, nous pouvons donc calculer l'énergie d'adhésion,  $W$ , grâce à la relation de Young-Dupré (en situation d'adhésion forte).

Pour ce faire, nous avons utilisé des vésicules constituées de EPC/mPEG-DOPE/DSPE-PEG-biotin: 95/4.995/0.005, et les surfaces adhérentes ont été préparées en suivant le mode opératoire du chapitre IV. Brièvement, une solution de streptavidine est incubée sur une lame de verre recouverte préalablement de PolyEthylène Imine. La solution des vésicules contenant de la caséine est ensuite introduite dans la chambre d'observation. L'angle de contact de la vésicule est déterminé de la même manière que dans la partie "Adhésion", c'est-à-dire en prenant le rapport du rayon de contact par le rayon de la vésicule (Figure V.17.).

Sur le cas particulier de la figure V.17, nous avons obtenu les mesures suivantes:  $R_c=3.7 \mu\text{m}$ ,  $R_v=9 \mu\text{m}$ ,  $\theta_{b,c}=8^\circ$ , et  $f_{t,c}=8.2 \text{ pN}$ . On en déduit donc que la tension de la membrane au moment où les tubes coalescent vaut  $\sigma_c=1.4 \times 10^{-5} \text{ N/m}$ . Pour revenir à la tension initiale de la vésicule adhérente, il faut prendre en considération l'augmentation de tension induite par la formation du tube. En supposant que les tubes coalescent à des longueurs inférieures à celles pour lesquelles la membrane est étirée élastiquement (voir chapitre IV) on peut écrire que:  $\sigma_c/\sigma_i = \exp\left[\left(8\sigma/k_B T\right)\sigma A/A_0\right]$ , où  $\sigma_i$  est la tension initiale de la membrane, et avec  $\sigma A/A_0 = 2\sigma R_t L/4R_v^2$ . Ici, le facteur 2 vient du fait qu'il y a 2 tubes et le rayon  $R_t$  du tube est donné par:  $R_t = (\sigma/2\sigma_c)^{1/2}$ . Avec  $L=19 \mu\text{m}$ , on obtient:  $\sigma_i=7 \times 10^{-7} \text{ N/m}$ . Enfin, puisque l'angle de contact de la vésicule sur le substrat vaut  $24^\circ$ , on trouve l'énergie d'adhésion,  $W=60 \text{ nJ/m}^2$ .



## Partie 2 : Tubes de membranes

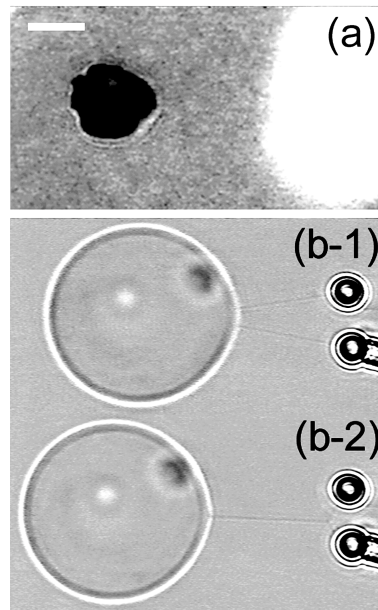


Figure V.17. : (a) Photographie en microscopie interférentielle de la zone d'adhésion d'une vésicule BSM:cholestérol 1:1 (95%) + lipides PEG<sub>2000</sub> (5%) sur une surface couverte de streptavidine. La tâche blanche sur la photo est due à la saturation de l'image RICM créée par les billes et les pipettes. Le contraste a été optimisé sur la tâche d'adhésion. (b) Photographie en vidéo microscopie de la même vésicule avant et après la coalescence. La barre d'échelle représente 6  $\mu\text{m}$ .

Dans l'article que nous avons publié sur ce chapitre, nous avons mentionné qu'il était difficile de comparer cette valeur avec les données de la littérature, car les énergies d'adhésion mesurées dépendent fortement de la chimie de surface effectuée (voir partie "adhésion" chapitre IV). Toutefois, une limite théorique supérieure serait de considérer que  $W$  correspond à l'énergie chimique associée à la formation des liaisons, soit  $W = \sigma U$ , avec  $\sigma$  la concentration en lipides biotinylés ( $\sigma \approx 10^{13} \text{ m}^{-2}$  dans notre cas) et  $U$  l'énergie de liaison d'un complexe streptavidine-biotine ( $U \approx 25 \text{ kT}$  (Merkel et al, 1999)), on devrait obtenir  $W = 1 \text{ J/m}^2$ . Dans notre article, nous avons suggéré que cette différence d'un ordre de grandeur pouvait être due à une couverture partielle de la surface par la streptavidine ou à une réduction de l'activité de la streptavidine immobilisée. Cependant, à la lumière de nos travaux du chapitre IV sur les longs tubes de vésicules adhérentes, il nous semble maintenant que cette valeur faible de  $W$  pourrait plutôt venir du fait que l'étalement des vésicules a été stoppé par l'injection de caséine. En conséquence (comme indiqué au paragraphe IV.1.), la loi de Young-Dupré n'est, en toute rigueur, pas valide en situation de canthotaxie, et on s'attend à trouver des énergies d'adhésion comprises entre  $W_{\text{max}}$  et presque 0 (si la passivation de la surface par la caséine était totale).

## V.6. Dynamique de coalescence

Nous avons déjà indiqué que le passage de la configuration "V" à "Y" se passait en quelques dizaines de millisecondes pour des tensions de membrane de l'ordre de  $10^{-5}$  à  $10^{-4}$ N/m. Nous avons essayé de réduire la tension de membrane (par la pression d'aspiration) afin de ralentir cette dynamique, mais sans succès. Quel mécanisme physique pourrait être responsable d'une dynamique de coalescence aussi rapide ?

Tout d'abord, nous pourrions imaginer un phénomène intrinsèque au tube. Le volume de fluide contenu dans les tubes passe, au premier ordre, d'un volume  $2V$  à  $V$ . Il faut donc expulser un volume de fluide,  $V$ . Lors du retour des lipides contenus dans le tube vers la membrane principale, l'expulsion de fluide est de nature visqueuse, imposée par le déplacement de la membrane.

Un autre mécanisme envisageable est le frottement visqueux de la membrane sur le fluide externe engendré par le mouvement de la jonction des trois tubes.

Afin de valider l'un ou l'autre de ces mécanismes possibles, nous avons cherché à visualiser le déplacement de la jonction des tubes au cours du phénomène de coalescence, en utilisant des vésicules rigides ( $\kappa=65k_B T$ ) adhérentes faiblement, (Figure V.18.).

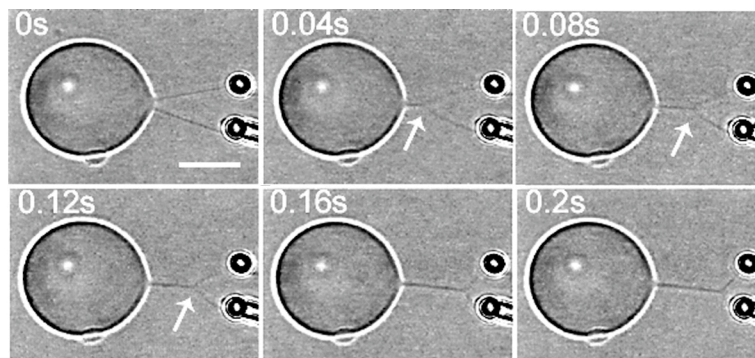


Figure V.18. : Série de photographies par vidéo-microscopie du passage de la configuration "V" à "Y" pour une vésicule rigide adhérente (BSM:Cholestérol 1:1). Les flèches indiquent le croisement des trois tubes. Notons la forme courbée en fer à cheval des tubes maintenus par les billes, pendant le déplacement. La barre d'échelle représente  $10\mu\text{m}$ .

Nous observons, sur les video-micrographies à 40, 80, et 120 ms, que la jonction n'est pas « droite », mais que les deux tubes liés aux billes sont courbés et

## Partie 2 : Tubes de membranes

ont une configuration de type « fer à cheval ». Cela suggère que la jonction résiste à l'avancée par rapport au retour des lipides dans la vésicule.

La force  $F_t$  qui agit à l'embranchement correspond à la force du tube principal (voir fig. V.4.). Comme cela peut être suggéré visuellement par les photographies de la figure V.18, on suppose que la force visqueuse ressentie par la jonction est essentiellement appliquée sur  $2r_t$  de part et d'autre de l'embranchement. Le déplacement de la jonction pourrait alors être schématisé comme indiqué à la figure V.19. La force de friction ressentie par un tube de longueur  $L$ , de rayon  $r_t$ , se déplaçant à la vitesse  $v_t$  est donnée par (Schlichting, 1966) :

$$C_d * L = \frac{F_t}{\rho v_t^2 r_t} \quad \text{V.13,}$$

avec  $C_d$ , le coefficient de friction,  $\rho$ , la densité du milieu.

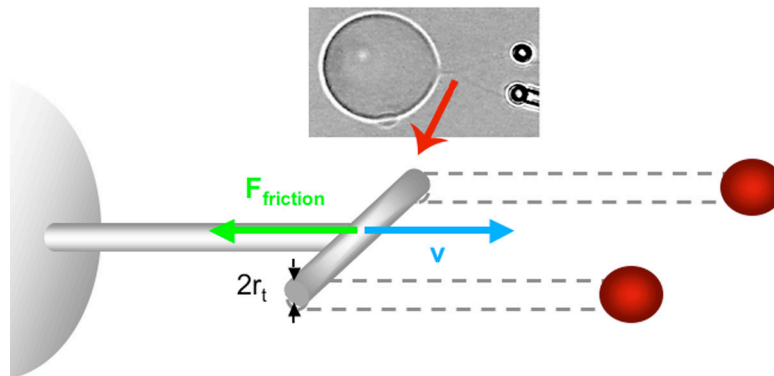


Figure V.19. : Schéma modélisant l'action de la friction visqueuse au niveau de l'embranchement des trois tubes durant le passage de la configuration V à Y.

Dans notre cas, le nombre de Reynolds est inférieur à l'unité ( $Re=r_t v \rho \approx 10^{-5}$ ), et  $C_d$  est de l'ordre de  $10^{3-4}$  (Schlichting, 1966). De l'expression V.13, la vitesse de déplacement pour des tubes de 200nm de rayon et pour une force  $F_t=8\text{pN}$  serait de l'ordre de  $100\mu\text{m/s}$ . Dans notre expérience,  $v_t \approx 80\mu\text{m/s}$ , ce qui est en bon accord qualitatif. Nous devons noter que pour des vésicules type EPC, la coalescence était achevée en moins de 40 ms, correspondant à une vitesse de propagation de la jonction supérieure à  $200\mu\text{m/s}$ . Aux tensions appliquées plus élevées et pour des vésicules en phase fluide, les rayons des tubes sont plus petits ( $\sim 50\text{nm}$ ), et la vitesse  $v_t$  doit en effet augmenter d'un facteur 2.

En complément, nous avons tracé le déplacement de la jonction  $d_t$  et la force à la jonction en fonction du temps (Figure V.19.). La force a été calculée en mesurant le rayon du tube principal à la jonction et en utilisant la relation  $F_t = 2\sigma/R_t$ . Nous remarquons que la vitesse de la jonction, qu'on peut mesurer ici, diminue avec la force. Un modèle plus complet de la dynamique de coalescence de tubes est en cours d'élaboration dans le groupe de théoriciens du laboratoire.

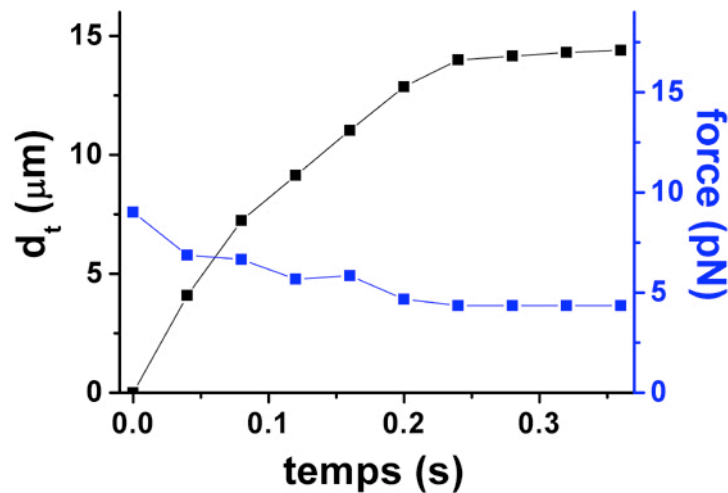


Figure V.19. : Déplacement de la jonction,  $d_t$ , et variation de la force à la jonction en fonction du temps pour une vésicule rigide adhéree faiblement.

### V.7. Conclusion

Nous avons montré dans ce chapitre que deux tubes de membrane lipidiques peuvent coalescer. A la différence d'une membrane plane, il existe une longueur d'interaction au-delà de laquelle deux tubes rester indépendants et stables. Une étude théorique basée sur l'attraction capillaire a permis de rendre compte des observations obtenues.

Enfin, ces résultats nous ont permis de proposer une nouvelle méthode de détermination de la rigidité courbure de membranes lipidiques indépendante de la mesure de la tension de membrane.

## Bibliographie : Chapitre V

- Baumgart T, Hess ST et Webb WW, 2003.  
Imaging coexisting fluid domains in biomembrane models coupling curvature and line tension.  
*Nature*,425:821-824.
- Bo L et Waugh RE, 1989.  
Determination of bilayer membrane bending stiffness by tether formation from giant, thin-walled vesicles.  
*Biophysical Journal*,55:509-517.
- Cuvelier D, Derényi I, Bassereau P et Nassoy P, 2005.  
Coalescence of membrane tethers : experiments, theory, and applications.  
*Biophysical Journal*,88:2714-2726.
- Davidson M, Dommersnes P, Markström M, Joanny JF, Karlsson M et Orwar O, 2005.  
Fluid Mixing in Growing Macroscale Vesicles Conjugated by Surfactant Nanotubes.  
*Journal of American Chemical Society*,127:1251-1257.
- Derényi I, Jülicher F et Prost J, 2002.  
Formation and Interaction of Membrane Tubes.  
*Physical Review Letters*,88:238101.
- Dimova R, Pouligny B et Dietrich C, 2000.  
Pretransitional effects in dimyristoylphosphatidylcholine vesicle membranes: optical dynamometry study.  
*Biophysical Journal*,79:340-356.
- Dommersnes P, Orwar O, Brochard F et Joanny JF, 2005.  
Marangoni transport in lipid nanotubes.  
*Europhysics Letters*:publié online.
- Evans E, Bowman H, Leung A, Needham D et Tirrell D, 1996.  
Biomembrane templates for nanoscale conduits and networks.  
*Science*,173:933-935.
- Evans E et Needham D, 1986.  
Giant vesicles composed of mixtures of lipids, cholesterol and polypeptides.  
*Faraday Discussions of the Chemical Society*,81:267-280.
- Evans E et Rawicz W, 1990.  
Entropy-driven tension and bending elasticity in condensed-fluid membranes.  
*Physical Review Letters*,64:2094-2097.

- Heimburg T, 1998.  
Mechanical aspects of membrane thermodynamics. Estimation of the mechanical properties of lipid membranes close to the chain melting transition from calorimetry.  
*Biochimica et Biophysica Acta*,1415:147-162.
- Heinrich V et Waugh RE, 1996.  
A piconewton force transducer and its application to measurement of the bending stiffness of phospholipid membranes.  
*Annals of Biomedical Engineering*,24:595-605.
- Karlsson M, Sott K, Davidson M, Cans AS, Linderholm P, Chiu D et Orwar O, 2002.  
Formation of geometrically complex lipid nanotube-vesicle networks of higher-order topologies.  
*Proceedings of the National Academy of Science U.S.A.*,99:11573-11578.
- Karlsson R, Karlsson A et Orwar O, 2003.  
A nanofluidic switching device.  
*Journal of the American Chemical Society*,125:8442-3.
- Kralchevsky PA et Nagayama K, 2001.  
Particles at Fluid Interfaces and Membranes. Elsevier, Amsterdam
- Lee CH, Lin WC et Wang J, 2001.  
All-optical measurements of the bending rigidity of lipid-vesicle membranes across structural phase transitions.  
*Physical Review E*,64:020901.
- Lobovkina T, Dommersnes P, Joanny JF, Bassereau P, Karlsson M et Orwar O, 2004.  
Mechanical tweezer action by self-tightening knots in surfactant nanotubes.  
*Proceedings of the National Academy of Science U.S.A.*,101:7949-53.
- Merkel R, Nassoy P, Leung A, Ritchie K et Evans E, 1999.  
Energy landscapes of receptor-ligand bonds explored with dynamic force microscopy.  
*Nature*,397:50-53.
- Powers TR, Huber G et Goldstein RE, 2002.  
Fluid-membrane tethers: Minimal surfaces and elastic boundary layers.  
*Physical Review E*,65:041901.
- Roux A, Cuvelier D, Nassoy P, Prost J, Bassereau P et Goud B, 2005.  
Role of curvature and phase transition in lipid sorting and fission of membrane tubules.  
*EMBO Journal*:publié on-line.
- Schlichting H, 1966.

## **Partie 2 : Tubes de membranes**

Boundary Layer Theory.  
Editor, New York: McGraw-Hill.

Waugh RE et Hochmuth RM, 1987.  
Mechanical equilibrium of thick, hollow, liquid membrane cylinders.  
*Biophysical Journal*,52:391-400.

## Chapitre VI

# Extraction de tubes de membrane à plusieurs lipides

Dans les chapitres III à V, nous nous sommes surtout focalisés sur l'extrusion de tubes de membrane en phase fluide à partir de vésicules EPC. Dans cette partie, d'autres compositions lipidiques seront envisagées. Nous allons analyser en détail les expériences sur les tubes de vésicules BSM:Cholestérol 1:1 en phase  $L_o$ . Puis nous étudierons un mélange constitué de BSM, cholestérol et de DOPC proche d'une transition de phase. Nous allons tenter de montrer que l'extraction de tubes de telles vésicules pose certains problèmes expérimentaux mais également des questions physiques et biologiques importantes.

### VI.1. Introduction

Les membranes biologiques sont constituées d'une multitude de lipides (composition moyenne : PC=45-55%, PE=15-25%, PI=10-15%, PS=5-10%, PA=1-2%, SM=5-10%, cardiolipine=2-5%, cholestérol=10-20%). Ces mélanges de lipides peuvent conduire à des séparations de phase in vitro (Dietrich *et al*, 2001). Des domaines lipidiques « rafts » sont également présent in vivo (Simons et Ikonen, 1997). Ils intéressent tout particulièrement les biologistes. La taille de ces radeaux lipidiques est encore controversée, mais semble être de quelques dizaines à quelques centaines de nanomètres de diamètre. Ils sont principalement enrichis en cholestérol et en sphingolipides (Edidin, 2003). Ils interviennent dans presque toutes les fonctions cellulaires : signalisation, transport, adhésion. Mais leur rôle précis dans le tri lipidique et protéique reste discuté (Figure VI.1.).



## Partie 2 : Tubes de membranes

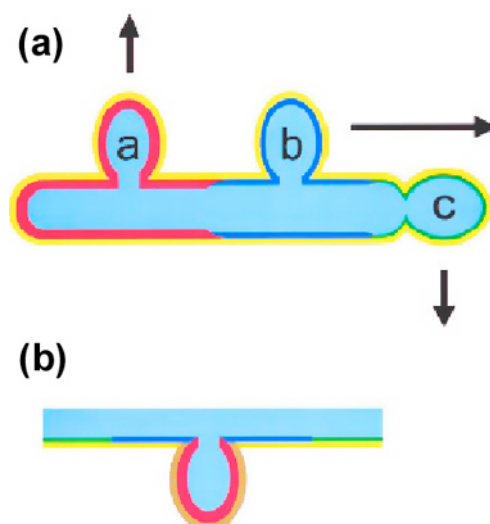


Figure VI.1. : Hypothèses sur le rôle des rafts dans le tri cellulaire. (a) La membrane est divisée en différents domaines de compositions différentes (a, b et c) et les intermédiaires de transport formés à partir de chacun de ces domaines n'ont pas la même composition et ont des destinations différentes. (b) C'est au cours de la formation de l'intermédiaire de transport qu'il y a recrutement de certains composants membranaires changeant la composition de la membrane spécifiquement à l'endroit de formation du bourgeon (extrait de (van Meer et Lisman, 2002)).

Il a été récemment montré qu'il était possible d'obtenir une séparation de phase dans des vésicules géantes à plusieurs composants (Dietrich *et al*, 2001). Avec un mélange de trois lipides (sphingomyéline, cholestérol, phosphatidylcholine), des domaines "géants" (de plusieurs microns) sont observés (Figure VI.2.) (Baumgart *et al*, 2003). Les sphingomyélines sont généralement sous forme cristal-liquide (« gel ») à température ambiante. L'ajout de cholestérol à cette phase provoque sa fluidification tout en gardant un certain ordre (probablement hexatique), la transformant en phase liquide-ordonné ( $L_o$ ). Ceci confère aux domaines riches en sphingomyéline des propriétés particulières : ils sont moins fluides que les domaines en phase liquide-désordonné ( $L_d$ ) (Kahya *et al*, 2003; Samsonov *et al*, 2001). De plus, leur fluidité augmente avec la concentration de cholestérol (Kahya *et al*, 2003). Nous avons montré au chapitre précédent que la rigidité de la phase  $L_o$  (BSM:Chol 1:1) était environ 2.2 fois plus élevée que celle de la phase  $L_d$  (DOPC:Chol 1:1) (Roux *et al*, 2005). Cette rigidité de courbure accrue est un point important car cela permet de proposer que les membranes en phase  $L_o$  puissent être plus difficilement courbées que les phases  $L_d$ , et que les lipides constituant la phase  $L_o$  puissent être exclus de structures très courbées comme les tubes de membranes.

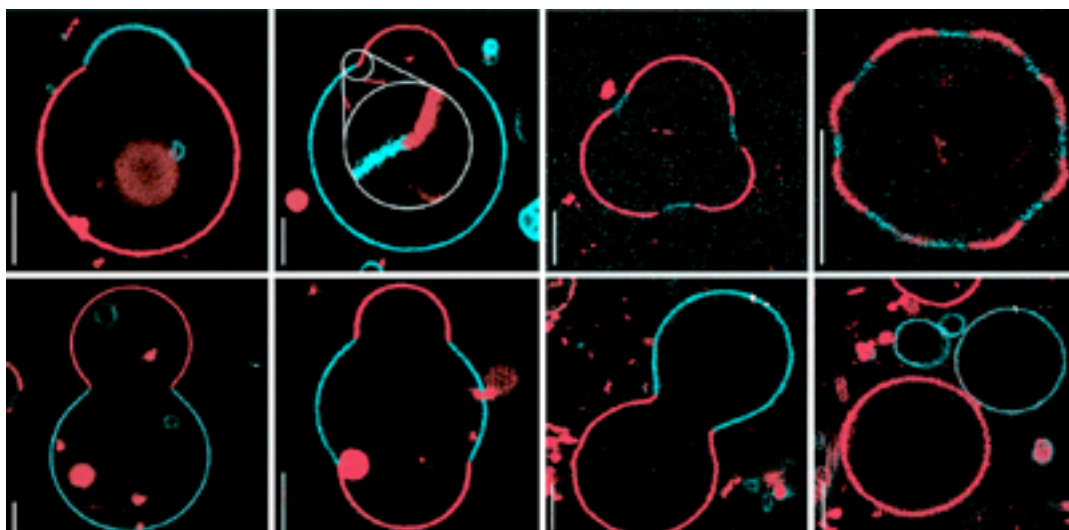


Figure VI.2. : Images de microscopie à deux photons montrant des GUVs constituées d'un mélange ternaire de sphingomyéline, DOPC et cholestérol et montrant la coexistence de deux phases. Les GUVs sont marquées par du pérylène (en bleu) dans la phase liquide-ordonné à courte distance  $L_o$  et par de la DPPE-rhodamine (en rouge) dans la phase liquide-désordonné  $L_d$ . La barre correspond à 5  $\mu\text{m}$  (adapté de (Baumgart *et al*, 2003)).

Aurélien Roux (Roux *et al*, 2005) a obtenu un diagramme de phase ternaire simplifié du mélange BSM/Chol/DOPC (figure VI.2). Dans nos expériences d'extraction, nous nous sommes limités à deux compositions lipidiques (surlignées en rose sur le diagramme de phase). Nous noterons ensuite les compositions molaires BSM:Chol:DOPC. La première est constituée d'un mélange équimolaire de sphingomyéline et de cholestérol (1:1:0). Cette composition forme une phase  $L_o$  homogène. Nous avons déjà déterminé le module de courbure de cette membrane dans le paragraphe V.5.a. par la méthode de coalescence de tubes ( $\kappa = 65k_B T$ ). Nous reviendrons cependant sur cette composition dans le paragraphe suivant, et nous décrirons des tentatives de mesure de  $\kappa$  par la méthode d'extraction d'un tube unique à tension constante afin d'insister sur les problèmes de contrôle de la tension membranaire. La deuxième composition lipidique est constituée des trois lipides (3:4:1). Elle se situe à la limite de transition de phase, voire à proximité d'un point critique (Figure VI.3.).

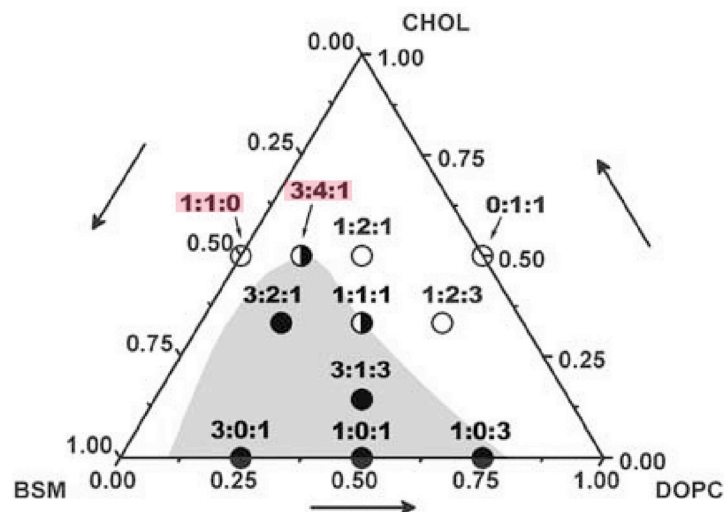


Figure VI.3. : Diagramme de phase ternaire du mélange sphingomyeline (BSM), cholestérol (CHOL), phosphatidylcholine (DOPC). Les compositions utilisées dans cette étude sont surlignées en rose. La partie grisée représente la zone biphasique L<sub>o</sub>-L<sub>d</sub>, le reste représentant la zone monophasique. La composition (3:4:1) est à la limite de transition de phase (Extrait de (Roux *et al*, 2005)).

## VI.2. Expériences

Le dispositif expérimental utilisé est le même que celui décrit dans le chapitre III où un tube unique est tiré à tension de membrane constante. Pour lier les vésicules aux billes couvertes de streptavidine, une faible fraction de lipide DSPE-PEG2000-biotin (50ppm) est ajoutée à la composition lipidique étudiée. La longueur des tubes formés est fixée à 15  $\mu$ m.

### VI.2.a. Tubes de vésicules en phase L<sub>o</sub> homogène

La composition (1:1:0) forme des membranes très rigides. De plus, ce type de membrane possède une propriété remarquable : elle est pratiquement imperméable aux molécules d'eau (Bloom *et al*, 1991). En conséquence il est difficile de rendre ces vésicules plus fluctuantes qu'elles ne le sont après électroformation, par différence de pression osmotique par exemple.

Rappelons que la tension de la membrane est directement proportionnelle à la pression d'aspiration appliquée par micropipette si la taille de la langue à l'intérieur de la pipette est suffisamment grande par rapport au rayon interne de celle-ci (voir

chapitre II.B.2, éq. II.9.). En fonction de la préparation des vésicules, deux cas de figures peuvent se présenter.

Parfois, les vésicules sont bien fluctuantes, on peut les aspirer facilement dans la micropipette, et la force mesurée par pince optique lors de l'extrusion de tube révèle un plateau dont la valeur peut effectivement être reliée à la tension de membrane et au module de courbure. Nous avons ainsi extrait et rétracté à vitesse contrôlée ( $v=0.24\mu\text{m/s}$ ) un tube de membrane ( $l=15\mu\text{m}$ ) à différentes tensions. Sur la figure VI.4., nous observons bien un plateau de force une fois que le tube est formé et nous vérifions que la force d'élongation du tube augmente avec la tension.

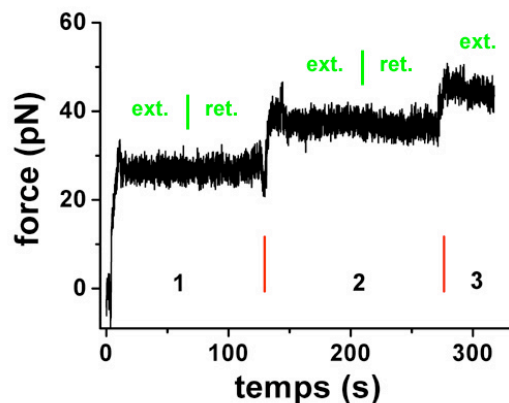


Figure VI.4. : Variation de la force du tube avec le temps pour des vésicules BSM/Chol :1/1. Cas (peu fréquent !) de vésicules fluctuantes permettant d'avoir une langue de membrane dans la pipette suffisamment longue par rapport au rayon de la pipette. Au cours de l'expérience, le tubes est extrait, puis rétracté, et la tension est ensuite augmentée, (1)  $\sigma=4.10^{-5}\text{N/m}$ , (2)  $\sigma=8.10^{-5}\text{N/m}$ , (3)  $\sigma=12.10^{-5}\text{N/m}$ . Le plateau de force est horizontal et la force au plateau augmente bien comme la racine carrée de la tension.

La mesure de la rigidité de courbure pourrait être envisagée. Les forces observées, respectivement de 28pN, 39pN, 46pN pour les tensions appliquées, donnent une rigidité de courbure de  $59\pm 3 k_B T$ , ce qui est en bon accord avec la valeur rapportée dans la partie précédente sur un grand nombre de vésicules.

Mais, dans la majorité des cas, les vésicules sont moins fluctuantes, et pour des pressions d'aspiration équivalentes, la langue de membrane dans la pipette est à peine visible. La figure VI.5 montre des exemples représentatifs de courbes force-temps pour des tubes extrudés et rétractés à vitesse constante ( $\sigma=4, 8, 12.10^{-5}\text{N/m}$ ). De manière surprenante à première vue, le plateau de force n'est plus observé au cours de l'étape extraction-rétraction. Dans un premier temps, la force augmente avec le temps (donc avec la longueur) puis, lors du retour de la pipette, la force diminue de manière symétrique. Cette observation est valable pour les deux

## Partie 2 : Tubes de membranes

premières tensions testées. Pour la tension la plus élevée (cycle 3), nous n'avons qu'une partie de l'extraction, car le tube a cassé. Toutefois, nous pouvons noter que la pente de la courbe force-temps (ou force-longueur) est d'autant plus faible que la tension est élevée. Pour le cycle 3, nous observons même presque un plateau de force.

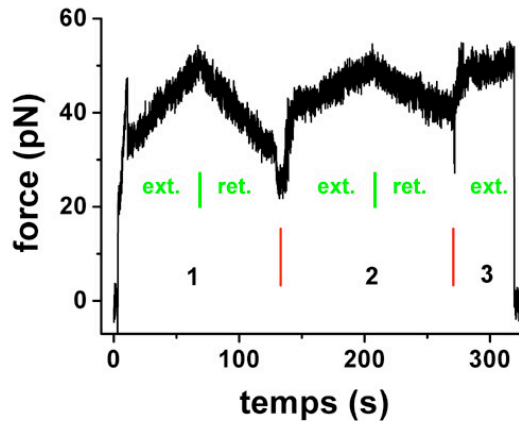


Figure VI.5. : Variation de la force du tube avec le temps. Cas d'une langue courte par rapport au rayon de la pipette. Les parties (1), (2), (3) correspondent à trois séries d'extraction-rétraction pour des tensions respectives de  $4 \cdot 10^{-5} \text{N/m}$ ,  $8 \cdot 10^{-5} \text{N/m}$  et  $12 \cdot 10^{-5} \text{N/m}$ .

Cette variation inhabituelle de  $F_t$  peut s'expliquer simplement par le fait que l'extraction n'est pas réalisée à tension strictement constante pour les tensions (1) et (2), et ceci malgré l'application d'une pression d'aspiration constante. Or la proportionnalité entre  $\Delta l$  et  $\Delta P$  n'est valable que si la longueur du « manchon » de membrane est « suffisamment grande » (de l'ordre de  $2R_p$ ). A l'opposé, si cette condition n'est pas satisfaite, le rayon de courbure de la langue sera supérieur à  $R_p$  et susceptible de varier au fur et à mesure que l'on récupère de la membrane dans le tube. L'insert de la figure VI.7 (un peu plus loin dans le texte) fournit une illustration schématique de ce phénomène. En conséquence, on s'attend à ce que la tension, donc la force du tube, varie au cours de l'extrusion.

Après cette description qualitative, nous pouvons tenter d'être plus quantitatif. Par un argument analogue à celui proposé pour les tubes de vésicules adhérentes (voir paragraphe IV.2.), nous pouvons écrire que l'aire de membrane récupérée dans le tube est fournie par le réservoir de lipides contenu dans la langue, qui subit donc une diminution d'aire égale:

$$A(l = 0) - A(l) = 2\pi R_t l \quad \text{VI.1,}$$

## Chapitre VI : Extraction de tubes de membranes à plusieurs lipides

avec  $A(l=0)$ , l'aire de la calotte sphérique interne à la pipette avant la formation du tube,  $A(l)$ , l'aire de la calotte pour un tube de longueur  $l$ , et  $R_t$  le rayon du tube formé à la longueur  $l$ .

Soit une calotte sphérique de rayon  $R$ , de section circulaire de rayon  $R_p$ , définie à un angle  $\theta$  ( $\sin\theta = R_p/R$ ), comme représentée sur la Figure VI.5. L'aire de la calotte,  $A$ , est donnée par :

$$A = 2\pi R^2(1 - \cos\theta) \quad \text{VI.2.}$$

D'après l'expression de la tension,  $\sigma$ , en fonction de la pression d'aspiration (éq. II.8.), l'aire de la calotte devient :

$$A = 2\pi R_p^2 \frac{2\sigma}{\sigma P + 2\sigma/R_v} \sqrt{1 - R_p^2 \frac{\sigma P}{2\sigma} + 1/R_v^2} \quad \text{VI.3.}$$

où  $R_v$ , est le rayon de la vésicule. Connaissant la relation entre la force et la tension de membrane, et en reliant l'expression VI.1. avec l'expression VI.3., nous obtenons une relation entre la longueur du tube étiré et la force :

$$l = \frac{2\pi R_p^2 f^2}{f \sqrt{4\sigma^2 P + f^2/R_v}} \sqrt{1 - R_p^2 \frac{4\sigma^2 P}{f^2} + 1/R_v^2} \quad \text{VI.4.}$$

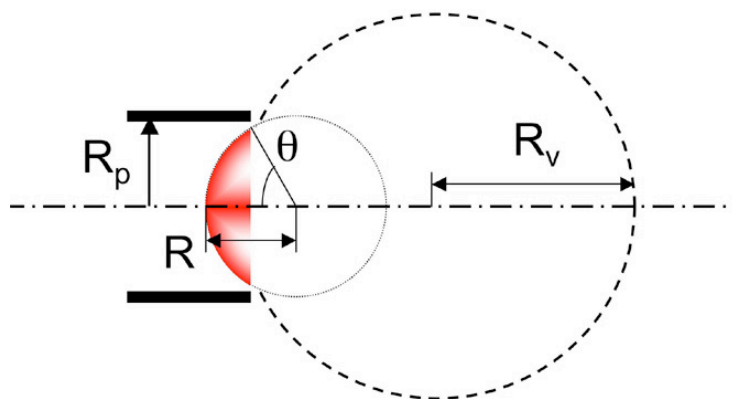


Figure VI.6. : Représentation de la calotte sphérique de la langue à l'intérieur de la pipette.  $R_p$ ,  $R$ ,  $R_v$  sont respectivement le rayon de la pipette, le rayon de la sphère définie par la calotte (rayon de courbure), et le rayon de la vésicule.  $\theta$  est l'angle défini par  $\sin\theta = R_p/R$ . Les pointillés représentent la vésicule à l'extérieur de la pipette.

## Partie 2 : Tubes de membranes

Pratiquement, le tube est extrudé à vitesse constante ; la relation force-longueur devient une relation force-temps, le paramètre  $A(\ell=0)$  étant ajustable mais proche de l'aire d'une demi-sphère de rayon  $R_p$ . Nous avons tenté d'ajuster les deux premières extractions de la figure VI.5. Ce phénomène rend bien compte de l'augmentation de force avec la longueur, même si la "courbure" des tracés théoriques semble plus marquée que celle des courbes expérimentales (Figure VI.7).

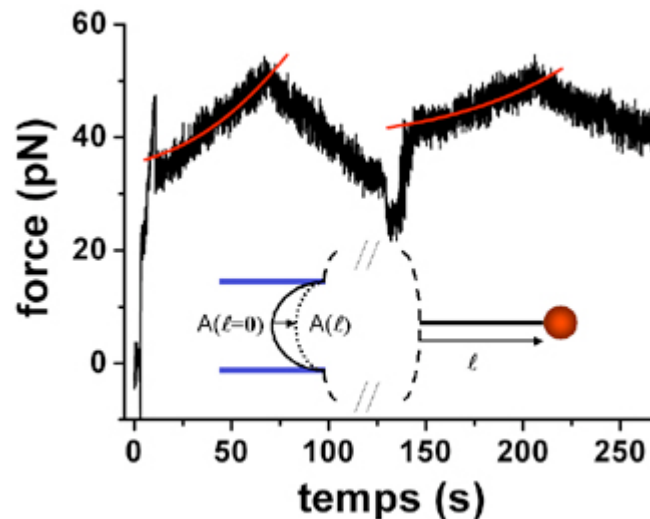


Figure VI.7. : Ajustement des courbes des extractions (1) et (2) en utilisant l'équation VI.4. En rouge, la force calculée en fonction du temps prend en compte l'échange d'aire entre la calotte interne à la pipette et le tube formé (schéma inséré).

Ces problèmes rencontrés nous ont conduit à déterminer rigoureusement la rigidité de courbure par la méthode de coalescence décrite dans le chapitre précédent même si la méthode de tube unique est valide, elle demande en contrepartie beaucoup de patience afin d'obtenir des vésicules suffisamment fluctuantes.

### VI.2.b. Tubes de vésicules proche d'une limite de phase

Avec la composition BSM/Chol/DOPC (3:4:1), pour laquelle nous nous situons à la limite de séparation de phase entre des domaines  $L_o$  enrichis en sphingolipides et des domaines  $L_d$  enrichis en DOPC, voire proche d'un point critique (Roux *et al*, 2005), nous avons extrait des tubes de la même manière que précédemment. Nous souhaitons étudier si la formation d'un tube de courbure élevée permettait ou non d'induire la ségrégation de phase et donc de trier les lipides.

Une courbe force-temps représentative est montrée sur la Figure VI.8 pour deux cycles extraction-rétraction. A première vue, les traces semblent peu reproductibles : la signature du premier cycle est radicalement différente de celle du deuxième. De plus, nous observons des « accidents » correspondant à une brusque augmentation de force suivie d'une chute rapide. De plus, dans les deux cas, pendant la rétraction contrôlée du tube, la force ne reste pas constante (comme on l'a observé pour des membranes monophasiques) mais décroît avec la longueur du tube.

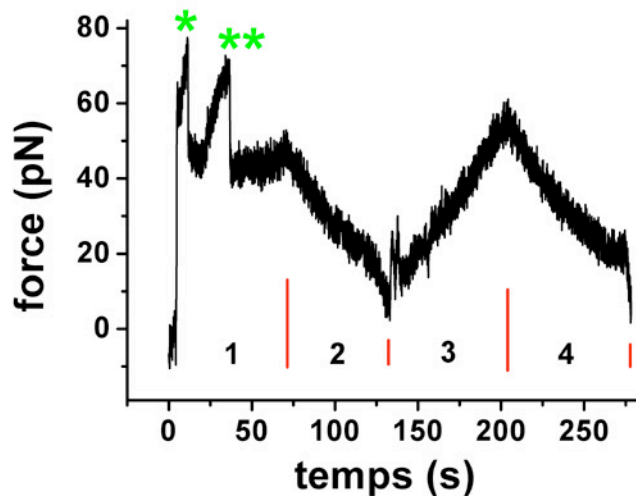


Figure VI.8. : Courbe force-temps d'un tube de vésicule BSM/Chol/DOPC (3:4:1) pour deux cycles extraction-rétraction consécutifs, à tension constante ( $\sigma=2.10^{-4}$ N/m). (1) Première extraction. Après le premier seuil de force (\*), la force atteint un plateau puis passe un deuxième seuil (\*\*), pour revenir au plateau. (2) Première rétraction. (3) Deuxième extraction. (4) Deuxième rétraction.

Tout d'abord, après le passage d'un premier seuil de force (\* sur la fig. VI.8), correspond à la formation d'un tube de membrane, la force atteint un plateau. Cependant, lorsqu'on poursuit l'élongation du tube, la force augmente à nouveau pour franchir un deuxième seuil (\* sur la fig. VI.8) et retomber à la valeur du plateau précédent.

A la première rétraction, un phénomène étonnant est observé en microscopie. La figure VI.8. montre trois video-photographies obtenues pendant l'étape de rétraction, où l'on voit à la fois la vésicule, la bille piégée optiquement et le tube. A la différence des cas étudiés dans les chapitres précédents, le diamètre du tube augmente et il se forme une petite vésicule allongée. Tout se passe comme si les lipides contenus dans le tube ne pouvaient pas revenir dans le corps de la vésicule.



## Partie 2 : Tubes de membranes

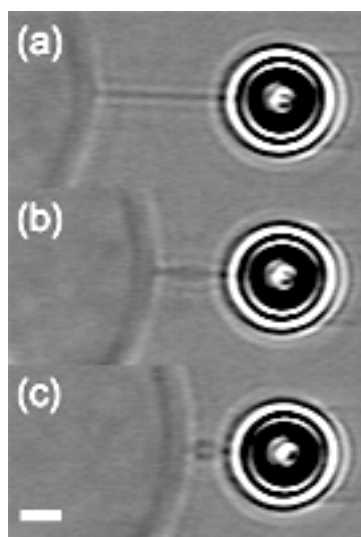


Figure VI.9. : Série de photographies par vidéo microscopie à différents intervalles de temps lors de la rétraction d'un tube extrait d'une vésicule composée de BSM/Chol/DOPC (3:4:1). Le tube grossit au cours de la rétraction, et une « bulle cylindrique » se forme. La barre d'échelle représente 2 μm.

Lors de la seconde extraction-rétraction, le tube formé se comporte comme un élastique. La force augmente linéairement avec la longueur, puis diminue de la même façon.

Différentes explications spéculatives pourraient être avancées pour rendre compte des phénomènes observés, tant dans la mesure de la force qu'optiquement.

La première repose sur l'existence d'une micro-séparation de phase. Rappelons en effet que la composition BSM:Chol:DOPC (3:4:1) forme une phase homogène (d'après les études d'Aurélien Roux), c'est-à-dire qu'aucun domaine « macroscopique » n'a été visualisé en microscopie de fluorescence, mais se trouve juste à la limite de séparation de phase, voire d'un point critique. Il est possible que certaines vésicules comportent des domaines dus aux fluctuations possible de compositions lipidiques d'une vésicules à l'autre liées à la technique de préparation. Nous n'avons pas pu vérifier ce point car nous ne pouvions pas réaliser de mesures de fluorescence. On ne peut pas exclure non plus que des « micro-domaines » (de taille sub-optique) soient présents (Roux, 2004; Roux *et al*, 2005). Si tel était le cas, nous pourrions donc suggérer que le deuxième saut de force observé est dû à l'entrée d'un micro-domaine composé essentiellement de lipides sphingomyéline et de cholestérol, donc plus rigide. L'augmentation de force traduirait ainsi l'élasticité de la bicouche lipidique du tube avant l'entrée de ce micro domaine. Le retour au

## Chapitre VI : Extraction de tubes de membranes à plusieurs lipides

plateau indiquerait que la membrane récupérée ensuite dans le tube serait à nouveau une phase fluide, enrichie en phospholipides DOPC.

La deuxième suggestion repose sur l'hypothèse que la composition lipidique considérée forme bien une phase homogène dans la vésicule, mais que la séparation de phase est induite par formation du tube. Pour des raisons purement énergétiques, il est en effet favorable de former un fin cylindre en récupérant des lipides formant une membrane de faible rigidité de courbure, donc riches en DOPC. Toutefois, la faible proportion de ces lipides (1 part pour 8 au total) ne permet pas de former un tube homogène constitué uniquement de phase  $L_d$ , plus rigoureusement, enrichi en DOPC ; cela serait possible si le temps caractéristique d'élongation du tube (imposé par la vitesse de la pipette) était plus long que le temps de diffusion des lipides DOPC dans la membrane. Or, au-delà d'une certaine longueur de tube, conduisant à un appauvrissement en lipides DOPC dans la vésicule, cette condition devient de plus en plus difficile à réaliser. Par conséquent, le tube s'enrichit alors en lipides BSM ce qui peut conduire à la formation de domaines de phase  $L_o$  et donc à la formation de zone de diamètre supérieure au reste du tube. Cette situation pourrait correspondre à la vésicule allongée que nous observons (Figure VI.9)

Ces deux hypothèses amènent d'autres questions ou plutôt des interrogations. En effet, J.-M Allain et al. (Allain *et al*, 2004) ont prédit que la présence de deux phases au sein d'un tube sous tension entraîne la fission du tube à cause de l'effet de pincement de la tension de ligne. Or, les tubes restent stables dans nos expériences. De plus, ne pouvant pas observer ces vésicules en fluorescence, nous ne pouvons pas savoir si le défaut allongé dans le tube correspond à une phase  $L_d$ .

Au cours de la rétraction, si le domaine était effectivement formé, il serait susceptible de gêner le flux de lipides entrant dans le corps de la vésicule. La signature d'un tube « élastique » a également été observée dans le cas de tubes de globules rouges (voir chapitre VII). Ce type de réponse peut en effet être obtenu si on force le tube à se rétracter à nombre de lipides constant, c'est-à-dire en supposant qu'il y a un « bouchon » au niveau du col. La raison de la formation d'un « bouchon » de lipides n'est pas évidente en l'absence de protéine et de cytosquelette.

Le deuxième cycle extraction-rétraction ne ferait alors que sonder l'élasticité de la petite vésicule formée, ce qui expliquerait l'allure radicalement différente de la courbe de force. A partir de la photographie de la figure VI.9, nous estimons que

## Partie 2 : Tubes de membranes

cette petite vésicule cylindrique a un diamètre de  $1\ \mu\text{m}$ , ce qui représente une surface de  $2.5\ \mu\text{m}^2$  environ. Or, un tube de  $15\ \mu\text{m}$  de long de  $50\text{nm}$  de diamètre (typique d'une phase  $L_d$  homogène) a une aire totale de  $5\ \mu\text{m}^2$ . Les effets liés à l'apport de nouveaux lipides lors de la deuxième extraction du tube pourrait donc être largement masqué par la déformation de cette vésicule. Il faudrait alors analyser si la différence des coefficients de diffusion des lipides dans les différentes phase pourrait suffire à expliquer la non-résorption du domaine à la rétraction

Les expériences réalisées dans cette partie sont encore très exploratoires et les conclusions évidemment encore spéculatives. Elles doivent donc être vérifiées par une étude plus systématique. Pour ce faire, il faudrait pouvoir combiner mesure de force par pince optique et visualisation par microscopie de fluorescence. Nous avons modifié notre dispositif expérimental en ce sens, en remplaçant le filtre d'émission et le miroir dichroïque classiquement utilisés en fluorescence par un filtre et un dichroïque laissant également passer les infra-rouges. La plupart des lipides fluorescents ne s'incorpore pas en général à la phase  $L_o$  mais facilement à la phase  $L_d$ . On pourra ainsi corrélérer en temps réel les accidents observés sur les courbes de force à la présence éventuelle de domaines non-fluorescents.

### **VI.3. Remarque finale : force d'extraction de tube et rigidité de courbure de membranes biphasiques**

Dans ce chapitre, nous nous sommes contentés de décrire qualitativement les courbes force-extension mesurées. Dans les chapitres précédents traitant de tubes de vésicules composées d'un seul type de lipide, nous avons vu que la mesure de la force d'équilibre d'un tube à tension fixée était directement reliée à la rigidité de courbure de la membrane. Si nous considérons maintenant des mélanges de lipides, plusieurs cas de figure peuvent se présenter.

Tout d'abord, même s'il n'y a pas de séparation de phase dans la vésicule, et si la formation d'un tube n'induit pas de séparation de phase, la composition en lipides dans le tube peut être sensiblement différente de celle de la vésicule mère. Dans ce cas, la rigidité de courbure de membrane que l'on déduira de la mesure de force sera

celle du tube et non de la vésicule. C'est ici une des limitations de la détermination de  $\kappa$  par extraction de tube. Ceci constitue une critique aux mesures effectuées au chapitre précédent sur la composition (1:1:0) (ie BSM:Chol 1:1). En effet, si la rigidité de courbure d'un mélange BSM :Chol décroît avec la concentration en cholestérol, on pourrait s'attendre que, à cause de courbure du tube, sa composition s'adapte pour diminuer sa rigidité de courbure et enrichisse la membrane en cholestérol (J. Prost, communication personnelle). Nous sous-estimerions alors la rigidité de courbure de la membrane. Mais un tel tri n'as encore été montré pour ce mélange.

Le deuxième cas d'intérêt est celui d'un tube biphasique (que la séparation de phase fût pré-existante ou induite par la formation du tube). L'analyse devient alors plus complexe. Schématisons la situation. Soit un tube comprenant deux phases de modules de courbure  $\kappa_1$  et  $\kappa_2$ , tels que  $\kappa_1 < \kappa_2$ . Supposons la phase (1) reliée à la bille piégée (Figure VI.10.). La force mesurée par la pince optique,  $F_{ot}$ , s'écrit :

$$F_{ot} = F_1 = 2\kappa_1 \sqrt{2\kappa_1 \sigma_1} \quad \text{VI.5,}$$

avec  $F_1$ , la force exercée par la phase (1) et  $\kappa_1$ , la tension de la membrane dans la phase (1). En notant  $F_2$ , la force exercée par le domaine (2), et  $\kappa_2$ , la tension dans ce domaine, l'équilibre des forces ( $F_1 = F_2$ ) impose :

$$\frac{\kappa_2}{\kappa_1} = \frac{\sigma_2}{\sigma_1} \quad \text{et} \quad r_2 = \frac{\kappa_2}{\kappa_1} r_1 \quad \text{VI.6,}$$

avec  $r_1$  et  $r_2$ , les rayons des tubes respectivement dans les domaines (1) et (2). Notons qu'en aucun cas, nous ne pouvons affirmer que les tensions de membrane définies dans le tube correspondent à celle dans la vésicule.

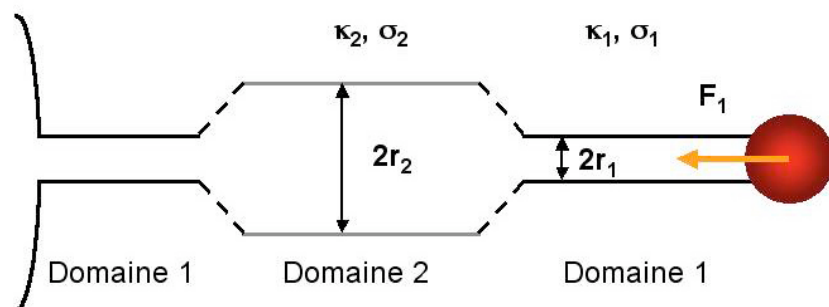


Figure VI.9. : Schéma d'un tube de membrane comportant deux phases (1) et (2). Les caractéristiques de ces domaines sont données respectivement par  $\kappa_1$ ,  $\sigma_1$ ,  $r_1$  et  $\kappa_2$ ,  $\sigma_2$ ,  $r_2$ , respectivement, la rigidité, la tension de membrane et le rayon du tube pour les phases (1) et (2).  $F_1$  est la force agissant sur la bille. Les connexions entre domaines sont en pointillée pour ne pas risquer une représentation erronée.

## **Partie 2 : Tubes de membranes**

Par conséquent, la tension n'est pas homogène au niveau du tube. L'analyse de la force est alors délicate. Si la composition de chaque domaine était connue, une analyse préliminaire sur les membranes de composition correspondante permettrait de mesurer  $\sigma_1$  et  $\sigma_2$  et de comprendre plus en détail ce phénomène. Il faudrait pour cela connaître le diagramme de phase détaillé en fonction de la courbure, ce qui représente un gros travail. Une étude théorique plus approfondie de la mécanique de ces tubes de vésicules biphasiques est également en cours au laboratoire.

### **VI.4. Conclusion**

Au cours de ce chapitre, les limites des expériences d'extraction de tube de vésicules ont été aperçues. D'une part, le contrôle de la tension de membrane est une chose délicate pour des vésicules rigides du fait du faible excès de surface présent et d'autre part, l'analyse de la force d'élongation de tube de vésicules à plusieurs composants nécessite des études complémentaires, théoriques et expérimentales.

Dans le chapitre suivant, malgré leur composition membranaire très complexes, les systèmes cellulaires que nous utiliserons seront considérés comme ayant une membrane homogène et nous supposerons qu'il n'y a pas de tri lipidique pendant l'extraction. Dans ce cadre, nous avons obtenu des informations rhéologiques et mécaniques sur la membrane.

## Bibliographie : Chapitre VI

- Allain J-M, Storm C, Roux A, Ben Amar M et Joanny JF, 2004.  
Fission of a multiphase membrane tube.  
*Physical Review Letters*,93:158104.
- Baumgart T, Hess ST et Webb WW, 2003.  
Imaging coexisting fluid domains in biomembrane models coupling curvature and line tension.  
*Nature*,425:821-824.
- Bloom M, Evans E et Mouritsen OG, 1991.  
Physical properties of the fluid lipid-bilayer component of cell membranes : a perspective.  
*Quarterly Reviews of Biophysics*,24:293-397.
- Dietrich C, Bagatolli LA, Volovyk ZN, Thompson NL, Levi M, Jacobson K et Gratton E, 2001.  
Lipid rafts reconstituted in model membranes.  
*Biophysical Journal*,80:1417-1428.
- Eddidin M, 2003.  
The State of Lipid Rafts: From Model Membranes to Cells.  
*Annual Review of Biophysical and Biomolecular Structures*,32:257-283.
- Kahya N, Scherfeld D, Bacia K, Poolman B et Schwille P, 2003.  
Probing lipid mobility of raft-exhibiting model membranes by fluorescence correlation spectroscopy.  
*Journal of Biological Chemistry*,278:28109-15.
- Roux A, 2004.  
Tubes de membrane dans le trafic intracellulaire : aspects physiques et biologiques.  
Paris: Université Paris VII.
- Roux A, Cuvelier D, Nassoy P, Prost J, Bassereau P et Goud B, 2005.  
Role of curvature and phase transition in lipid sorting and fission of membrane tubules.  
*EMBO Journal*:publié on-line.
- Samsonov AV, Mihalyov I et Cohen FS, 2001.  
Characterization of cholesterol-sphingomyelin domains and their dynamics in bilayer membranes.  
*Biophysical Journal*,81:1486-1500.
- Simons K et Ikonen E, 1997.  
Functional rafts in cell membranes.  
*Nature*,387:569-572.

**Partie 2 : Tubes de membranes**

van Meer G et Lisman Q, 2002.  
Sphingolipid Transport: Rafts and Translocators.  
*Journal of Biological Chemistry*,277:25855-25858.

## **Chapitre VII**

# **Extraction de tubes de membrane cellulaire : Interaction membrane-cytosquelette et stabilité des cavéoles**

Le principe des expériences effectuées dans cette partie ne diffère pas fondamentalement de celui des chapitres précédents. Seul le système d'étude est modifié, et gagne en complexité. En effet, nous passons de systèmes modèles artificiels (des vésicules), à des systèmes biologiques (des cellules). Dans un premier temps, nous étudierons les propriétés mécaniques et rhéologiques des globules rouges et dans un deuxième temps, nous présenterons des expériences préliminaires d'extraction de tubes sur des cellules visant à sonder des mécanismes intracellulaires comme l'endocytose.

### **VII.A. Mécanique et rhéologie des tubes de globules rouges**

L'érythrocyte peut être considéré en première analyse comme un système "passif" et ne semble différer des vésicules que par l'existence d'un cytosquelette bidimensionnel ancré à la membrane. L'interaction cytosquelette-membrane est reconnue jouer un rôle crucial dans l'aptitude des globules rouges à subir des cisaillements importants dans les vaisseaux. Des anomalies, déficiences, ou altérations (par des protéines parasites de la malaria par exemple) de cet ancrage conduisent immédiatement à une rigidification des cellules ou une moindre résistance aux déformations, ce qui peut avoir des répercussions dramatiques sur l'organisme (Glenister et al, 2002; Mohandas et Evans, 1994).



## **Partie 2 : Tubes de membrane**

La formation de tubes de membranes peut être considérée comme un cas de déformation extrême. Nous souhaitons voir si la réponse force-extension d'un tube d'érythrocyte est susceptible de nous informer quantitativement sur l'interaction cytosquelette-membrane, et plus généralement sur les propriétés mécaniques et rhéologiques des globules rouges. Comme nous le verrons par la suite, nous sommes loin d'être les premiers à nous intéresser aux tubes de globules rouges. Toutefois, la plupart des études séminales remontent aux années 1970. Néanmoins, avec le développement de techniques de mesures de forces ultra-faibles, telles que les pinces optiques, il nous semble que ce phénomène pourrait être utilement revisité.

### **VII.A.1. Propriétés mécaniques des globules rouges**

Dans le chapitre II de la première partie, nous avons brièvement présenté le globule rouge, et évoqué sa réponse morphologique à des variations osmotiques, sa composition biochimique (lipides et protéines) et la structure du cytosquelette de spectrine.

Ici, nous allons nous focaliser sur les propriétés mécaniques des érythrocytes. En 1973, E. Evans a posé les bases d'un nouveau concept d'un matériau bidimensionnel, hautement déformable et de faible compressibilité d'aire pour décrire le globule rouge (Evans, 1973a). Depuis, de très nombreux travaux ont visé à caractériser les propriétés élastiques et visqueuses du globule rouge. Nous rappellerons brièvement les principaux résultats. Pour plus de détails, le lecteur est invité à se reporter à (Hochmuth et Waugh, 1987; Mohandas et Evans, 1994).

#### **VII.A.1.a. Elasticité du globule rouge**

Il existe trois modes de déformations intrinsèques d'un élément de membrane en réponse à l'application d'une contrainte (voir partie « adhésion » Chapitre II.1.a). Chaque mode de déformation peut être caractérisé par une constante élastique. Il

**Chapitre VII : Extraction de tubes de membrane cellulaire**  
*Interaction membrane-cytosquelette et stabilité des cavéoles*

sera important pour la suite de savoir les contributions relatives du cytosquelette et de la membrane à chacun de ces modules élastiques.

**VII.A.1.a.i. Module d'élasticité d'extension de surface,  $K_a$**   
**(« dilational elasticity » en anglais)**

Un globule rouge en conditions physiologiques (pression osmotique d'environ 300 mOsm) est flaccide et se déforme facilement sans rompre. En revanche, une fois gonflé osmotiquement (150 mOsm), la capsule sphérique obtenue semble presque indéformable ; son aire est limitée par l'aire de la membrane lipidique. L'application d'une tension supplémentaire isotrope (par micropipette par exemple) conduit à un étirement élastique de la membrane, jusqu'à la lyse du globule éventuellement. Dans ce régime élastique, l'excès d'aire  $\Delta A$  récupéré est proportionnel à la tension  $\sigma$  appliquée selon :  $\Delta A = K_a \cdot \sigma$ , et  $K_a = 300$  à  $500$  mN/m (Evans et al, 1976; Katnik et Waugh, 1990). Il semble acquis que le réseau de spectrine ne contribue pas à  $K_a$ .

**VII.A.1.a.ii. Module d'élasticité de courbure,  $\kappa$**

La bicouche lipidique régule aussi l'opposition du globule rouge à la courbure. La constante d'élasticité de courbure a été obtenue initialement de la mesure de pression d'aspiration à appliquer dans une pipette pour faire entrer un globule (par flambage (Evans, 1983). La valeur obtenue de  $1.8 \times 10^{-19}$  J a été confirmée et raffinée par la suite :  $\kappa = 50 k_B T$  (Waugh et al, 2001). Cette valeur est compatible avec celles de bicouches lipidiques composées de teneurs élevées en cholestérol (25%) et en sphingoglycolipide (20%) (Needham et Zhelev, 1996).

**VII.A.1.a.iii. Module d'élasticité extensionnelle ou module de cisaillement,  $\mu$**

Une bicouche lipidique fluide étant un liquide bidimensionnel, elle n'a pas de résistance au cisaillement. Cette propriété est donc intrinsèque au réseau de spectrine sous-jacent. Le module de cisaillement a d'abord été mesuré par

## Partie 2 : Tubes de membrane

micropipette et déduit de la relation entre la pression d'aspiration et la longueur de la langue dans la pipette pour des globules flacides (Evans, 1973b), puis par pinces optiques (Lenormand et al, 2001; Sleep et al, 1999). Bien qu'il existe encore une controverse sur la valeur exacte de  $\sigma$ , les mesures les plus couramment rapportées donnent  $\sigma \sim 2-15 \text{ nN/m}$ .

### VII.A.1.b. Viscosité du globule rouge

Au delà de ces propriétés élastiques bien caractérisées, il est reconnu depuis longtemps que le globule rouge exhibe des propriétés visqueuses significatives (Chien et al, 1978; Evans et Hochmuth, 1976; Jay et Canham, 1977; Rand et Burton, 1964). Du temps caractéristique de relaxation  $t$  d'un globule relâché soudainement d'une pipette et de la connaissance du module de cisaillement  $\mu$ , une viscosité de surface du globule rouge a pu être définie (Dao et al, 2003; Waugh et Evans, 1979) :  $\sigma = \mu \cdot t \sim 10^{-6} \text{ N.s/m}$ . Cette valeur est cependant fortement influencée par la concentration en hémoglobine et la température, et elle est réduite dans le cas de maladies du sang impliquant des réductions de la quantité de spectrine ou du nombre de sites de liaison ankyrine.

### VII.A.2. Réponse force-extension de tubes de membranes de globules rouges extraits par pince optique

Dans cette partie, nous allons montrer que la courbe force-longueur de tubes de globules rouges présente quelques similitudes, mais surtout de nombreuses différences par rapport à celle de tubes de vésicules lipidiques. L'origine de ces singularités provient évidemment de la structure interne du globule rouge et plus précisément de l'interaction entre le squelette de spectrine et la bicouche lipidique. Nous essaierons d'analyser quantitativement ces effets.

### **VII.A.2.a. Introduction : rappels historiques**

En 1973, Hochmuth et al. (Hochmuth et al, 1973) ont été les premiers à voir des tubes de membrane se former à partir de globules rouges discocytes adhérents sur une surface de verre et soumis à un flux hydrodynamique. Puis, en 1982, une étude plus détaillée a été conduite sur des globules rouges gonflés maintenus dans une micropipette et desquels des tubes étaient extrudés mécaniquement, sans mesure de force (Hochmuth et Evans, 1982; Hochmuth et al, 1982). De là, il a été proposé que : i) le globule rouge se comporte comme une membrane liquide laissant « couler » les lipides pour alimenter la formation du tube, ii) le rayon du tube diminue lorsque la vitesse d'extrusion augmente et dépend de la viscosité de surface de la membrane (et non de celle du milieu extérieur), iii) le tube se comporte comme un solide élastique tel que le rayon du tube diminue avec la tension axiale agissant sur le tube.

Au cours de ces premiers travaux, aucune mesure de force n'a été rapportée. Une estimation du rayon des tubes (invisibles au microscope optique) était déduite de la réduction de la taille de la langue dans la pipette. A ce niveau, le comportement solide-élastique du tube était étonnant, ce qui faisait suggérer à Evans que le tube pouvait être rempli d'une « masse protéique spongieuse, faite de spectrine et d'hémoglobine concentrée » !

Pourtant, des expériences de FRAP (Recouvrement de Fluorescence Après Photoblanchiment) révèlent une diffusion accrue des protéines membranaires dans le tube (Berk et al, 1992; Berk et Hochmuth, 1992) suggérant que la formation du tube implique une séparation membrane-cytosquelette. Ces expériences sont confirmées par des études ultra-structurales par microscopie électronique. Après traitement au triton (tensioactif qui solubilise les lipides mais pas le squelette protéique), le tube disparaît (Waugh et Bauserman, 1995). Sur cette base, le groupe de R. Waugh a implémenté une technique de mesure de force avec une fibre de verre flexible comme capteur. En supposant que le travail de la force mesurée pour allonger le tube était la somme de l'énergie de séparation cytosquelette-membrane  $w_s$  et du travail nécessaire pour allonger un tube lipidique, ils ont obtenu une première estimation de  $w_s$ . Celle-ci a été affinée (corrigée) à plusieurs reprises (Hochmuth et Marcus, 2002; Hwang et Waugh, 1997; Waugh et al, 2001). Une forme

## Partie 2 : Tubes de membrane

simplifiée de la force d'extraction d'un tube de globule rouge pressurisé (à une tension de membrane  $\sigma$ ) est donnée par :  $f = 2\sigma\sqrt{2\sigma(\sigma + w_s)}$ , avec  $w_s=60 \text{ } \mu\text{J/m}^2$ .

La description précédente résulte d'une analyse thermodynamique. Aucun effet dynamique n'est pris en compte. Pourtant, quelques observations surprenantes de relaxation ont été rapportées. Par exemple, une variation de longueur du tube, à tension fixée, induit dans un premier temps une augmentation de force, puis, dans un deuxième temps, à longueur fixée, la force relaxe avec une constante de temps de l'ordre de la minute (Waugh et al, 2001).

Si les propriétés à l'équilibre d'un tube de membrane extrait d'un globule rouge semblent bien comprises, il n'en est pas de même pour la dynamique. Notre approche a consisté à revisiter la réponse force-longueur de tubes de globules rouges à l'aide de notre piège optique. Une étude à l'extrusion et à la rétraction à vitesse contrôlée a été menée. Nous commencerons par comparer nos observations sur globule rouge avec celles obtenues dans les chapitres précédents sur des vésicules lipidiques. Ensuite, nous détaillerons point par point les différentes caractéristiques de la courbe force-extension, afin de dégager les propriétés mécaniques et rhéologiques des tubes de globules rouges. Nous verrons que celles-ci sont, de façon surprenante, très similaires aux propriétés des microvilli de neutrophiles étudiés récemment par E. Evans (Evans et al, 2005; Heinrich et al, 2005) et qu'une approche rhéo-mécanique similaire peut être appliquée. De notre étude sur la rétraction de tubes, nous discuterons le rôle potentiel de la jonction entre le globule rouge et le tube (le « col »).

### VII.A.2.b. Matériels et méthodes

Les globules rouges utilisés dans cette étude sont ceux de l'expérimentateur, obtenus en se piquant le doigt le matin même du jour de l'expérience. Les érythrocytes sont lavés rapidement deux fois avec du PBS 300 mOsm. Ensuite, la pression osmotique est diminuée progressivement jusqu'à 170 mPsm (pour éviter tout choc osmotique) et du polyéthylène glycol (OH-PEG3400-OH) à 0.05 % w :w est ajouté à la suspension de manière à éviter la crénation des globules (i.e. leur transformation en échinocyte). Finalement, les globules rouges à 170 mOsm ont une

**Chapitre VII : Extraction de tubes de membrane cellulaire**  
*Interaction membrane-cytosquelette et stabilité des cavéoles*

forme sphérique mais restent faiblement gonflés. Ils sont aspirés et manipulés avec une micropipette de rayon interne de l'ordre de 0.7-0.8  $\mu\text{m}$ . La pression d'aspiration a été gardée constante, égale à 200 Pa (ou  $2 \times 10^{-3}$  atm ou une hauteur d'eau de 2 cm) tout au long des expériences rapportées ci-dessous. Cette pression d'aspiration est suffisamment élevée pour les maintenir dans la pipette au cours de l'extraction de tubes et suffisamment faible pour ne pas pressuriser les érythrocytes (voir figure VII.2 et justification quantitative au §VII.A.2.f). Cette remarque est importante pour la suite. En effet, la pression d'aspiration ne fixe pas la tension de la membrane du globule rouge car il n'est pas suffisamment gonflé osmotiquement (Evans, 1983; Mohandas et Evans, 1994). Le gonflement osmotique a permis le passage de la forme discocyte à une forme sphérique (ST1, voir partie « adhésion », figure II.4) et non à une forme complètement sphérique (SphST).

L'extrusion de tube est réalisée en piégeant une bille de latex amino-fonctionnalisée de rayon de 3  $\mu\text{m}$  (17145, Polysciences), en la mettant en contact avec le globule et en éloignant la pipette à vitesse constante à l'aide d'un translateur piézo-électrique (course 300  $\mu\text{m}$ ). Le mouvement de l'élément piézo-électrique est contrôlé par un générateur de fonction arbitraire. En pratique, nous appliquerons le plus souvent une série de déplacements correspondant à une rampe « positive » (extraction), un temps de pause, et une rampe « négative » (rétraction). Les vitesses à l'extraction et à la rétraction peuvent être fixées indépendamment. De même, le temps d'attente entre les cycles aller et retour peut être varié de 0 seconde à plusieurs dizaines de minutes. Nous verrons aussi que des mouvements plus variés, comme par exemple une rétraction par paliers, seront parfois appliqués (§VII.A.2.k). Enfin, la force est obtenue de la même manière qu'au cours des précédents chapitres, par détection vidéo du déplacement de la bille connaissant la raideur du piège optique. La figure VII.1 montre une photographie de l'assemblage expérimental. On remarque notamment que la forme du « col » (jonction entre le corps du globule rouge et le tube) est plus prononcée que pour une vésicule.

## Partie 2 : Tubes de membrane

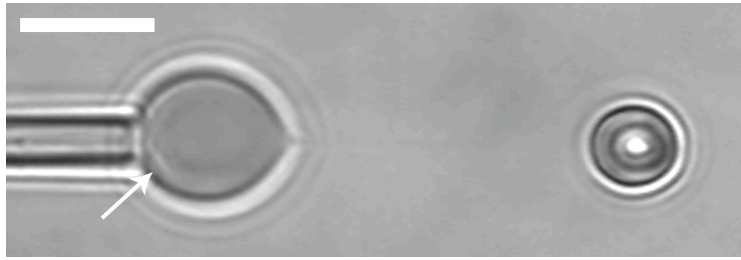


Figure VII.2 : Image en vidéo microscopie d'une expérience d'extraction de tube de globule. Le tube est formé à l'aide d'une bille amine piégée optiquement. La présence d'un pincement de la membrane (flèche) indique que le globule est faiblement gonflé et non pressurisé. La barre d'échelle représente  $5\mu\text{m}$ .

### VII.A.2.c. Allure des courbes force-temps

La vitesse de déplacement de la pipette étant maintenue constante au cours de l'extraction et de la rétraction du tube, nous représenterons souvent les courbes force-temps pour discuter la réponse force-extension. Le graphe de la figure VII.3 montre trois courbes représentatives obtenues à trois vitesses d'extraction différentes ( $0.06\mu\text{m/s}$ ,  $0.12\mu\text{m/s}$  et  $0.24\mu\text{m/s}$ ), tous les autres paramètres étant conservés constants (temps de pause et vitesse de rétraction). La longueur maximale du tube est  $13\text{-}14\mu\text{m}$ .

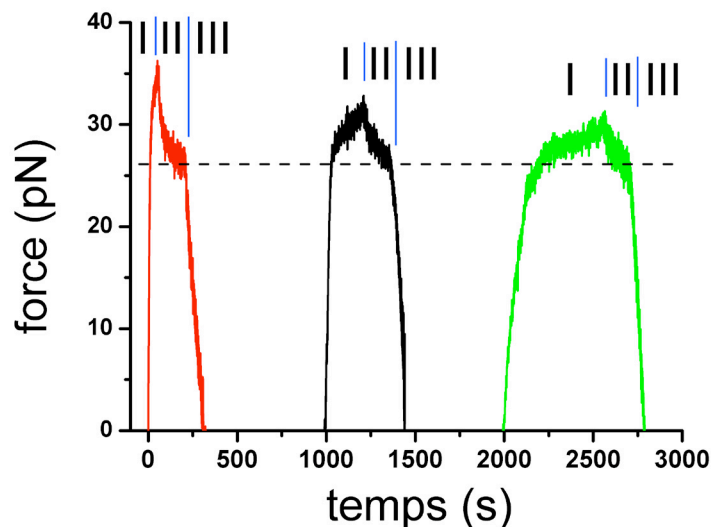


Figure VII.3. : Traces force-temps pour trois cycles extraction-pause -rétraction de tubes de globule rouge. Chaque courbe est obtenue pour un globule rouge différent. Le seul paramètre modifié entre les 3 courbes est la vitesse d'extraction (I) :  $0.24\mu\text{m/s}$  (rouge),  $0.12\mu\text{m/s}$  (noir),  $0.06\mu\text{m/s}$  (vert). Le temps de pause (II) est fixé à 2 min et la vitesse de rétraction (III) est de  $0.24\mu\text{m/s}$ . Les traits en pointillés indiquent la valeur de la force statique à la fin de la période (II), de l'ordre de  $25\text{pN}$ .

**Chapitre VII : Extraction de tubes de membrane cellulaire**  
*Interaction membrane-cytosquelette et stabilité des cavéoles*

A l'extraction, deux régimes de déformation apparaissent. Dans le premier régime correspondant à la déformation élastique initiale du globule rouge attaché à la bille, la force augmente rapidement et linéairement avec le temps, donc avec l'extension. Puis, dans un deuxième régime, une fois le tube formé, la force continue à augmenter plus lentement. Plus la vitesse est importante, plus l'augmentation de force est rapide et plus la force atteinte à la longueur maximale de tube est élevée. Lorsque le tube est maintenu à longueur constante, la force relaxe vers une valeur d'équilibre, de l'ordre de 25 pN, indépendante de la vitesse d'extraction initiale. La constante de temps de relaxation semble indépendante de la valeur de la force atteinte à la fin de l'extraction. Enfin, de manière plus surprenante encore, la rétraction du tube entraîne une diminution (apparemment linéaire) de la force de maintien du tube. Chacune de ces observations sera analysée quantitativement et discutée dans les paragraphes suivants.

**VII.A.2.d. Force statique et énergie de séparation entre le squelette de spectrine et la membrane.**

Avant d'aborder les effets dynamiques observés, nous allons commencer par vérifier que nos expériences sont bien cohérentes avec la description à l'équilibre qui prévaut pour rendre compte de la force « statique » observée. La force statique du tube, notée  $f_s$ , est la force obtenue, après relaxation, à longueur de tube fixée.

Nous avons tracé sur un histogramme les valeurs de  $f_s$  pour 19 tubes de globules rouges (Figure VII.4). Ces valeurs rassemblent les résultats pour différentes vitesses d'extraction ;  $f_s$  est la valeur mesurée en fin de la période de pause (II), moyennée sur les 10 dernières secondes. La distribution de  $f_s$  peut être ajustée par une gaussienne centrée autour de 25pN et de demi largeur à mi-hauteur 2pN.



## Partie 2 : Tubes de membrane

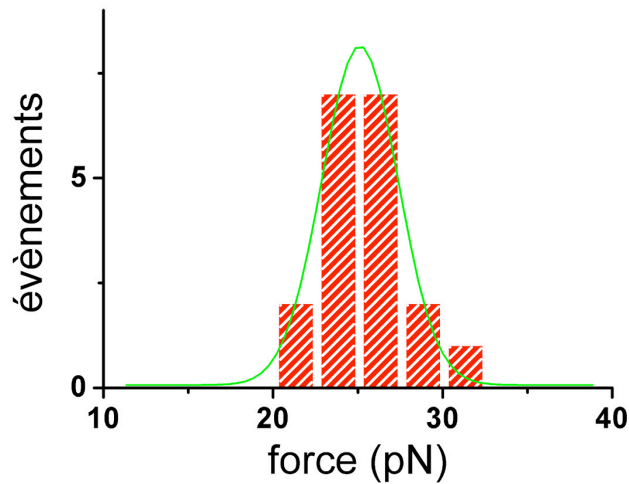


Figure VII.4 : Histogramme de la force statique de tubes de globules rouges. La gaussienne est centrée sur 25.1pN.

Comme nous l'avons rappelé au §VII.A.2.a, la force statique peut s'écrire sous la même forme que la force de plateau d'un tube de vésicule, à savoir  $f_s = 2\kappa\sqrt{2\kappa\sigma}$ , où  $\kappa$  est le module de courbure de la membrane du globule rouge, et la tension apparente  $\sigma = \sigma + w_s$  (Hochmuth et Marcus, 2002). L'énergie d'adhésion par unité d'aire,  $w_s$ , entre le réseau de spectrine et la membrane lipidique est donc liée à  $f_s$  par :

$$f_s = 2\kappa\sqrt{2\kappa(\sigma + w_s)} \quad \text{VII.1}$$

Du fait que nos globules rouges ne sont pas gonflés osmotiquement, nous pouvons négliger la valeur de la tension par rapport à celle de l'énergie d'adhésion du squelette. En prenant  $\kappa=50k_B T$  (§VII.A.1.i), nous obtenons  $w_s=40\kappa J/m^2$ , ce qui est en bon accord avec les valeurs précédemment rapportées et convergeant vers  $60\kappa J/m^2$  (Hochmuth et Marcus, 2002). L'hypothèse qui a consisté à négliger  $\sigma$  nous semble justifiée car les tubes sont courts (14  $\mu m$ ), donc l'excès d'aire récupéré dans le tube est insuffisant pour provoquer une augmentation de tension significative.

### VII.A.2.e. Comparaison avec les vésicules lipidiques

La description des tubes de vésicules lipidiques est relativement bien comprise d'un point de vue théorique et a été étudiée en détail expérimentalement (voir chapitres précédents). Elle nous servira donc de référence pour expliquer la courbe force-extension d'un tube de globule rouge. Par souci de comparaison directe, nous

## Chapitre VII : Extraction de tubes de membrane cellulaire Interaction membrane-cytosquelette et stabilité des cavéoles

avons tracé, sur la figure VII.5, la courbe force-extension d'un tube de globule rouge et d'un tube de vésicule extrudés à la même vitesse ( $0.2 \mu\text{m/s}$ ), avec un temps de pause identique (2 min) à la longueur maximale de  $13 \mu\text{m}$ , et rétractés à la même vitesse ( $0.2 \mu\text{m/s}$ ).

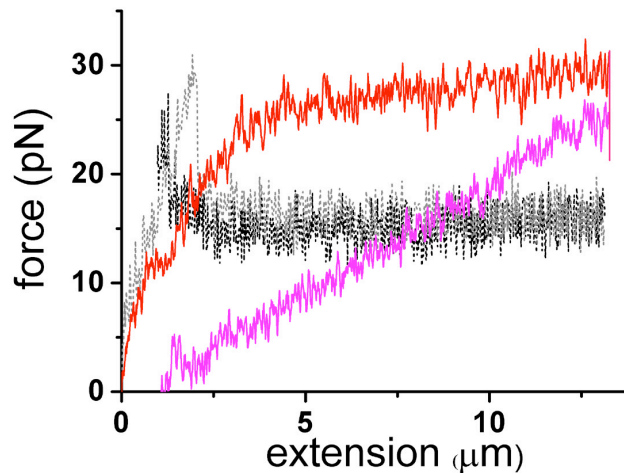


Figure VII.5: Courbe force-extension d'un tube de globule rouge et d'un tube de vésicule. L'extraction et la rétraction sont respectivement, pour le globule, en ligne continue rouge et magenta, et pour la vésicule, en ligne pointillée grise et noire.

Les deux traces sont radicalement différentes. Malgré une déformation élastique initiale comparable, le seuil de force (« overshoot ») observé pour la vésicule disparaît dans le cas du globule rouge. Seul un petit décrochement marquant une rupture de pente indique la formation du tube. De plus, tandis qu'un plateau parfaitement horizontal est obtenu pour le tube lipidique à l'extraction et à la rétraction, un tel plateau est absent et une forte hystérèse entre l'aller et le retour est observée pour le tube de globule rouge. Tout se passe donc comme si une vitesse d'extraction-rétraction de  $0.2 \mu\text{m/s}$  était suffisamment faible pour considérer que le tube de vésicule est à l'équilibre à tout instant, et beaucoup trop élevée pour qu'il en soit de même dans le cas du globule rouge. Une réduction significative de la vitesse (jusqu'à  $0.02 \mu\text{m/s}$ ) ne permet pas de retrouver la signature du tube de vésicule pour le globule rouge (données non montrées)

### VII.A.2.f. Déformation élastique initiale du globule rouge

Avant la formation du tube, le globule se déforme de manière élastique. A partir de la vitesse de déplacement de la pipette et de la pente de  $f(t)$ , nous pouvons

## Partie 2 : Tubes de membrane

mesurer la constante de raideur du système global « globule rouge+pince optique ». Puis, connaissant la raideur du piège placé en série avec le globule rouge, on peut extraire la constante d'élasticité  $k_{rbc}$  du globule rouge aux temps initiaux de la déformation. Cette approche est analogue à celle développée au chapitre III (III.1.b) pour les vésicules. Nous avons représenté les différentes valeurs obtenues de  $k_{rbc}$  en fonction de la vitesse d'extrusion sur le graphe de la figure VII.6

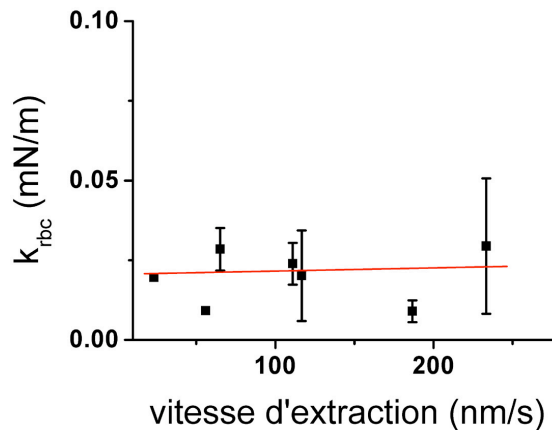


Figure VII.6 : Constante d'élasticité du globule rouge en fonction de la vitesse d'extraction. La ligne rouge est l'ajustement par une loi de puissance à exposant flottant.

La constante d'élasticité trouvée dépend faiblement de la vitesse d'extraction  $v_{ext}$  suivant une loi de puissance :

$$k_{rbc} = 0.015 \text{ pN/nm} (v_{ext} / (\text{nm/s}))^{0.07} \quad \text{VII.2.}$$

Comme nous le discuterons plus tard, cette faible dépendance avec la vitesse est caractéristique d'une réponse viscoélastique du globule rouge à la déformation. Nous supposons cependant, par la suite, la constante d'élasticité du globule rouge indépendante de la vitesse et égale à 0.015 pN/nm.

Que représente cette constante de raideur ? Nous avons insisté jusqu'à présent sur le fait que les globules rouges utilisés ne sont pas gonflés osmotiquement jusqu'à obtention d'une sphère d'aire limitée par la membrane lipidique. Si tel avait été le cas, comme on l'a vu au chapitre III,  $k_{rbc}$  serait directement reliée à la tension de membrane  $\sigma$ , elle-même proportionnelle à la pression d'aspiration  $\Delta P$ , selon (Evans et al, 1995) :

$$k_{rbc} = \frac{\sigma R_p \Delta P}{\left( \frac{R_p}{R_v} \right) \ln \left( \frac{4R_0^2}{R_p R_v} \right)} \quad \text{VII.3,}$$

## Chapitre VII : Extraction de tubes de membrane cellulaire Interaction membrane-cytosquelette et stabilité des cavéoles

avec  $R_p$  le rayon de la pipette,  $R_0$  le rayon de la partie sphérique du globule en dehors de la pipette, et  $R_c$  le rayon de contact entre la bille et le globule.

Dans notre cas, si le globule rouge était effectivement mis sous tension par la pression d'aspiration appliquée ( $\Delta P=2\text{cm}$  d'eau), on aurait  $\kappa=10^{-4}\text{N/m}$  d'où une constante d'élasticité de l'ordre de  $0.2\text{ pN/nm}$ , ce qui est un ordre de grandeur plus rigide que la valeur effectivement mesurée.

Nous justifions ce désaccord en affirmant que le globule n'est pas gonflé, donc que sa membrane n'est pas sous tension. Encore faut-il le vérifier ! Si tel est le cas, la constante de raideur mesurée doit refléter le module de cisaillement du globule rouge (donc du réseau de spectrine). Parker et Winlove (Parker et Winlove, 1999) ont proposé une relation permettant de relier la force axiale  $f$  à la déformation axiale  $\Delta$  d'un fantôme (« ghost ») de globule rouge. Nous avons déjà utilisé cette approche au chapitre III de la partie « Adhésion ». Si l'érythrocyte est dégonflé ou sans membrane lipidique,

$$f = 5\kappa(R_0\Delta^2)^{1/3} \quad \text{VII.4,}$$

avec  $\kappa$  le module de cisaillement,  $\Delta$  le module de courbure, et  $R_0$  le rayon initial du globule rouge. Dans notre cas, pour une déformation  $\Delta$  la force s'exprime en fonction de la constante d'élasticité,  $k_{\text{rbc}}$ , par :

$$f = k_{\text{rbc}} \cdot \Delta x_{\text{rbc}} = k_{\text{rbc}} \cdot (2R_0\Delta) \quad \text{VII.5,}$$

où  $\Delta x_{\text{rbc}}$  est l'extension du globule rouge. Avec  $\kappa=50k_B T$ ,  $k_{\text{rbc}}=0.015\text{pN/nm}$ ,  $R_0=3.5\mu\text{m}$ , nous déduisons des équations VII.4 et VII.5 que  $\kappa=11\mu\text{N/m}$ , ce qui est bien en accord avec les valeurs de module de cisaillement rapportées dans la littérature (voir §VII.A.1.i)

### VII.A.2.g. Un événement moléculaire de détachement membrane-cytosquelette à l'origine de la formation du tube

Le graphe de la figure VII.7 montre une trace force-temps représentative d'un tube de globule rouge pendant l'extraction et la pause. On observe qu'après la déformation élastique du globule entier, l'augmentation de force n'est plus linéaire et semble tendre vers un plateau. Nous notons  $f$ , la force atteinte au moment où l'on

## Partie 2 : Tubes de membrane

s'écarte du régime linéaire. La visualisation des séquences de video-microscopie nous suggère par ailleurs que ce point coïncide avec la nucléation du tube. Ce changement abrupt de régime pourrait être le signe d'une séparation entre la membrane et le cytosquelette de spectrine (qui ne devrait pas entrer dans le tube d'après toutes les expériences rappelées au début de ce chapitre). Pour comprendre plus précisément ce que représente  $f$ , nous allons nous inspirer de l'analyse proposée récemment par Evans et al. (Evans et al, 2005) pour expliquer la formation de « tethers » sur des neutrophiles humains exprimant des récepteurs PSGL-1 collés de manière ponctuelle à une bille sonde décorée de P-sélectines.

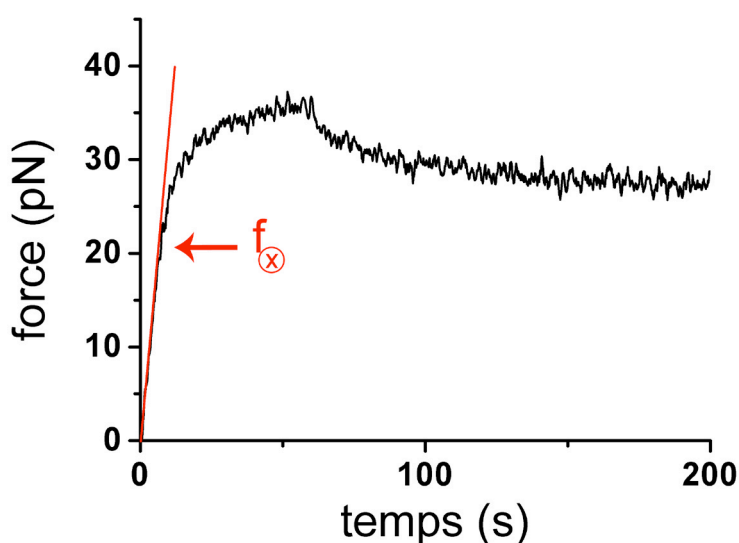


Figure IIV.7 : Trace force-temps d'un tube de globule rouge extrait à une vitesse d'extraction de  $0.12 \mu\text{m/s}$ . La droite en rouge montre le régime linéaire et la flèche rouge indique la force  $f$  qui marque la fin du régime linéaire.

L'hypothèse de base consiste à dire que cette séparation membrane-cytosquelette peut résulter de la rupture d'un seul lien participant à la cohésion cytosquelette-membrane. L'élongation du tube serait ensuite permise par un simple flux de lipides. Pour tester cette hypothèse, il suffit d'étudier la dépendance de  $f$  avec la vitesse de séparation. Plus précisément, on définira le taux de charge,  $r_f$ , comme l'augmentation de force par unité de temps exprimée en pN/s. Le cadre théorique d'une rupture de liaison limitée cinétiquement avait été d'abord proposé par Bell (Bell, 1978) puis raffiné et validé expérimentalement par Evans (Evans, 2001; Merkel et al, 1999). Ce modèle est basé sur le fait que l'application d'une force sur une liaison augmente exponentiellement la probabilité de rupture d'une liaison. Comme on le voit sur le dessin de la figure VII.8, le travail mécanique de la force

**Chapitre VII : Extraction de tubes de membrane cellulaire**  
*Interaction membrane-cytosquelette et stabilité des cavéoles*

extérieure engendre un abaissement de la barrière d'énergie, ce qui favorise la dissociation de la liaison. Brièvement, lorsque la liaison est sollicitée par une force augmentant linéairement avec le temps, la force de rupture la plus fréquente  $f^*$  est donnée par :

$$f^* = f_{\square} \ln \left[ \frac{r_f t_0}{f_{\square}} \right] \quad \text{VII.6,}$$

où  $t_0$  est le temps de vie de la liaison à force nulle et  $f_{\square}$ , appelée « force thermique », qui correspond à la force nécessaire pour abaisser la barrière d'énergie libre de  $k_B T$ , est donnée par:  $f_{\square} = k_B T / x_{\square}$ , avec  $x_{\square}$  la position de l'état de transition, c'est-à-dire la distance seuil suivant l'axe de la force au-delà de laquelle ligand et récepteurs sont dissociés.

Notons que l'équation (VII.6) est valable pour une liaison unique. Si plusieurs liaisons sont engagées, le spectre de force dépend du mode de sollicitation (pelage, en parallèle, etc...) et les paramètres  $t_0$  et  $f_{\square}$  dépendent du nombre de liaisons rompues (Evans, 2001; Seifert, 2000).

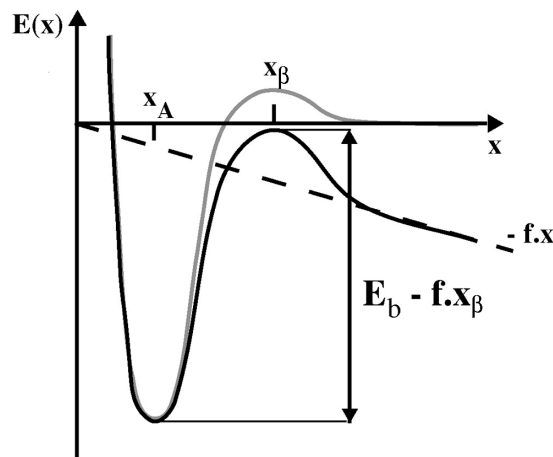


Figure VII.8 : Potentiel d'interaction récepteur-ligand sans (gris) ou avec (noir) application d'une force extérieure. Le travail de la force tend à incliner le profil énergétique et diminue la barrière énergétique de  $-f \cdot x_{\square}$ .

Revenant à nos expériences, nous avons tracé, sur la figure VII.9, en échelle semi logarithmique la force  $f$  en fonction de  $r_f$  donné par la pente initiale  $df/dt$ . Bien que la gamme de taux de charge explorée soit petite (moins de 2 décades), nous pouvons constater que les points expérimentaux peuvent être correctement ajustés par l'eq. (VII.6). Nous trouvons ainsi  $f_{\square} = 9 \pm 3 \text{ pN}$  et  $t_0 = 80 \pm 50 \text{ s}$ .

## Partie 2 : Tubes de membrane

La valeur de la force  $f_0$  correspond à une longueur  $x_0$  de 0.4nm, ce qui est typique d'une interaction récepteur-ligand unique (Evans, 2001). En effet, une rupture de N liaisons en parallèle conduirait à une force thermique  $N.f_0$  et une longueur apparente  $x_0/N$ , qui devient alors rapidement sub-atomique (Pierrat, 2004). Quant à  $t_0$ , quelle est la signification d'un temps de vie de 80s ? On sait que la protéine transmembranaire band 3 joue un rôle important dans la cohésion membrane-cytosquelette du globule rouge par le biais de son interaction avec l'ankyrine (Low et al, 1991). Le temps de vie de l'interaction ankyrine-band 3 a été estimé par des mesures de saut de pH par Thévenin et Low (Thevenin et Low, 1990). Les auteurs ont trouvé  $t_0=6\pm 2$ min, ce qui du même ordre de grandeur que la valeur que nous avons déduite du spectre de force. Pour toutes ces raisons, certes indirectes, il semblerait donc que la formation d'un tube de globule rouge tel que nous la réalisons résulte d'un événement moléculaire unique de détachement cytosquelette-membrane.

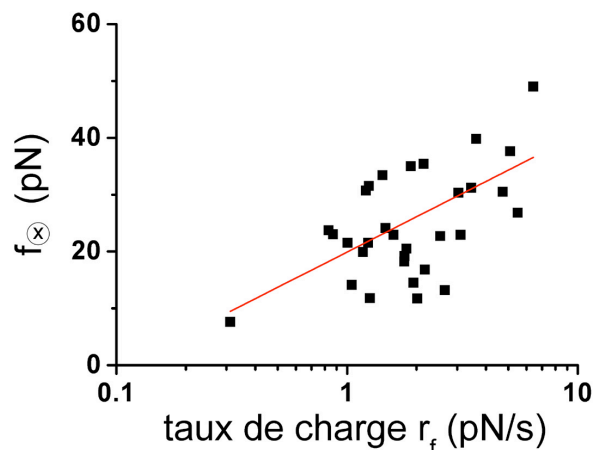


Figure VII.9 : Variation de la force  $f$  en fonction du taux de charge  $r_f$  en échelle semi logarithmique. La courbe rouge correspond à l'ajustement  $f=f_0 \ln(r_f t_0 / f_0)$  où  $f_0=9$ pN et  $t_0=82$ s.

### VII.A.2.h. L'élongation des tubes révèle une réponse viscoélastique caractérisée par des effets rhéofluidifiants significatifs

Ce paragraphe va introduire une vision phénoménologique de la dynamique observée au cours de l'extraction d'un tube de globule rouge. Cette approche est inspirée de la description développée par E.Evans (Evans et al, 2005; Heinrich et al,

**Chapitre VII : Extraction de tubes de membrane cellulaire**  
*Interaction membrane-cytosquelette et stabilité des cavéoles*

2005; King et al, 2005). Une fois le tube formé, la force d'allongement semble tendre exponentiellement vers un plateau (Figure VII.10). A un temps arbitraire,  $t_1$ , choisi supérieur mais proche du temps marquant la fin du régime linéaire, nous avons ajusté les données par :

$$f(t) = \Delta f + f_s \left( \Delta f + f_s \right) \exp \left( -\frac{t - t_1}{\tau} \right) \quad \text{VII.7}$$

où  $\Delta f$  est l'excès de force en fin d'extraction par rapport à la force statique (composante dynamique),  $f_1$  la force au temps  $t_1$ , et  $\tau$ , le temps caractéristique de relaxation.

Le lecteur attentif aux articles cités ci-dessus s'apercevra que nous introduisons ici la force statique directement, alors qu'E. Evans considérait que, dans le cas des neutrophiles, celle-ci résultait vraisemblablement d'une réorganisation intracellulaire ultérieure du cortex d'actine, et n'en tenait donc pas compte pour sa description rhéologique. Dans notre cas, nous supposons que l'état d'équilibre est déterminé par  $f_s$  et que les effets dynamiques se manifestent par l'écart observé à  $f_s$ .

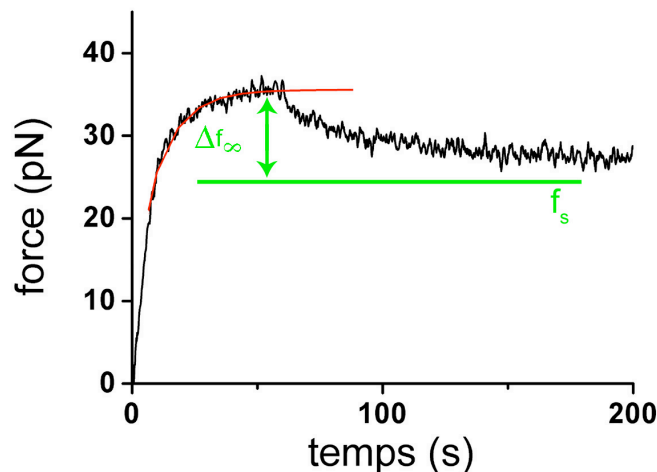


Figure VII.10 : Ajustement de la montée en force lors de l'élongation du tube de membrane par l'équation VII.7 caractéristique d'un fluide de Maxwell. Dans ce cas, la vitesse d'extraction est de 0.12  $\mu$ m/s et l'ajustement donne  $\Delta f = f - f_s = 11$  pN, où  $f_s$  est la force statique, et  $\tau = 23$  s en prenant  $(t_1, f_1) = (7 \text{ s}, 22 \text{ pN})$ .

Nous avons regroupé les résultats de nos ajustements de  $\Delta f$  et de  $\tau$  en fonction de la vitesse d'extraction (entre 4 et 7 globules rouges pour chaque vitesse) dans les graphes des figures VII.11 et VII.12. Il apparaît clairement que la membrane à l'extraction n'est pas un fluide newtonien car l'excès de force  $\Delta f$  n'est pas une fonction linéaire de la vitesse d'extraction.



## Partie 2 : Tubes de membrane

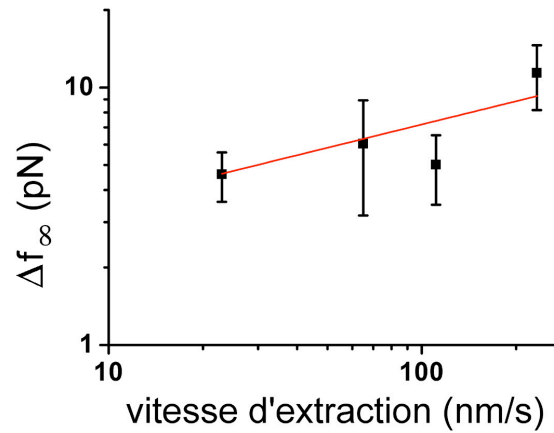


Figure VII.11 : Evolution de la force  $\Delta f$  en fonction de la vitesse d'extraction. Les données sont ajustées avec une loi de puissance  $av_{\text{ext}}^b$  avec  $a=1.8\pm 0.2\text{pN}(\text{s/nm})^{0.3}$  et  $b=0.3\pm 0.1$  où  $v_{\text{ext}}$  est la vitesse d'extraction.

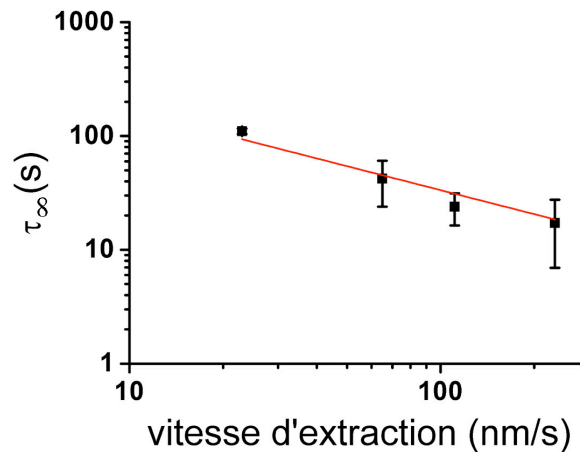


Figure VII.12 : Evolution du temps de relaxation  $\tau_{\infty}$  en fonction de la vitesse d'extraction. Les données sont ajustées avec une loi de puissance  $cv_{\text{ext}}^d$  avec  $c=840\pm 60\text{s}(\text{s/nm})^{0.7}$  et  $d=0.7\pm 0.1$  où  $v_{\text{ext}}$  est la vitesse d'extraction.

En ajustant la variation de  $\Delta f$  avec  $v_{\text{ext}}$  par une loi de puissance, on trouve :

$$\Delta f = 1.8\text{pN} (v_{\text{ext}} / (\text{nm/s}))^{0.3} \quad \text{VII.8}$$

La dépendance en loi de puissance de  $\Delta f$  en fonction de la vitesse avec un exposant  $<1$  est la signature d'effets rhéo-fluidifiants.

De même, le temps de relaxation  $t$  montre une dépendance avec la vitesse d'extraction:

$$\tau = 840\text{s} ((\text{nm/s}) / v_{\text{ext}})^{0.7} \quad \text{VII.9.}$$

Le flux de lipide impliqué dans l'extraction du tube ne peut donc pas être décrit rigoureusement comme un fluide de Maxwell simple. Nous allons toutefois voir que cette description phénoménologique peut être a posteriori justifiée si l'on tient compte

**Chapitre VII : Extraction de tubes de membrane cellulaire**  
*Interaction membrane-cytosquelette et stabilité des cavéoles*

de propriétés rhéofluidifiantes de la membrane (Evans et al, 2005; Heinrich et al, 2005).

Soit  $f_{\square}$  la composante de force correspondant aux propriétés de friction de la membrane du globule rouge. Par analogie avec les fluides rhéo-amincissants classiques, on la suppose pouvant être décrite par une fonction non linéaire du taux d'extension,  $v_{\square}$ , soit sous la forme :

$$f_{\square} = \eta(v_{\square}) v_{\square} \quad \text{VII.10,}$$

où  $\eta(v_{\square})$  est le coefficient de friction du fluide à un taux d'extension  $v_{\square}$  donné.

La force totale mesurée par pince optique est la somme de cette force « dynamique » et de la force statique  $f_s$ , soit :

$$f_{\square} = f + \eta f_s \quad \text{VII.11.}$$

Nous supposons ensuite que ce coefficient de viscosité suit une loi de puissance en  $v_{\square}$ :

$$\eta(v_{\square}) = \eta v_{\square}^{\alpha} \quad \text{VII.12.}$$

Le comportement global du tube étant visco-élastique, on introduit par ailleurs une composante élastique sous la forme d'un ressort de raideur globale constante  $k_e$ . Pour l'instant, nous ne précisons pas l'origine physique de  $k_e$ . Cette raideur est susceptible d'englober les effets élastiques du tube lipidique, de la pince ou d'autres éléments élastiques. Alors, l'extension instantanée de la composante élastique,  $x_e$ , est donnée par :

$$x_e = (f + \eta f_s) / k_e \quad \text{VII.13.}$$

Dans nos conditions expérimentales, la vitesse d'extrusion constante imposée,  $v_{\text{ext}}$ , est la somme des taux d'extension visqueux et élastique, soit :

$$v_{\text{ext}} = v_{\square} + \dot{x}_e \quad \text{VII.14.}$$

La combinaison des équations VII.10 à VII.14 conduit finalement à l'équation différentielle suivante :

$$\frac{d(f + \eta f_s)}{dt} = k_e v_{\text{ext}} - \eta \frac{d(f + \eta f_s)}{dt} \quad \text{VII.15.}$$

Lorsque le régime stationnaire est atteint,  $d(f + \eta f_s)/dt=0$  et  $f = f_s + \eta f$ . D'après l'expression précédente :

$$\eta f = \eta (v_{\text{ext}})^{1/\alpha} \quad \text{VII.16.}$$

## Partie 2 : Tubes de membrane

De plus, à proximité de  $f$  (i.e.  $f-f_s = \Delta f + \delta f$ ), un développement au premier ordre donne :

$$\frac{d\Delta f}{dt} = \frac{k_e v_{\text{ext}} \Delta f}{\Delta f (1 - \Delta f)} \quad \text{VII.17,}$$

ce qui définit un temps caractéristique de montée,  $\tau$  par :

$$\tau = (1 - \Delta f) \frac{\Delta f}{k_e v_{\text{ext}}} = \frac{(1 - \Delta f) \Delta f}{k_e v_{\text{ext}}} \quad \text{VII.18}$$

Les expressions VII.16 et VII.18 sont cohérentes simultanément avec nos données expérimentales précédemment ajustées si l'on fixe  $\Delta f = 0.7$ .

De VII.8 et VII.16, on en déduit aussi que :  $\Delta f = 1.8 \text{ pN}(\text{s/nm})^{0.3}$ . Et de VII.9 et VII.18, l'élément élastique global du système a une raideur  $k_e = 0.0007 \text{ pN/nm}$ . Or, notre système peut être considéré comme la mise en série de 4 éléments élastiques : le piège optique ( $k_{\text{OT}} \approx 0.1 \text{ pN/nm}$ ), le tube formé de lipides (module élastique d'une membrane  $K_a \approx 300 \text{ pN/nm}$  - voir chapitre IV), le globule rouge lui-même ( $k_{\text{rbc}} \approx 0.02 \text{ pN/nm}$  à  $v_{\text{ext}}$  non nulle - voir § VII.A.2.f.) et le col du tube relié au globule rouge, dont la raideur est inconnue (Remarque : on néglige ici la raideur de la langue qui joue le rôle de réservoir de lipides). A priori, comme l'élément le plus souple fixe la constante de raideur de l'ensemble, il semblerait que ce soit le col globule-tube qui détermine l'élasticité observée. Pour l'instant, nous ne pouvons aller plus loin quantitativement. Il est toutefois à noter qu'au contraire des vésicules, la forme du col est beaucoup plus « douce », ce qui suggère que le squelette de spectrine, bien que n'envahissant pas le tube lui-même, pourrait être accommodé à l'intérieur du col. Cela implique un gradient de déformation important du squelette de spectrine. On pourrait spéculer que les filaments de spectrine interconnectés en triangle puissent s'aligner pour former des fuseaux jusqu'au début du col. Cet alignement peut être favorisé par la friction des lipides sur les points d'ancrage du squelette dans la membrane entraînant leur déplacement à l'origine du col.

### VII.A.2.i. Relaxation de la force à longueur constante vers la force d'équilibre

Lorsque nous arrêtons l'extraction du tube et observons l'évolution de la force à longueur fixée, celle-ci relaxe vers la force statique  $f_s$ , comme on le voit sur le graphe

**Chapitre VII : Extraction de tubes de membrane cellulaire**  
*Interaction membrane-cytosquelette et stabilité des cavéoles*

de la figure VII.13. En notant  $t_2$  le temps marquant le début de la phase II (pause) et  $f(t_2)$  la force correspondante, l'équation différentielle VII.15 peut être résolue en fixant  $v_{ext}=0$ :

$$\frac{f(t) - f_s}{f(t_2) - f_s} = \frac{1}{\tau + \frac{t - t_2}{\tau_r} (1 - \tau_r/\tau)} \quad \text{VII.19}$$

où  $\tau$  est donnée par l'expression :

$$\tau_r = \frac{1 - \tau_r/\tau}{k_e (f(t_2) - f_s)} \tau_r / (1 - \tau_r/\tau) \quad \text{VII.20}$$

La comparaison des expressions VII.20 et VII.18 montre que la constante de temps à la relaxation est sensiblement différente de celle à l'allongement, ce qui ne serait pas le cas pour un fluide newtonien. D'ailleurs, l'évolution temporelle de la force n'est pas une exponentielle simple (mais étirée). Pour tester à nouveau la pertinence de ces effets rhéo-fluidifiants, nous avons superposé, sur le graphe de la figure VII.13, deux ajustements de nos données expérimentales : l'un utilisant l'équation VII.19 et l'autre une relaxation exponentielle correspondant à un fluide de Maxwell. De plus nous avons inséré l'écart quadratique des ajustements avec les données expérimentales. On observe une plus forte déviation avec l'ajustement exponentiel aux temps courts. Au contraire, l'accord est excellent lorsqu'on prend en compte cet effet rhéo-fluidifiant.

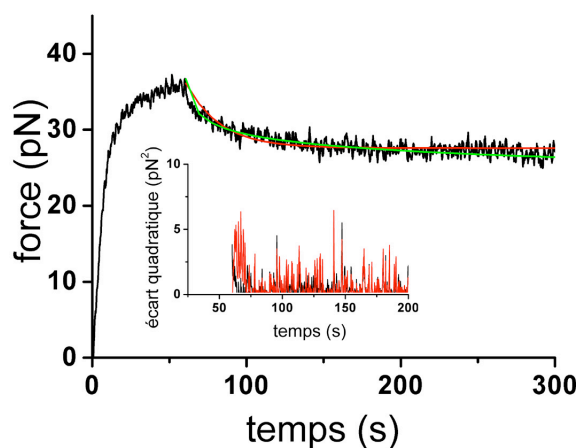


Figure VII.13 : Relaxation de la force après extraction d'un tube de globule rouge à longueur fixe. Deux ajustements ont été tracés, l'un correspond à une relaxation exponentielle d'un fluide Maxwell simple (rouge), l'autre correspond à une relaxation en loi de puissance caractérisant les propriétés rhéo-fluidifiantes de la membrane. En insert est représenté l'écart de ces ajustements avec les données expérimentales (en rouge : fluide de Maxwell, et en noir : fluide rhéofluidifiant)

L'origine moléculaire de cette relaxation peut être spéculée de la même manière que précédemment. La conformation supposée du squelette où les filaments de spectrines tendent à être alignés suivant l'axe du tube dans le col est une situation défavorable, car les points d'ancrage sont concentrés et confinés au début du col et les filaments compressés. Le retour à une situation énergétiquement plus stable passerait par une homogénéisation de la distribution des protéines transmembranaires liant le squelette et impliquant un réarrangement du squelette de spectrine. Cette redistribution n'est que spéculative et n'a pas été démontrée au cours de ce travail.

### **VII.A.2.j. La rétraction de tubes à vitesse constante est caractérisée par une réponse élastique**

La troisième phase de notre procédure expérimentale visant à sonder la micro-mécanique de tubes de globule rouge est une rétraction forcée du tube à vitesse constante. Nous avons évoqué au §VII.A.2.c une diminution linéaire de la force au cours de la rétraction, signature d'une réponse purement élastique. Evidemment, la courbe force-temps ou force-extension peut laisser suggérer cela si la fréquence de sollicitation est trop élevée par rapport à la fréquence caractéristique  $1/\tau$  du système. Nous avons donc fait varier la vitesse de rétraction sur deux ordres de grandeur, la rétraction complète des 14  $\mu\text{m}$  de tube étant accomplie de 6 s à 10 min. Pour s'affranchir de la variable temps, nous avons cette fois représenté la courbe force-longueur sur le graphe de la figure VII.14. Quelle que soit la vitesse de rétraction, nous avons observé un comportement élastique du tube de l'érythrocyte. Une légère déviation à la linéarité est seulement observée pour la vitesse la plus faible. Mais, dans tous les cas, nous n'avons pas été capable d'atteindre des vitesses suffisamment faibles pour raccourcir le tube à force constante, comme pour les vésicules lipidiques.

Sur la gamme de vitesses de rétraction explorée [0.02  $\mu\text{m/s}$  – 2  $\mu\text{m/s}$  ], la raideur du tube ainsi mise en évidence est de l'ordre de 0.0018 pN/nm.

**Chapitre VII : Extraction de tubes de membrane cellulaire**  
*Interaction membrane-cytosquelette et stabilité des cavéoles*

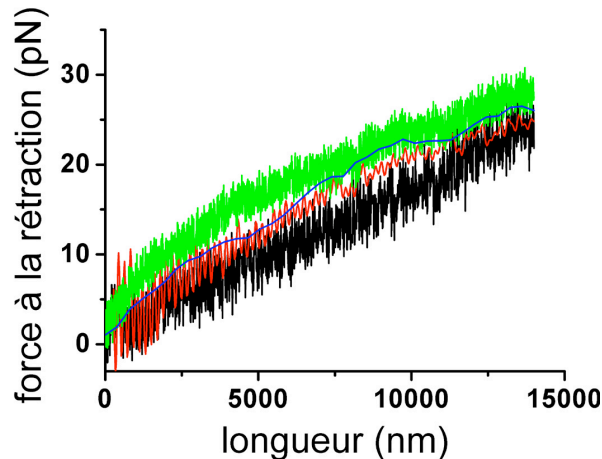


Figure VII.14 : Evolution de la force en fonction de la longueur de tubes de globules rouges pendant la rétraction à différentes vitesses constante pour une longueur initiale de 14 μm. Les courbes vertes, noires, rouges et bleues correspondent respectivement à des vitesses de rétraction de 0.02, 0.12, 0.2 et 2 μm/s

En supposant les caractéristiques visqueuses équivalentes à l'extraction et à la rétraction, l'équation VII.15 devient immédiatement dans le cas de la rétraction du tube de membrane à une vitesse  $v_{ret}$  constante :

$$\frac{d(f_s - f)}{dt} = k_e^r v_{ret} \left( \frac{f_s - f}{l} \right)^{1/(1-\alpha)} \quad \text{VII.21,}$$

avec  $k_e^r$ , la composante élastique à la rétraction.

Cette écriture suppose donc implicitement que le flux de lipides entrant est caractérisé par le même processus rhéo-amincissant que le flux de lipides sortant au cours de l'extraction !

Si l'équation VII.21 est valide, nous pouvons définir un temps caractéristique,  $\tau_o^r$ :

$$\tau_o^r = \frac{(1-\alpha) l}{k_e v_{ret}} \quad \text{VII.22.}$$

En prenant la valeur mesurée de  $k_e^r$ , et une vitesse  $v_{ret} = 200 \text{ nm/s}$ , le temps caractéristique attendu est  $\tau_o^r \approx 20 \text{ s}$ . Dans ce cas, nous devrions observer une réponse non linéaire puisque le temps de la rétraction à une telle vitesse est de 60s environ. Nous arrivons donc à la limite de la description de fluide rhéo-fluidifiant résumée par l'eq. (VII.15) et une question est levée : la mécanique du système est-elle la même en extraction et rétraction? Même si, a priori, il n'y a pas de raison évidente pour que la friction des lipides à l'extrusion soit identique à celle à la

## Partie 2 : Tubes de membrane

rétraction, nous ne pouvons fournir de réponse justifiée pour l'instant. Nous allons chercher à sonder plus finement le comportement élastique du tube qui raccourcit, afin de trouver l'origine de cette élasticité.

### VII.A.2.k. La raideur du tube rétracté dépend de sa longueur initiale

Nous avons ici modifié la procédure expérimentale suivie depuis le début. Plutôt que d'effectuer une rétraction depuis la longueur maximale du tube jusqu'à ce que celui-ci soit réabsorbé dans le globule rouge, nous avons maintenant réalisé une rétraction par paliers. La trace force-temps de la figure V.15 est un exemple représentatif. Après extraction puis relaxation jusqu'à la force statique  $f_s$ , des séries de retractions à vitesse constante de  $v_{ret} = 0.02 \mu\text{m/s}$ , entrecoupées de pauses de 1 min sont effectuées.

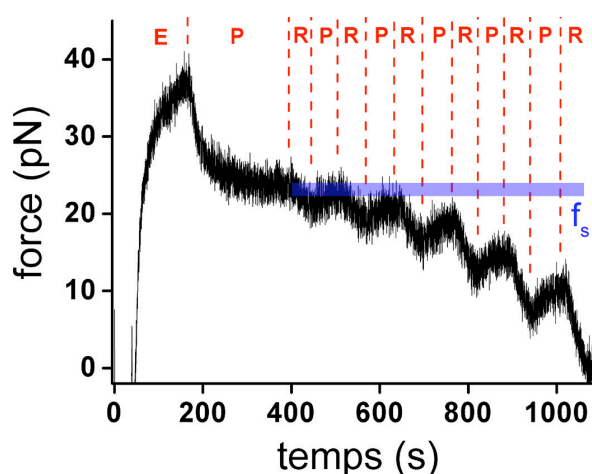


Figure VII.15 : Evolution de la force en fonction du temps pendant l'extraction (E) d'un tube de globule rouge, à une vitesse de  $0.12 \mu\text{m/s}$ , suivie d'une pause (P) de 5min, à longueur fixe de  $13 \mu\text{m}$ , puis d'une série de retractions (R), à  $0.02 \mu\text{m/s}$ , et de pause (P) de 60 s, à des longueurs de 11, 9, 7, 5,  $3 \mu\text{m}$ .

Tout d'abord, à chaque rétraction (n) qui succède à un temps de pause, nous observons une diminution linéaire de la force avec le temps. Ensuite, à chaque période de pause, la force augmente et tend à relaxer vers la force statique  $f_s$ . Lorsque la rétraction (n+1) démarre, le tube est plus court, mais la force initiale est pratiquement  $f_s$  (au moins pour les 3 premières retractions). Par conséquent, la raideur apparente du tube augmente à chaque rétraction. En d'autres termes, il

**Chapitre VII : Extraction de tubes de membrane cellulaire**  
*Interaction membrane-cytosquelette et stabilité des cavéoles*

apparaît, de façon surprenante à première vue, que la raideur du tube dépend de la longueur du tube.

Nous avons également tracé sur le graphe de la figure VII.16 la courbe force-longueur. Puisque les premiers temps de pause permettent à la force de relaxer vers  $f_s$ , la rétraction se passe presque de façon « quasi-statique » entre 13 et 6  $\mu\text{m}$ .

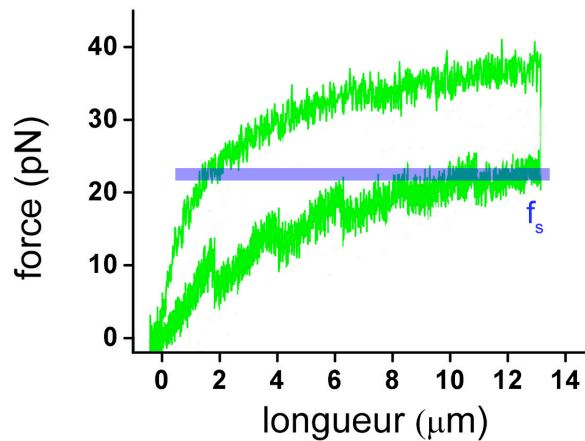


Figure VII.16 : Trace force-longueur pour un tube de globule rouge rétracté par paliers.

A partir de cette courbe, on peut immédiatement mesurer la constante de raideur du tube  $k_e^r$  en fonction de la longueur du tube prise au début de la phase de rétraction, i.e. pour des longueurs de 13, 10.8, 8.5, 6.2, 4 et 1.8  $\mu\text{m}$ . Les résultats sont rassemblés dans le tableau VII.1. Le tube apparaît donc bien d'autant plus raide que sa longueur est petite.

Longueur initiale ( $\mu\text{m}$ )	13	10.8	8.5	6.2	4	1.8
Raideur observée (pN/ $\mu\text{m}$ )	1.87	1.96	2.95	4.75	4.95	5.90

Tableau VII.1. : Raideur observée en fonction de la longueur initiale du tube pendant la rétraction du tube par paliers (voir figure VII.16.).

Si, au cours de l'extraction d'un tube de globule rouge, les effets visqueux se manifestent clairement, il semble que l'élasticité du tube domine la réponse mécanique à la rétraction. Comme la force diminue au cours de la rétraction, la tension du tube baisse également, ce qui entraîne une augmentation du rayon du tube. Tout se passe comme si, à  $v_{\text{ret}} \neq 0$ , les lipides n'avaient pas le temps de réincorporer le corps du globule rouge.



## Partie 2 : Tubes de membrane

Pour être plus quantitatif, considérons l'hypothèse extrême où la rétraction du tube est effectuée à nombre constant de lipides, donc à aire de tube constante et que le flux de lipides traversant le col est nul.

Soit un tube lipidique de longueur initiale  $l_0$  et de rayon  $r_0$ , impliquant une force  $f_0$ . Pour une longueur  $l < l_0$  pendant la rétraction, l'hypothèse d'aire constante impose un rayon de tube  $r$  défini par:

$$r = \frac{r_0 l_0}{l} \quad \text{VII.23.}$$

La force étant inversement proportionnelle au rayon du tube ( $f = 2\pi\gamma/r$ ), la force pendant la rétraction s'exprime simplement par :

$$f = \frac{2\pi\gamma}{r_0 l_0} l = \frac{f_0}{l_0} l \quad \text{VII.24,}$$

et la raideur est inversement proportionnelle à la longueur initiale du tube avant chaque étape de rétraction:

$$k_e^r = f_0 / l_0 \quad \text{VII.25.}$$

Sur la base de cette description, nous avons tracé le rapport  $f_0/k_e^r$  en fonction de la longueur avant le début de chaque rétraction. Le graphe de la figure VII.17 montre que l'équation (VII.25) permet une description satisfaisante des données expérimentales.

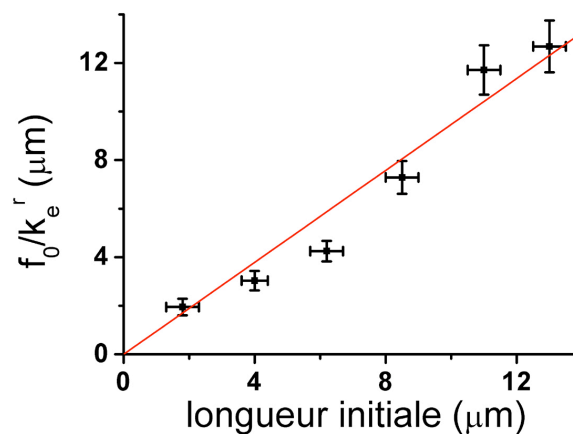


Figure VII.17 : Variation du rapport de la force initiale avant chaque rétraction sur la raideur observée en fonction de la longueur initiale du tube de globule rouge avant chaque rétraction. La droite rouge passe par zéro et est de pente 0.96.

En bref, lors de la rétraction, le col du tube ne permet pas le retour des lipides au sein de la membrane. Il joue le rôle d'un bouchon, en isolant les lipides du tube membranaire. La compression forcée de celui-ci augmente son diamètre pour

maintenir l'aire constante, et s'accompagne donc d'une baisse de la force mesurée. Lors de chaque pause, le système se met à l'équilibre ; les lipides peuvent à nouveau rentrer dans le corps principal du globule se traduisant par une remontée de la force vers la force statique.

### **VII.A.2.I. Discussion**

L'approche thermodynamique classique décrit la formation d'un tube de globule rouge comme un processus de séparation de la membrane du cytosquelette, associée à une énergie  $w_s$ . Cette énergie correspond au travail à fournir pour créer un tube formé d'une bicouche lipidique seule, sans interaction avec le réseau de spectrine.

Au-delà de cette approche à l'équilibre, nous avons étudié les effets dynamiques accompagnant l'extraction et la rétraction forcée d'un tube de globule rouge à vitesse finie. D'une part, nous avons montré que la réponse force-extension à l'extraction pouvait être décrite de façon satisfaisante sur la base d'un modèle mécanique prenant en compte l'élasticité de l'érythrocyte et du col tube-globule ainsi qu'un effet rhéo-fluidifiant associé au flux de lipides sortant du corps du globule pour former le tube. Cette description phénoménologique, adaptée de celle proposée par E. Evans pour expliquer la formation de « tethers » de neutrophiles, permet de rationaliser entièrement les phases de nucléation, allongement et relaxation du tube. Elle ne fournit cependant que peu d'indices sur les processus moléculaires à l'origine de ce comportement visco-élastique. Au cours de la rétraction forcée (non décrite jusqu'alors), nous avons mis en évidence expérimentalement un comportement purement élastique pour toutes les vitesses explorées. De plus, nous avons montré que la constante de raideur du tube était inversement proportionnelle à la longueur initiale « relaxée » à partir de laquelle la rétraction démarre. Nous avons proposé qu'un tel comportement pouvait être expliqué en supposant que le tube lipidique était comme « isolé » du reste du globule, donc rétracté à nombre de lipides constant.

L'ensemble de ces observations nous conduit naturellement à spéculer, à l'échelle moléculaire, sur la formation du tube et le rôle du cytosquelette : pour initier

## Partie 2 : Tubes de membrane

la formation d'un tube, la rupture d'un lien unique entre la membrane et le cytosquelette (type band 3-ankyrine) est suffisante. L'élongation du tube résulte ensuite d'un flux de lipides autour des protéines transmembranaires et sur le réseau de spectrine. La friction associée diminue lorsque la vitesse augmente. Enfin, lorsqu'on force le tube à la rétraction, le col tube-globule rouge, qui concentre les filaments de spectrine et les protéines transmembranaires, joue le rôle de bouchon, freinant considérablement le flux entrant de lipides.

Bien que toutes nos données expérimentales ne semblent pas être prises en défaut par la description proposée, il faut reconnaître que celle-ci reste très phénoménologique. Françoise Brochard a développé un modèle alternatif, partant d'une vision radicalement différente du mécanisme d'extrusion de tube. Le modèle est encore en discussion et sera décrit en détail dans la thèse de Nicolas Borghi sur l'extrusion hydrodynamique de tubes de globules rouges. Nous évoquons seulement ici les grandes lignes. Le postulat de départ consiste à dire que la formation du tube est réalisée par « pelage » de la membrane du cytosquelette. Le mécanisme dominant la formation du tube n'est pas le flux de lipides frottant sur le réseau de spectrine et autour des protéines transmembranaires, mais la rupture de tous les liens cytosquelette-membrane.

D'après F. Brochard, la force totale mesurée serait alors la somme de trois contributions :

-  $f_c$ , la force « critique » statique définie précédemment par :

$$f_c = 2\sigma\sqrt{2\sigma(\ell + w_s)}.$$

-  $f_v$ , la force visqueuse associée au flux de lipides au niveau du col du tube  $J = 2\pi r v_{\text{ext}}$ , avec  $r$  le rayon du col à un endroit donné. En supposant la géométrie du col assimilable à un cône à base circulaire et le fluide incompressible, il existe un gradient de vitesse au niveau du col. La vitesse,  $v(r)$ , suivant l'axe du tube étant  $v(r) = v_{\text{ext}} \cdot r_t / r$  (où  $r_t$  est le rayon du tube cylindrique), et la friction par obstacle étant  $\eta_s v(r)$  où  $\eta_s$  est la viscosité de membrane, la dissipation visqueuse totale s'exprime sous la forme :

$$\int \eta_s v_{\text{ext}}^2 \frac{2\pi r_t}{r} dr, \text{ avec } \sigma \text{ la densité de surface de points d'ancrage dans la}$$

membrane. En négligeant les termes logarithmiques, on trouve finalement :

**Chapitre VII : Extraction de tubes de membrane cellulaire**  
*Interaction membrane-cytosquelette et stabilité des cavéoles*

$f_v \approx 2\eta r_t^2 \rho_s v_{ext}$ , ce qui permet d'introduire la viscosité effective de la membrane  $\eta_{eff} \approx \eta r_t^2 \rho_s$ .

-  $f_p$ , la force de pelage, qui suppose un décrochement de la bicouche lipidique du squelette de spectrine par l'intermédiaire de la rupture des complexes protéiques reliant ces deux surfaces :  $f_p = 2r_t \rho G(v_{ext})$ , où  $G$  l'énergie de pelage par rupture des liaisons transmembranaires à la vitesse d'extraction,  $v_{ext}$ .

Finalement, la force totale de rappel est :

$$f = 2\eta \sqrt{2\eta(\rho + w_s)} + 2\eta r_t^2 \rho_s v_{ext} + 2r_t \rho G(v_{ext}) \quad \text{VII.26.}$$

Cette équation n'est cependant pas complètement incompatible avec le précédent modèle. Le deuxième terme fait apparaître une viscosité effective dépendant de la densité de protéines et du rayon du tube. Cette viscosité est supposée ici constante par simplification, mais il serait raisonnable de considérer i) que le rayon du tube varie pendant l'élongation du tube et dépende de la vitesse d'extrusion, et ii) que la densité de protéines dépende aussi de  $v_{ext}$ , car le flux de lipides par friction peut tendre à faire augmenter la concentration des protéines dans le col. Une telle dépendance en vitesse serait alors cohérente avec l'effet rhéofluidifiant précédemment évoqué.

Toutefois, la différence principale entre les deux modèles vient de la présence significative ou non d'une force de pelage. Nous l'avons négligée, en supposant qu'une seule liaison était rompue. Dans le présent modèle, c'est la contribution principale, ce qui semble être validé par les expériences de N. Borghi d'extraction hydrodynamique de tube à grande vitesse (supérieure au  $\mu\text{m/s}$ ). Notre sentiment actuel, partagé par l'équipe de F. Brochard et nous-mêmes, serait que le pelage dominerait la mécanique d'extrusion de tubes pour des vitesses élevées d'extraction, tandis que la friction des lipides gouvernerait les processus à faible vitesse. A l'heure actuelle, aucune preuve expérimentale concrète ne peut être avancée.

### **VII.A.3. Rétraction « libre » d'un tube de globule rouge adhérent à une surface: phénomène de perlage (« pearling »)**

Nous avons effectué des expériences similaires sur des globules rouges simplement adhérents sur du verre. Lorsque les tubes sont courts ( $< 50 \mu\text{m}$ ), la dynamique de rétraction est qualitativement similaire à celle décrite au paragraphe précédent. Pour des tubes longs ( $> 50 \mu\text{m}$ ), nous avons observé un phénomène reproductible surprenant. Les photographies de la figure VII.18 montrent un phénomène de perlage à la rétraction, suivi d'une coupure du chapelet de perles connectées au niveau du col.

Un phénomène de « pearling » a déjà été observé de nombreuses fois, sur des cellules (Bar-Ziv et al, 1999) ou sur des vésicules (Bar-Ziv et Moses, 1994) par le groupe de Bar-Ziv notamment. Toutefois, les conditions étaient très différentes. Sur des cellules, le perlage est induit par une destruction du cortex d'actine. Sur des structures tubulaires lipidiques, c'est l'application d'un faisceau laser qui induit la formation de chaînes de perles, par augmentation locale de la tension de membrane (attraction des lipides dans le faisceau laser), donc par diminution d'aire.

A l'opposé, dans notre cas, l'instabilité de perlage résulte du passage d'un état tendu vers un état de moindre tension.

**Chapitre VII : Extraction de tubes de membrane cellulaire**  
*Interaction membrane-cytosquelette et stabilité des cavéoles*

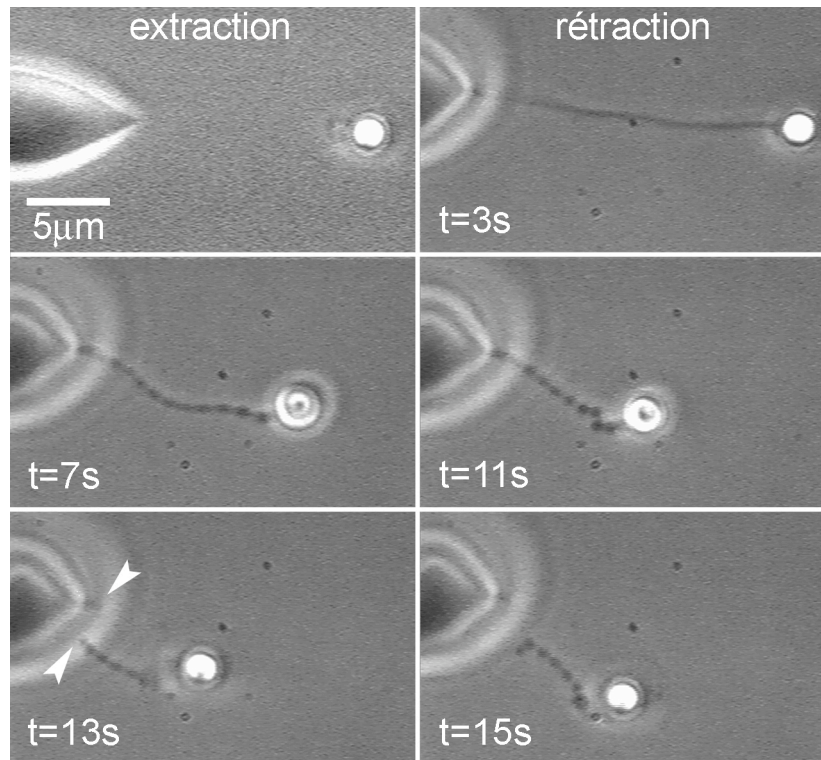


Figure VII.18. : Séquence d'images en vidéo microscopie de la rétraction d'un tube de globule rouge adhérent. La longueur initiale du tube est d'environ 70  $\mu\text{m}$  (hors du champ de vue). Le temps d'attente après extraction est de 10min.

Nous n'avons pas d'explication quantitative de ce phénomène. Juste quelques pistes de réflexion. Comme on l'a vu au chapitre IV pour les tubes longs de vésicules adhérentes, l'augmentation de force avec la longueur du tube peut être importante lorsque la tension n'est pas maintenue constante à l'aide d'une micropipette. Ainsi, la tension à la fin de l'extraction est supérieure à celle du globule avant extraction et, à l'équilibre, la force de maintien du tube est d'autant plus grande que le tube est long. Il existe donc une importante tension de membrane à relaxer pour rejoindre l'état final hypothétique dans lequel le tube serait complètement absorbé par le corps du globule rouge. Or, comme nous l'avons déjà mentionné, le col tube-globule joue le rôle de bouchon. Ces deux phénomènes tendent à augmenter le rayon du tube, donc le volume du tube (à aire constante). Cependant, comme pour un cylindre qu'on soumet à une différence de tension entre les deux extrémités, la tension le long d'un tube s'équilibre rapidement ( $\approx 1\text{ms}$ ) alors que la mise à l'équilibre du rayon prend quelques secondes (Dommersnes et al, 2005). Pour revenir à notre expérience, le tube de globule rouge qui se rétracte doit accommoder son augmentation de volume en augmentant son rayon. Cet ajustement étant un processus lent, on peut envisager que, d'un point de vue énergétique, il soit favorable de former des perles.

## Partie 2 : Tubes de membrane

Des expériences plus systématiques sont en cours, en collaboration avec Pierre Sens pour l'aspect théorique.

### VII.A.4. Dé-coalescence d'une jonction de tubes de globule rouge

Nous rapportons ici quelques observations mettant en évidence l'influence du squelette de spectrine dans la formation d'un tube de globule rouge, ou plus exactement de deux tubes. Plus précisément, le principe de l'expérience consiste à former une jonction triple de tubes de membrane d'un globule rouge puis à provoquer la dé-coalescence de ces tubes. Alors que l'étude de coalescence de tubes lipidiques du chapitre V visait à analyser la transition de la configuration V à la configuration Y, celle-ci explore le passage  $Y \rightarrow V$ .

Pour des raisons pratiques liées à la taille plus réduite de l'érythrocyte, le mode opératoire est cependant sensiblement différent de celui du chapitre V.

- Dans une première phase, une jonction Y est formée. Les photographies de la figure VII.19 montrent les différentes étapes de la procédure expérimentale conduisant à la configuration Y : (a) par pince optique, un tube est extrait d'un globule rouge aspiré dans une micropipette ; (b) ce tube est collé sur une grosse bille de verre ( $\varnothing 10-30 \mu\text{m}$ ) couverte de polylysine ; (c) un déplacement de la platine du microscope perpendiculairement au tube en extrait un second à partir du premier, formant ainsi une jonction triple Y.

**Chapitre VII : Extraction de tubes de membrane cellulaire**  
*Interaction membrane-cytosquelette et stabilité des cavéoles*

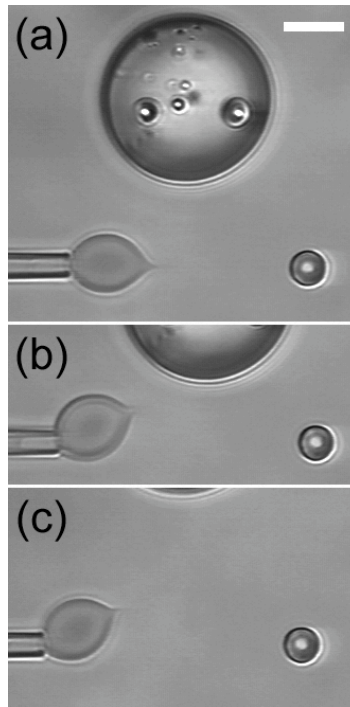


Figure VII.19. : Montage de photographies par vidéo microscopie résumant les différentes étapes de formation d'une jonction triple de tubes à partir d'un globule rouge. Voir texte pour détails de (a), (b) et (c). La barre d'échelle représente 5  $\mu$ m. Bien que la jonction triple ne soit pas très visible sur (c), on peut la deviner en suivant la direction du tube au niveau du col du globule rouge.

- Dans une deuxième phase, on provoque la dé-coalescence de la jonction Y en approchant la pipette du point triple. Les photos de la figure VII.20 montrent le passage Y  $\rightarrow$  V. Les deux « oreilles » (ou cols) témoignent de l'existence de ces deux tubes.

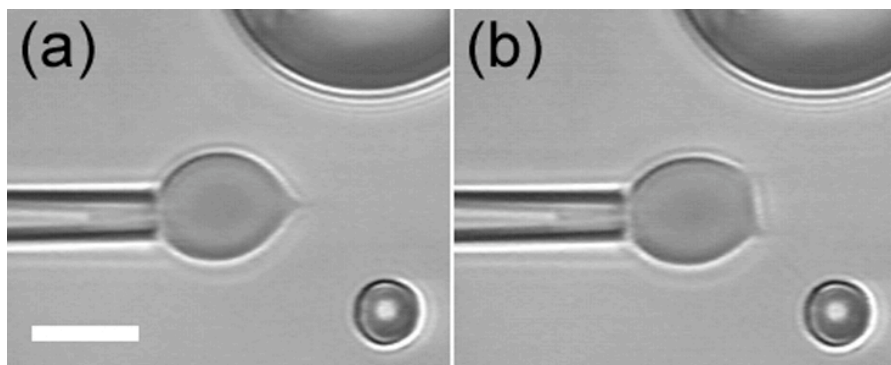


Figure VII.20. : Vidéo-micrographies (a) de la configuration "Y" et (b) de la configuration "V". La barre d'échelle représente 5  $\mu$ m.

Même si aucune étude systématique et quantitative n'a été menée, nous avons observé que la dé-coalescence n'est pas toujours instantanée. Si l'expérience s'effectue en moins d'une minute environ, la transition Y  $\rightarrow$  V intervient exactement au



## Partie 2 : Tubes de membrane

moment où l'extrémité du globule rouge atteint la jonction. Au contraire, si après extraction du tube, une pause de quelques minutes est effectuée (de manière à atteindre l'équilibre), le globule peut rester au contact de la jonction sans que les deux tubes ne se séparent, comme on le voit sur la photographie de la figure VII.21.

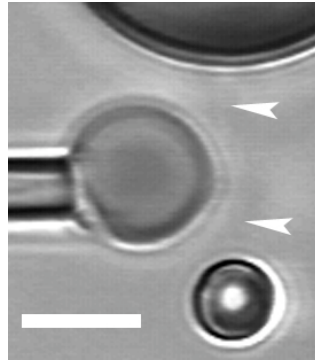


Figure VII.21 : Photographie par vidéo microscopie d'une situation où la transition  $Y \rightarrow V$  n'est pas instantanée. Les flèches blanches indiquent les deux tubes encore liés. La barre d'échelle représente 5  $\mu$ m.

Puisque le processus de dé-coalescence n'est pas instantané, on peut supposer qu'il est limité cinétiquement par une barrière énergétique. Celle-ci peut résulter de la présence de réseau de spectrine dans le col (comme nous l'avons précédemment suggéré), qui modifie la nature de l'interaction capillaire entre deux tubes lipidiques. Cette hypothèse est confortée par les « cicatrices » que laissent les tubes, lorsque plusieurs expériences sont conduites sur le même globule rouge. Par exemple, sur la photographie de la figure VII.22, nous pouvons encore visualiser un « col » de tube incomplètement cicatrisé.

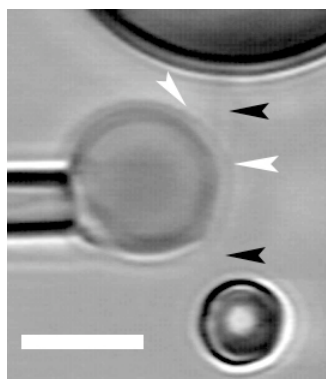


Figure VII.22 : Photographie par vidéo microscopie de tubes après dé-coalescence. Les flèches noires indiquent les deux tubes séparés. Les flèches blanches indiquent la présence de défauts correspondant aux tubes formés antérieurement. La barre d'échelle représente 5  $\mu$ m.

## Chapitre VII : Extraction de tubes de membrane cellulaire Interaction membrane-cytosquelette et stabilité des cavéoles

Cette dernière observation nous semble être un signe supplémentaire de la présence du cytosquelette à l'entrée du tube (au niveau du col). Elle soutient la vision spéculée par Hochmuth et schématisée sur la figure VII.23. Lors de l'extraction d'un tube de membrane, le squelette est étiré dans la direction de la déformation tubulaire (Berk et Hochmuth, 1992).

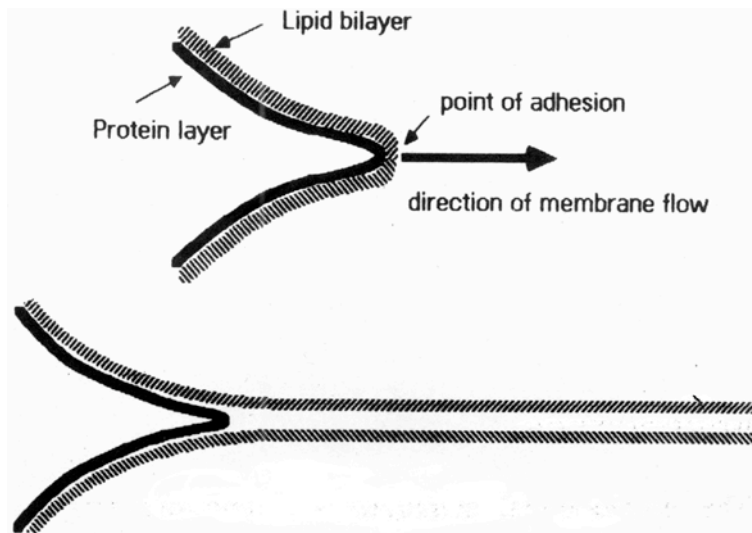


Figure VII.23 : Schéma représentant la structure la plus probable du cône d'un tube de globule rouge après extraction. (Extrait de (Berk et Hochmuth, 1992)).

### VII.A.5. Coalescence de tubes dans les cellules ?

Une cellule adhérente sur une surface qui entre en mitose laisse autour d'elle de très nombreux tubes appelés fibres de rétraction. Celles-ci, pourtant très proches les unes des autres, ne coalescent pas. Ces structures tubulaires sont différentes de celles observées (artificiellement) sur les érythrocytes, car elles contiennent des filaments d'actine, comme le montrent l'image de la figure VII.24, où l'actine a été marquée en fluorescence. La présence de ces filaments rigides à l'intérieur des tubes inhibe leur coalescence.

## Partie 2 : Tubes de membrane

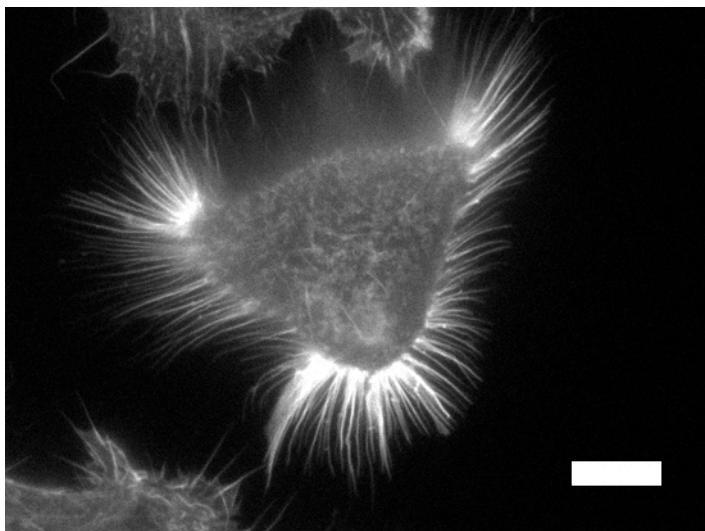


Figure VII.24 : Photographie par microscopie de fluorescence d'une cellule en cours de mitose. L'actine a été marquée par fluorescence. La barre d'échelle représente 10  $\mu$ m. (image fournie par Manuel Théry, UMR 144)

## **VII.B. Tubes de membrane cellulaire et stabilité des caveolae**

L'étude mécanique des cellules par l'extraction de tube est complexe (Dai et Sheetz, 1995; Dai et Sheetz, 1998; Dai et Sheetz, 1999). L'analyse de la réponse force-extension est difficilement exploitable d'un point de vue quantitatif. En effet, la cellule est un système actif ; par endocytose et exocytose, le nombre de lipides constituant la membrane plasmique varie au cours du temps, donc la tension de la membrane également.

Ici, notre approche consiste à utiliser un tube membranaire comme une sonde locale des interactions de protéines avec la membrane plasmique. Nous nous focaliserons sur le cas particulier de la caveoline. Cette étude, très préliminaire, visant à tester la faisabilité de la méthode, a été initiée par la rencontre d'un théoricien, Pierre Sens, et d'un biologiste, Christophe Lamaze.

### **VII.B.1. Les caveoleae : un micro-réservoir de membrane**

#### **VII.B.1.a. Introduction**

La caveoline est une protéine nécessaire à la formation des caveolae. Découvertes dans les années 50 par Palade et Yamada (Palade, 1953; Yamada, 1955), les caveolae ont été visualisées par microscope électronique dans les cellules endothéliales où elles abondent. Elles ont une forme ovoïde et sont localisées à la membrane plasmique. Elles sont très stables, et leur séparation de la membrane plasmique semble rare. Pourtant, elles sont impliquées dans une des voies d'endocytose classiquement identifiées (Conner et Schmid, 2003).

La caveoline est une protéine qui s'insère dans le feuillet cytosolique de la bicouche. D'autres éléments protéiques s'y associent également pour former les caveolae, représentées schématiquement sur la figure VII.25. Pour l'instant les acteurs moléculaires et le mécanisme par lesquels la déformation est produite

## Partie 2 : Tubes de membrane

restent hypothétique : le plus probable est que la déformation est liée à l'insertion de la caveoline et son organisation autour de la cage.

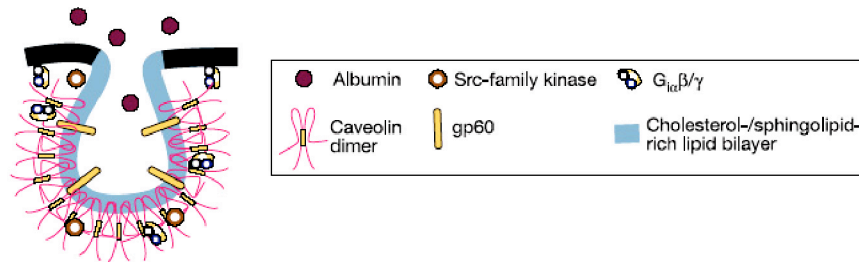


Figure VII.25. : Structure et composition simplifiées d'une caveolae (Extrait de (Conner et Schmid, 2003)).

Le mécanisme de disparition des caveolae n'est pas connu sur le plan biologique. Notamment, les protéines impliquées dans la structure des caveolae restent-elles ancrées dans la membrane ou se dispersent-t-elles lorsqu'une structure se « désagrège » ?

Récemment, les caveolae ont été identifiées comme participant à la réponse et l'adaptation de cellule endothéliale à une contrainte de cisaillement (Park et al, 2000). En conséquence, elles pourraient jouer un rôle de senseur mécanique de la tension de membrane qui est modifiée par le flux hydrodynamique. Bien qu'aucune étude précise n'ait cherché à tester cette hypothèse, de nombreux travaux suggèrent que le nombre de caveolae présentes dans la membrane plasmique est effectivement directement corrélé à la contrainte de cisaillement appliquée (Boyd et al, 2003).

### VII.B.1.b. Expérience préliminaire

Nous avons effectué une expérience préliminaire sur des cellules HeLa transfectées avec un vecteur de la cavéoline-GFP. Des tubes de membrane ont été extraits à l'aide de billes maintenues dans une pipette à proximité de caveolae. Les images de microscopie de fluorescence de la figure VII.26 montrent : i) des caveolae, sous la forme de points fluorescents, au voisinage du contact de la bille avec la cellule ; ii) au cours de l'élongation du tube, ces motifs deviennent de plus en plus diffus. Cette décroissance de fluorescence n'est pas uniquement due au photoblanchiment, car les caveolae fluorescentes éloignées de la bille restent plus

**Chapitre VII : Extraction de tubes de membrane cellulaire**  
*Interaction membrane-cytosquelette et stabilité des cavéoles*

brillantes. Il semble donc bien y avoir destruction des structures caveolaires par diffusion de la cavéoline dans la membrane.

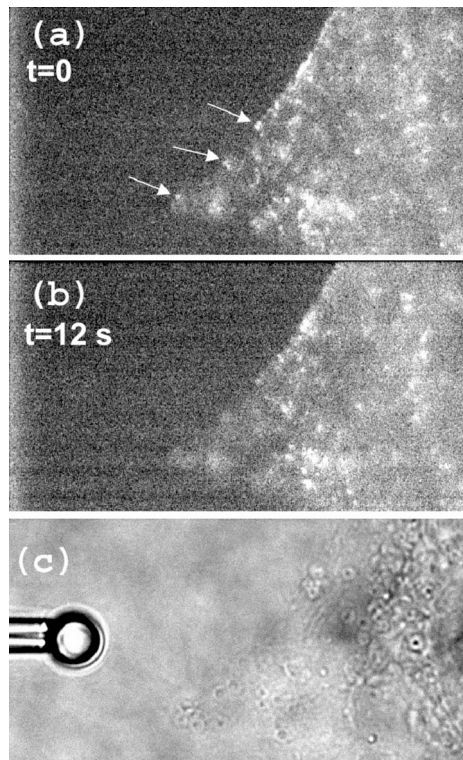


Figure VII.26. : Séquence d'images par microscopie de fluorescence ((a) et (b)) au cours de l'élongation d'un tube de membrane d'une cellule cavéoline-GFP à partir d'une pipette visible en DIC (c). Le diamètre de la bille est de 5  $\mu$ m. Les flèches blanches montrent la perte de fluorescence de la structure caveolaire (a,b).

## VII.B.2. Représentation physique de la structure des caveolae

Dans les cellules, des assemblages de protéines transmembranaires peuvent induire des déformations locales de la membrane plasmique. L'énergie associée à cette déformation peut être généralement décrite par trois phénomènes physiques, schématisés sur la figure VII.27.

La tension de ligne caractérise l'énergie à l'interface entre deux domaines de membrane de compositions différentes (Lipowsky, 1993). Ce paramètre est particulièrement pertinent pour les caveolae qui s'assemblent préférentiellement sur des micro-domaines lipidiques de type "raft". De plus, les protéines de recouvrement s'insèrent souvent de manière asymétrique et s'organisent en fonction d'une

## Partie 2 : Tubes de membrane

courbure préférentielle de la membrane. Le phénomène de courbure spontanée doit donc aussi être pris en compte. Enfin, de manière générale, les membranes lipidiques sont aussi caractérisées par la tension de membrane qui tend à aplanir les déformations. Le but de cette étude est de montrer l'importance de la tension de membrane dans la formation des caveolae.

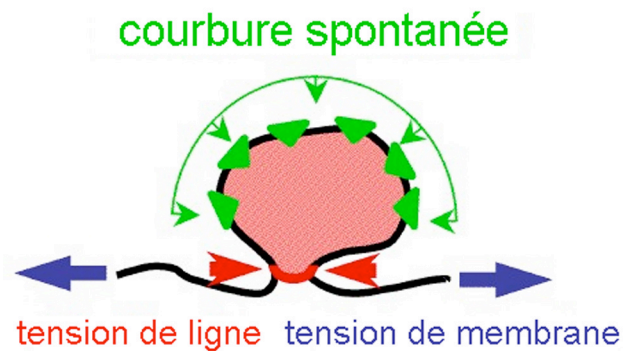


Figure VII.27. : Représentation schématique d'une déformation membranaire induite par les protéines représentées par des triangles verts, et caractérisée par trois phénomènes physiques membranaires.

Les caveolae sont des déformations qui ont un rayon caractéristique de 40nm, représentant une surface  $S$  de  $10^4 \text{nm}^2$ . La différence d'énergie entre l'état déformé et l'état plat peut être défini par (P. Sens, non publié):

$$\Delta F = \Delta S \left[ 8\sigma \sqrt{S} \right] \quad \text{VII.27}$$

où  $\sigma$  est la tension de ligne, de l'ordre  $k_B T/\text{nm}$ . En supposant  $\sigma \approx 20k_B T$ , on trouve qu'il faut  $\sigma > 10^{-5} \text{N/m}$  pour permettre l'aplatissement de la déformation ( $\Delta F > 0$ ). Cela suggère donc le rôle crucial de la tension de membrane sur la stabilité des caveolae.

Or, nous avons vu précédemment que la formation d'un tube à partir d'une membrane nécessitait une force au moins égale à la force statique  $2\sigma\sqrt{2\sigma}$ . En convertissant la tension de membrane seuil nécessaire à l'aplatissement des caveolae en force, on constate qu'une force d'environ 10 pN serait suffisante pour défaire des structures cavéolaires localement. Au fur et à mesure que celles-ci se désassemblent, de la membrane est relâchée, et l'on pourrait s'attendre à allonger le tube à force constante jusqu'à aplatissement de l'ensemble des déformations environnantes.

Le modèle où l'application d'une force entraîne une disparition des caveolae ne semble pas aller dans le même sens que les résultats exposés dans des travaux récents (Boyd et al, 2003; Park et al, 2000) où l'application d'une force au niveau de

**Chapitre VII** : *Extraction de tubes de membrane cellulaire*  
*Interaction membrane-cytosquelette et stabilité des cavéoles*

la membrane tend à augmenter la concentration en caveolae. Il nous semble donc important de tester quantitativement cette hypothèse. Après notre expérience de faisabilité, un projet plus complet vient d'être entamé à l'Institut Curie sur ce sujet.



## Bibliographie : Chapitre VII

- Bar-Ziv R et Moses E, 1994.  
Instability and "pearling" states produced in tubular membranes by competition of curvature and tension.  
*Physical Review Letters*,73:1392-1395.
- Bar-Ziv R, Tlusty T, Moses E, Safran SA et Bershadsky A, 1999.  
Pearling in cells: a clue to understanding cell shape.  
*Proceedings of the National Academy of Science U.S.A.*,96:10140-5.
- Bell GI, 1978.  
Models for the specific adhesion of cells to cells.  
*Science*,200:618-627.
- Berk D, Clark Jr A et Hochmuth RM, 1992.  
Analysis of lateral diffusion from a spherical cell surface to a tubular projection.  
*Biophysical Journal*,61:1-8.
- Berk D et Hochmuth RM, 1992.  
Lateral mobility of integral proteins in red blood cell tethers.  
*Biophysical Journal*,61:9-18.
- Boyd NL, Park H, Yi H, Boo YC, Sorescu GP, Sykes M et Jo H, 2003.  
Chronic shear induces caveolae formation and alters ERK and Akt responses in endothelial cells.  
*American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*,285:1113-1122.
- Chien S, Sung KL, Skalak R, Usami S et Tozeren A, 1978.  
Theoretical and experimental studies on viscoelastic properties of erythrocyte membrane.  
*Biophysical Journal*,24:463-487.
- Conner SD et Schmid SL, 2003.  
Regulated portals of entry into the cells.  
*Nature*,422:37-44.
- Dai J et Sheetz MP, 1995.  
Mechanical properties of neuronal growth cone membranes studied by tether formation with laser optical tweezers.  
*Biophys. J.*,68:988-996.
- Dai J et Sheetz MP, 1998.  
Cell membrane mechanics.  
*Methods in Cell Biology*,55:157-71.

**Chapitre VII : Extraction de tubes de membrane cellulaire**  
*Interaction membrane-cytosquelette et stabilité des cavéoles*

- Dai J et Sheetz MP, 1999.  
Tether formation from blebbing cells.  
*Biophysical Journal*,77:3363–3370.
- Dao M, Lim CT et Suresh S, 2003.  
Mechanics of the human red blood cell deformed using optical tweezers.  
*Journal of the Mechanics and Physics of solids*,51:2259-2280.
- Dommersnes PG, Orwar O, Brochard-Wyart F et Joanny JF, 2005.  
Marangoni transport in liquid nanotubes.  
*Europhysics Letters*,70:271-277.
- Evans E, 1973a.  
A new material concept for the red cell membrane.  
*Biophysical Journal*,13:926.
- Evans E, 1973b.  
New membrane concept applied to the analysis of fluid shear and micropipet deformed red blood cells.  
*Biophysical Journal*,13:941-954.
- Evans E, 1983.  
Bending elastic modulus of red blood cell membrane driven from buckling instability in micropipet aspiration tests.  
*Biophysical Journal*,43:27-30.
- Evans E, 2001.  
Probing the relation between force--lifetime--and chemistry in single molecular bonds.  
*Annual Review of Biophysical and Biomolecular Structures*,30:105-128.
- Evans E, Heinrich V, Leung A et Kinoshita K, 2005.  
Nano- to Microscale Dynamics of P-Selectin Detachment from Leukocyte Interfaces. I. Membrane Separation from the Cytoskeleton.  
*Biophysical Journal*,88:2288-2298.
- Evans E et Hochmuth RM, 1976.  
Membrane viscoplastic flow.  
*Biophysical Journal*,11:13-26.
- Evans E, Ritchie K et Merkel R, 1995.  
Sensitive force technique to probe molecular adhesion and structural linkages at biological interfaces.  
*Biophysical Journal*,68:2580-2587.
- Evans E, Waugh RE et Melnik L, 1976.  
Elastic area compressibility modulus of red cell membrane.  
*Biophysical Journal*,16:585-595.

## Partie 2 : Tubes de membrane

- Glenister FK, Coppel RL, Cowman AF, Mohandas N et Cooke BM, 2002.  
Contribution of parasite proteins to altered mechanical properties of malaria-infected red blood cells.  
*Blood*,99:1060-1063.
- Heinrich V, Leung A et Evans E, 2005.  
Nano- to Microscale Dynamics of P-Selectin Detachment from Leukocyte Interfaces. II. Tether Flow Terminated by P-Selectin Dissociation from PSGL-1.  
*Biophysical Journal*,88:2299-2308.
- Hochmuth RM et Evans EA, 1982.  
Extensional flow of erythrocyte membrane from cell body to elastic tether. I. Analysis.  
*Biophysical Journal*,39:71-81.
- Hochmuth RM et Marcus WD, 2002.  
Membrane tethers formed from blood cells with available area and determination of their adhesion energy.  
*Biophysical Journal*,82:2964-2969.
- Hochmuth RM, Mohandas N et Blackshear PL, 1973.  
Measurement of the Elastic Modulus for Red Cell Membrane Using a Fluid Mechanical Technique.  
*Biophysical Journal*,13:747-762.
- Hochmuth RM et Waugh RE, 1987.  
Erythrocyte membrane elasticity and viscosity.  
*Annual Review of Physiology*,49:209-219.
- Hochmuth RM, Wiles HC, Evans EA et McCown JT, 1982.  
Extensional flow of erythrocyte membrane from cell body to elastic tether. II. Experiment.  
*Biophysical Journal*,39.
- Hwang WC et Waugh RE, 1997.  
Energy of dissociation of lipid bilayer from the membrane skeleton of red blood cells.  
*Biophysical Journal*,72:2669-2678.
- Jay AW et Canham PB, 1977.  
Viscoelastic properties of the human red blood cell membrane. II. Area and volume of individual red cells entering a micropipette.  
*Biophysical Journal*,17:169-178.
- Katnik C et Waugh RE, 1990.  
Alterations of the apparent area expansivity modulus of red blood cell membrane by electric fields.  
*Biophysical Journal*,57:877-882.

**Chapitre VII : Extraction de tubes de membrane cellulaire**  
*Interaction membrane-cytosquelette et stabilité des cavéoles*

- King MR, Heinrich V, Evans E et Hammer DA, 2005.  
Nano-to-Micro Scale Dynamics of P-Selectin Detachment from Leukocyte Interfaces. III. Numerical Simulation of Tethering under Flow.  
*Biophysical Journal*,88:1676-1683.
- Lenormand G, Henon S, Richert A, Simeon J et Gallet F, 2001.  
Direct measurement of the area expansion and shear moduli of the human red blood cell membrane skeleton.  
*Biophysical Journal*,81:43-56.
- Lipowsky R, 1993.  
Domain-induced budding of vesicles.  
*Biophysical Journal*,64:1133-1138.
- Low PS, Willardson BM, Mohandas N, Rossi M et Shoet S, 1991.  
Contribution of the band 3-ankyrin interaction to erythrocyte membrane mechanical stability.  
*Blood*,77:1581-1586.
- Merkel R, Nassoy P, Leung A, Ritchie K et Evans E, 1999.  
Energy landscapes of receptor-ligand bonds explored with dynamic force microscopy.  
*Nature*,397:50-53.
- Mohandas N et Evans E, 1994.  
Mechanical properties of the red cell membrane in relation to molecular structure and genetic defects.  
*Annual Review of Biophysical and Biomolecular Structures*,23:787-818.
- Needham D et Zhelev DV, 1996.  
The mechanochemistry of lipid vesicles examined by micropipet manipulation techniques. In: Vesicles. Rosoff M, Surfactant Science Series, Marcel Dekker, New York and Basel
- Palade GE, 1953.  
The fine structure of blood capillaries.  
*Journal of Applied Physics*,24:1424.
- Park H, Go YM, Darji R, Choi JW, Lisanti MP, Maland MC et Jo H, 2000.  
Caveolin-1 regulates shear stress-dependent activation of extracellular signal-regulated kinase.  
*American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*,278:1285-1293.
- Parker KH et Winlove CP, 1999.  
The deformation of spherical vesicles with permeable, constant-area membranes : Application to the red blood cell.  
*Biophysical Journal*,77:3096-3107.

## Partie 2 : Tubes de membrane

Pierrat S, 2004.

Etude de l'adhésion cellulaire à différentes échelles : de la molécule unique à la cellule.

Paris: Université de Paris VI.

Rand RP et Burton AC, 1964.

Mechanical properties of the red cell membrane. I. Membrane stiffness and intracellular pressure.

*Biophysical Journal*,4:115-135.

Seifert U, 2000.

Rupture of Multiple Parallel Molecular Bonds under Dynamic Loading.

*Physical Review Letters*,84:2750-2753.

Sleep J, Wilson D, Simmons R et Gratzer W, 1999.

Elasticity of the Red Cell Membrane and Its Relation to Hemolytic Disorders: An Optical Tweezers Study.

*Biophysical Journal*,77:3085–3095.

Thevenin BJ et Low PS, 1990.

Kinetics and regulation of the ankyrin-band 3 interaction of the human red blood cell membrane.

*Journal of Biological Chemistry*,265:16166-16172.

Waugh RE et Bauserman RG, 1995.

Physical measurements of bilayer-skeletal separation forces.

*Annals of Biomedical Engineering*,23:308-321.

Waugh RE et Evans E, 1979.

Thermoelasticity of red blood cell membrane.

*Biophysical Journal*,26:115-131.

Waugh RE, Mantalaris A, Bauserman RG, Hwang WC et Wu JHD, 2001.

Membrane instability in late-stage erythropoiesis.

*Blood*,97:1869-1875.

Yamada E, 1955.

The fine structure of the gall bladder epithelium of the mouse.

*Journal of Cell Biology*,1:445-458.

## Conclusion générale et Perspectives

Les membranes plasmiques de cellules ont des propriétés d'une richesse, donc d'une complexité, extraordinaire. Chercher à les étudier d'un point de vue de physicien, afin de dégager quelques mécanismes universels, conduit inexorablement le théoricien à faire d'innombrables hypothèses simplificatrices, et amène souvent l'expérimentateur à utiliser des systèmes modèles artificiels. Au cours de ce travail de thèse, nous avons adopté cette approche pour étudier quelques aspects de la dynamique d'adhésion cellulaire et de la mécanique de tubes de membranes. Dans chacune de ses parties, nous sommes partis de systèmes synthétiques, les vésicules lipidiques géantes, que nous espérons être de bons candidats pour mimer de façon minimale le comportement cellulaire. Dans tous les cas, des modèles théoriques originaux ont été proposés qui rendent bien compte de nos données expérimentales. Ensuite, nous avons testé la pertinence biologique de ces modèles en réalisant des expériences similaires sur des cellules. Les résultats furent mitigés. Alors que la connaissance de la mécanique des tubes de membrane lipidique s'est révélée être un bon point de départ pour appréhender la formation de tubes de membrane cellulaire, nous avons également montré que les mécanismes physiques contrôlant les premières étapes (passives) de l'adhésion cellulaire n'avaient rien à voir avec ceux qui gouvernent la dynamique d'étalement de vésicules. Chacune des étapes de notre approche a cependant été riche d'enseignements de notre point de vue. Nous en résumons ici les principaux points et évoquons quelques prolongements possibles de notre travail.

Dans la partie « *Adhésion* », en guise de pré-requis à l'étude de la dynamique de l'adhésion cellulaire, nous avons commencé par concevoir et préparer des substrats bio-fonctionnalisés, c'est-à-dire décorés de biomolécules spécifiques, et montrant une adhésion exclusive pour le ligand associé. L'accent a notamment été mis sur l'importance d'inhiber les interactions non-spécifiques par l'utilisation de polymères hydrophiles ou de protéines à effet passivant. Nous avons focalisé notre étude sur le couple streptavidine-biotine, et les protocoles que nous avons développés, s'ils ne sont pas fondamentalement novateurs, ont l'avantage de

## Conclusion générale et perspectives

produire de façon simple, rapide et reproductible de tels substrats biomimétiques pour l'adhésion cellulaire.

L'utilisation de ces surfaces a permis l'étude de la dynamique d'adhésion de vésicules induite par des interactions spécifiques. Nous avons ainsi analysé quantitativement, sur la base de prédictions théoriques développées par P.-G. de Gennes, les lois de croissance de la zone de contact sur différents types de substrats. Cela nous a permis de mettre en évidence que la dynamique d'étalement d'une vésicule décorée de récepteurs dépend très fortement de l'accessibilité du ligand greffé sur la surface. Si le ligand est fixé à un long polymère flexible, la diffusion du récepteur est le facteur limitant dans l'étalement. Au contraire, pour un ligand difficilement accessible, le temps de réaction moléculaire entre le récepteur mobile sur la surface de la vésicule et le ligand immobilisé sur le verre contrôle l'étalement. En d'autres termes, il nous semble illusoire de vouloir continuer à définir une constante d'association bidimensionnelle intrinsèque à un couple récepteur-ligand, comme on le fait à trois dimensions.

Enfin, l'étude de la dynamique d'adhésion de cellules sur des substrats plans a permis de montrer les lacunes biomimétiques du système modèle purement lipidique. Nous avons montré en collaboration avec L. Mahadevan que la cellule peut être correctement modélisée de manière simplifiée comme une goutte visqueuse à coque encore plus visqueuse dans les premiers stades de son contact avec une surface, ce qui se traduit par une loi de croissance universelle de la zone de contact au cours de ces étapes où l'activité cellulaire joue un rôle mineur. Ainsi, c'est la dissipation visqueuse au sein du cortex d'actine qui semble être le facteur dominant dans la compréhension de la dynamique d'adhésion et non la diffusion ou l'accessibilité des ligands-récepteurs.

En guise de perspective, afin d'apporter des éléments de validation supplémentaires à ce modèle, nous proposons de revenir à des systèmes artificiels, sur lesquels les différents paramètres importants (viscosité, élasticité) pourront être variés et contrôlés. Dans un premier temps, des vésicules lipidiques remplies d'un gel de polymère (plus ou moins réticulé) pourront être utilisées. Ce travail a déjà débuté en collaboration avec le groupe d'Annie Viallat. Afin de créer un cortex visqueux, nous pouvons également proposer d'utiliser des vésicules lipidiques dans la membrane desquelles une protéine nucléatrice de filaments d'actine serait

## Conclusion générale et perspectives

insérée. Un candidat possible est la ponticuline, une protéine extraite de *Dictyostelium discoïdum*, et fournie par le groupe de S. Evans à l'Université de Leeds.

Une suite logique à notre travail serait aussi de travailler avec deux types de couples récepteur-ligand ayant des caractéristiques différentes pour tenter de mimer les motifs adhésifs observés dans les synapses immunologiques. L'adhésion de cellules du système immunitaire fait en effet intervenir deux couples récepteur-ligand qui se distinguent par leurs constantes d'affinité et leurs tailles moléculaires : l'un, de constante d'affinité faible et de grande taille ; l'autre, de constante d'affinité élevée mais de taille plus petite. Les premiers contacts se font par l'intermédiaire du couple qui conduit aux liaisons les plus longues, mais de faible stabilité. Ensuite, le rapprochement des membranes peut permettre la formation des liaisons du couple de plus forte affinité. Un réarrangement (ou ségrégation de phase) peut se produire avec les liaisons récepteurs-ligands les plus stables et plus courtes au centre et les autres en périphérie. Expérimentalement, nous envisageons d'utiliser les couples streptavidine-biotine et lectine-sucre, en collaboration avec le groupe de Véronique Rosilio à Châtenay-Malabry et celui d'Annie Viallat. Une configuration possible serait une vésicule comportant les deux types de ligands sédimentant sur une bicouche supportée comportant les deux types de récepteurs.

Dans la partie « *Tubes* » de notre travail, nous avons exploré la réponse force-extension de nanotubes de membrane à l'aide d'une pince optique. Alors que la mécanique des tubes de membrane est bien connue tant expérimentalement que théoriquement pour des tubes uniques extraits de vésicules maintenues à tension constante, nous avons envisagé plusieurs situations expérimentales nouvelles. Tout d'abord, lorsque la vésicule est fermement adhérente sur une surface, et qu'un tube en est extrait, sa tension de membrane n'est pas fixée. L'analyse quantitative des traces force-longueur inhabituelles a montré que l'élongation de longs tubes permettait de sonder les propriétés élastiques de la membrane lipidique. Ensuite, nous avons étudié l'interaction entre deux tubes de membrane extrudés d'une même vésicule. Le processus de coalescence (force et angle de coalescence) a été analysé quantitativement sur la base d'une théorie développée par I. Dérenyi. Cette étude nous a permis de proposer une nouvelle méthode de mesure de la rigidité de courbure sans contrôle de la tension, ou inversement.



## Conclusion générale et perspectives

Suivant une démarche analogue à celle adoptée pour la partie « Adhésion », nous avons ensuite souhaité passer à des systèmes cellulaires, afin de voir en quoi la présence d'un cytosquelette interagissant avec la membrane plasmique pouvait affecter la mécanique de l'extraction de tubes. L'espoir est de pouvoir utiliser ces tubes pour sonder l'environnement membranaire des cellules. En commençant par les plus simples des cellules qu'on pouvait envisager, à savoir des globules rouges, nous avons mis en évidence des propriétés rhéologiques et mécaniques singulières, en particulier le caractère rhéofluidifiant de la membrane du globule rouge lors de l'extraction d'un tube de membrane. L'interaction du squelette de spectrine avec la membrane lipidique via des complexes protéiques ajoute donc une complexité supplémentaire indéniable. De plus, lors de rétraction, cette interaction semble bloquer la rentrée des lipides dans le corps principal du globule engendrant dans certaines conditions des phénomènes de perlage (« pearling »).

L'utilisation d'un tube comme sonde mécanique des membranes cellulaires a été suggérée par C. Lamaze et P. Sens dans le but de disséquer l'interaction des caveolines avec la membrane plasmique. Les caveolae, ces petites invaginations membranaires, sont vues comme des réservoirs de membrane, utilisables par la cellule au moment de l'endocytose notamment. L'élongation d'un tube permettrait de récupérer l'excès de membrane contenu dans les caveolae et les mesures de forces donneraient des informations quantitatives sur l'interaction protéines-membrane.

En bref, la plus grande partie de notre travail a porté sur l'adhésion de vésicules lipidiques ou sur les tubes de membrane extraits de vésicules lipidiques. Des études parallèles sur des cellules ont clairement montré les limites biomimétiques de ce système modèle. Il n'en reste pas moins que les vésicules sont, de notre point de vue, un magnifique outil d'étude des propriétés mécaniques des membranes. Leur fragilité limite souvent leur utilisation à des fins purement académiques. Dans une perspective plus appliquée, les « polymersomes », vésicules constituées de copolymères multiblocs, développés par D. Discher, nous semblent plus prometteurs, du fait de leur stabilité accrue. De plus, les trésors d'imagination des chimistes spécialistes de synthèse des polymères nous laissent entrevoir des perspectives variées. Par exemple, la fabrication de polymersomes activables semble maintenant à portée. Au laboratoire, le groupe de M.-H. Li a synthétisé des polymères contenant un bloc cristal liquide (activable par la température ou la

## **Conclusion générale et perspectives**

lumière), et nous avons déjà montré qu'on pouvait en faire des vésicules. Une étude des propriétés dynamiques, mécaniques et rhéologiques de ce nouveau matériau pourrait être conduite avec les outils et approches développés au cours de cette thèse...

**Conclusion générale et perspectives**

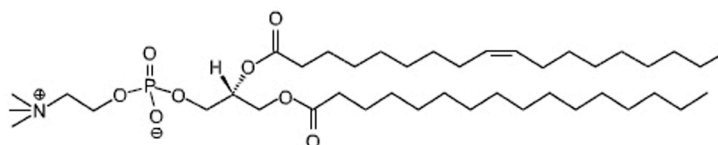
# **Annexes**



# Annexe A

## Lipides utilisés (Avanti Polar Lipids)

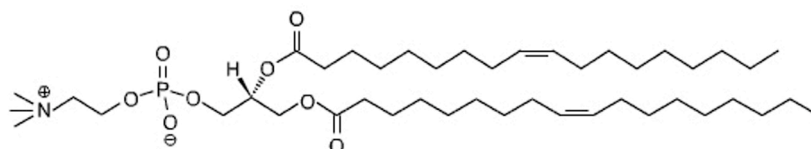
\* **EPC** : Egg Yolk L- $\alpha$ -Lecithin-(PhosphatidylCholine) (la formule donnée correspond au lipide majoritaire).



©Avanti Polar Lipids

MW : 760g/mol

\* **DOPC** : Dioleoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholine.

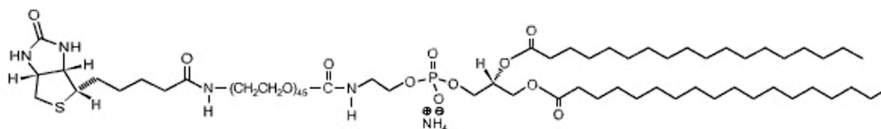


©Avanti Polar Lipids

MW : 786g/mol



\* **DSPE-PEG-biot** : 1,2 Dioleoyl-sn-Glycero-3-Phosphoethanolamine-N-(biotinyl-(Polyethylen Glycol)2000)



©Avanti Polar Lipids

MW : 3017g/mol

## Préparation des solutions de lipides

A partir de lipides en poudre stockés sous argon à  $-80^{\circ}\text{C}$ , on prépare une solution mère de lipides solubilisés dans le chloroforme à 10 mg/ml généralement qui est ensuite stockée à  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Les différentes solutions mères sont laissées à température ambiante pendant 10 min. En fonction des besoins, une solution mélangeant différents lipides est préparée à une concentration de 0.5mg/ml à partir des solutions mères. La solution est conservée à  $-20^{\circ}\text{C}$  sous argon.



**Annexes**

# Annexe B

## Electroformation des vésicules géantes (GUVs)

La technique d'électroformation permet d'obtenir des vésicules géantes unilamellaires (GUVs) à partir d'un dépôt lipidique. Les différentes phases du protocole sont détaillées ci-dessous : préparation des lames conductrices, préparation des lipides, dépôt sur les lames puis hydratation sous champ électrique et formation des GUVs.

### Préparation des lames ITO

Les lames d'ITO (PGE, Allemagne) sont formées d'un dépôt conducteur d'ITO (Indium Tin Oxyde) d'épaisseur 100nm et d'indice  $n=1.92$ . La conductivité par unité de surface est de  $10\ \square$  par carré. Le côté conducteur est facilement reconnu à l'ohmètre. Des espaceurs en téflon autocollant (Bytac, Polylabo) sont collés du côté conducteur de façon à former une chambre.

Les deux lames d'ITO sont lavées abondamment à l'éthanol, à l'eau MQ puis séchées à l'aide d'un papier optique. Un dernier lavage au chloroforme est effectué. L'endroit du dépôt sera marqué sur les faces externes des lames.

### Dépôt des lipides sur les lames ITO

Les lames, la solution de lipides et la seringue Hamilton de prélèvement sont placées à température ambiante. Après 10min de thermalisation,  $10\ \square$ l de la solution sont prélevés et déposés rapidement aux endroits marqués pour chaque lame, de la façon la plus homogène possible. Des mouvements circulaires peuvent être effectués pour étaler le dépôt. Des cercles concentriques irisés doivent être alors obtenus. Les lames sont placées dans une boîte de Pétri recouverte d'aluminium puis séchées dans une enceinte à vide pendant une nuit.

### Formation des GUVs sous champ électrique

Préalablement, une solution de sucrose ( $\alpha$ -D-Glucopyranosyl  $\beta$ -D-fructofuranoside,  $C_{12}H_{22}O_{11}$ ,  $M=342.3\text{g/mol}$ ,  $d=1.002$ ,  $n=1.334$ , S 8501 Sigma) est préparée à une osmolarité donnée, typiquement entre 50 et 300 mOs. Pour empêcher le développement des bactéries, un bactéricide, l'azide (Sodium azide,  $\text{NaN}_3$ ,  $M=65\text{g/mol}$ , S 2002 Sigma) est ajouté à une concentration de 0.1mM. La solution ainsi préparée sera la solution de pousse. L'osmolarité des solutions est contrôlée avec un osmomètre. Les solutions sont conservées à 4°C.

La chambre d'électroformation est représentée ci-dessous (figure 27). Les deux lames d'ITO sont assemblées face à face et les contacts sont assurés par des lames de cuivre autocollantes (EZ 7251, Radio Spare). L'épaisseur de la chambre est de 1mm et l'étanchéité est réalisée par une pâte de scellement (Vitrex, Modulhor). Les contacts sont vérifiés à l'ohmmètre avant de passer à l'étape suivante.

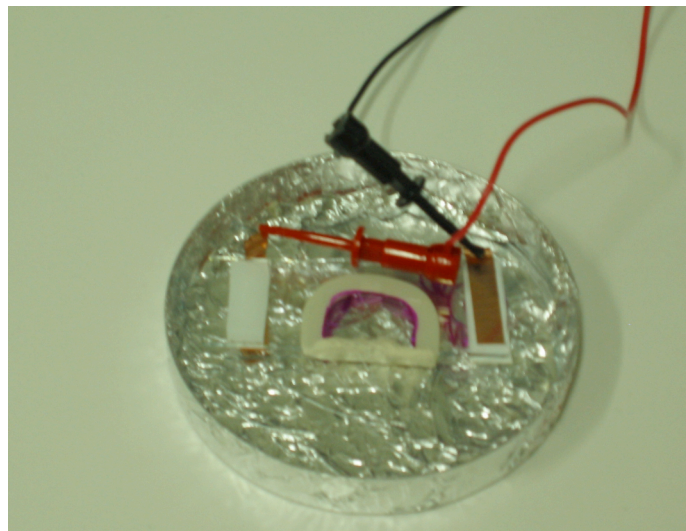


Figure B.1 : Chambre de pousse de vésicules

La chambre de pousse est remplie avec la solution de sucrose et fermée avec la pâte de scellement. Les électrodes de cuivre sont ensuite branchées aux bornes du circuit d'alimentation de pousse.

Le champ électrique est contrôlé par une rampe alimentée par un générateur de basse fréquence et délivrant une tension sinusoïdale incrémentée toutes les 5min

de 20mV à 1.1V. Par des constatations purement empiriques, une fréquence de 10Hz permet d'obtenir une croissance optimale des vésicules pour un milieu de viscosité similaire à l'eau. La formation de GUVs prend environ 2-3h. La fréquence est ensuite diminuée à 4Hz en signaux carrés tout en augmentant la tension à 1.5V pour décoller les vésicules. Finalement, la chambre est placée à 4°C pour la conservation.

Cette opération est effectuée à température ambiante pour les vésicules fluides (à base de lipides EPC ou DOPC majoritaires). Au contraire, pour les vésicules rigides (à base de lipides SM+cholestérol ou d'un mélange SM+DOPC+cholestérol), la chambre de pousse est placée dans une étuve à 55°C afin de travailler au dessus de la température de transition des lipides BSM.

### **Transfert des vésicules pour étude ou vérification de pousse**

Les vésicules sont préparées dans du sucrose. Pour permettre une bonne visualisation, il convient de les transférer dans un milieu de même osmolarité, d'indice différent (étude par contraste de phase) et de densité différente pour permettre leur sédimentation. Les milieux utilisés sont des solutions de glucose quand nous voulons juste vérifier la pousse des vésicules, des milieux tamponnés autrement (PBS).

Le milieu extérieur est injecté dans la chambre de manipulation puis 1 à 2µL de la solution de vésicules y sont ajoutés. Les vésicules sont prélevées délicatement à l'aide d'un capillaire de 1mm de diamètre permettant de diminuer les cisaillements par flux hydrodynamique et de préserver les plus grosses vésicules (50-100µm de diamètre).

Les vésicules ainsi préparées peuvent être observées en contraste de phase (objectif à huile ou air phase 2 ou 3, 40x, 63x, 100x), en DIC (Differential Interferenciel Contrast), en microscopie interférentielle.

### **Protocole de préparation des vésicules biotynilées**

Après avoir électroformé des vésicules biotynylées, nous pouvons les recouvrir de molécules de streptavidine. Pour se faire, 1µl de streptavidine fluorescente

## Annexes

(Extravidin-Cy3, Sigma) est mélangé dans 100  $\mu$ l d'une solution de sucrose à la même osmolarité que la solution de pousse. A cette solution sont injectés 30  $\mu$ l de solution de vésicules. Après un temps d'incubation de 5min à température ambiante, 1ml d'une solution de PBS (Phosphate Buffer Solution) de même osmolarité est ajoutée. Pour éliminer la streptavidine en solution, le mélange obtenu est centrifugé pendant 5min à 500rpm. 1ml du surnageant est retirée délicatement et 1ml de PBS est réintroduit. Ensuite le mélange est centrifugé dans les mêmes conditions. L'opération est répétée deux fois. Après avoir enlevé 1ml de surnageant, des vésicules fluorescentes couvertes de streptavidine sont finalement obtenues (Figure B.2.). Le bruit de fond permet de voir si le lavage de la streptavidine a bien été effectué.

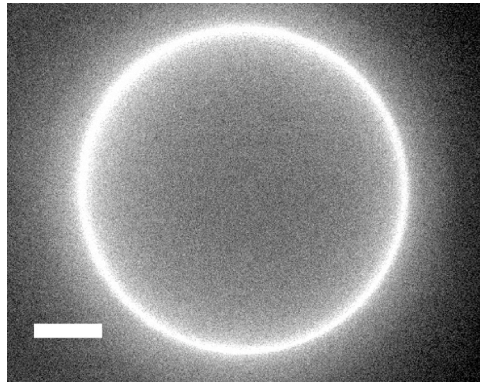


Figure B.2. : Image par microscopie de fluorescence d'une vésicule biotinyllée préalablement incubée dans une solution de streptavidine fluorescente et lavée par une solution de PBS. La barre d'échelle représente 5  $\mu$ m.

## Annexe C

### Préparation des globules rouges biotinylés

Nous avons utilisé des globules rouges biotinylés, d'une part, pour tester la qualité des surfaces modifiées et pour étudier la cinétique d'adhésion de cellules biotinylées sur des surfaces décorées de streptavidine et d'autre part, pour étudier la rétraction de tube de globule rouge à vitesse non contrôlée. Les globules rouges frais sont fournis par l'expérimentateur, lavés au PBS 290 mOs, et trois fois avec un tampon carbonate-bicarbonate à 0.1M (pH 8.5). Les globules sont ensuite biotinylés par incubation dans une solution de SBA-PEG<sup>3400</sup>-biotin (Nektar) à 0.5mM dans du tampon CB pendant 30min pour obtenir une biotinylation maximale, ou 2 minutes pour obtenir une biotinylation partielle. Après trois lavages avec une solution tamponnée Tris (pH 7.5), les globules biotinylés sont ensuite gonflés pour obtenir une forme sphérique dans du 140 mOs avec ou sans 0.5% en poids de BSA pour prévenir la crénation (ie. formation de globules rouges en forme de "hérissos"). La figure C.1. montre un globule rouge biotinylé recouvert de molécules de streptavidine fluorescente (Extravidin-Cy3, Sigma).

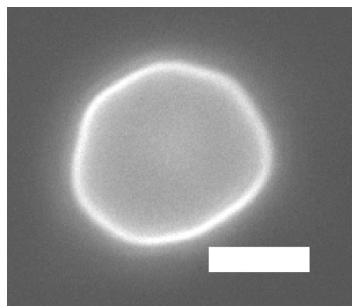


Figure C.1. : Image par microscopie de fluorescence d'un globule rouge biotinylé recouvert de streptavidine fluorescente. La barre d'échelle représente 5  $\mu$ m.

## Annexes

## Annexe D

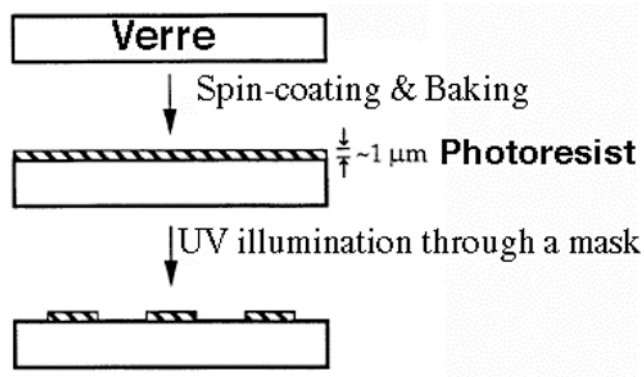
### Fabrication du moule d'élastomère

Pour fabriquer le moule de PDMS destiné à l'impression de micro-motifs, nous avons directement utilisé la technique de photolithographie molle développée par Whitesides (Xia et Whitesides, 1998). Toutes ces opérations sont effectuées dans la salle blanche du laboratoire.

La première étape consiste en la production à partir d'un photomasque (sans relief) d'un "master" en résine présentant le négatif du relief souhaité. La technique est résumée sur la figure ci-dessous. Une lame de verre ( $75 \times 25 \times 1 \text{ mm}^3$ ) est préalablement nettoyée au sonicateur dans de l'éthanol pendant 5min, puis séchée à l'azote. Une résine photoactive positive (Microposit S1813 photoresist, Shipley) est étalée sur la lame à la tournette ("spincoating"). Après une cuisson douce ("soft-baking") sur une plaque chauffante à  $120^\circ\text{C}$  pendant 3min, la lame est illuminée sous lumière UV à travers un photomasque (fabriqué sur mesure par lithographie à faisceau d'électrons et acheté chez Compugraphics) pendant 3-4s. La résine étant positive, ce qui est illuminé sera éliminé au révélateur. Les différents motifs du masque sont principalement des rails courbes ou des droites de largeur comprise entre 2 et  $6 \mu\text{m}$ . La résine est développée dans un mélange eau MQ/révélateur 5/1 v/v (microposit MF-321 developer, Shipley). Après un rinçage à l'eau MQ, la lame est séchée par "spincoating".



## Annexes



Réalisation du "master" négatif par la technique de photolithographie.

La deuxième étape consiste à fabriquer le moule de PDMS à partir du "master" de résine. L'élastomère de PDMS est préparé à partir d'une huile de polydiméthylsiloxane et d'un réticulant (kit Sylgard 184, Corning) en proportion massique 10/1. Le mélange est agité vigoureusement puis dégazé sous une cloche à vide afin d'éliminer les bulles. Les lames couvertes de résine préalablement placées dans une boîte de Pétri sont recouvertes du gel (encore liquide) puis mises au four à 60°C pendant 2h pour thermo-réticulation. Les différents élastomères sont finalement coupés à façon, en s'attachant à ouvrir les extrémités des canaux aux deux extrémités. Les lames recouvertes de résines sont réutilisables plus d'une centaine de fois.

### référence :

Xia Y et Whitesides GM, 1998.  
Soft Lithography.  
*Annual Review of Material Science*,28:153-184.