HAL open science

Pores transitoires, adhésion et fusion des vésicules géantes

Olivier Sandre

▶ To cite this version:

Olivier Sandre. Pores transitoires, adhésion et fusion des vésicules géantes. Matière Molle [cond-mat.soft]. Université Pierre & Marie Curie - Paris 6, 2000. Français. NNT : 2000PA066428 . tel-01385141

HAL Id: tel-01385141

https://theses.hal.science/tel-01385141v1

Submitted on 20 Oct 2016

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.

Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial - NoDerivatives 4.0 International License

THESE de DOCTORAT de l'UNIVERSITE PARIS 6

Spécialité :

Matière Condensée / Chimie Physique

présentée

par M. Olivier SANDRE

pour obtenir le grade de DOCTEUR de l'UNIVERSITE PARIS 6

Sujet de la thèse :

PORES TRANSITOIRES, ADHESION ET FUSION DES VESICULES GEANTES

soutenue le 27 septembre 2000

devant le jury composé de :

M. Loïc AUVRAY,	Rapporteur
M. Jean-Marc DI MEGLIO,	Rapporteur
M. Armand AJDARI	
Mme Miglena ANGELOVA	
Mme Françoise BROCHARD-WYART	
M. Pierre-Gilles DE GENNES	Président
M. Pierre TURQ	

Résumé

Les vésicules géantes sont des objets artificiels utilisés pour mimer l'enveloppe lipidique des cellules biologiques, la membrane plasmique, qui sépare l'intérieur de la cellule de son milieu extérieur. Parmi tous les systèmes censés modéliser les membranes biologiques (couches monomoléculaires à l'interface eau/air, bicouches supportées sur un substrat solide, films noirs lipidiques, etc..) les vésicules géantes sont les plus molles et les plus déformables. En effet, leur membrane est une mince couche fluide dont la tension de surface est pratiquement nulle. Néanmoins, elle peut être tendue progressivement par une action extérieure. La tension mécanique qui apparaît alors reste très en deçà des tensions interfaciales usuelles des liquides. Mais, sur des vésicules géantes, la relaxation de cette tension suffit pour provoquer des réorganisations importantes des lipides. Ce travail met en lumière deux types de transformation : i) la rupture transitoire de la membrane, et la fuite du liquide interne à travers un pore macroscopique géant ; ii) la fusion de deux membranes adjacentes, qui passe par les étapes intermédiaires d'hémifusion puis d'un pore de fusion. Les observations expérimentales ont été réalisées principalement en microscopie de fluorescence. Un modèle hydrodynamique simple étudie la dissipation visqueuse à l'intérieur de la membrane et dans le solvant alentour. En parallèle, une nouvelle imagerie mise au point récemment, la microscopie par génération de second harmonique (SHG), apporte des informations complémentaires sur le profil de distance des membranes adhérentes. Enfin, des vésicules géantes décorées par des protéines permettent de s'approcher un peu plus de la réalité de l'adhésion cellulaire.

Le chapitre I présente les caractéristiques générales des vésicules, ainsi que les manipulations permettant de les mettre sous tension. Les protocoles expérimentaux sont décrits au chapitre II, pour préparer d'une part des suspensions de vésicules géantes dans différents milieux, d'autre part des traitements de surfaces adhésifs sur le verre. Les méthodes de microscopie optique, nécessaires pour observer les membranes lipidiques avec un contraste optimal, sont détaillées au chapitre III. La suite aborde les deux voies adoptées par les vésicules géantes pour relaxer une tension de surface. Après un bref état de l'art sur les ruptures de bicouches lipidiques, le chapitre IV décrit, sur le plan théorique puis expérimental, la dynamique complète des pores transitoires. Nous verrons en particulier comment la viscosité accrue du milieu augmente à la fois leur durée de vie et leur taille. Le chapitre V ne fait qu'aborder, d'une manière surtout descriptive, les mousses de vésicules géantes. Suivant leur type d'interaction, soit les vésicules restent tendues comme des bulles de savon, soit elles relaxent leur tension, en mélangeant partiellement leurs membranes.

Abstract

Giant vesicles are artificial objects used to mimic the lipid envelope of biological cells, or plasma membrane, delimiting the cell interior from the outer medium. Among all the systems modeling biological membranes (monomolecular layers at the air/water interface, bilayers supported on a solid substrate, black lipid membranes, etc..), giant vesicles are the softest and the easiest to change their shapes. Their membrane is a thin fluid sheet with indeed almost no surface tension. Nevertheless, it can stretched by an external action. The value of the so created mechanical tension lies far below the usual interfacial tensions of liquids. However, with giant vesicles, the necessity to relax this low tension is a sufficient factor to cause major reorganizations of lipids. This work highlights two types of transformation: i) transient rupture of the membrane, and the leakage of the inner fluid through a giant macroscopic pore; ii) fusion of neighboring membranes, via the steps of hemifusion and then of a fusion pore. Experimental observations have been obtained mainly by fluorescence microscopy. A simple hydrodynamical theory modelizes the viscous dissipation inside the membrane and in the surrounding solvent. Besides, a novel imaging technique developed recently, the second harmonic generation (SHG) microscopy, provides complementary information about the distance profile of adhering membranes. Finally, giant vesicles decorated with proteins enable to get a little closer to the reality of cell adhesion.

Chapter I presents the general characteristics of vesicles, and the manipulations enabling to put them under tension. The experimental protocols are described in chapter II, to prepare on the one hand suspensions of giant vesicles in various mediums, on the other hand adhesive coatings on glass. Chapter III details the methods of optical microscopy, in order to observe the lipid membranes with the best contrast. After a brief state of the art about the break-down of lipid bilayers, chapter IV describes the complete dynamics of transient pores, both theoretically and experimentally. In particular, we shall see how the increased viscosity of the medium leads to longer lifetimes together with larger sizes. Chapter V just reveals descriptively the foams of giant vesicles. Depending on the type of interaction, vesicles either remain tense as soap bubbles, or they relax their tension by mixing part of their membranes.

Remerciements

Je remercie vivement les membres du jury d'avoir accepté de juger ce travail, Loïc Auvray et Jean-Marc di Meglio pour leurs rapports en tant qu'experts dans le domaine des fluides complexes, ainsi que les professeurs Pierre-Gilles de Gennes, Pierre Turq et Miglena Angelova, sans qui l'étude des vésicules géantes n'aurait jamais pris un tel essor depuis ces dernières années. Je suis heureux de l'intérêt porté à mon travail depuis l'année du DEA par l'un des mes anciens « tuteurs », Armand Ajdari. Enfin, je suis particulièrement reconnaissant à Françoise Brochard-Wyart, pour la confiance et pour la liberté qu'elle m'a accordées dans le choix des expériences, ainsi que pour sa clairvoyance dans l'interprétation des résultats et leur modélisation.

Bien que ce travail n'ait pas au départ de motivation biologique, j'ai pu bénéficier d'un environnement pluridisciplinaire exceptionnel, au laboratoire Physico-Chimie Curie (UMR 168 CNRS / Institut Curie), dont je remercie le directeur, Jacques Prost. Peut-être se souvient-il de l'étudiant tout frais émoulu de l'école Physique et Chimie, venu le voir il y a cinq ans « pour faire de la physico-chimie théorique », et qu'il a su guider sur sa voie : celle de la physico-chimie, expérimentale !

Cette étude n'aurait pu être réalisée sans le concours de chercheurs venant d'horizons très divers : Jérôme Mertz pour l'optique, Mireille Blanchard-Desce pour la chimie de synthèse, Sylvie Dufour et Hélène Feracci pour la biologie. Je suis très honoré d'avoir pu participer, de près ou de loin, à l'expérimentation de nouvelles techniques d'imagerie, développées sur le « microscope à deux photons », cet instrument formidable qui est le fruit d'une collaboration entre l'ESPCI et l'Institut Curie. J'ai beaucoup appris auprès d'opticiens hors pairs, Laurent Moreaux et Emmanuel Beaurepaire. Les quelques protocoles que j'ai pu leur montrer en retour, je les tiens moi-même d'une communauté de physico-chimistes s'intéressant aux membranes, organisée autour du GDR « Films moléculaires bidimensionnels ». Je remercie en particulier Christine Ménager, Marie-Alice Guedeau-Boudeville et Anne-Laure Bernard, qui m'ont donné l'envie de m'intéresser aux vésicules géantes.

Je suis par ailleurs redevable à Valérie Cabuil et à Régine Perzynski, qui depuis mon année de « scientifique du contingent », m'ont enseigné la rédaction d'articles scientifiques. Mes remerciements s'adressent aussi à toute l'équipe pédagogique de chimie, à l'UFR de Bobigny (Université Paris 13), en particulier ma « binôme » de TP Carole Marboeuf-Gueye. Je remercie aussi les stagiaires qui ont travaillé sur les vésicules, en leur souhaitant bonne chance pour la suite : Jérôme Prost, Christine Richard, Hicham Guitouni et Dephine Debarre.

Durant ces trois dernières années, je n'ai plus trop fait la différence entre le laboratoire et « la maison ». L'une des causes est un hôte bienveillant, qui s'occupe à la fois des nourritures de l'esprit et de celles du ventre : loué soit Othman Bouloussa pour les soins qu'il apporte à tous les thésards noctambules !

J'ai une dette envers encore de nombreuses personnes, qu'il me serait impossible de nommer toutes. J'espère qu'elles se reconnaîtront dans les remerciements que j'adresse en bloc à tout le personnel technique et administratif du laboratoire, à tous ses étudiants, qui lui apportent une ambiance dynamique et détendue, enfin aux chercheurs avec lesquels j'ai pu interagir.

Je terminerai ces remerciements par mes amis, qui me pardonneront de les avoir parfois négligés, Vincent et Anne Favre-Nicolin, Oussama Rabi, José Bico, François Boudot ; mes colocataires Vincent Noireaux et Andrea Parmeggiani ; la famille Bouchex, de la Giettaz (Savoie), chez qui j'ai écrit les premières et les dernières lignes de ce manuscrit ; enfin mes parents et mes sœurs Marion et Caroline, à qui je souhaite un bon début de thèse.

En hommage à Etienne Acloque,

mon ami d’enfance,

mort accidentellement le 9 juillet 2000.

Table des matières

Chapitre I: Les vésicules géantes unilamellaires I–10

I.1 Les membranes vues à l'échelle microscopique I–11
I.2 Les vésicules géantes à l'oculaire du microscope optique I–13
2.1 La bicouche résiste à la courbure I–14
2.2 La bicouche asymétrique I–15
2.3 La membrane est ondulée par l'agitation thermique I–18
I.3 Manipulations d'une vésicule géante I–20
3.1 Choc osmotique I–20
3.2 Aspiration par une micropipette I–21
3.3 Adhésion sur une surface I–22
3.4 Champ électrique I–24
a) Electroporation par une impulsion électrique I–24
b) Déformation sous champ alternatif I–25
3.5 Champ magnétique I–25
3.6 Gradient de densité I–27
3.7 Cisaillement I–27
3.8 Pinces optiques I–29
I.4 Références du Chapitre I I–30

Chapitre II: Fabrication des vésicules et des surfaces adhésives II–33

II.1 Les méthodes de préparation des GUV II–33
1.1 Conservation des lipides II–33
1.2 Gonflement spontané II–34
1.3 Electroformation II–34
a) Principe de la méthode II–34
b) Fabrication d'une chambre de préparation II–35
c) Protocole pour le « gonflement » des vésicules II–36
1.4 Encapsulations II–38
a) Mélanges d'eau et de glycérol II–39
b) Solutions concentrées de sucres II–40

d) Des billes fluorescentes II–41
e) Une macromolécule hydrosoluble : l'ADN II–43
II.2 Surfaces adhésives II–44
2.1 Substrats solides II–44
a) Cellule ouverte II–44
b) Cellule fermée II–45
2.2 Adsorption électrostatique sur le verre II–45
2.3 Greffage de molécules fonctionnalisées II–46
a) Greffage d'ancres cholestérol sur une couche hydrophile II–46
b) Greffage direct du thiocholestérol sur une couche d'or II–51
c) Surface décorée par des bandes alternativement hydrophiles et hydrophobes II–53
II.3 Références du Chapitre II II–56

Chapitre III: Méthodes d'observation III–58

III.1 Microscopies interférentielles III–60
1.1 Contraste interférentiel différentiel (DIC) en réflexion III–60
1.2 Contraste interférentiel en réflexion (RICM) III–61
a) Reconstruction du profil de distance III–63
b) Paramètres influençant le contraste III–65
c) Autres applications de la RICM III–67
III.2 Microscopie de fluorescence III–68
2.1 Principe III–68
2.2 Marqueurs fluorescents membranaires III–69
a) Phospholipides fluorescents III–69
b) Sondes (aminostyryl)pyridinium et analogues III–70
2.3 Aspects quantitatifs de l'imagerie de fluorescence III–72
a) Mesures spatiales III–72
b) Mesures des niveaux de gris III–74
2.4 Traitement d'images III–78
a) Détection automatique de contour III–78
b) Mesures quantitatives sur les formes de révolution III–80
III.3 Microscopies non linéaires sur le « microscope à deux photons » III–81
3.1 Imagerie en fluorescence excitée à 2 photons (TPEF) III–85
3.2 Imagerie en génération de second harmonique (SHG) III–86
III.4 Références du Chapitre III III–97

Chapitre IV: Pores transitoires dans les vésicules tendues IV–98

IV.1 Introduction et revue sur les pores dans les bicouches IV–98
1a) Pores stationnaires ouverts grâce à un champ électrique IV–99
1b) Ruptures irréversibles de bicouches IV–102
1c) Diagramme énergétique d'un pore.....IV–102
IV.2 Pores transitoires : résultats expérimentaux globaux qualitatifs IV–107
2.1 Vésicules adhérant sur un substrat solide IV–107
1a) Adhésion faible : fuite lente.....IV–107
1b) Adhésion forte : éclatement irréversible.....IV–108
2.2 Vésicules dans un mélange d'eau et de glycérol.....IV–110
IV.3 Modèle de pore transitoire : de la bulle visqueuse à la vésicule..... IV–112
3.1 Le ballon mou IV–112
3.2 Le ballon mou qui se détend IV–114
2a) Equations générales IV–114
2b) Solutions numériques IV–117
2c) Solutions analytiques IV–120
3.3 Et si la dissipation en volume domine celle dans la membrane ? IV–125
3a) Equations générales IV–125
3b) Solutions numériques IV–126
3c) Solutions analytiques IV–127
IV.4 Résultats expérimentaux détaillés IV–128
4.1 Où l'expérience et la théorie se rencontrent….....IV–129
4.2 Mesure de la tension de ligne.....IV–132
4.3 Les mesures de la tension de ligne mises à l'essai.....IV–135
3a) Mesures de $\Im$ d'après la taille d'équilibre d'un pore géant IV–136
3b) Mesures de $\Im$ d'après une statistique de ruptures IV–136
3c) Comparaison des résultats IV–139
4.4 Peut-on mesurer la viscosité de surface ? IV–139
IV.5 Mise sous tension des vésicules par fluorescence..... IV–145
5.1 Mécanismes responsables de la photo-induction des pores IV–145
1a) Facteurs expérimentaux IV–145
1b) Tension photo-induite : la piste moléculaire… IV–150
5.2 Nucléation des pores IV–154
IV.6 Expulsion d'objets encapsulés à travers les pores..... IV–155
IV.7 Références du Chapitre IV IV–157

Chapitre V: Adhésion des vésicules tendues V–159

V.1 Les forces intermoléculaires entre bicouches V–161
1.1 Répulsions à longue, moyenne et courte portées V–161
a) Répulsion due aux ondulations à 100 nm V–161
b) Répulsion stérique à 10 nm V–163
c) Répulsion d'hydratation à moins de 1 nm V–163
1.2 Interaction électrostatique V–164
1.3 Effets du calcium sur les phospholipides V–167
1.4 Attractions à longue portée V–167
a) Forces de Van der Vaals à 100 nm V–167
b) Effet de déplétion V–168
1.5 Forces spécifiques V–168
V.2 Adhésion entre une membrane et une surface solide V–170
2.1 Surface homogène V–171
a) Croissance des contacts V–171
b) Irrégularités de la ligne de contact V–172
2.2 Surface décorée par des lignes V–172
V.3 Adhésion entre membranes libres V–178
3.1 Adhésion induite par la tension V–178
3.2 Evolution des mousses de vésicules V–179
a) Croissance des contacts V–179
b) Instabilité des parois V–180
c) Fusion complète des vésicules V–187
3.3 Adhésion spécifique stabilisée par une répulsion stérique V–188
a) Préparation de « cellules artificielles » V–188
b) Adhésion électrostatique due au calcium V–190
c) Adhésion spécifique des cadhérines entre vésicules « chevelues » V–190
3.4 Perspective : étude fine des réarrangements membranaires par microscopie SHG V–192
V.4 Références du Chapitre V V–194

Chapitre I: Les vésicules géantes unilamellaires

Les molécules « amphiphiles » possèdent à la fois une partie polaire hydrophile et des groupements hydrophobes. Certaines d'entre elles résolvent ce dilemme d'interactions antagonistes avec l'eau en s'organisant spontanément en films bidimensionnels, plus ou moins flexibles. A l'état fluide, ils présentent des analogies avec les membranes des cellules biologiques, la plus évidente étant d'assurer une étanchéité (ou une perméabilité sélective) entre deux milieux. Lorsqu'une membrane est refermée sur elle-même, on parle de vésicule. C'est un petit sac entourant un volume isolé de solution aqueuse, en suspension dans une autre. Si la membrane est composée de molécules grasses, les lipides, les vésicules sont appelées liposomes. Ils sont dits unilamellaires quand leur membrane est une « bicouche » moléculaire unique (Figure 2). On les classe suivant leur taille : *Small* (20-50 nm), *Large* (50-500 nm) et *Giant* (0.5-100 μm) *Unilamellar Vesicles*. Les SUV et les LUV peuvent être comparés à certains organites cellulaires : vésicules de sécrétion (vésicules synaptiques, granules des cellules chromaffines), vésicules de transport entre les compartiments internes de la cellule (appareil de Golgi), etc.. Les liposomes géants ou GUV ressemblent davantage à la membrane plasmique des cellules (qui sépare le cytoplasme du milieu extérieur). De par leur taille, les GUV sont facilement observables par microscopie optique. De nombreux travaux ont ainsi été consacrés à leur morphologie et à leurs propriétés mécaniques. Par ailleurs, ils peuvent servir de milieux de reconstitution pour étudier un phénomène biologique dans un environnement simplifié. Dans cet ordre d'idée, des efforts ont été fournis pour incorporer soit des protéines membranaires dans la bicouche lipidique (protéoliposomes), soit des substances biologiquement actives dans le volume interne (micro-réacteurs). Enfin, les vésicules sont aussi pressenties comme vecteurs de composés fragiles (drogues ou plasmides) dans un organisme vivant. Même si, à l'heure actuelle, la barrière entre les tests *in vitro* et les traitements *in vivo* n'a pas été franchie, l'étude des complexes lipide-ADN (lipoplexes) constitue un domaine en pleine expansion. Ce mémoire met en lumière un possible mécanisme pour l'utilisation des GUV comme micro-transporteurs. Des objets préalablement encapsulés sont libérés à travers un pore, qui apparaît quand on soumet la vésicule à l'action d'une tension mécanique très faible.

Ce premier chapitre brosse un portrait général, mais non exhaustif, des liposomes géants. On commencera par décrire les caractéristiques moléculaires des phospholipides qui les constituent ; puis, après avoir évoqué brièvement la forme générale de ces membranes fermées[1], on s'arrêtera sur leur point le plus singulier, d'incessantes fluctuations thermiques qui les agitent. En effet, seule la résistance à la courbure limite l'amplitude des déformations, car la tension de surface est quasi-nulle par rapport à celle des liquides usuels. On terminera ce chapitre par un tour d'horizon des

[1] **Note au lecteur pressé** : certains points précis, non indispensables pour suivre le fil conducteur de la thèse, sont détaillés à part, sous forme de documents encadrés.

manipulations possibles avec les vésicules géantes : choc osmotique, aspiration dans une micropipette, sédimentation par la gravité ou cisaillement par un écoulement, adhésion sur une surface solide, application d'un champ électrique, magnétique ou bien encore d'une onde lumineuse.

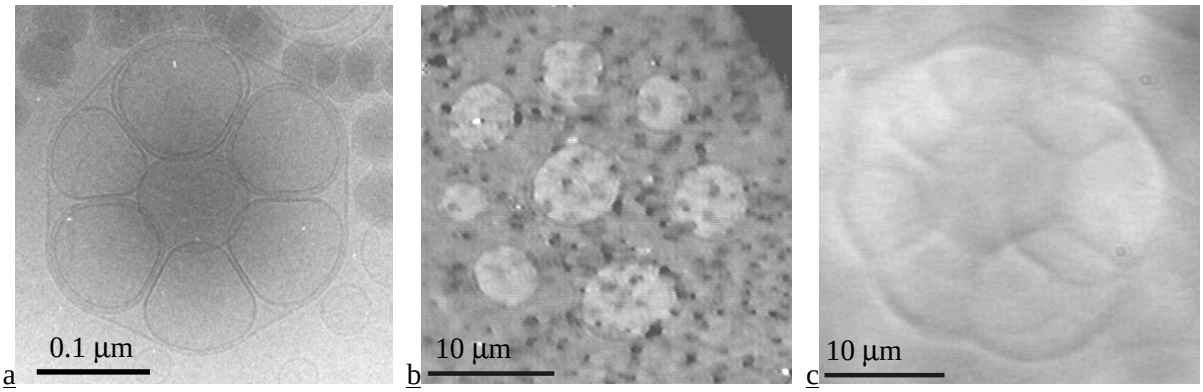


Figure 1 : La taille des vésicules varie entre moins de 100 nm (a SUV en microscopie électronique, image Olivier Lambert, PCC/Institut Curie) et plusieurs dizaines de µm (GUV en microscopie optique ; b zones de contact sur le verre, observées en réflexion ; c images en transmission prises à plusieurs niveaux et superposées).

Epaisse de 3–4 nm, la membrane lipidique est imagée à l'échelle sur les clichés de microscopie électronique de petites vésicules (Ø 50–100 nm). On reconnaît facilement des vésicules bi-lamellaires, formées de deux membranes emboîtées. Les vésicules géantes ont, quant à elles, un rayon environ 10^4 fois plus grand que la taille des molécules. Cependant, l'extrême finesse de la membrane joue sur ses propriétés mécaniques : la tension étant nulle, seule l'énergie de courbure s'oppose aux déformations, et la bicouche lipidique est parcourue par d'incessantes ondulations thermiques.

I.1 Les membranes vues à l'échelle microscopique

Les lipides des membranes biologiques sont majoritairement des phospholipides. D'un point de vue chimique, ce sont des molécules constituées d'un noyau glycérol estérifié par deux acides gras et un groupement polaire phosphatidyle. La tête polaire étant hydrophile et les deux chaînes hydrophobes, les phospholipides sont amphiphiles. Au delà d'une concentration critique d'association très faible ($\approx 10^{-10}$ M), ils ne sont plus solubles dans l'eau et tendent à s'auto-assembler. Les objets ainsi formés ont une structure lamellaire : les molécules se regroupent en feuillets bi-dimensionnels, eux-mêmes accolés en bicouches.

Figure 2 : Structure en double couche ou « bicouche »

L'organisation de molécules amphiphiles en phase lamellaire est liée à la forme des molécules élémentaires[1] : elles doivent être *grosso modo* cylindriques. Les **phospholipides bicaténaires** (i.e. à deux chaînes grasses) remplissent, pour la plupart, cette condition. En effet l'encombrement des chaînes est voisin de celui de la tête polaire (environ 60 $Å^2$). La bicouche peut cependant exister sous différents états en fonction de la température. A basse température, les molécules d'une même bicouche peuvent avoir un ordre orientationnel à longue distance. On dénombre différentes phases suivant les molécules : L_β (phase gel classique), L_β' (phase gel inclinée), P_β' (phase ridée), etc. … Au dessus de la température T_m dite « de fusion des chaînes », la bicouche est dans la phase fluide L_α, qui est en fait un état cristal liquide. En effet, si les molécules n'ont plus de corrélations à longue distance, elles sont cependant confinées dans la bicouche, et contraintes d'adopter une orientation en moyenne perpendiculaire au plan. Dans la phase L_α, les différents mouvements moléculaires sont plus rapides que dans les phases gels. Par exemple, les coefficients de diffusion latérale (à l'intérieur d'un même feuillet) sont de l'ordre de 10^{-12} m^2s^{-1}, tandis que la moitié des molécules passe d'un feuillet à l'autre par « flip-flop » en un temps qui varie entre 10 min pour le cholestérol[2] et plusieurs heures pour des phospholipides chargés.

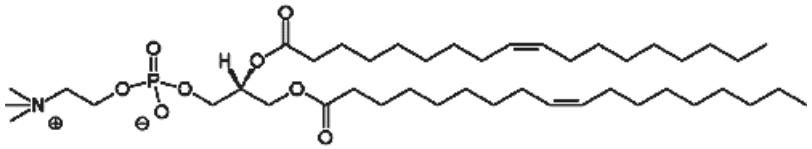


Figure 3 : 1,2-dioléoyl-sn-glycéro-3-phosphocholine (DOPC) M_w=786.1 T_m= –22°C. L'épaisseur de la bicouche est 35 Å.

Les propriétés des phospholipides varient en fonction de leur structure chimique précise. On note par convention Cn:m le nombre de méthylènes et le nombre d'insaturation des chaînes paraffiniques. Ces paramètres jouent surtout sur la température de gel. Par exemple, T_m augmente dans la série des chaînes dérivées des acides gras de longueur croissante (lauroyl C12 :0, myristoyl C14:0, palmitoyl C16:0 et stéaroyl C18:0), en raison des interactions intermoléculaires accrues. La température T_m est, au contraire, diminuée par les effets qui gênent l'ordre des molécules : double liaison cis introduisant un « coude » de la chaîne (oléoyl C18:1 [cis]-9), chaîne ramifiée (phytanoyl C16:4Me, possédant 4 groupes pendants méthyles), incorporation de cholestérol… La lécithine d'œuf (EPC) est fluide à température ambiante parce qu'elle contient un mélange de molécules, ayant la même tête polaire phosphatidylcholine (comme le DOPC, Figure 3) mais différentes chaînes, saturées et insaturées.

Le deuxième facteur qui différencie les lipides est la nature de la tête polaire. Dans le cas des phospholipides, elle est toujours ionique car le groupe phosphate est ionisé à pH>2. La charge nette de la molécule dépend du groupement lié au phosphate. L'acide phosphatidique PA (Figure 4), le phosphatidylglycérol PG et le phosphatidylinositol PI sont anioniques. La phosphatidylcholine ou

phosphocholine PC est zwitterionique, de même que la phosphatidyléthanolamine PE à pH 7 (mais la tête PE devient anionique à pH basique). La phosphatidylsérine PS qui possède un groupe positif et deux négatifs est globalement négative. Notons que la charge effective d'une bicouche lipidique dans l'eau ne dépend pas uniquement de la charge nominale des lipides, mais également de facteurs tels que l'adsorption d'ions. Par ailleurs il n'existe pas de phospholipide naturel à tête chargée positivement. Pour les applications qui demandent des bicouches positives (par ex les complexes avec l'ADN) on utilise soit des sphyngolipides (sphyngosine), soit des lipides artificiels (trimethyl-ammonium-propyle TAP ou autres ammonium quaternaires).

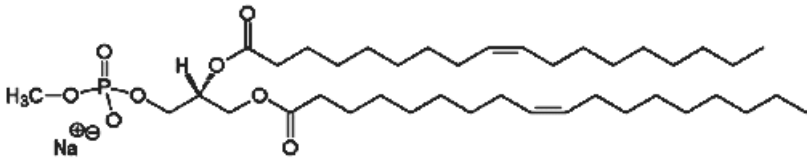


Figure 4 : 1,2-dioléoyl-sn-glycéro-3-phosphate de sodium (DOPA) M_w=737.1

L'hydrolyse de la fonction ester, éventuellement catalysée par une enzyme[3], la phospholipase A2, conduit à des **lysophospholipides monocaténaires**, c'est-à-dire ne comportant plus qu'une seule chaîne grasse. Ces molécules ont une solubilité dans l'eau accrue ($>10^{-6}$ M). Comme leur forme est conique, elles s'associent préférentiellement en micelles sphériques. Ces lysolécithines (lysoPC) déstabilisent ainsi la structure lamellaire. Des dérivés du cholestérol tels que l'acide cholique (présent dans la bile) induisent le même effet (cf. IV–4.2).

I.2 Les vésicules géantes à l'oculaire du microscope optique

Les vésicules géantes exercent un attrait visuel très fort, car leurs formes variées peuvent être observées avec un simple microscope optique. Pour les imager, l'expérimentateur dispose de différents contrastes qu'on verra en détail au chapitre III. Ces formes des vésicules géantes ne se résument cependant ni à des spécimens zoologiques, ni même uniquement à des surfaces mathématiques dans l'espace. Les physiciens ont pu en donner une description mécanique, reliée aux propriétés physico-chimiques de la bicouche. Dans ce travail, on a choisi des conditions dans lesquelles les vésicules sont sphériques ou quasi-sphériques (sphères tronquées ou ellipsoïdes). On cite, pour information, les formes qu'on peut rencontrer par ailleurs, modélisables avec un minimum de paramètres (Encadré 1).

La grande particularité des vésicules géantes est de posséder une tension de surface σ en théorie nulle[4]. En effet, comme les phospholipides sont quasiment insolubles dans l'eau, le nombre total N de molécules composant sa membrane est fixé. En l'absence de perturbation extérieure, l'aire totale de la vésicule peut donc être traitée comme une constante, $A = Na_0/2$, où a_0 désigne l'aire par tête polaire. Elle s'ajuste à une valeur qui minimise l'énergie libre F du système, de sorte que $\frac{\partial F}{\partial A} = \sigma = 0$. Bien

entendu, cette affirmation est nuancée dans des conditions expérimentales réelles, car il existe toujours des réservoirs ou des puits de lipides (par exemple de petites vésicules qui entourent les géantes). Néanmoins, les deux conséquences de cette conservation de la surface totale subsistent : d'une part, ce n'est plus la tension de surface qui s'oppose aux déformations, mais l'énergie de courbure ; d'autre part, cette énergie étant faible, l'agitation thermique suffit à provoquer des fluctuations incessantes de la membrane, visibles au microscope optique.

2.1 La bicouche résiste à la courbure

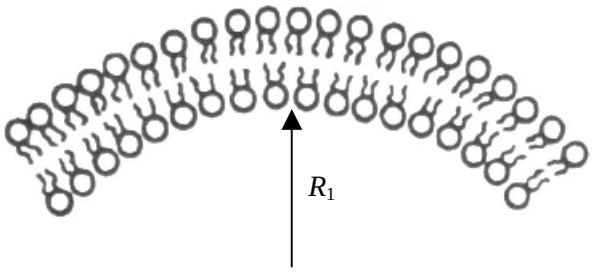


Figure 5 : Déformation de courbure (*bending* ou *splay*) d'une bicouche

La déformation d'un film fin tel qu'une bicouche lipidique ne coûte qu'une faible énergie de courbure. Sur le schéma ci-dessus, un seul rayon de courbure R_1 est représenté, contenu dans le plan de figure. Dans l'espace, en chaque point d'une surface sont définis deux rayons de courbure principaux R_1 et R_2 : ce sont les rayons de cercles ausculateurs perpendiculaires, comptés négativement si le centre du cercle est situé à l'extérieur de la vésicule. La courbure est alors définie par $H = 1/R_1 + 1/R_2$. Par exemple, pour une sphère de rayon *R*, $H = 2/R$, et pour un cylindre de même rayon, $H = 1/R$. La courbure de Gauss est un second invariant géométrique, défini par $G = 1/R_1R_2$. Les formes quasi-sphériques telles que les ellipsoïdes vérifient $G > 0$, tandis que l'égalité $G = 0$ n'est rencontrée que pour le cylindre. Les surfaces à $G < 0$ ressemblent localement à une « selle de cheval » (*saddle splay*). La vésicule en forme de poire apparaissant à la Figure 6 possède ses deux courbures *H* et *G* négatives (il s'agit vraisemblablement d'une vésicule plurilamellaire). L'autre image représente une invagination de la paroi entre deux vésicules (cf. Chapitre V) : $R_2 \approx -R_1$, de sorte que sa courbure *H* est nulle tandis que *G* est négative. Plus généralement, cette géométrie se rencontre dans le bourgeonnement d'une vésicule (ou l'exocytose d'une cellule biologique), au niveau du col qui relie la membrane principale à des évaginations. Les vésicules toroïdales, voire de topologie plus élevée, comme celle d'un bouton percé de plusieurs trous[5], illustrent encore le cas $G < 0$ et *H* positive ou négative. Quelle que soit la forme globale, l'énergie de courbure locale est donnée par une expression introduite par Helfrich[6], écrite par unité de surface :

Eq. (1) $$g_b = \tfrac{1}{2} K_b H^2 + \overline{K}_b G$$

où K_b et $\overline{K}_b$ sont deux modules élastiques de courbure associés respectivement aux courbures *H* et *G*.

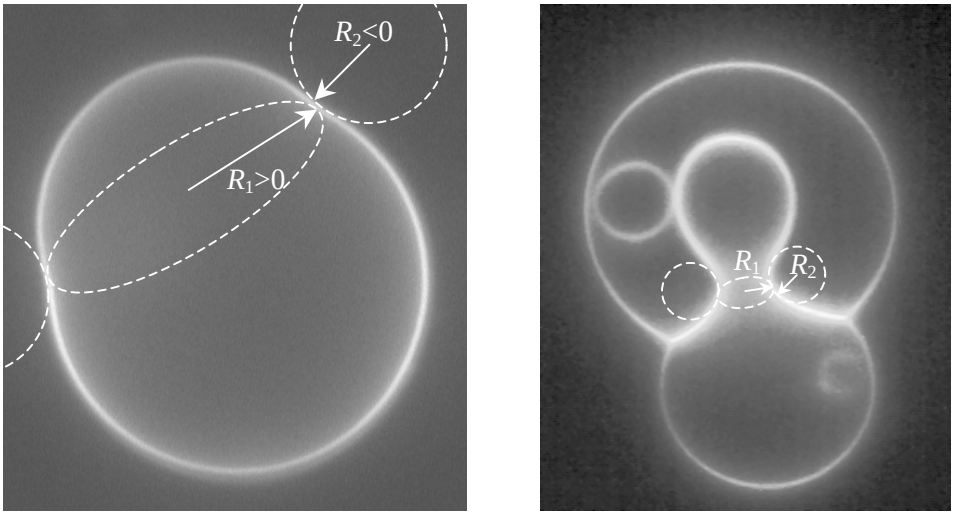


Figure 6 : Illustrations des courbures moyenne $H = 1/R_1 + 1/R_2$ et Gaussienne $G = 1/R_1R_2$ sur une vésicule en forme de poire (à gauche, H<0 et G<0) et sur une invagination (à droite, H≈0 et G<0).

D'après le théorème de Gauss-Bonnet, l'intégrale de G sur une surface fermée ne dépend que du nombre de poignées ou anses (ce nombre définit la topologie). Le second terme de l'Eq. (1) est donc systématiquement ignoré, aussi bien dans l'étude des fluctuations que dans la recherche des formes d'énergie minimale, à topologie fixée (le plus souvent celle de la sphère). C'est pourquoi K_b est l'unique module élastique de courbure considéré. Il possède la dimension d'une énergie, et son ordre de grandeur est $K_b \approx 10^{-19}$ J pour les phospholipides, soit quelques dizaines de fois l'énergie kT d'agitation thermique. Ainsi les ondulations thermiques visibles impliquent-elles une énergie de courbure par unité de surface $g_b \approx 2\times10^{-7}$ N/m (pour un rayon de courbure d'environ 1 μm). Dans les liquides usuels, on ne tient jamais compte de cette énergie de courbure, car elle négligeable devant la tension de surface ($\gamma > 10^{-2}$ N/m). Par contre, une membrane de vésicule géante peut très bien avoir une tension σ inférieure à 10^{-7} N/m.

2.2 La bicouche asymétrique

Par ailleurs, l'Eq. (1) est écrite en toute rigueur pour une bicouche symétrique. Or les deux faces de la membrane ne sont jamais parfaitement équivalentes. L'asymétrie entre les deux feuillets est la plus évidente quand ils sont composés de phospholipides de natures chimiques différentes. Ainsi la membrane des globules rouges comporte-t-elle principalement des aminophospholipides (PS et PE) sur sa face interne, cytoplasmique, tandis que sa face extracellulaire contient des phosphocholines PC et des sphyngolipides[7]. Même dans un cas où les lipides sont identiques, des solutions aqueuses interne et externe différentes contribuent aussi à l'asymétrie des feuillets. En effet, les têtes polaires des phospholipides sont sensibles à la composition de la solution par l'intermédiaire du pH[8,9], de la force ionique[10] ou de solutés qui s'adsorbent spécifiquement, tels que des sucres[11] ou des ions

multivalents[12,13]. Des particules colloïdales ayant une interaction répulsive avec la membrane induisent aussi une asymétrie[14-16]. Le modèle d'Helfrich rend compte de ces effets par l'introduction d'une courbure spontanée c_0 dans l'énergie de courbure :

Eq. (2) $$g_b = \tfrac{1}{2} K_b \left(H - c_0\right)^2$$

Avec des lipides tous de même nature chimique, et des compartiments aqueux rigoureusement identiques, il subsiste encore une dernière asymétrie. En effet, les deux monocouches qui constituent la membrane n'ont pas forcément la même densité surfacique de molécules. Cette contribution à l'asymétrie de la membrane dépend de la forme géométrique globale de la vésicule, et ne peut donc être ramenée à l'expression locale du modèle de la courbure spontanée. On peut néanmoins la décrire, grâce à un modèle élastique qui considère la différence d'aire des deux feuillets (voir l'Encadré 1).

Encadré 1 Formes d'équilibre des vésicules[17]

Le modèle le plus simple pour trouver les formes de vésicules consiste à minimiser uniquement l'énergie de courbure, dans les hypothèses suivantes :

- bicouche fluide et symétrique, dont l'énergie de courbure est décrite par l'Eq. (1) ;
- topologie sphérique, ce qui permet de négliger le terme de courbure de Gauss ;
- surface totale de lipide A constante ;
- volume de solution interne V constant.

Dans ces conditions, la forme d'équilibre de la vésicule dépend d'un unique paramètre, le volume réduit, composé à partir de la surface et du volume :

$$v = \frac{3V}{4\pi\left(A/4\pi\right)^{3/2}}$$

En particulier, la forme ne dépend ni de la taille de la vésicule, ni de la valeur exacte de la rigidité de courbure. Le paramètre sans dimension v quantifie simplement le « gonflement » de la vésicule, la valeur v=1 correspondant à une sphère, c'est-à-dire la forme géométrique qui contient le plus grand volume V, pour une aire A donnée. Au fur à mesure que la vésicule est dégonflée (v décroissant), les formes rencontrées sont : la sphère, l'ellipsoïde allongé (*prolate*), des formes non ellipsoïdales, mais toujours allongées, qui ressemblent d'abord à une cacahouète, puis à des haltères (*dumbell*) ; ensuite une transition discontinue conduit la vésicule à une forme discoïdale, qui dérive des ellipsoïdes aplatis (*oblate*) et rappelle la forme physiologique biconcave des globules rouges (discocytes) ; enfin, par une seconde transition du premier ordre, la forme d'équilibre évolue avec une seule concavité, mais très prononcée, comme le font les globules rouges dégonflés (stomatocytes).

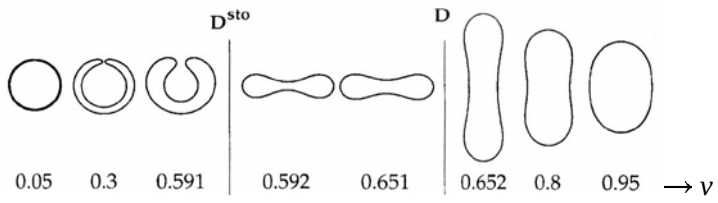


Figure 7 : Formes théoriques d'une vésicule en fonction de son volume réduit[18]

Cependant, d'autres formes pourtant observées expérimentalement ne sont pas prédites par ce modèle très simple : les haltères dissymétriques ressemblant à des poires (*pears*), et les formes en étoile de mer (*starfish*), ayant jusqu'à sept branches[19]. Pour les retrouver, il faut tenir compte en plus de la dissymétrie entre les densités surfaciques de part et d'autre de la membrane.

Les deux monocouches possèdent toujours des nombres de molécules différents[1], respectivement N^+ et N^-. La surface moyenne de membrane est $A = \left(N^+ + N^-\right)a_0/2$, et la différence d'aire intrinsèque entre les deux feuillets, $A_0^{\pm} = \left(N^+ - N^-\right)a_0$. Imaginons une bicouche initialement plane, telle que celle de la Figure 2. Quand on la replie pour former une sphère de rayon *R*, la monocouche externe est étirée, tandis que la face interne est comprimée (un peu comme les deux côtés d'un arc qu'on tend). L'aire du feuillet externe de la bicouche, d'épaisseur $e << R$, devient supérieure à celle du feuillet interne, d'une quantité $A^{\pm} \approx 8\pi eR$. Pour $R = 10\,\mu\text{m}$ et $e = 4\,\text{nm}$, cette différence d'aire représente moins d'un millième de la surface moyenne $A = 4\pi R^2$. Mais $A^{\pm}$ est dépendante de la forme globale, et en général différente de $A_0^{\pm}$, qui elle a été fixée à la formation de la vésicule, quand la bicouche s'est refermée. L'énergie de la vésicule est alors la somme de l'énergie de courbure, intégrée sur toute la surface, et d'une énergie élastique d'étirement, non locale[(20)] :

$$E = \tfrac{1}{2}K_b \oiint \left(H - c_0\right)^2 dS \quad + \quad \tfrac{1}{2}K_s \frac{\left(A^{\pm} - A_0^{\pm}\right)^2}{A}$$

où $K_s \approx 10^{-1}$ N/m est le module élastique d'étirement latéral des molécules (*stretching*). Dans le cas d'une forme quelconque, la différence d'aire géométrique entre les deux monocouches est recalculée pour chaque nouvelle conformation de la membrane, par $A^{\pm} = e\oiint HdS$. Cette théorie, dite ADE (*Area Difference Elasticity*), conduit à un diagramme de phases unique avec seulement deux paramètres : le volume réduit *v* et une différence d'aire effective Δa_0, qui tient compte à la fois de la courbure spontanée c_0 du modèle de Helfrich et de la différence de surface $A_0^{\pm}$ entre les feuillets.

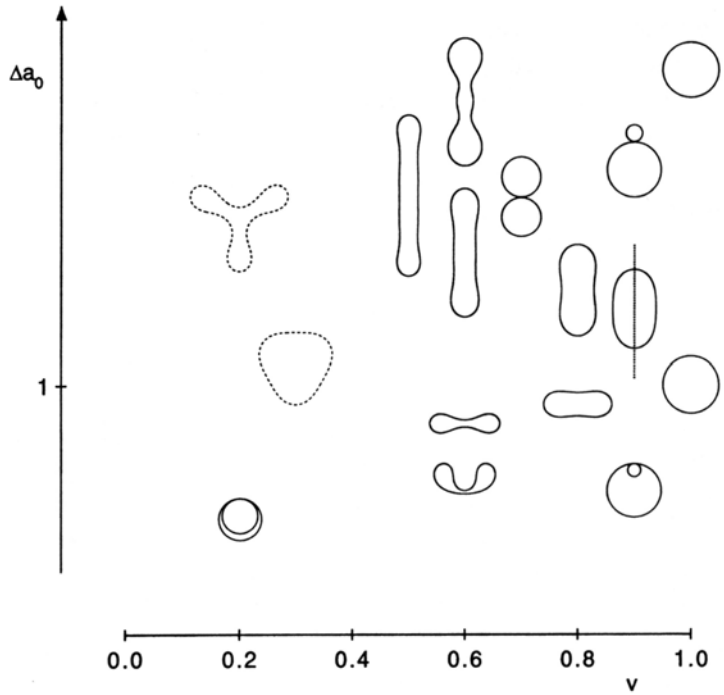


Figure 8 : Diagramme de phases simplifié du modèle ADE[(21)].

[1] Ces nombres varient d'une vésicule à l'autre, même de rayon identique, à l'intérieur d'une même préparation. Comme le passage des lipides d'un feuillet à l'autre par flip-flop est un phénomène très lent (plusieurs heures), le temps d'équilibrage des feuillets est supérieur au temps d'observation de la vésicule.

2.3 La membrane est ondulée par l'agitation thermique

Dans le paragraphe précédent, les formes sont prédites à température nulle, c'est-à-dire sans tenir compte des fluctuations thermiques. Or les membranes libres opposent très peu de résistance aux déformations, et le choc incessant des molécules de solvant de chaque côté suffit à provoquer de larges fluctuations thermiques. Ce phénomène a d'abord été décrit pour expliquer le scintillement du globule rouge, quand on l'observe au microscope optique dans sa forme dégonflée, biconcave[22]. Depuis, l'analyse du spectre de ces fluctuations dans les vésicules géantes a donné lieu à de nombreux travaux[4,23-32].

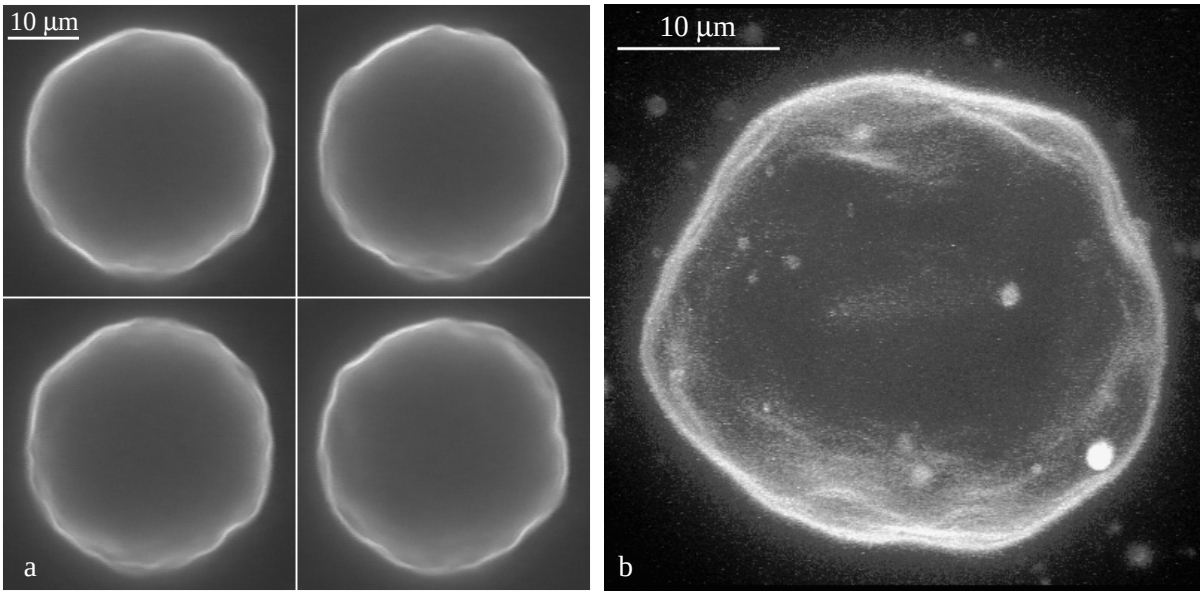


Figure 9 : Ondulations thermiques d'une vésicule géante, observées en microscopie de fluorescence, à différents instants dans le plan même plan (a) et par projection de plusieurs plans (b).

Sous tension nulle, l'amplitude des fluctuations parcourant la membrane est limitée uniquement par l'énergie de courbure : $\left\langle u^2 \right\rangle^{\frac{1}{2}} \approx \left(kT/K_b\right)^{\frac{1}{2}} R$. Avec un module élastique $K_b = 10 - 50\,kT$, on trouve effectivement des ondulations supérieures au micromètre. En comparaison, la « rugosité » d'un liquide usuel, $\left\langle u^2 \right\rangle^{\frac{1}{2}} \approx kT/\gamma$, atteint quelques Å seulement pour une tension interfaciale $\gamma \approx 10^{-2}$ N/m. Or, de même que du papier froissé peut contenir une grande surface dans un petit volume, la membrane plissée des vésicules fluctuantes possède un réservoir conséquent d'aire cachée. Dans la littérature, on parle plutôt « d'excès de surface », défini comme l'aire ΔA récupérable en dépliant les fluctuations[24]. A l'état complètement détendu ($\sigma = 0$), cette fraction ΔA^0 représente 5 à 10% de la surface moyenne projetée, A_p^0. L'augmentation de la surface projetée A_p, par une action extérieure, se fait au détriment des fluctuations. D'origine entropique, cette élasticité est décrite par une relation logarithmique en fonction de la tension σ de la membrane :

Eq. (3) $$\frac{A_p - A_p^0}{A_p^0} = \frac{\Delta A^0 - \Delta A}{A_p^0} = \frac{kT}{8\pi K_b} \ln\left(1 + c\frac{A_p^0}{K_b}\sigma\right)$$

où c est un facteur numérique, qui vaut $c = 1/\pi^2$ pour des ondulations sinusoïdales autour d'un plan moyen (Encadré 2), et $c = 1/24\pi$ pour des fluctuations autour de la forme sphérique[33].

Dans la suite, on passe en revue les différents expériences pour accroître la tension de surface (ou tension latérale), de façon plus ou moins bien contrôlée. Comme une partie des fluctuations composant ΔA est d'amplitude trop petite pour être observée en microscopie optique, les expériences mesurent toujours une augmentation de surface projetée A_p, par rapport à sa valeur sous tension quasi-nulle, A_p^0. Elle est égale en valeur absolue à l'aire dépliée, à condition que la surface totale de lipide A soit conservée pendant la durée de l'expérience : $A_p + \Delta A = A_p^0 + \Delta A^0 = A$.

Encadré 2 <u>Fluctuations d'une bicouche plane</u>

Le plus simple est de considérer une portion carrée de membrane, de côté L, dans le plan (xy). Les fluctuations sont alors représentées par un déplacement vertical $u_{x,y}$ autour du plan moyen. L'excès de surface est la différence entre l'aire de la surface ondulée et l'aire projetée sur le plan : $\Delta A = A - A_p$. L'énergie de courbure est intégrée sur toute la membrane :

$$E_b = \tfrac{1}{2} K_b \oiint (\Delta u_{x,y})^2 \, dxdy$$

L'énergie libre F de la membrane est la somme de l'énergie élastique et de l'énergie de surface :

$$F = E_b + \sigma \Delta A$$

En ajoutant des conditions de périodicité $u(x,y) = u(x+L,y) = u(x,y+L)$, on peut décomposer les ondulations en modes de Fourier, c'est-à-dire en composantes sinusoïdales de longueurs d'onde $2\pi/q$ et d'amplitudes u_q. L'énergie libre est alors écrite sous la forme :

$$F = L^2 \sum_q \tfrac{1}{2}\left(\sigma + K_b q^2\right) q^2 \left|u_q\right|^2$$

Chaque mode contribue à hauteur de $\tfrac{1}{2}kT$ (théorème d'équipartition de l'énergie), d'où le spectre en amplitude : $$\left\langle \left|u_q\right|^2 \right\rangle = \frac{kT}{L^2 q^2 \left(\sigma + K_b q^2\right)}$$

L'excès de surface est, par mode, $\Delta A_q = L^2 q^2 \left|u_q\right|^2 = \dfrac{kT}{\sigma + K_b q^2}$. La fraction de surface plissée contenue dans l'ensemble des fluctuations est obtenue en intégrant entre q_{min} et q_{max} :

$$\frac{\Delta A}{L^2} = \frac{kT}{8\pi K_b} \ln \frac{q_{\max}^2}{q_{\min}^2 + \sigma/K_b}$$

La longueur d'onde est au maximum $2L$, donc la borne inférieure est $q_{\min} = \pi/L$, où $A_p^0 = L^2$. Le plus grand mode est $q_{max} = \pi/a$, a désignant une taille moléculaire ($q_{max}^2 >> \sigma/K_b$). Les expériences donnent accès à des diminutions de l'excès de surface, à partir de l'état de tension nulle :

$$\frac{\Delta A - \Delta A^0}{A_p^0} = -\frac{kT}{8\pi K_b} \ln\left(1 + \frac{A_p^0}{\pi^2 K_b}\sigma\right)$$

I.3 Manipulations d'une vésicule géante

3.1 Choc osmotique

On change le volume des vésicules en leur appliquant des différences de pression osmotique. Le solvant (eau ou glycérol) peut en effet traverser la bicouche, de sorte que les vésicules plongées dans un milieu hypotonique (plus dilué en solutés) gonflent, tandis qu'elles se dégonflent dans une solution hypertonique (plus concentrée). La pression osmotique d'une solution de concentration c peut être différente de son expression à dilution infinie, $\Pi = ckT$ (Π en Pa, c en m^{-3}). La pression osmotique réelle est liée à son « osmolarité », elle-même proportionnelle à l'abaissement de son point de fusion : une solution aqueuse d'osmolarité 1 Os/kg d'eau gèle à –1.86°C. Les mesures expérimentales de la pression osmotique reposent sur ce principe : osmomètre à point de fusion, ou à point d'ébullition. On trouve aussi dans les handbooks la pression osmotique des solutés les plus courants, en fonction de leur concentration. Elle est parfois exprimée en « osmosité », i.e. la concentration de solution de Na^+Cl^- ayant le même point de fusion.

[Glucose] mol/L	Osmolarité Os/kg
0.050	0.0509
0.100	0.102
0.300	0.315
2	2.75

[Sucrose] mol/L	Osmolarité Os/kg
0.050	0.0510
0.100	0.104
0.300	0.333
2	>3.7

Tableau 1 : Osmolarités des solutions, aux concentrations utilisées (d'après [34])

Dans les expériences réalisées au cours de ce travail, les vésicules ont toujours été transvasées entre des solutions de sucrose et de glucose de même concentration. En toute rigueur, il aurait fallu systématiquement mesurer les pressions osmotiques, et les ajuster exactement. Néanmoins, on voit sur le tableau que la différence relative de pression osmotique est négligeable à 50 mM. Elle vaut 2% à 100 mM, et 5% à 300 mM. Les chocs osmotiques sont donc faibles, sauf pour les solutions à 2 M.

Encadré 3 La perméabilité d'une bicouche lipidique

La bicouche phospholipidique est une membrane semi-perméable. Le coefficient de perméabilité d'un soluté à travers la bicouche (P en m/s) est défini à partir du flux volumique par unité de surface de lipide (Q en m/s) obtenu par application d'une différence de pression Δp de part et d'autre de la bicouche :

$$Q = P\frac{\Delta p v_0}{kT} = P\frac{\Delta p}{p_0}$$

v_0 étant le volume moléculaire de l'espèce chimique. Pour l'eau v_0=30Å^3 et $p_0 = kT/v_0 = 1.4\times10^8$ Pa .

Toutes les espèces en solution qui ont un faible coefficient de perméabilité exercent une pression osmotique : le glucose (10^{-12} à 10^{-11} cm/s), le sucrose (10^{-13} cm/s), mais pas l'eau (10^{-3} cm/s) ni le glycérol (10^{-4} cm/s), qui sont de petites molécules neutres (de même que l'éthanol). Les valeurs de P pour ces solutés viennent de [35] et ont été mesurées sur des films noirs lipidiques (BLM). Peu de mesures de perméabilité ont été faites directement sur des GUV. Dans [36], des vésicules géantes d'EPC gonflées dans l'eau pure sont mises dans des solutions de Na^+Cl^- ou de glucose de concentrations entre 1.5 et 20 mM. Dans ces milieux hypertoniques (Π=4x10^3 à 5x10^4 Pa), les vésicules rétrécissent en perdant de l'eau. La vitesse de diminution des rayons est $\dot{R} = -P\dfrac{\Pi}{p_0}$. La valeur déduite de la perméabilité à l'eau de la lécithine d'œuf (EPC) est $P \approx 4\times10^{-3}$ cm/s. Ce type d'expérience nécessite de pouvoir observer continûment les vésicules tout en échangeant la solution aqueuse (donc en limitant les flux hydrodynamiques). Une chambre d'observation spéciale avec une paroi poreuse a été réalisée dans [37]. Dans ce cas, les GUV ont été formées dans du glucose 50 mOs/kg, puis équilibrées avec du glucose entre 60 et 300 mOs/kg. La perméabilité mesurée est un peu plus faible ($P \approx 10^{-3}$ cm/s), mais la composition lipidique est aussi légèrement différente (EPC/dicétylphosphate/cholestérol 7/2/1). La diminution du rayon (jusqu'à 50%) libère un grand excès de surface : la vésicule devrait être complètement flasque. En fait l'excès est réparti par le bourgeonnement d'une multitude de petites vésicules reliées à la vésicule initiale. La forme d'équilibre est ainsi globalement sphérique et de tension non nulle.

L'expérience opposée de gonflement osmotique dans un milieu hypotonique est plus délicate à réaliser. Un écart de concentration aussi faible que 10 mM – solution plus diluée à l'extérieur – induit une surpression à l'intérieur de la vésicule $\Delta p = 2\times10^4$ Pa. En égalant avec la loi de Laplace $\Delta p = \dfrac{2\sigma}{R}$, on estime la tension de surface ainsi créée à $\sigma = 10^{-1}$ N/m pour une vésicule de rayon R=10 µm. Cette tension étant de l'ordre de sa tension de rupture σ_r, la bicouche ne peut pas supporter un tel écart des pressions interne et externe. Cependant, dans les expériences, on n'observe pas les vésicules éclater comme des ballons trop gonflés. Il est plus probable en fait que la tension de surface n'atteigne jamais cette valeur, parce qu'elle est relaxée bien avant. Au chapitre IV, on étudie en détail des pores transitoires dans les GUV induits par des tensions de surface $\sigma \approx 10^{-5}$ N/m. On peut alors faire le parallèle avec ce qui se passe dans un choc osmotique. Si la membrane se rompt par endroits, l'excès de soluté à l'intérieur peut s'échapper rapidement. Quand l'équilibre osmotique est atteint, la membrane se referme, et la vésicule retrouve un état de tension de surface très faible. En conséquence, la perméabilité de la bicouche à l'eau ne peut être mesurée sur des GUV que par dégonflement osmotique, mais pas par gonflement.

3.2 Aspiration par une micropipette

Le choc osmotique est finalement une manipulation très brutale, puisqu'un gradient de concentration d'à peine 40 mM représente déjà une différence de pression d'un bar de part et d'autre de la membrane. Pour appliquer une pression bien plus faible, et mieux contrôlée, la méthode de choix est celle des micropipettes, développée par E. Evans[38]. Elle permet de mettre la vésicule en légère dépression hydrostatique par rapport à son milieu extérieur. La micropipette est un fin tube capillaire, dont l'extrémité a un diamètre D_p≈5 µm, et avec lequel on aspire une portion de la membrane. La dépression Δp est contrôlée par une dénivellation et peut être aussi faible que 0.1 Pa (10 µm d'eau).

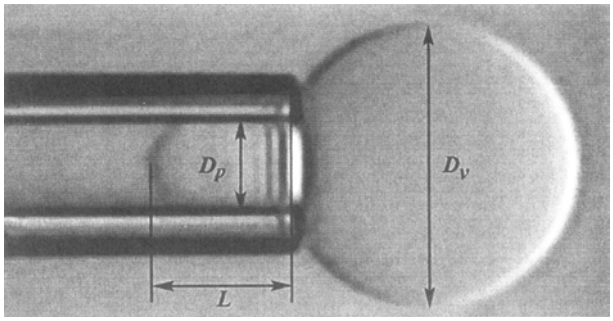


Figure 10 : Aspiration d'une partie de la vésicule dans une micropipette[39].

L'aspiration fait pénétrer une extension tubulaire de la membrane à l'intérieur de la pipette. Des changements de la longueur cylindrique L, on mesure très précisément les variations de surface de la vésicule. La tension σ imposée à la membrane est déduite simplement à partir de la loi de Laplace. Par cette méthode, on peut sonder l'élasticité de la membrane sur quatre ordres de grandeur de tension, entre 10^{-6} et 10^{-2} N/m. L'augmentation de la surface projetée A_p par la tension latérale σ présente deux régimes : d'abord l'élasticité entropique à très faible σ (le dépliement des fluctuations), puis l'élasticité classique de Hook, lorsque σ n'est plus négligeable devant le module K_s d'étirement des têtes polaires :

Eq. (4)
$$\frac{A_p - A_p^0}{A_p^0} = \frac{kT}{8\pi K_b}\ln\left(1 + \frac{A_p^0}{24\pi K_b}\sigma\right) + \frac{\sigma}{K_s}$$

Par ailleurs, un bras micromanipulateur contrôle très finement les déplacements de la micropipette. Une fois que la vésicule est tenue par une faible aspiration, de nombreuses expériences peuvent être envisagées, avec l'avantage de mesurer en permanence la tension de la membrane.

3.3 Adhésion sur une surface

En vue de mimer l'adhésion cellulaire, on fabrique des substrats modèles, bien caractérisés, sur lesquels les vésicules géantes adhèrent[40].

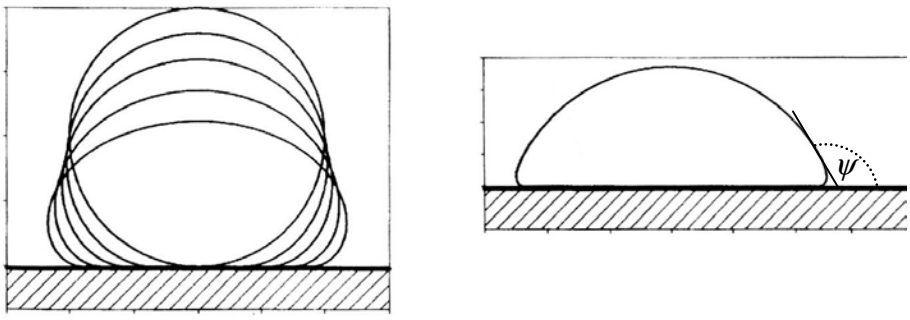


Figure 11 : Profils simulés d'une vésicule géante adhérant sur un substrat solide, dans le régime d'adhésion faible (à gauche), et celui d'adhésion forte (à droite), d'après [41].

Les forces attractives entre la membrane et la surface solide créent un travail d'adhésion *W*, qui est l'énergie par unité de surface gagnée en les rapprochant l'une de l'autre depuis l'infini jusqu'à la distance d'équilibre[1]. La vésicule adopte une forme résultant de la compétition entre l'énergie d'adhésion E_W, qui tend à accroître l'aire de contact, et l'énergie de courbure E_b qui s'oppose à la déformation. Les profils de la Figure 11 représentent une vésicule initialement sphérique de rayon *R*, soumise à des valeurs de *W* croissantes. A gauche elle reste dans le régime d'adhésion faible, défini par $W < K_b / R^2$. On observe sur ces simulations une augmentation progressive à la fois de l'aire de contact et de la courbure de la membrane au bord de la zone d'adhésion. Dans le régime d'adhésion forte, la forme de la vésicule ressemble à celle d'une goutte qui mouille partiellement une surface solide. Cependant, contrairement à un bord de goutte, celui de la vésicule possède un rayon de courbure non nul, donné par la loi $R_c = \sqrt{K_b / W}$. L'analogie avec le mouillage peut néanmoins être faite en mesurant un angle de contact ψ, entre la tangente à la membrane dans sa partie sphérique et la surface – dans la convention du mouillage, l'angle de contact serait plutôt ($\pi - \psi$). La tension σ de la bicouche vérifie une relation qui ressemble à l'équation de Young-Dupré en mouillage partiel :

Eq. (5) $$W = \sigma(1 - \cos\psi)$$

Mais contrairement à une goutte dont la tension de surface γ est une caractéristique du liquide, la vésicule adopte une tension latérale σ qui n'est pas connue *a priori*. L'angle de contact ψ seul ne suffit donc pas à mesurer l'énergie d'adhésion *W* sur un substrat donné. Loin de la surface, la membrane est bien décrite par une calotte sphérique, car l'énergie est dominée par la tension. Par contre, au voisinage de la zone d'adhésion, c'est l'énergie de courbure qui domine, et la membrane rejoint tangentiellement la surface. Le raccord entre les deux régimes se fait à une distance :

Eq. (6) $$\xi_\sigma = \sqrt{K_b / \sigma}\,.$$

Le profil théorique *y*(*x*) de la distance entre la membrane et la surface est représenté sur la Figure 12. Une expression approchée est $y(x) = \xi_\sigma \exp(x/\xi_\sigma)$. Si on mesure expérimentalement la longueur de raccord ξ_σ, on déduit une valeur de la tension quand on connaît par ailleurs le module de courbure. Cependant, pour une tension égale seulement à 10^{-6} N/m, on estime $\xi_\sigma \approx \sqrt{10^{-19}/10^{-6}}$ m, soit une taille inférieure au micron. Cette mesure est donc à la limite de la résolution optique. On espère une meilleure précision en mesurant plutôt le rayon de courbure R_c. Dans la limite des petits angles ψ<<1, on a en effet $W \approx \sigma\psi^2/2$ et donc $R_c \approx \sqrt{2}\xi_\sigma/\psi >> \xi_\sigma$. A partir des mesures de ψ et ξ_σ, par une méthode interférentielle (RICM, voir chapitre III), des énergies d'adhésion *W* comprises entre 10^{-8} et

[1] Il reste toujours un film d'eau d'épaisseur *h* confiné entre la membrane et le solide. Cette distance, qui dépend de la nature des interactions, peut varier entre 1 et 50 nm.

10^{-6} N/m ont été obtenues pour des vésicules chargées sur une surface de signe opposé, de densité de charges variable[42].

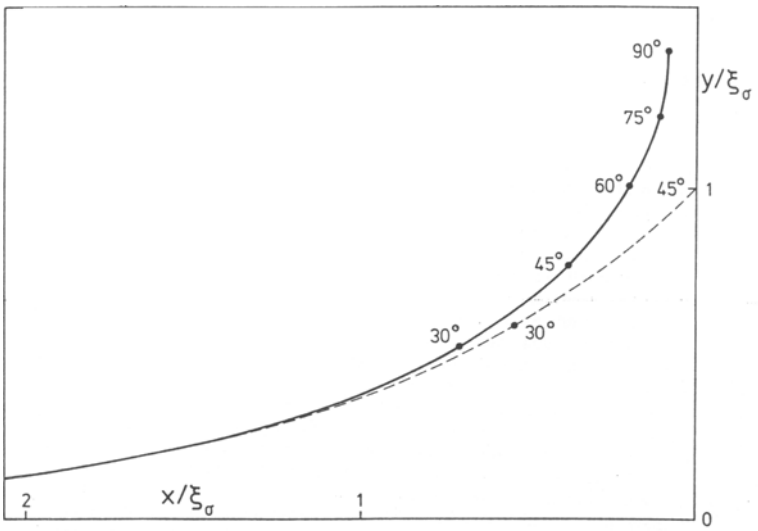


Figure 12 : Abaque donnant le profil du raccord tangentiel entre une membrane et une surface adhésive[43]. Le profil en pointillés est une approximation exponentielle. Les courbes sont paramétrées par l'angle de contact extérieur ψ.

3.4 Champ électrique

a) Electroporation par une impulsion électrique

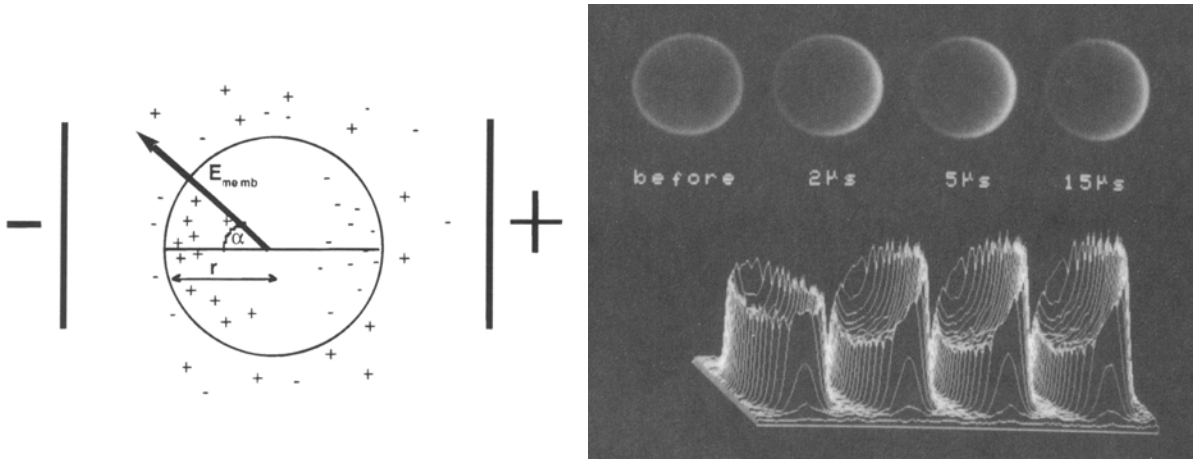


Figure 13 : à gauche, distribution des ions à l'intérieur d'une vésicule ou d'une cellule soumise au champ électrique créé entre deux plaques, en vue de l'électroporation[44] ; à droite, champ électrique transmembranaire dans cette même géométrie, visualisé en microscopie de fluorescence, grâce à la sonde de potentiel RH292 ([45], la cellule est un œuf d'oursin).

Dans les expériences d'électroporation, des cellules ou des vésicules sont placées entre deux plaques et soumises à un champ électrique E_{ext} de l'ordre de 10^5 V/m pendant une courte durée, entre

0.1 et 10 ms. Schématiquement, la bicouche lipidique est un isolant électrique séparant deux liquides conducteurs. Les ions en solution s'accumulent de part et d'autre de la membrane, et créent ainsi un champ électrique local entre les deux feuillets. Sa modulation, le long de la bicouche, peut être visualisée en microscopie grâce à une sonde fluorescente sensible au potentiel (Figure 13). Le champ transmembranaire est maximal aux pôles, et exhibe une variation sinusoïdale en fonction de l'angle polaire α. Par ailleurs, le champ local est amplifié d'un facteur de l'ordre de $R/e \approx 10^4$ par rapport au champ externe appliqué. Le claquage de la bicouche se produit toujours aux pôles, et le potentiel transmembranaire s'effondre dès qu'une conduction électrique s'établit à travers des pores.

b) Déformation sous champ alternatif

Un champ d'intensité plus faible ($E_{ext} \approx 10^4$ V/m) peut être appliqué continûment, sans provoquer la rupture de la bicouche. Dans ce cas, la vésicule a aussi le temps d'adapter sa forme en réaction aux forces de polarisation, créées par les charges électriques qui décorent la membrane. Initialement sphérique, une vésicule acquiert une déformation ellipsoïdale, qui résulte de la compétition entre l'énergie électrostatique et l'énergie de courbure[46]. La contrainte exercée aux pôles est $\sigma_e \approx e(\varepsilon_s - \varepsilon_m)\varepsilon_0 E_{memb}^2$, où ε_s est la constante diélectrique[1] de la solution (≈78) et ε_m celle de la membrane (≈2). On évalue ainsi à 10^{-5} N/m (pour $E_{memb} \approx 10^7$ V/m) la tension latérale qui provoque l'allongement de la vésicule (ellipsoïde *prolate*). Cette description simplifiée n'est valable que dans une certaine gamme de fréquences du champ alternatif[47]. A basse fréquence (<5Hz), on observe en plus des déplacements par électrophorèse dus à la charge globale de la vésicule. A haute fréquence (>kHz) la conductivité électrique de l'eau chute, et les charges de polarisation changent de signe par rapport au schéma de la Figure 13. La vésicule devient alors écrasée aux pôles (ellipsoïde *oblate*).

3.5 Champ magnétique

Les forces magnétiques peuvent également conduire à des déformations ellipsoïdales. Cependant, l'ellipticité d'une vésicule classique, placée dans un champ fort *B*=1 Tesla, n'est pas décelable expérimentalement[48]. Pour obtenir des effets importants avec un champ magnétique de faible intensité, on fabrique des vésicules dont la solution interne est un ferrofluide, c'est-à-dire une solution colloïdale de nanoparticules d'oxyde de fer, magnétiques et chargées[49]. L'énergie magnétique d'une telle vésicule est $E_m \approx \chi R^3 B^2 / \mu_0$ [2]. La susceptibilité magnétique du ferrofluide encapsulé est typiquement $\chi \approx 10^{-3}$, d'après les mesures locales par magnétophorèse[3]. On calcule alors

---

[1] La permittivité électrique du vide est $\varepsilon_0 \cong 1/(36\pi \times 10^9)$ SI

[2] La perméabilité magnétique du vide est $\mu_0 = 4\pi \times 10^{-7}$ SI

[3] Dans un gradient de champ magnétique contrôlé, la vésicule se déplace à vitesse constante, qui résulte de l'équilibre entre la friction visqueuse et la force magnétique. On en déduit une mesure de χ *in situ*.

$E_m \approx 10^{-14}$ J pour un champ aussi faible que B=0.04 Tesla. Cette valeur est bien supérieure à l'énergie de courbure $E_b = 2\pi K_b \approx 10^{-18}$ J . La vésicule est donc dans un état de tension élevée, qu'on évalue à $\sigma \approx E_m / 4\pi R^2 \approx 10^{-5}$ N/m . Les fluctuations ont en effet été absorbées dans l'augmentation de surface entre la sphère et un ellipsoïde de même volume.

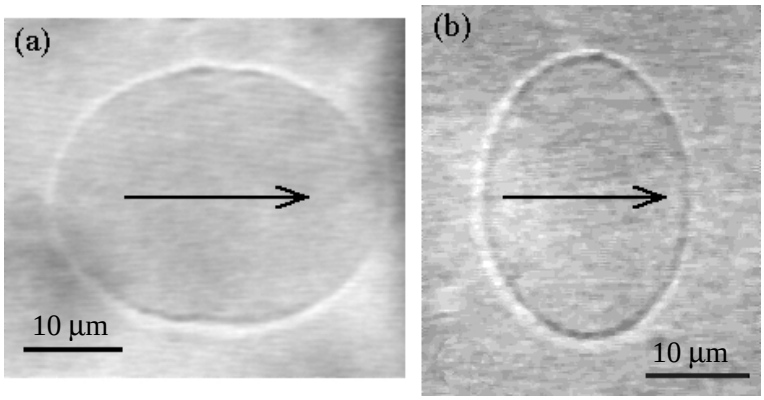


Figure 14 : Déformation d'une vésicule remplie d'un ferrofluide, dans un champ magnétique B=0.04 Tesla, dirigé selon la flèche[16]. L'excentricité de l'ellipsoïde change de signe suivant la force ionique (a, *prolate* ; b, *oblate*).

Un effet supplémentaire a été observé quand, au lieu d'un ferrofluide ionique classique, on utilise pour préparer les vésicules un ferrofluide de concentration réduite en ions libres (i.e. non adsorbés sur les particules). La déformation sous champ magnétique est toujours ellipsoïdale, mais l'excentricité passe d'un type *prolate* à *oblate*. Nous avons montré que cette transition de forme est effectivement contrôlée par la concentration C_s de l'électrolyte. Il faut tenir compte en effet de la répulsion électrostatique entre les nanoparticules (qui portent chacune en moyenne 25 charges élémentaires négatives) et la bicouche lipidique (le potentiel zeta de vésicules de DOPC est légèrement négatif, cf. V.1.2). Nous avons modélisé la courbure spontanée c_0 à partir de la double-couche électrostatique, à laquelle les particules contribuent du côté interne de la membrane, mais pas sur la face externe :

Eq. (7)
$$c_0 \approx \frac{2\kappa_{\text{ext}}^2}{3}\left(\kappa_{\text{ext}}^{-1} - \kappa_{\text{int}}^{-1}\right)$$

où κ_{ext}^{-1} et κ_{int}^{-1} désignent les longueurs d'écran électrostatiques, respectivement à l'extérieur et à l'intérieur de la vésicule magnétique.

En présence du champ, les particules sont attirées vers les pôles, ce qui diminue localement c_0. La forme *oblate* aplatie aux pôles est favorisée par cette anisotropie magnétique de c_0. Cet effet n'est pas rencontré pour de fortes concentrations en sel, car l'écrantage électrostatique sur le feuillet interne de la bicouche est alors dominé par les ions libres, et non par les particules.

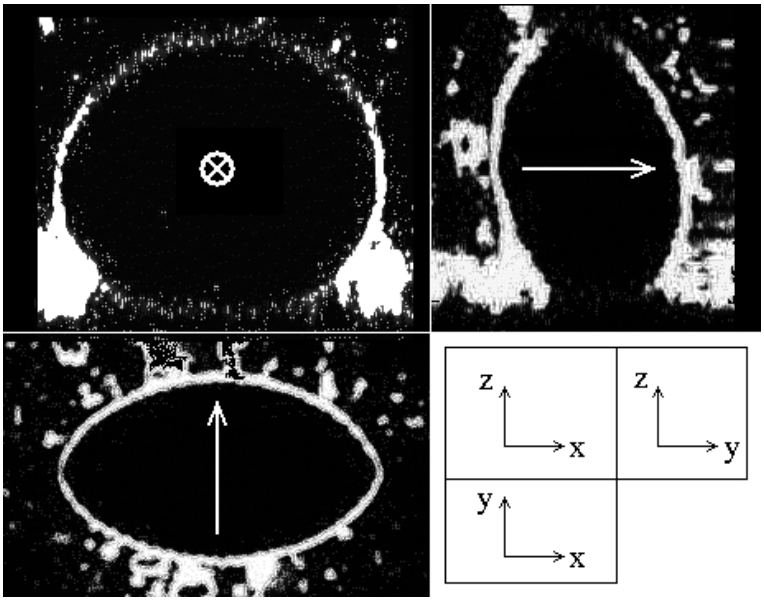


Figure 15 : Vésicule magnétique *oblate* dans ses trois plans de coupe principaux, d'après les sections de fluorescence. La flèche indique la direction du champ magnétique, d'intensité *B*=0.02 Tesla.

3.6 Gradient de densité

La solution interne des vésicules peut avoir une différence de densité $\Delta\rho$ par rapport au liquide porteur. Dans les expériences, on utilise couramment le poids des vésicules (ou au contraire la poussée d'Archimède) pour les approcher d'une surface. Pour cela, des solutions équimolaires de sucrose et de glucose assurent le gradient de densité. Les vésicules magnétiques aussi sont plus denses que le milieu extérieur, car elles contiennent une fraction élevée de particules d'oxyde. En plus de la force extérieure, dirigée vers le bas ou vers le haut, une déformation de la vésicule est attendue. Pour l'estimer on utilise encore l'énergie de courbure, qu'on compare à l'énergie gravitationnelle. On obtient un nombre sans dimension[50] : $g = g_0 \Delta\rho R^4 / K_b$. Il est déjà égal à 1 pour une faible différence de densité $\Delta\rho = 1\,\mathrm{kg/m^3}$ et un rayon *R*=10 μm. La variation avec *R* est ensuite extrêmement rapide. Les formes des vésicules ont donc presque toujours une correction due à la gravité. C'est le cas sur la Figure 15, où l'on observe que la symétrie de révolution autour du champ magnétique est légèrement violée à cause d'un tassement vers le bas de la vésicule.

3.7 Cisaillement

Récemment, plusieurs études théoriques sur le comportement des vésicules géantes dans un flux de cisaillement ont été réalisées, dans le but de modéliser les mouvements de roulement et de glissement des cellules sanguines (leucocytes par exemple) dans les vaisseaux[51-53]. Elles prévoient qu'une vésicule adhérant sur un substrat, selon une énergie d'adhésion *W* par unité de surface, et soumise par ailleurs à un cisaillement de valeur $\dot{\gamma}$, se met en mouvement à vitesse *V* constante, tout en subissant une déformation globale asymétrique. Tiré par la friction visqueuse, l'avant de la vésicule acquiert un

rayon de courbure (R_+) plus grand que celui de l'arrière (R_-), qui reste plaqué sur la surface par l'adhésion. Au dessus d'une valeur critique du flux, une transition de détachement est attendue. C'est tout à fait par hasard que nous avons vérifié expérimentalement la première conclusion de ce modèle, à savoir la déformation asymétrique. Pour une raison que l'on verra au chapitre IV, on prépare des vésicules dans un solvant plus visqueux que l'eau pure, un mélange d'eau et de glycérol. Il est alors impératif de les observer dans une cellule bien fermée, entre lame et lamelle. En effet, dès qu'une fuite se présente accidentellement, le flux de solvant déplace et déforme les vésicules. Leur vitesse de dérive reste néanmoins suffisamment faible (typiquement $V = 10^{-1}$ µm/s) pour acquérir des sections de fluorescence dans différents plans (*xy*), sans effet de bougé notable. Les coupes verticales (*xz*) et (*yz*) de la vésicule, calculées à partir des images expérimentales, ressemblent assez au profil théorique.

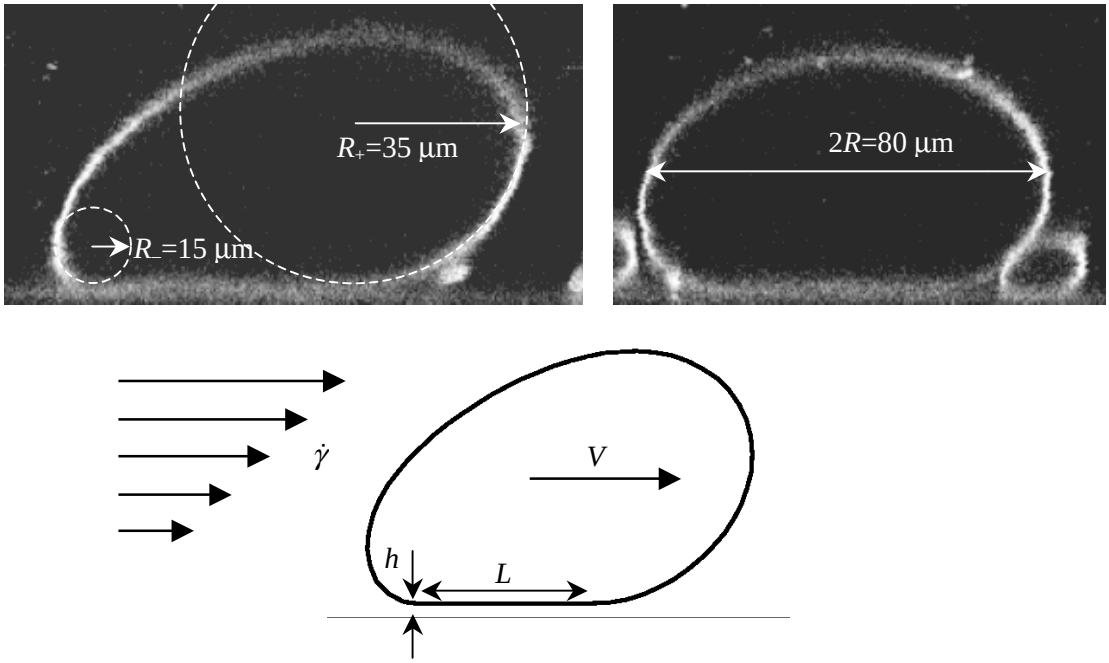


Figure 16 : Vésicule en adhésion faible déformée par un flux hydrodynamique ; en haut, sections (*xz*) et (*yz*) obtenues à partir d'images expérimentales dans le plan (*xy*), dans un solvant de viscosité η=32 cPoise ; en bas, profil issu d'une simulation numérique[54].

En raison de la nature incontrôlée du flux, la valeur du cisaillement n'est pas mesurée. On peut cependant l'évaluer d'après la vitesse d'entraînement[1] V=0.1 µm/s, le rayon R=40 µm et l'espace estimé entre la vésicule et la surface h≈0.05 µm, d'où $\dot{\gamma} = V/\sqrt{hR} \approx 7\times10^{-2}$ s^{-1}.

[1] La vésicule est assimilée à un cylindre de longueur infinie, en contact avec la surface sur une largeur $L \approx \sqrt{hR}$. La force visqueuse qui tire la vésicule est de l'ordre de $F \approx \eta R\dot{\gamma}$. La dissipation visqueuse due au fluide qui s'écoule sous la vésicule est $T\dot{S} \approx \eta(V/h)^2 Lh$. On l'égale à la puissance motrice FV, d'où $V \approx \dot{\gamma}\sqrt{hR}$.

Par un heureux hasard, nous avons pu observer cette déformation sous flux pour deux raisons dues aux conditions expérimentales : d'une part la viscosité élevée du solvant, $\eta = 3\times10^{-2}$ Nsm^{-2} ; d'autre part, l'adhésion très faible sur la surface, constituée simplement d'un verre propre. La différence entre les courbures expérimentales à l'arrière et à l'avant est $R_-^{-1} - R_+^{-1} = (1/15 - 1/35)\,\mu\text{m}^{-1} \approx 4\times10^4$ m^{-1}. La théorie prévoit $R_-^{-1} - R_+^{-1} = \eta\dot{\gamma}/W_m$ où $W_m = \left(W^3 K_b / R^2\right)^{\frac{1}{4}}$, une valeur intermédiaire entre les énergies d'adhésion et de courbure. En utilisant les grandeurs expérimentales, on calcule $W_m = 5\times10^{-8}$ N/m, puis $W = 5\times10^{-7}$ N/m. L'origine de cette faible adhésion pourrait très bien être simplement l'énergie gravitationnelle qui, rapportée à l'unité de surface, est de l'ordre de $W_g = g_0 \Delta\rho R^2 \approx 2\times10^{-7}$ N/m.

3.8 Pinces optiques

Dans la trousse à outils du biophysicien, les « pinces optiques » font figure de scalpel à l'échelle du microscope optique, car il s'en sert pour de nombreuses micromanipulations : pour appliquer ou mesurer des forces (étirement, courbure,…), pour assembler ou bien au contraire couper des objets. Dans les expériences de R. Bar-Ziv et E. Moses, le faisceau d'un laser argon (raie verte 488 ou 514 nm) est focalisé directement sur la membrane d'une vésicule géante. Après une période d'application d'environ 100 s, les ondulations thermiques ont entièrement disparu. La vésicule, qui a perdu environ 10% de sa surface, est maintenant parfaitement sphérique. L'énergie d'un faisceau optique de 20 mW focalisé sur environ 1 μm^2 est compatible avec une tension de surface $\sigma \approx 10^{-6}$ N/m. L'interaction précise entre les molécules et la lumière n'est pas bien comprise. Le piège optique agirait comme un puits d'attraction des lipides, qui les dégrade et les évacue sous forme de micelles microscopiques.

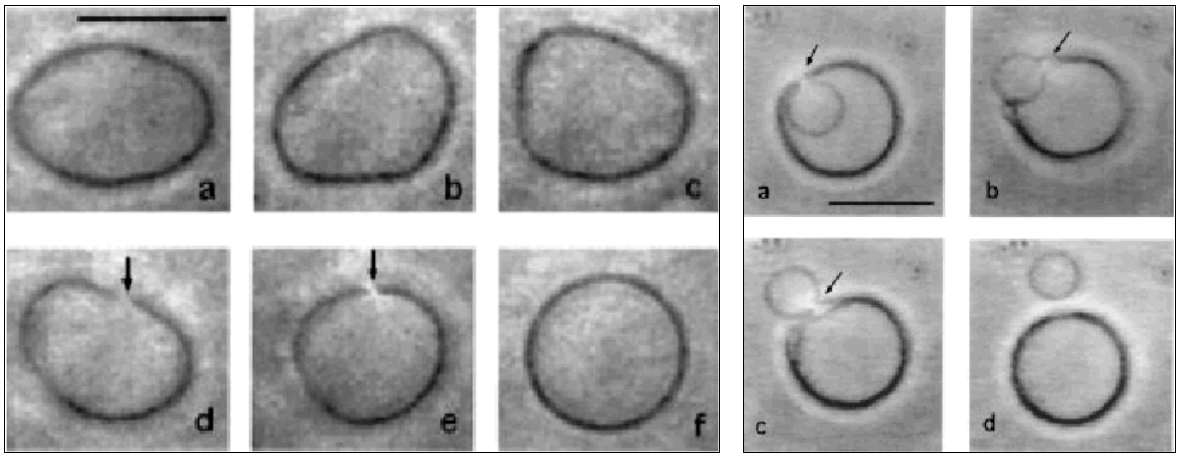


Figure 17 : L'application d'une pince optique sur la membrane d'une vésicule (au point indiqué par la flèche) la rend sphérique et tendue au bout d'environ 100 s (cadre de gauche). Dans une deuxième expérience (cadre de droite), le laser est appliqué au point de contact entre une grande vésicule géante bilamellaire et une vésicule plus petite encapsulée. La mise sous tension déclenche l'expulsion de la petite vésicule[55]. Les barres d'échelle mesurent 10 μm.

I.4 Références du Chapitre I

1. Israelachvili, J. *Aggregation of amphiphilic molecules into micelles, bilayers, vesicles and biological membranes* in *Intermolecular & surfaces forces* 366-394 (Academic Press, San Diego, 1991).
2. Schroeder, F. et al. Membrane cholesterol dynamics: cholesterol domains and kinetic pools. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **196**, 235-252 (1991).
3. Walde, P. *Enzymatic reactions in giant vesicles* in *Giant vesicles* (eds. Luisi, P. L. & Walde, P.) 297-311 (John Wiley & Sons, Chichester, 2000).
4. Brochard-Wyart, F., de Gennes, P.-G. & Pfeuty, P. Surface tension and deformations of membrane structures: relation to two-dimensional phase transitions. *J. Physique* **37**, 1099-1104 (1976).
5. Fourcade, B., Mutz, M. & Bensimon, D. Experimental and theoretical study of toroidal vesicles. *Phys. Rev. Lett.* **68**, 2551-2554 (1992).
6. Helfrich, W. Elastic properties of lipid bilayers: theory and possible experiments. *Z. Naturforsch.* **28c**, 693-703 (1973).
7. Farge, E. in *Thèse de Biophysique Moléculaire: Changements et fluctuations de courbure: I-Morphologies de liposomes; II-Ondulations de l'actine* (Univ. Paris 7, Denis Diderot, Paris, 1993).
8. Farge, E. & Devaux, P. F. Shape changes of giant liposomes induced by an asymmetric transmembrane distribution of phospholipids. *Biophys. J.* **61**, 347-357 (1992).
9. Lee, J. B., Petrov, P. G. & Döbereiner, H.-G. Curvature of zwitterionic membranes in transverse pH gradients. *Langmuir* **15**, 8543-8546 (1999).
10. Carrion, F. J., de la Maza, A. & Parra, J. L. The influence of ionic strength and lipid bilayer charge on the stability of liposomes. *J. Colloid Interface Sci.* **164**, 78-87 (1994).
11. Döbereiner, H.-G., Selchow, O. & Lipowsky, R. Spontaneous curvature of fluid vesicles induced by trans-bilayer sugar asymmetry. *Eur. Biophys. J.* **28**, 174-178 (1999).
12. Akutsu, H. & Seeling, J. Interaction of metal ions with phosphatidylcholine bilayer membranes. *Biochemistry* **20**, 7366-7373 (1981).
13. Petrov, P. G., Lee, J. B. & Döbereiner, H.-G. Coupling chemical reactions to membrane curvature: a photochemical morphology switch. *Europhys. Lett.* **48**, 435-441 (1999).
14. Dinsmore, A. D., Wong, D. T., Nelson, P. & Yodh, A. G. Curvature-induced forces and particle-induced curvature. *Phys. Rev. Lett.* **80**, 409-412 (1998).
15. Lipowsky, R. & Döbereiner, H.-G. Vesicles in contact with nanoparticles and colloids. *Europhys. Lett.* **43**, 219-225 (1998).
16. Sandre, O., Ménager, C., Prost, J., Cabuil, V., Bacri, J.-C. & Cebers, A. Shape transition of giant liposomes induced by an anisotropic spontaneous curvature. *Phys. Rev. E* **62**, 3865-3870 (2000).
17. Seifert, U. *Giant vesicles: a theoretical perspective* in *Giant vesicles* (eds. Luisi, P. L. & Walde, P.) 71-91 (John Wiley & Sons, Chichester, 2000).
18. Seifert, U., Berndl, K. & Lipowsky, R. Shape transformation of vesicles: phase diagram for spontaneous curvature and bilayer-coupling models. *Phys. Rev. A* **44**, 1182-1202 (1991).
19. Wintz, W., Döbereiner, H.-G. & Seifert, U. Starfish vesicles. *Europhys. Lett.* **33**, 403-408 (1996).
20. Miao, L., Seifert, U., Wortis, M. & Döbereiner, H.-G. Budding transitions of fluid-bilayer vesicles: the effect of area-difference elasticity. *Phys. Rev. E* **49**, 5389-5407 (1994).

21. Mui, B. L.-S., Döbereiner, H.-G., Madden, T. D. & Cullis, P. R. Influence of transbilayer area asymmetry on the morphology of large unilamellar vesicles. *Biophys. J.* **69**, 930-941 (1995).

22. Brochard-Wyart, F. & Lennon, J.-F. Frequency spectrum of the flicker phenomenon in erythrocytes. *J. Physique* **36**, 1035-1047 (1975).

23. Servuss, R.-M., Harbich, W. & Helfrich, W. Measurement of the curvature-elastic modulus of egg lecithin bilayers. *Biochim. Biophys. Acta* **436**, 900-903 (1976).

24. Helfrich, W. & Servuss, R.-M. Undulations, steric interaction and cohesion of fluid membranes. *Il Nuoco Cimento* **3D**, 137-151 (1984).

25. Schneider, M. B., Jenkins, J. T. & Webb, W. W. Thermal fluctuations of large quasi-spherical bimolecular phospholipid vesicles. *J. Physique* **45**, 1457-1472 (1984).

26. Zilker, A., Ziegler, M. & Sackmann, E. Spectral analysis of erythrocyte flickering in the 0.3-4 um-1 regime by microinterferometry combined with fast image processing. *Phys. Rev. A* **46**, 7998-8001 (1992).

27. Duwe, H. P., Kaes, J. & Sackmann, E. Bending elastic moduli of lipid bilayers: modulation by solutes. *J. Phys. France* **51**, 945-962 (1990).

28. Milner, S. T. & Safran, S. A. Dynamical fluctuations of droplet microemulsions and vesicles. *Phys. Rev. A* **36**, 4371-4379 (1987).

29. David, F. & Leibler, S. Vanishing tension of fluctuating membranes. *J. Physique II* **1**, 959 (1991).

30. Döbereiner, H.-G., Evans, E., Seifert, U. & Wortis, M. Spinodal fluctuations of budding vesicles. *Phys. Rev. Lett.* **75**, 3360-3363 (1995).

31. Faucon, J. F., Mitov, M. D., Méléard, P., Bivas, I. & Bothorel, P. Bending elasticity and thermal fluctuations of lipid membranes. Theoretical and experimental requirements. *J. Phys. France* **50**, 2389-2414 (1989).

32. Prost, J., Manneville, J.-B. & Bruinsma, R. Fluctuation-magnification of non-equilibrium membranes near a wall. *Eur. Phys. J. B* **1**, 465-480 (1998).

33. Evans, E. & Rawicz, W. Entropy-driven tension and bending elasticity in condensed-fluid membranes. *Phys. Rev. Lett.* **64**, 2094-2097 (1990).

34. Wolf, A. V., Brown, M. G. & Prentiss, P. G. *Concentrative properties of aqueous solutions: conversion tables* in *CRC Handbook of chemistry and physics, 65th Ed* (ed. Weast, R. C.) D-222-265 (CRC Press, Boca Raton, 1984).

35. Gevc, G. *Phospholipids handbook* (Marcel Dekker, New York, 1993).

36. Boroske, E., Elwenspoek, M. & Helfrich, W. Osmotic shrinkage of giant egg-lecithin vesicles. *Biophys. J.* **34**, 95-109 (1981).

37. Bernard, A.-L. in *Thèse de Chimie Physique: Perméabilité de bicouches lipidiques vésiculaires soumises à une déformation: perceuse moléculaire et autres exemples* (Univ. Paris 6, Pierre et Marie Curie, Paris, 1999).

38. Kwok, R. & Evans, E. Thermoelasticity of large lecithin bilayer vesicles. *Biophys. J.* **35**, 637-652 (1981).

39. Needam, D. & Zhelev, D. V. *Use of micropipet manipulation techniques to measure the properties of giant lipid vesicles* in *Giant vesicles* (eds. Luisi, P. L. & Walde, P.) 103-147 (John Wiley & Sons, Chichester, 2000).
40. Sackmann, E. Supported membranes: scientific and practical applications. *Science* **271**, 43-48 (1996).
41. Seifert, U. & Lipowsky, R. Adhesion of Vesicles. *Physical Review A* **42**, 4768-4771 (1990).
42. Nardi, J., Bruinsma, R. & Sackmann, E. Adhesion-induced reorganization of charged fluid membranes. *Phys. Rev. E* **58**, 6340-6354 (1998).
43. Servuss, R.-M. & Helfrich, W. Mutual adhesion of lecithin membranes at ultralow tensions. *J. Phys. France* **50**, 809-827 (1989).
44. Bradley, J.-C., Guedeau-Boudeville, M.-A., Jandeau, G. & Lehn, J.-M. Toposomes bearing stable perforations by the action of an electric field on partially polymerized giant vesicles. *Langmuir* **13**, 2457-2462 (1997).
45. Kinosita, K. J. et al. Electroporation of cell membrane visualized under a pulse-laser fluorescence microscope. *Biophys. J.* **53**, 1015-1019 (1988).
46. Kummrow, M. & Helfrich, W. Deformation of giant lipid vesicles by electric fields. *Phys. Rev. A* **44**, 8356-8360 (1991).
47. Mitov, M. D., Méléard, P., Winterhalter, M., Angelova, M. I. & Bothorel, P. Electric-field-dependant thermal fluctuations of giant vesicles. *Phys. Rev. E* **48**, 628-631 (1993).
48. Helfrich, W. Lipid bilayer spheres: deformation and birefringence in magnetic fields. *Phys. Lett.* **43A**, 409-410 (1973).
49. Bacri, J.-C., Cabuil, V., Cebers, A., Ménager, C. & Perzynski, R. Flattening of ferro-vesicle undulations under a magnetic field. *Europhys. Lett.* **33**, 235-240 (1996).
50. Kraus, M., Seifert, U. & Lipowsky, R. Gravity-induced shape transformations of vesicles. *Europhys. Lett.* **32**, 431-436 (1995).
51. Cantat, I. & Misbah, C. Dynamics and stability laws for adhering vesicles in haptotaxis. *Phys. Rev. Lett.* **83**, 235-238 (1999).
52. Cantat, I. & Misbah, C. Lift force and dynamical unbinding of adhering vesicles under shear flow. *Phys. Rev. Lett.* **83**, 880-883 (1999).
53. Seifert, U. Hydrodynamic lift on bound vesicles. *Phys. Rev. Lett.* **83**, 876-879 (1999).
54. Cantat, I. in *Thèse de Physique: "Dynamique de vésicules en adhésion"* (Univ. Joseph Fourier, Grenoble, 1999).
55. Bar-Ziv, R., Frisch, T. & Moses, E. Entropic Expulsion in Vesicles. *Phys. Rev. Lett.* **75**, 3481-3484 (1995).

Chapitre II: Fabrication des vésicules et des surfaces adhésives

II.1 Les méthodes de préparation des GUV

Quelle que soit la méthode de préparation, les vésicules résultent de l'hydratation progressive de lipides, initialement en poudre ou en solution dans un solvant organique. Dans les préparations de vésicules microscopiques (SUV, LUV), on cherche à casser les bicouches et à les disperser le plus possible (par extrusion dans un filtre poreux, ou agitation ultrasonore). Au contraire, pour préparer des GUV, on doit favoriser le « gonflement » de membranes d'épaisseur microscopique (bimoléculaire), mais de surface la plus large possible. Pendant la préparation de vésicules géantes, il faut donc favoriser les fusions de membranes et les préserver des ruptures. Il existe différents protocoles, qui comportent des variantes suivant les auteurs et les applications voulues. On rapporte ici celles qui ont été utilisées au cours de ce travail et qui ont donné les meilleurs résultats.

1.1 Conservation des lipides

Les phospholipides sont des produits sensibles à l'hydrolyse et à l'oxydation (tout particulièrement les lipides insaturés). On les conserve à –20°C, à l'abri de l'air et de l'humidité. Les produits commerciaux proviennent d'Avanti Polar Lipids[1], Sigma[2], Fluka[3] ou Molecular Probes[4]. Ils sont conditionnés sous argon, à l'état de poudre ou de solution dans le chloroforme. Pour limiter la durée de stockage, on achète les lipides par petite quantité (25 mg), qu'on renouvelle impérativement tous les deux mois pour les lipides diluants. Les lipides plus coûteux (fluorescents ou ligands) peuvent être conservés plus longtemps, car leurs produits de dégradation éventuels ne constituent qu'une très faible fraction de la bicouche finale. A l'ouverture, les flacons doivent être totalement décongelés pour éviter la condensation de l'humidité ambiante sur les produits. Les solutions mères de lipide sont préparées à 10 mg/mL dans le chloroforme. Pour éviter l'hydratation d'un lipide en poudre (qui se manifeste par un état pâteux), on le laisse le moins longtemps possible à l'air. Pour cela, on casse l'ampoule scellée ou le septum, on rince au chloroforme et on récupère la solution dans un pilulier (en verre brun) immédiatement fermé. La pesée du lipide se fait alors par différence.

---

[1] Revendeur Coger 79, rue des Morillons 75015 Paris tel 01-45-33-67-17 fax 01-45-33-71-04 – Références 850375 (18:1 PC = DOPC), 840875 (18:1 PA = DOPA), 850467 (18:0-18:1 PC = SOPC), 850356 (4ME 16:0 PC = DPhPC), 700000 (cholestérol), 880130 (18:1 PEG2 PE = DOPE-PEG_{2000}) et 870273 (18:1 Biotinyl Cap PE = DOPE-biotine)

[2] L'Isle d'Abeau-Chesnes BP701 38070 St Quentin Fallavier tel 04-74-82-28-00 fax 08-00-03-10-52 – Références P7212 (DOPC chloroforme, épuisé), P4578 (DOPC poudre), P2767 (DOPA)

[3] même adresse, Référence 43705 (DSPE-PEG_{2000})

[4] PoortGebouw, Rijnsburgerweg 10, 2333 AA Leiden, Pays Bas, tel 1-71-523-6850 fax 31-71-523-3419 – Références N-3786 (NBD-C6-HPC), H-3790 (perylene-PC), S-1109 (RH237) S-467 (Di-10-ASPPS, épuisé)

1.2 Gonflement spontané

Une solution organique d'un lipide pur ou d'un mélange de lipides est évaporée lentement, d'abord sous flux de gaz inerte et sec (azote ou argon), puis sous vide pour éliminer toute trace du solvant. Un film multilamellaire sec s'est déposé sur les parois du récipient. On ajoute alors la solution aqueuse de gonflement. Si le lipide est à l'état gel à l'ambiante, on chauffe au bain-marie pour être au-dessus de la température de fusion des chaînes T_m. Au bout d'un temps variable (de 15 min à 1–2h) on observe un voile blanc qui témoigne de la présence d'agrégats lipidiques en suspension. On contrôle au microscope qu'on a effectivement des vésicules géantes. Cette méthode conduit à des objets de tailles et de types très divers : vésicules oligolamellaires, dont la membrane est constituée d'un petit nombre de bicouches, vésicules emboîtées les unes dans les autres, vésicules très multilamellaires (figures de myéline, oignons). Les vésicules unilamellaires, reconnaissables au faible contraste de leur membrane et à leurs ondulations, sont rares. Différents conseils sont préconisés dans la littérature pour augmenter la proportion des GUV : dépôt du film lipidique sur un substrat de téflon rugueux au lieu du verre, pré-hydratation du lipide sous un flux d'argon humide juste avant le gonflement, etc.. Bien qu'elle ait été utilisée pendant longtemps (dans la plupart des articles sur les formes des vésicules !), cette méthode manque de reproductibilité, et oblige à ne s'intéresser qu'à une petite partie des objets formés. Elle reste utile pour préparer des vésicules en milieu trop salin pour utiliser la méthode électrique.

1.3 Electroformation

a) Principe de la méthode

Mise au point il y a quelques années[(1)], cette méthode très efficace est maintenant répandue dans de nombreux laboratoires. Elle consiste à appliquer un champ électrique, oscillant à basse fréquence (5 à 20 Hz), perpendiculairement au film lipidique[(2)]. La proportion des vésicules géantes unilamellaires dans la préparation est améliorée de façon spectaculaire. Le lipide est déposé directement sur les électrodes, au choix deux fils de platine, ou bien deux lames transparentes et conductrices. C'est cette deuxième variante que l'on a toujours utilisée. Plusieurs mécanismes électrocinétiques ont été proposés pour rendre compte de l'effet du champ sur la croissance des vésicules. Comme la méthode marche aussi bien avec des lipides neutres que des lipides chargés, la contribution de l'électrophorèse directe des membranes n'est pas seule responsable[(3)]. Sous l'effet des flux périodiques d'électro-osmose, induits dans la solution, la dernière bicouche empilée est déstabilisée, et forme par endroits des cloques. Ces objets deviennent pareils à des champignons, la partie sphérique enflant progressivement, par alimentation à partir du film lipidique. Mais ils ne sont véritablement qualifiés de vésicules qu'à partir du moment où le « pied » les reliant à l'électrode s'est détaché, et que la bicouche s'est refermée sur elle-même. L'unilamellarité des vésicules ainsi formées pourrait venir de ce mode de gonflement du film initialement multilamellaire, par l'effeuillage des bicouches, une à une. La grandeur et la faible polydispersité des diamètres (20 à 200 μm) est due à un phénomène de

mûrissement pendant la croissance. Les vésicules ont une petite taille quand elle commencent à « pousser » sur la surface (2 à 5 μm). Cependant, leur tension est élevée car le substrat auquel elles sont encore liées joue le rôle de réservoir de molécules de lipide. On observe alors de nombreux réarrangements où plusieurs vésicules fusionnent en une seule plus grosse (Figure 1). Au fur et à mesure qu'elles grossissent, les vésicules s'éloignent de la surface solide. Au final, la répartition des diamètres est étagée, des plus petits au plus grands en partant de l'électrode.

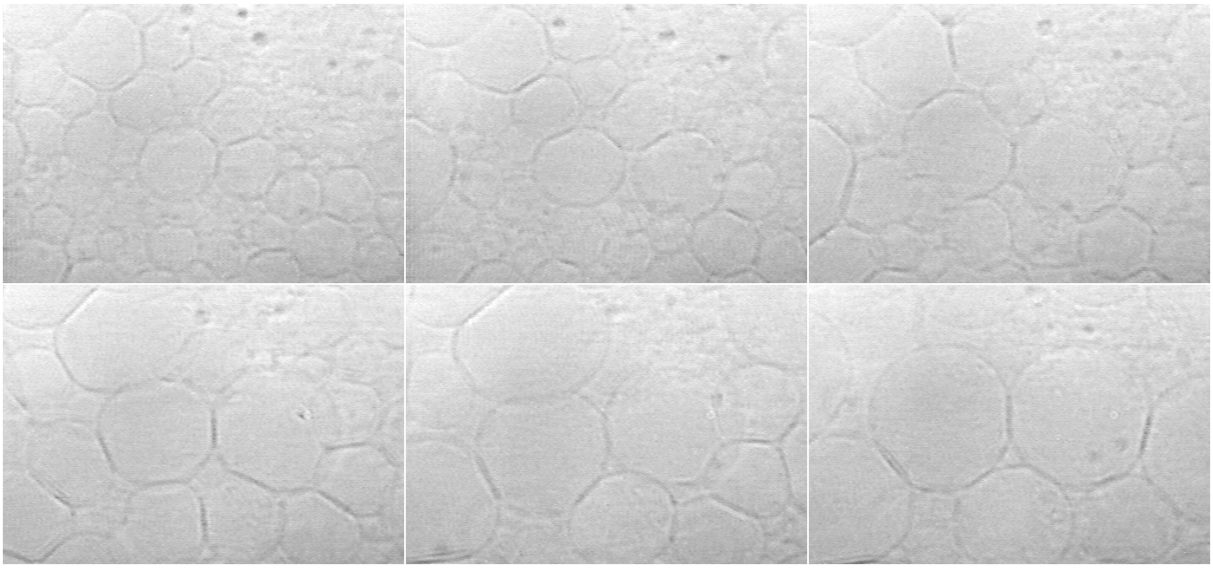


Figure 1 : Electroformation de vésicules de DOPC, dans une solution de glucose 50 mM et $Na^+N_3^-$ 0.5 mM, sous une tension sinusoïdale de 1 Volt à 10Hz. Les électrodes sont constituées par deux plaques transparentes et conductrices, parallèles au plan des images (prises toutes les 50 secondes).

b) Fabrication d'une chambre de préparation

L'oxyde d'indium dopé à l'étain (ITO pour « indium tin oxide ») est un conducteur électronique qui, en couche mince, a également une bonne transparence à la lumière visible. Le verre recouvert d'ITO est utilisé dans l'industrie pour les écrans à cristaux liquides, les baies vitrées électrochromes, les pare-brises auto-dégivrants, etc.. Des lames rectangulaires 55 x 80 mm sont découpées dans de telles vitres[1], au couteau de verrier, pour fabriquer les deux fenêtres d'une chambre de préparation. On réalise un contact électrique permanent sur chaque surface d'ITO. Pour cela, on colle un fil de cuivre multibrin (dénudé sur 55 mm), d'abord à la laque d'argent, puis à la colle époxy. La chambre de préparation se compose d'un puits circulaire en téflon (Ø 40 mm) qui sépare les deux électrodes d'une distance de 1.2 mm. Sa contenance est ainsi de 1.5 mL. La cellule est rendue étanche grâce à un boudin de pâte à sceller (Critoseal, Prolabo) entourant le puits, écrasé entre les deux lames.

[1] don d'Anne-Laure Bernard et Marie-Alice Guedeau-Boudeville (Lab. Matière Condensée / Collège de France).

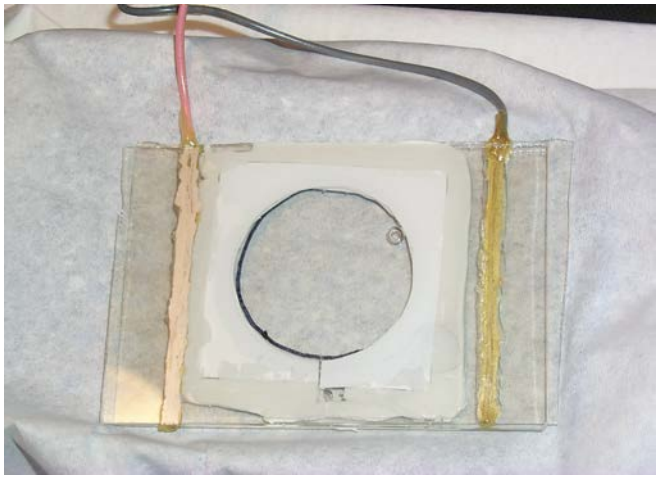


Figure 2 : Chambre de préparation des vésicules.

c) Protocole pour le « gonflement » des vésicules

A partir des solutions stocks de lipides (10 mg/mL), on prépare des solutions diluées à 1 mg/mL (soit 1.27 mM si le lipide est du DOPC pur). Tous les lipides sont solubles dans le chloroforme, et les phospholipides qui ont une tête polaire chargée le sont aussi dans l'éther éthylique. Le protocole consiste à étaler lentement la solution de lipide, 75 µL sur chaque lame parfaitement nettoyée au chloroforme, dans une surface de disque de Ø 40 mm. Avec ces solvants très volatils, la solution se rompt en gouttelettes qui, en s'évaporant très vite, laissent des auréoles sur la lame de verre/ITO. On utilisera donc plutôt un mélange 2/3 chloroforme et 1/3 méthanol (en volumes) afin de ralentir un peu l'évaporation du solvant. On peut alors effectuer des zigzags sur la surface avec l'aiguille de la microseringue (Hamilton). Il s'avère en effet que de multiples rayures dans le film favorisent la nucléation des vésicules[(4)]. Un dépôt sur chaque face de la cellule dure environ 30 min. Elle est ensuite mise sous vide, à température ambiante, au minimum 2 h (optimum une nuit), pour enlever toute trace de solvant, et surtout pour que le lipide s'assemble en une phase lamellaire, parfaitement déshydratée. L'épaisseur du dépôt est de l'ordre du micromètre, comme en témoigne son irisation, ce qui correspond à une pile d'une centaine de bicouches.

Par la suite, on procède à l'assemblage des deux lames et de l'espaceur en téflon, et on écrase bien la pâte à sceller pour que la distance entre électrodes soit constante. Une fois la cellule montée, on vérifie qu'il n'y a ni faux contacts, ni court-circuits entre les deux électrodes. On commence à établir une petite tension alternative (0.3 Volt). Le remplissage de la chambre avec la solution de gonflement se fait alors avec une seringue stérile de 2 mL et une aiguille 21G (Ø interne 0.8 mm). On injecte dans le puits, par l'ouverture aménagée, suffisamment lentement pour ne pas décoller le film lipidique. On chasse les bulles, et on scelle complètement la chambre. On monte progressivement la tension, par pallier de 0.3 V toutes les 5 min, jusqu'à 1.2 V. L'électrolyse doit rester faible, ce qui est avéré dans les solutions peu conductrices, mais demande de ne pas monter plus haut la tension, surtout à basse

fréquence. Cette dernière est choisie en fonction de la viscosité de la solution, qui limite la dynamique des flux d'électro-osmose : 10-15 Hz pour une solution de viscosité de l'ordre de celle de l'eau, 6-8 Hz pour une solution 30 fois plus visqueuse. Le gonflement du film et l'apparition des vésicules peuvent être suivis au microscope, avec un objectif dont la distance de travail est suffisamment grande pour traverser une lame de verre/ITO (1.5 mm). La durée nécessaire à l'électroformation est 2 h en solution peu visqueuse, et 6 h dans un mélange eau/glycérol. On termine la préparation en induisant pendant 15 min des mouvements de plus grande amplitude (1.4 V à 4Hz), afin d'aider les vésicules à se détacher de la surface. Après la coupure du champ électrique, la chambre est mise au repos à 4°C, pendant une nuit impérativement, pour que les vésicules encore tendues se détachent complètement et deviennent fluctuantes. Le prélèvement se fait de nouveau à la seringue, en tirant tout doucement le piston pour ne pas cisailler les vésicules et rompre les plus grosses. Les suspensions stocks sont conservées à 4°C, dans des tubes en plastique pour éviter l'adhésion et l'éclatement des vésicules aux parois. Leur volume, environ 1.5 mL, contient moins des 150 μg de lipide déposés au départ, car les membranes ayant mal gonflé restent attachées aux électrodes. Même si les vésicules sont au contact les une des autres dans la cellule, la quantité de lipide en suspension est inférieure à 0.1 mg/mL. On obtient au final de véritables GUV, sphériques et très homogènes en taille, dans une solution à pH6.6 (valeur mesurée). Par cette méthode, on a préparé couramment des vésicules dans du glucose ou du sucrose, en concentration 50 mM, 100 mM, 300 mM et même 2 M. Les solutions contiennent aussi un agent anti-bactérien, l'azide de sodium $Na^+N_3^-$ (10 μg/mL soit 154 μM). Du glycérol peut être incorporé dans la solution de gonflement, au moins jusqu'à une fraction volumique de 66 %.

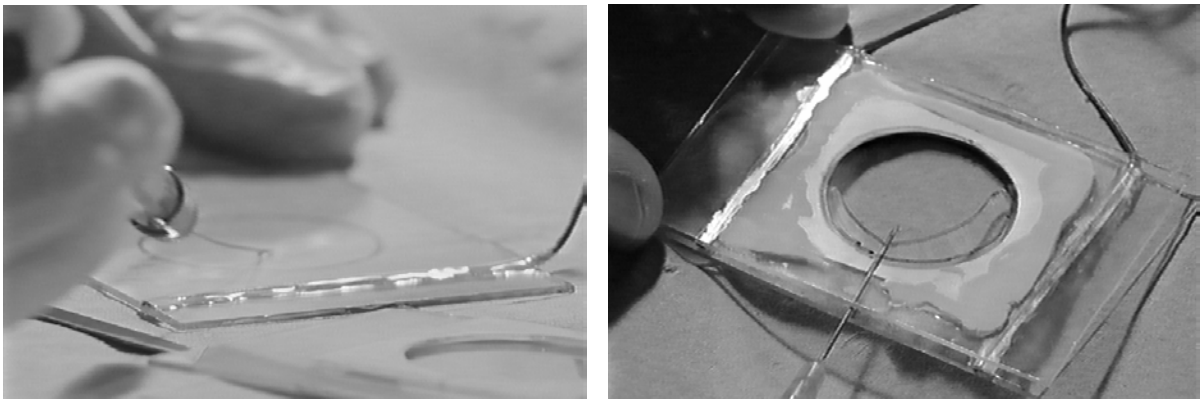


Figure 3 : Dépôt du lipide sur l'électrode (à gauche) et remplissage de la cellule (à droite).

Les vésicules préparées par l'une ou l'autre des méthodes d'électroformation ou de gonflement spontané sont toujours symétriques : d'une part les deux feuillets des bicouches ont *a priori* la même composition lipidique, d'autre part les deux compartiments aqueux interne et externe contiennent la même solution. Les membranes ont donc une courbure spontanée c_0 rigoureusement nulle (mais le paramètre $\overline{a}_0$ du modèle ADE, qui tient compte de la différence des nombres de molécules sur chaque feuillet, ne l'est pas forcément, cf. Encadré 1). Une première façon de dissymétriser les vésicules est

de modifier le feuillet externe de la membrane. C'est le cas : i) des marquages fluorescents par perfusion externe d'une sonde lipophile (III–2.1) ; ii) de la préparation de vésicules décorées avec des protéines, par adsorption ou greffage sur les lipides, qui est présentée dans une autre partie de la thèse (Chapitre V). On développe ci-dessous l'introduction d'une dissymétrie entre les deux solutions.

1.4 Encapsulations

Les solutions stocks de vésicules peuvent être resuspendues dans une solution différente de la solution de gonflement. Il faut néanmoins éviter un choc osmotique qui provoque la rupture des membranes et la libération du contenu des vésicules. L'échange complet de la solution externe par une autre solution de même osmolarité peut être réalisé par dialyse. On peut utiliser pour cela des tubes de dialyse de faible contenance (Spectra/Por, seuil M_w 300 kDa, Ø 5 mm 500 µL, fermeture par bouchon vissé, Fisher Scientific), qu'on plonge dans un grand volume de solution externe. En pratique la dialyse n'est employée que si l'on veut éliminer complètement les solutés internes de la solution externe. Une méthode beaucoup plus rapide est de faire sédimenter (ou au contraire crémer) les vésicules dans quelques volumes de solution iso-osmolaire, de densité différente, inférieure ou supérieure à celle de la solution de gonflement. On donne dans le tableau ci-dessous les densités de quelques solutions courantes. On ajoute par exemple 100 µL de vésicules, préparées dans du sucrose 300 mM, dans 200 µL de glucose 300 mM. Après 5 min, on prélève 50 µL au fond du tube : la quasi-totalité des vésicules sédimentées est ainsi récupérée[1]. Le temps de sédimentation doit être beaucoup plus long (minimum 3 h) pour un gradient sucrose/glucose 100 mM dans le glycérol 66%.

Soluté(s)	Solvant	Densité g/cm^3
Sucrose 300 mM	Eau	1.040
Sucrose 100 mM, Glucose 200mM	Eau	1.026
Sucrose 100 mM	Glycérol 66% Eau 34%	1.187
Sucrose 33 mM, Glucose 67 mM	Glycérol 66% Eau 34%	1.182

Tableau 1 : Densités des solutions employées, à l'intérieur ou à l'extérieur des vésicules.

[1] Dans toutes les opérations de prélèvement des vésicules, on veille à ne pas les casser par cisaillement. Pour cela, un moyen simple est de couper l'extrémité des cônes des pipettes pour que le diamètre soit au moins 1 mm.

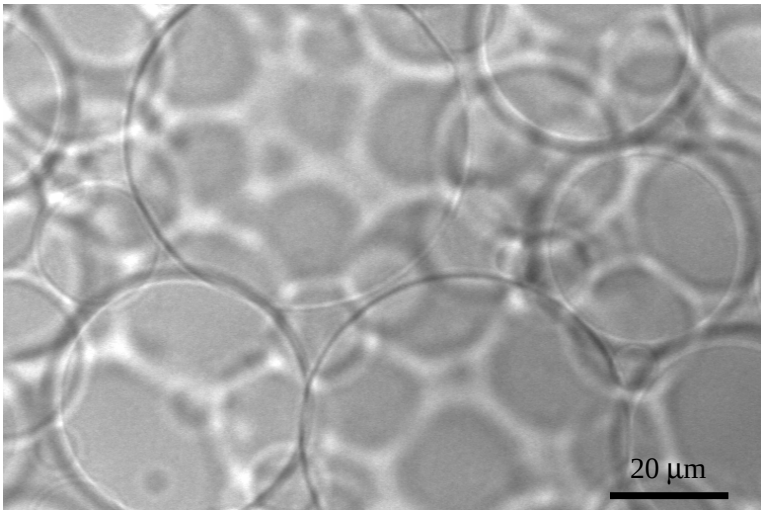


Figure 4 : Après sédimentation, les vésicules s'amassent au fond de la cellule.

La méthode consistant à resuspendre les vésicules, dans un milieu isotonique avec la solution d'électroformation, s'est révélée efficace pour encapsuler des solutés moléculaires ou bien des objets macroscopiques. Le maintien à long terme de l'asymétrie, entre les compartiments aqueux interne et externe, reste néanmoins conditionné par l'équilibre parfait des pressions osmotiques. On détaille ci-après les particularités de quelques exemples.

a) Mélanges d'eau et de glycérol

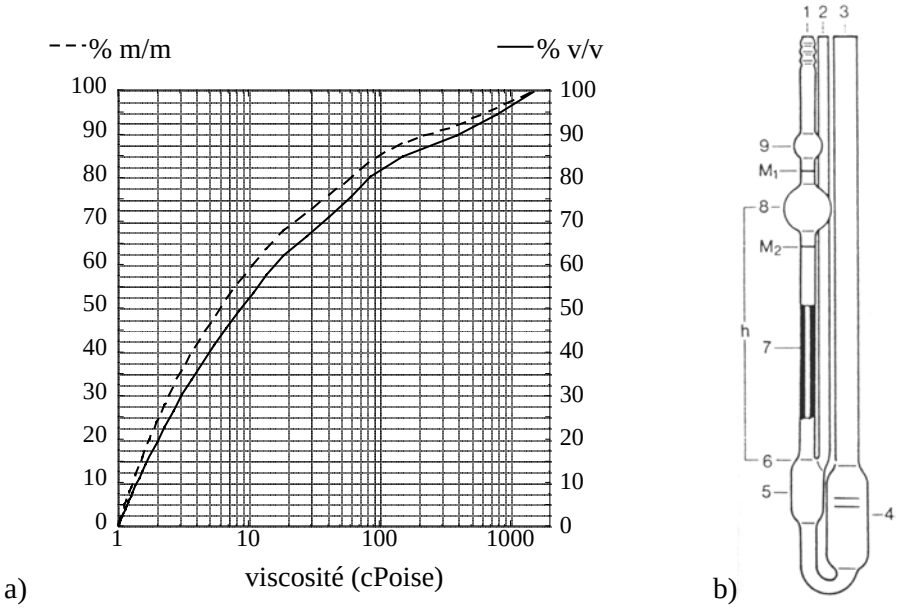


Figure 5 : a) Viscosité d'un mélange eau/glycérol, en fonction des fractions massique et volumique du glycérol (20°C), d'après [5] ; b) Viscosimètre capillaire de Ubbelohde (Schott, No. III).

Miscible en toute proportion avec l'eau, le glycérol est couramment utilisé pour augmenter la viscosité des solutions aqueuses. Les molécules de glycérol, tout comme celles de l'eau, n'exercent pas de pression osmotique sur les bicouches lipidiques (cf. Encadré I–3). De ce fait, le mélange

eau/glycérol constitue le solvant, contenant par ailleurs comme soluté un sucre (sucrose ou glucose). Des vésicules géantes ont été produites par électroformation dans des mélanges contenant une fraction volumique en glycérol de 50% (3 échantillons) et 66% (plusieurs dizaines). Comme la viscosité du mélange varie de façon rapide et non linéaire avec la composition (Figure 5a), la mesure des volumes doit être précise[1]. La valeur exacte de la viscosité du milieu est mesurée pour la solution intervenant le plus souvent dans le traitement quantitatif des pores transitoires (Chapitre IV) : un tiers (en volume) de sucrose 300 mM (densité $\rho_1 = 1.04\,\mathrm{g/cm^3}$) et deux tiers de glycérol 98% ($\rho_2 = 1.26\,\mathrm{g/cm^3}$). On utilise pour cela un viscosimètre capillaire (Figure 5b). La méthode consiste à chronométrer le temps de passage Δt d'un volume fixé du liquide (délimité par les traits de jauge M_1 et M_2), à travers un tube capillaire (7), ici de diamètre 2 mm. La valeur moyennée sur 17 mesures est $\Delta t = 27.2 \pm 0.3\,\mathrm{s}$. A l'aide d'un facteur de conversion, on obtient la viscosité cinématique $\nu = 26.6 \pm 0.3\,\mathrm{mm^2/s}$. Compte tenu de la masse volumique du mélange $\rho = 1/3\,\rho_1 + 2/3\,\rho_2 = 1.19\,\mathrm{g/cm^3}$, on calcule la viscosité dynamique $\eta = \rho\nu = (31.7 \pm 0.3)\times 10^{-3}$ Pas (ou $\mathrm{Ns/m^2}$), soit environ 32 cPoise.

b) Solutions concentrées de sucres

Habituellement, les composés de la famille des sucres (saccharose ou sucrose, glucose, inositol, raffinose, ...) sont utilisés pour ajuster la pression osmotique des vésicules. A forte concentration, ils donnent des sirops visqueux dont on a vérifié qu'ils peuvent servir de milieux aqueux aux vésicules. L'électroformation de vésicules a réussi dans du sucrose 2 M (30 cPoise) et du glucose 2 M (3 cPoise).

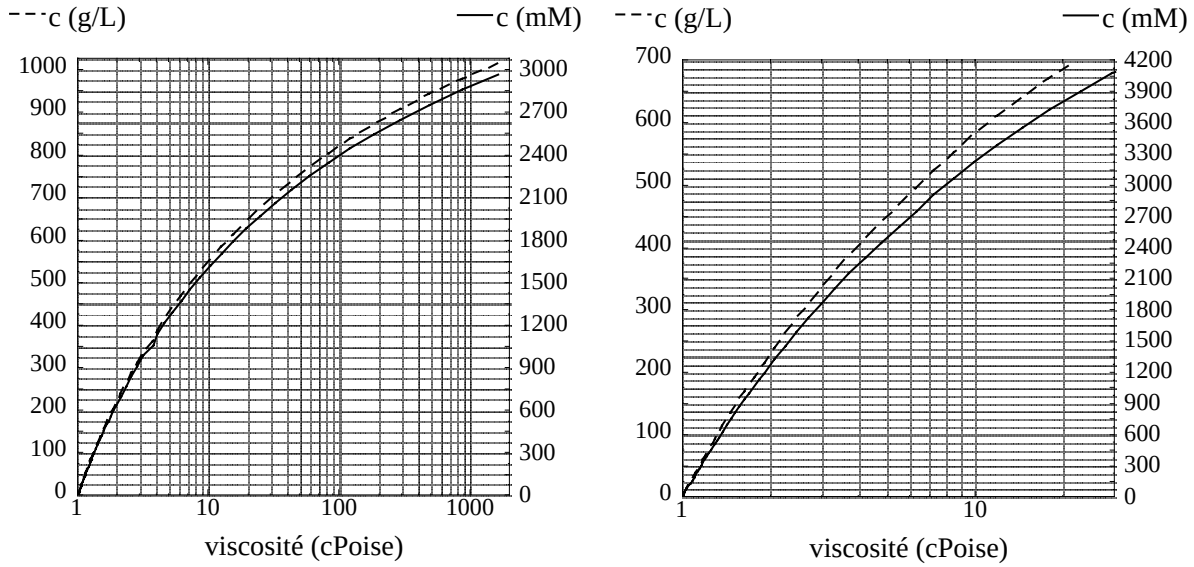


Figure 6 : Viscosité d'une solution de sucrose (à gauche) et de glucose (à droite), en fonction des concentrations massique et molaire du soluté (20°C), d'après [(5)].

[1] En pratique, le glycérol est ajouté en une seule fois dans une solution aqueuse de sucre (et non l'inverse), en vidant entièrement la (micro)pipette, grâce à des aller-retours de la solution, progressivement moins visqueuse.

c) Un soluté fluorescent : la calcéine

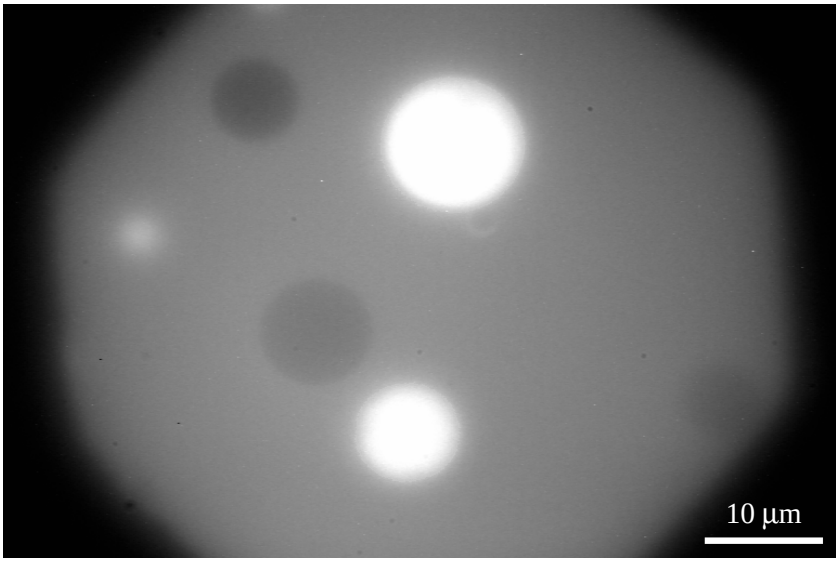


Figure 7 : Vésicules formées par électroformation dans une solution fluorescente (sucrose 298 mM / Na^+Cl^- 1 mM / calcéine 10 µM pH 6.4) et suspendue dans du glucose 300 mM (expérience réalisée avec Reagan Bussy-Socrate, PCC / Institut Curie). Les vésicules brillantes sont celles qui ont conservé leur contenu, tandis que celles qui se sont vidées apparaissent plus sombres que le fond.

d) Des billes fluorescentes

Des vésicules de DOPC sont préparées en présence de billes de latex (polystyrène réticulé) de diamètre D=100 nm, contenant de la fluorescéine (FITC), et représentant une fraction volumique d'environ $\Phi = 2\times10^{-5}$ dans une solution de sucrose 100 mM / glycérol 66%. Afin de disperser les agrégats de billes, la suspension est filtrée à 0.2 µm, puis passée aux ultra-sons pendant 15 min. L'électroformation est réalisée sous une tension de 1.2 Volt à 8 Hz pendant sept heures. Un échantillon de vésicules est incubé pendant une nuit avec 10 µM du fluorophore RH237 (cf. III–2.2), puis dilué 5 fois dans du glucose 100 mM / glycérol 66%. L'observation après une heure de sédimentation montre un bon contraste entre des vésicules remplies de billes et le milieu externe non fluorescent. L'illumination déclenche néanmoins le phénomène illustré par la séquence de la Figure 8, qui dure en tout 2.5 min. Sur les images, on voit la vésicule se recroqueviller, au fur et à mesure que les billes sont expulsées (séparément, ou bien en gerbes continues). Cette déstabilisation par l'éclairement est constatée aussi sans marquage par RH237. Le même échantillon, dilué dans le glucose, puis conservé plusieurs heures à l'obscurité, ne contient plus aucune vésicule géante. On observe à la place un fond continu de billes fluorescentes. Le remplissage des vésicules par des billes n'est donc pas stable quand on les disperse dans un autre milieu, l'éclairage par la lampe HBO ne faisant que précipiter leur libération. Les vésicules géantes sont néanmoins conservées intactes pendant plusieurs jours dans la solution initiale pourvue de billes.

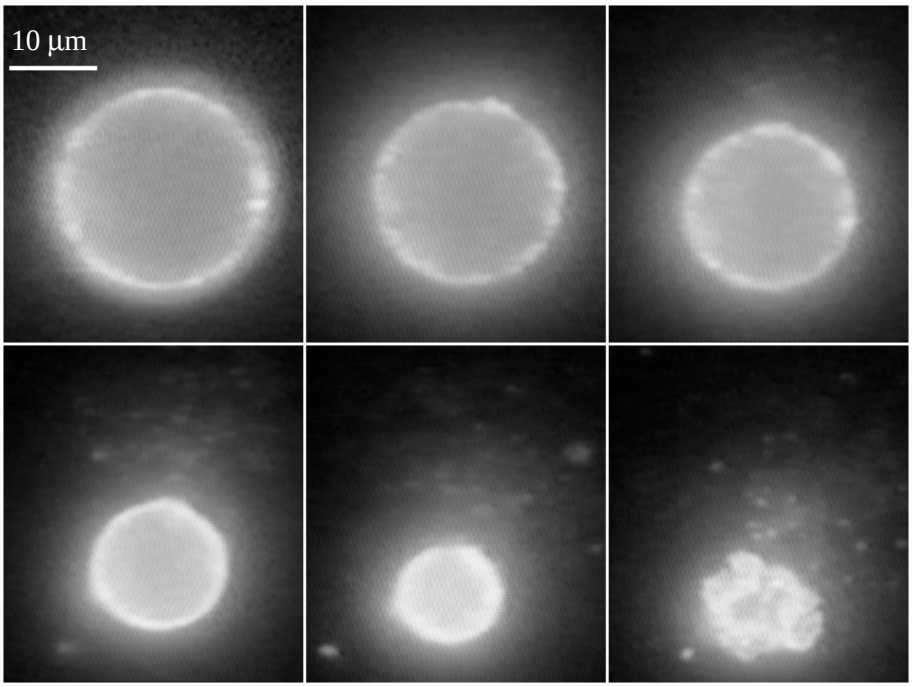


Figure 8 : Fuite d'une vésicule de DOPC marquée avec 10 µM du fluorophore RH237. Des billes fluorescentes, de diamètre *D*=100 nm, encapsulées à l'électroformation, sont ici expulsées par « bouffées » (Hicham Guitouni, mémoire de Maîtrise, Université Paris 6, juin 2000).

D'ordinaire, la dissymétrie entre les milieux interne et externe ne provoque pas un tel éclatement des vésicules. Les billes semblent donc en être à l'origine. Leur concentration est évaluée à $6\Phi/\pi D^3 \approx 4\times10^{10}$ billes/cm^3, soit moins de 10^{-10} mol/L. La contribution des billes à la différence de pression osmotique est donc minime, même en tenant compte de leurs contre-ions dissociés (le latex est chargé négativement en surface par des fonctions carboxylates). Une vésicule de rayon $R\approx10$ µm contient au départ environ 200 billes, au contact desquelles la membrane pourrait être fragilisée. En effet, il existe une interaction attractive entre des billes de latex chargées et les phospholipides des vésicules géantes[(6)]. L'enrobage complet des billes par la membrane provoquerait une augmentation relative d'aire projetée d'environ $200(D/2R)^2 \approx 10^{-3}$. La tension de surface correspondante n'excède pas 10^{-7} N/m (cf. Encadré IV–5), et ne peut donc pas expliquer la rupture des membranes. Les billes collées aux vésicules pourraient simplement constituer des centres nucléateurs de pores membranaires. La tension de surface des vésicules proviendrait soit du choc osmotique (2 mOs/kg de différence entre le sucrose et le glucose 100 mM, cf. Tableau I–1), soit par un effet de l'éclairement (lié à la fluorescence de RH237 ou à celle de FITC, cf. Chapitre IV). En l'absence de défauts sur la membrane, de tels pores se referment sans mal. Par contre, une membrane décorée par des billes cicatrise beaucoup plus difficilement.

e) Une macromolécule hydrosoluble : l'ADN

Au contraire d'avec les billes, l'électroformation de vésicules géantes dans une solution d'ADN a conduit à un rendement médiocre d'encapsulation (la plupart des macromolécules se retrouvant dans la solution extérieure). Une méthode plus efficace a été inspirée de l'une de celles employées pour préparer des liposomes magnétiques, remplis d'une suspension de nanoparticules d'oxyde de fer[7]. Le lipide est déposé sous forme de poudre (environ 1 mg), au fond d'une boîte de Pétri bien dégraissée. Il est alors hydraté par 10 µL d'une solution concentrée d'ADN fluorescent, puis étalé du bout du doigt (couvert d'un gant vinyle). Avant que le film gras ne soit complètement sec, on verse 2 mL d'une solution de sucrose 150 mM dans du glycérol 50%. L'échantillon est incubé à 42°C pendant 3 h.

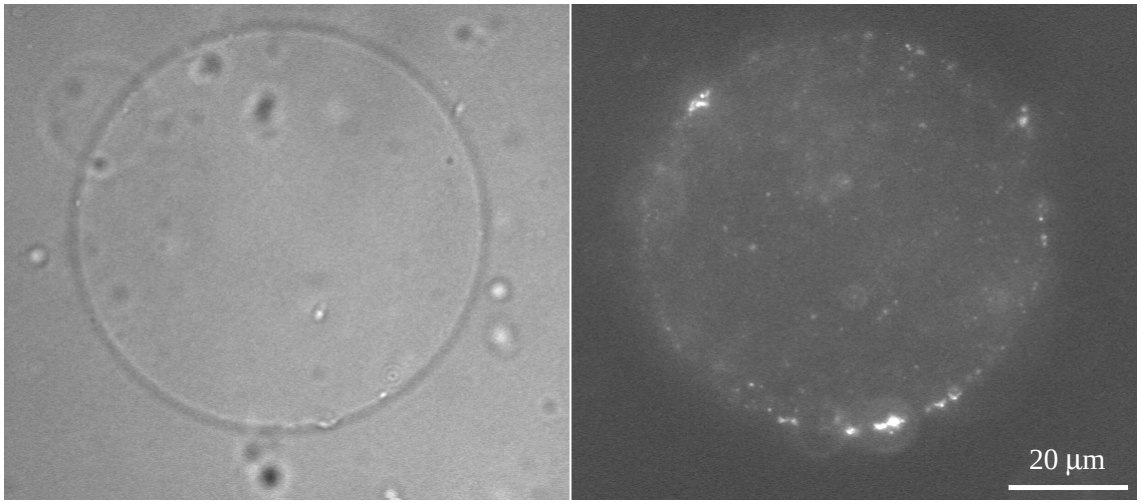


Figure 9 : Vésicule de DOPC pur encapsulant des filaments d'ADN de phage T4, rendus fluorescents par intercalation du marqueur YOYO-1. L'observation est à gauche en transmission, à droite en fluorescence (expérience réalisée avec Erdem Karatekin, « Surfaces Douces » PCC / Institut Curie).

Sans avoir à resuspendre les vésicules dans un autre milieu, on obtient par cette méthode une composition asymétrique entre les compartiments internes des membranes, contenant pour la plupart de l'ADN, et la solution externe qui en est dépourvue. Les brins d'ADN sont néanmoins répartis en deux populations. Une partie présente un mouvement Brownien dans tout le volume interne de la vésicule. L'autre reste confinée au voisinage de la membrane, sa diffusion étant limitée à la surface de la sphère. Comme dans le cas des billes, une attraction faible existerait donc entre les phospholipides DOPC, zwitterioniques, et l'ADN. Cette interaction mériterait sans doute d'être approfondie, compte tenu du fait que les « lipoplexes » décrits dans la littérature sont plutôt des complexes électrostatiques très compacts, entre l'ADN et des membranes chargées positivement : vésicules géantes contenant un lipide cationique, la sphyngosine[8], phases lamellaires avec des phospholipides de tête polaire ammonium quaternaire[9] ou comportant plusieurs fonctions amines protonées[10], etc..

II.2 Surfaces adhésives

Un substrat solide est rendu adhésif pour des vésicules géantes, par des traitements de surface qui introduisent des fonctions chimiques ayant une affinité pour les bicouches lipidiques. L'adhésion de vésicules sur des « surfaces modèles » permet ainsi d'étudier des liaisons spécifiques, de type ligand-protéine (cf. les travaux de l'équipe d'E. Sackmann à Münich). Dans ce travail, on s'est attaché néanmoins à des interactions purement physiques : électrostatique, dipolaire, ou hydrophobe.

2.1 Substrats solides

La surface solide avec laquelle les vésicules sont en contact constitue l'une des parois transparentes de la chambre d'observation. En microscopie par réflexion, on peut aussi utiliser comme substrat une pastille de silicium[(11)]. Les lames de microscopie et les lamelles couvre-objets sont faites d'un verre flotté, très lisse. Néanmoins, elles comportent toujours des éclats de coupe. Même pour les expériences ne nécessitant qu'une surface de verre nu, il est recommandé d'effectuer un dégraissage préalable des lames et lamelles, avec une solution diluée (2–5%) d'un tensioactif anionique (Decon 90[1] ou Hellmanex[2]), suivi d'un rinçage abondant à l'eau ultra-pure et d'un séchage à l'azote ou l'argon. Suivant les expériences, la préparation microscopique est scellée ou pas.

a b

Figure 10 : Chambre d'observation ouverte (a) ou fermée (b)

a) Cellule ouverte

Un puits contenant environ 400 µL est fabriqué sur la lame, en empilant quatre épaisseurs de film téflon autocollant, percées à l'emporte-pièce d'un trou circulaire (Ø16 mm). Cette configuration est utilisée avec un objectif à air, ou bien à immersion à eau. L'avantage est de pouvoir ajouter un composé à la micropipette (colorant, calcium, protéine, …), et de visualiser directement son effet sur les vésicules. Un délai d'attente est néanmoins nécessaire, le temps que les vésicules déplacées par les flux créés par l'injection se redéposent au fond, et que les concentrations s'homogénéisent.

[1] Prolabo, 54 rue Roger Salengro 94126 Fontenay-sous-Bois.

[2] Hellma France, 35 rue de Meaux 75019 Paris.

L'évaporation du solvant produit, à la longue, un dégonflement osmotique des vésicules. La surface libre est néanmoins réduite quand l'objectif est plongé dans le milieu, et l'évaporation peut être compensée en ajoutant environ 40 µL de solution toutes les demi-heures.

b) Cellule fermée

Quand les flux doivent être proscrits (pour une observation longue de la même vésicule, ou bien en milieu très visqueux, où les cisaillements sont plus forts), on travaille entre lame et lamelles scellées. L'espaceur entre elles est constitué de deux épaisseurs de Parafilm (©American National Can). Un puits circulaire (Ø14 mm) ainsi que deux ouvertures de remplissage y sont découpés au préalable, au scalpel[1]. L'espaceur est déposé sur la lame de verre, puis chauffé sur une plaque à 60–70°C. Quand la pégosité du film est satisfaisante, la lame est sortie du chauffage, puis une lamelle (Ø18 mm), de verre nu ou traité, est appuyée sur l'espaceur, pendant les quelques secondes où celui-ci reste translucide (pas plus longtemps, au risque de casser la lamelle). Le volume contenu dans une telle cellule est 50 µL, et la distance entre les parois est d'environ 300 µm. Des vésicules de diamètre jusqu'à 100 µm peuvent être injectées à l'intérieur (lentement pour parer au cisaillement). Le scellement des ouvertures est effectué en déposant sur chacune une goutte de paraffine fondue.

2.2 Adsorption électrostatique sur le verre

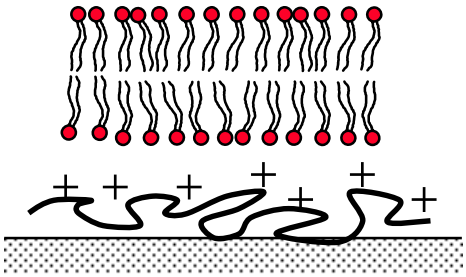


Figure 11 : Adsorption de poly(L-lysine) sur le verre ou le silicium.

Un moyen simple de rendre une surface de verre adhésive pour les membranes de cellules et de vésicules est l'adsorption de poly(L-lysine). Une solution commerciale à 0.1% w/v est disponible commercialement (Sigma, P8920). Les lames ou lamelles de verre, dégraissées au préalable, sont traitées pendant 5 min environ dans un bain dilué 10 fois par rapport à la solution mère, puis rincées abondamment et séchées. Les surfaces sont alors très hydrophiles. Elles doivent donc être utilisées rapidement pour fabriquer une cellule d'observation, sinon elles se polluent.

Le résidu de la lysine étant une amine primaire, le polypeptide est chargé positivement à pH neutre. Les chaînes possèdent une masse moléculaire M_w=150.000-300.000 g/mol. L'épaisseur de la couche adsorbée est 15±5 Å au bout de 4 min d'incubation[2]. La mesure a été réalisée par ellipsométrie sur une

[1] Un tracé de cercle bien net, découpé grâce à un guide, est un gage contre les bulles au remplissage.

[2] Christine Richard, stage de magistère « Physico-chimie moléculaire » (Univ. Paris sud), juillet 1998.

pastille de silicium, dont la couche oxydée en surface possède une réactivité chimique très proche de celle du verre. La valeur n'augmente plus pour un traitement plus long. Les chaînes sont probablement couchées à plat sur la surface. La densité de charge positive sur la surface peut être augmentée en acidifiant la solution jusqu'à pH~3, par ajout d'acide chlorhydrique.

Au chapitre V, une autre adhésion de type électrostatique est utilisée, simplement sur le verre nu : les vésicules sont mises en présence de calcium, dont la concentration module l'interaction entre les bicouches (les ions Ca^{2+} s'y adsorbant) et la surface de verre (négative à pH~6).

2.3 Greffage de molécules fonctionnalisées

La plupart des expériences d'adhésion de vésicules sur une paroi solide utilise une attraction avec la surface polaire des membranes[12]. Au début de ce travail, on a pensé fabriquer des surfaces dont l'adhésion est basée, au contraire, sur l'insertion de cholestérol entre les chaînes hydrophobes des phospholipides. Dans ce schéma, les bicouches s'interpénètrent avec une couche de molécules de cholestérol greffées à la surface (Figure 12). Cette interaction est non spécifique, car les ancres n'interagissent pas avec un lipide particulier, mais peuvent pénétrer à n'importe quel endroit dans la bicouche. Cette propriété est importante, car même l'adhésion électrostatique, pourtant de type physique, induit parfois une séparation de phases dans la bicouche (cf. V–1.2). En fait cette idée a déjà été réalisée, dans le but de tapisser une surface avec une bicouche unique, grâce à l'éclatement de petites vésicules (SUV)[13]. Les auteurs préconisent de conférer à la surface une part de fluidité, en réalisant une couche hydrophile de poly(éthylèneglycol) en-dessous de celle de cholestérol. On a suivi une voie analogue, en utilisant comme réaction de départ une silanisation, un traitement de surfaces courant au laboratoire. La méthode de greffage de monocouches de thiols sur une fine couche d'or est décrite par la suite, car elle a permis de réaliser des interactions entre les vésicules géantes et des surfaces, hydrophobes ou polaires, voire les deux en même temps (surfaces décorées).

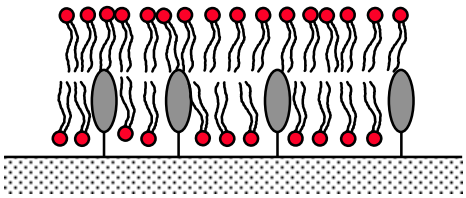


Figure 12 : Adsorption des bicouches sur une surface fonctionnalisée au cholestérol.

a) Greffage d'ancres cholestérol sur une couche hydrophile

Les surfaces de verre ou de silice comportent comme sites réactifs des groupes silanols (Si–OH). La « silanisation » est une réaction de couplage entre ces fonctions de surface et des molécules d'organosilanes, de formule R–Si–X_3, où R est une chaîne organique, X un atome d'halogène ou un radical alkoxyle. La réaction de silanisation permet de réaliser de nombreux traitements de surface (voir par exemple [14]). Dans notre cas, trois réactions successives sont réalisées sur la surface :

- (1) greffage sur silice d'un organosilane terminé par l'éthylènediamine (EDA, cf. Figure 13) ;
- (2) couplage des groupements $–NH_2$ de la surface avec l'ester de N-hydroxysuccinimidyle, à une extrémité d'un PEG fonctionnalisé (M_w=3400 g/mol) ;
- (3) réaction de l'autre terminaison du PEG, vinylsulfone, avec le dérivé soufré du cholestérol.

Les deux premières étapes sont inspirées d'une étude utilisant un tel espaceur PEG entre des molécules adhésives et une surface de verre[15].

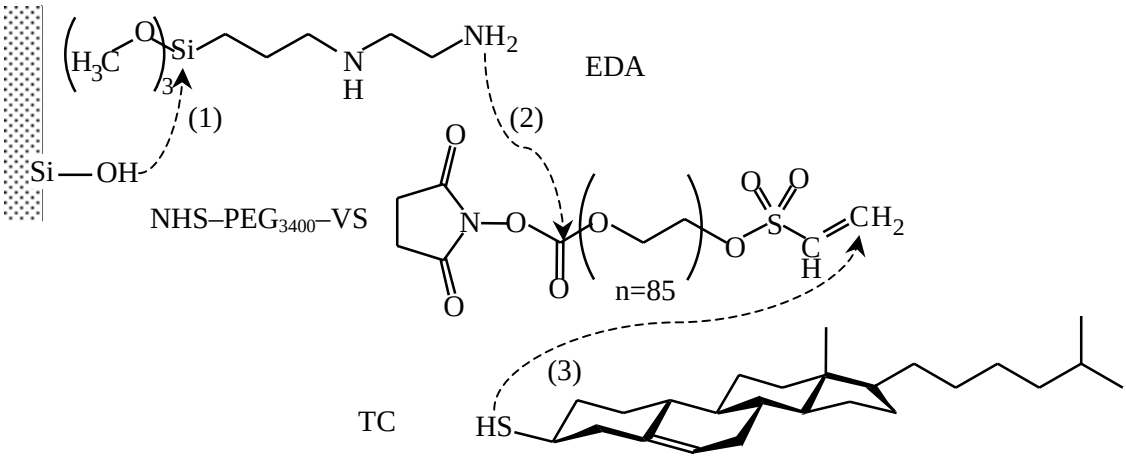


Figure 13 : Molécules greffées successivement (EDA : N-[3-(triméthoxysilyl)propyl]éthylenediamine, NHS : N-hydroxysuccinimide, PEG : poly(éthylèneglycol), VS : vinylsulfone, TC : thiocholestérol)[1].

Afin de suivre l'avancée des réactions par ellipsométrie et par spectroscopie infra-rouge en ATR (Figure 14), un prisme de silicium est traité dans le même bain de réaction que les lamelles de verre. Sa petite base est tournée vers le fond du récipient, pour servir de témoin (sauf pour la silanisation, qui a été effectuée des deux côtés). Le protocole commence par une activation de la silice, pendant 15 min dans un mélange piranah bouillant (2/3 H_2SO_4, 1/3 H_2O_2), suivie d'un rinçage à l'eau ultrapure (qui mouille totalement les lamelles), séchage à l'azote, puis traitement sous flux d'ozone (15 min par face). Le bain de silanisation contient 40 mL de méthanol, 1.5 mL d'eau, 0.4 mL d'HCl 1M et 1 mL d'EDA. Après 40 min de réaction, les lamelles et le prisme sont rincés trois fois au méthanol, séchés à l'azote, puis placés 30 min à l'étuve à 70°C. Après silanisation, l'angle de contact de l'eau sur les lamelles est 38±2° (avec un hystérésis de 4°). La deuxième étape est réalisée dans 25 mL de THF (tétrahydrurofuranne) contenant 25 mg du PEG hétérofonctionnel, dans un récipient fermé (placé dans une boîte, pour saturer l'atmosphère en THF). Le prisme est sorti pour effectuer les caractérisations, à différents temps de réaction : 5 h, 21 h, 44h et 66h. A l'issue de la dernière mesure, la réaction de couplage est arrêtée. Les lamelles sont rincées deux fois 15 min au THF, trois fois au chloroforme, sous ultra-sons pour désorber le PEG non greffé. La dernière réaction est effectuée pendant une nuit,

[1] Références 10,488-4 Aldrich (EDA), T3256 Sigma (TC) et NHS-3400-VS Shearwater polymers, inc. 2305 Spring Branch Rd. Huntsville, AL35801 USA.

dans 25 mL d'éthanol absolu contenant 50 mg de TC. Enfin on rince à l'éthanol, puis au chloroforme, sous ultra-sons.

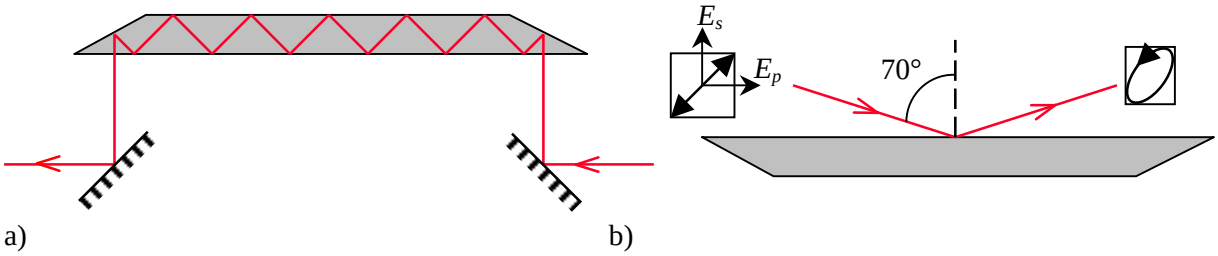


Figure 14 : a) Spectroscopie d'absorption infra-rouge à la surface d'un prisme de silicium (d'angle 22.5°), acquis sur un spectromètre équipé d'un accessoire de réflexion totale interne ou ATR-IR ; b) Le même prisme permet de mesurer l'épaisseur de la couche diélectrique greffée, par ellipsométrie; son principe est l'étude du déphasage entre les polarisations *s* et *p* d'un faisceau laser réfléchi. Ces deux méthodes sont décrites dans [16].

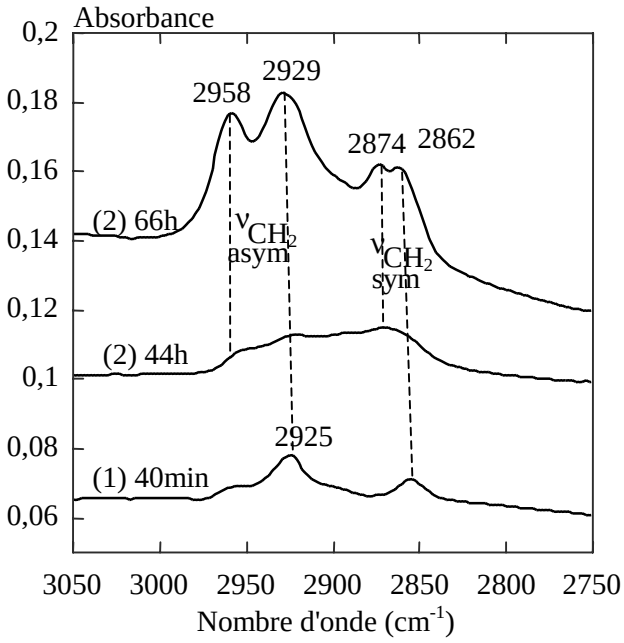


Figure 15 : Evolution du spectre infra-rouge dans la zone des méthylènes, au cours des deux premières étapes de greffage ; (1) silanisation à l'EDA ; (2) réaction avec NHS–PEG–VS. D'après les rapports des aires 4.5 : 1.5 : 0.75, on estime le rendement de l'étape (2) à 6% après 44h et 30% au bout de 66h.

Le greffage effectif sur la surface des fonctions amines (primaire et secondaire) est révélé en spectroscopie ATR-IR, par une bande d'absorption large entre 3410 et 3490 cm^{-1}. Il faut savoir que les spectres en ATR-IR sont restreints aux nombres d'onde supérieurs à 1600 cm^{-1}, en raison de l'absorption du rayonnement par le silicium du prisme. Ainsi le pic intense caractéristique des liaisons éthers C–O–C, visible à 1100 cm^{-1} sur le spectre en transmission, n'est pas utilisable pour suivre le greffage du PEG. Par contre, les vibrations des groupes méthylènes peuvent servir de repères

quantitatifs. D'après l'aire des pics, on mesure que le nombre d'atomes de carbone a doublé au bout de 44h. Comme la molécule d'EDA en comporte cinq, et la chaîne du PEG environ 170, et compte tenu du fait que la réaction n'est réalisée que sur un seul côté du prisme, on estime le rendement du couplage entre $-NH_2$ et NHS à $2\times5/170\approx6\%$. Au bout de 66h, l'aire du massif des carbones ayant augmenté d'un facteur 5 par rapport au spectre de l'EDA seul, la fraction des groupements amino qui ont effectivement réagi est environ 30%.

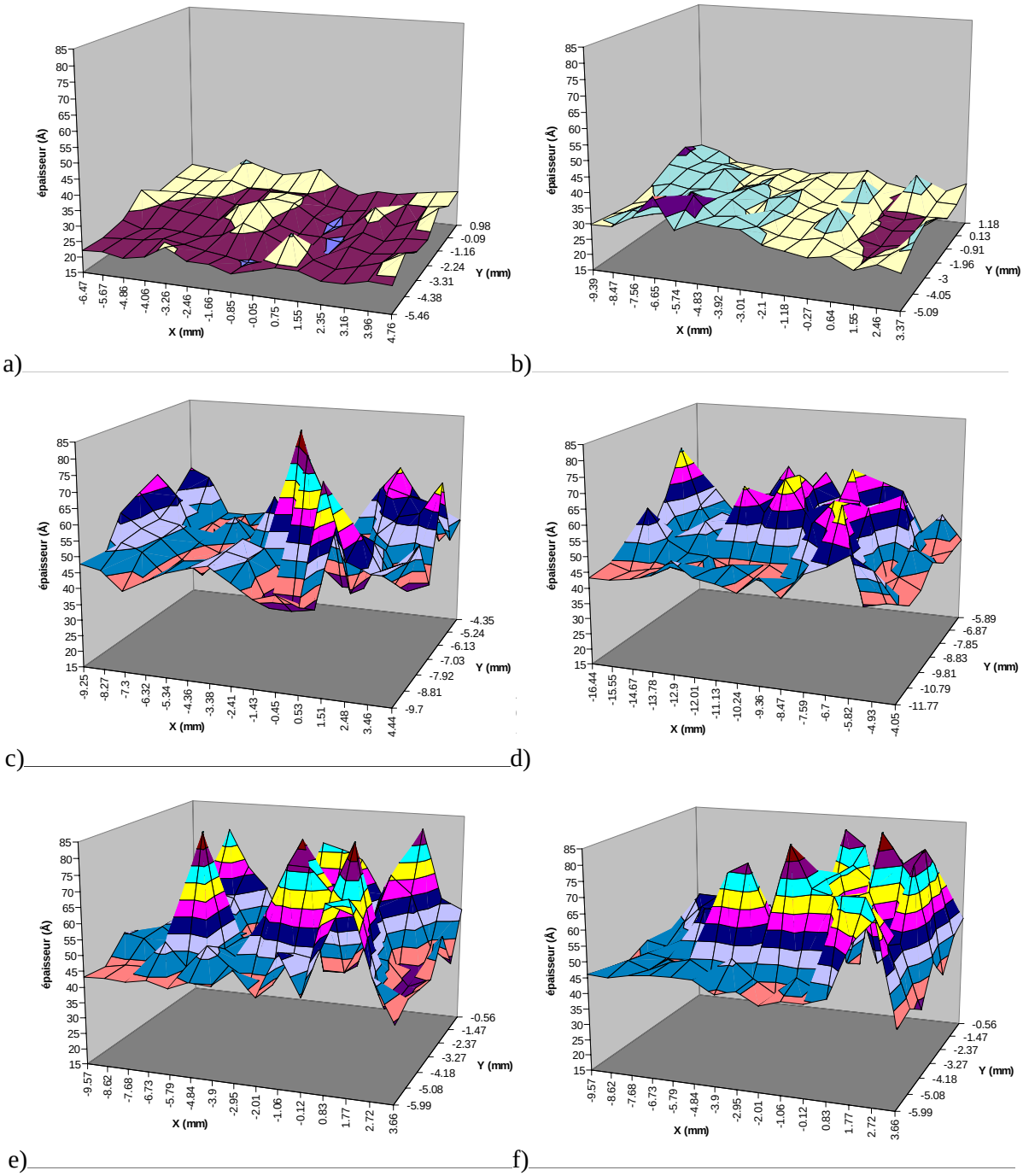


Figure 16 : Suivi ellipsométrique du greffage de PEG sur la grande base d'un prisme de silicium (la petite base, en contact avec le fond du récipient, sert de témoin). a) *e*=24±3 Å, couche initiale de

silice ; b) *e*=29±3 Å, après 40 min de silanisation à l'EDA ; c) *e*=49±11 Å, après 5 h de réaction avec NHS-PEG-VS ; d) *e*=50±8 Å, après 21 h ; e) *e*=52±16 Å, après 44 h ; f) *e*=54±12 Å, après 66 h. L'indice optique de la couche organique est pris égal à celui de la silice (*n*=1.46). La macro Excel permettant de visualiser les surfaces a été programmée par Pascal Bezou (PCC / Institut Curie).

Sur les profils ellipsométriques, la précision de l'épaisseur est proche de l'Å, mais la résolution latérale est très modeste, environ 1 mm (car le faisceau laser n'est pas focalisé). L'information de hauteur est donc moyennée sur une large zone de l'échantillon. La couche oxydée du silicium mesure environ 24 Å et elle est relativement homogène. L'épaississement de 5 Å, mesuré après la première étape, indique que le silane EDA forme une couche monomoléculaire à la surface. Au cours du greffage ultérieur, la rugosité de la surface augmente considérablement. L'écart moyen de 25 Å par rapport au silane est insuffisant pour représenter une couche homogène de PEG_{3400}, dont la taille est estimée plutôt aux alentours de 45 Å. La couverture de la surface est donc hétérogène, des îlots denses (45 Å) alternant avec des zones moins bien greffées (15 Å en moyenne). De l'ordre du mm, l'extension latérale des domaines greffés de façon homogène est néanmoins suffisante à l'échelle des vésicules (<100 µm). L'épaisseur ellipsométrique d'une monocouche de TC est 16 Å[17]. On n'a pas pu la mesurer dans notre cas, la couche inférieure de PEG n'étant pas assez plane.

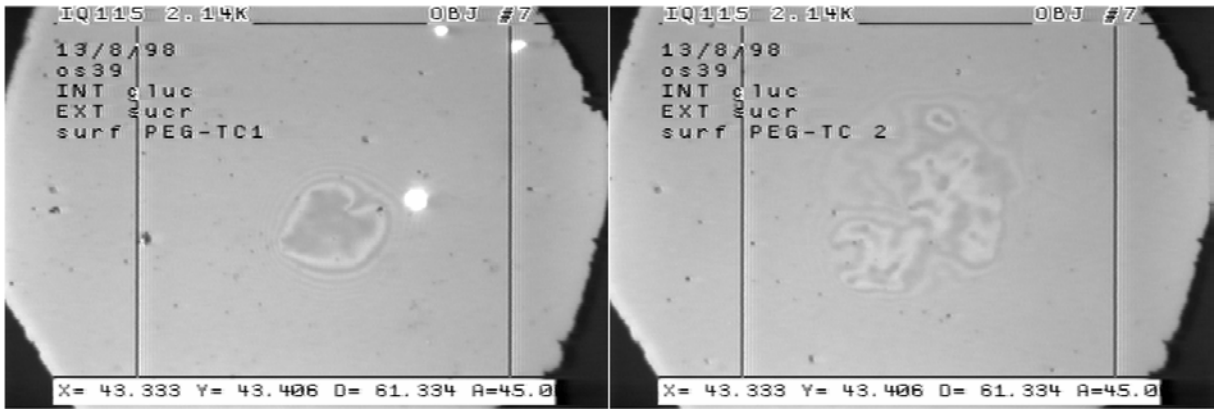


Figure 17 : Visualisation de la zone d'interaction entre des vésicules et des lamelles greffées, par microscopie RICM (cf. III-1.2). Les franges d'interférence indiquent que les membranes adhèrent seulement sur des zones très locales (points noirs). Les dimensions du cadre sont inscrites en µm.

Le comportement des surfaces en présence de vésicules s'est révélé décevant. Globalement répulsive, les surfaces présentent néanmoins des points d'accroche forts pour les vésicules. On les attribue à des zones localement plus concentrées en cholestérol. Bien qu'elle se soit soldée par un échec, cette recherche d'un protocole de greffage du cholestérol *via* un espaceur PEG a été instructive, car elle a permis de s'initier aux méthodes de traitements de surface. On décrit ci-dessous une méthode beaucoup plus simple, grâce à laquelle le thiocholestérol est greffé en une seule étape.

b) Greffage direct du thiocholestérol sur une couche d'or

Pour greffer des couches organiques mono-moléculaires sur un substrat solide, une alternative à la silanisation est l'auto-association des thiols sur l'or[18]. Elle repose sur la liaison entre Au et –SH, de nature électro-covalente car réversible en fonction du potentiel électrique de l'or[19]. Les propriétés d'adhésion des surfaces peuvent être modulées en associant deux mercaptans différents : soit mélangés de façon homogène dans une monocouche mixte[20], soit répartis sur des motifs, imprimés sur la surface grâce à un tampon[21]. Les différentes zones de ces surfaces décorées peuvent présenter des affinités antagonistes envers des protéines ou des cellules biologiques[22].

Durant ce travail, toutes les monocouches de thiols ont été réalisées à la surface d'une mince couche d'or, déposée sur des lames ou lamelles de microscopie par "sputtering". L'appareil (Blazers) permet d'effectuer différentes métallisations. Brièvement, l'échantillon est placé sous pression réduite d'argon, sur une électrode en regard d'une cible métallique (Al, Pt, Ni, Cr ou Au), portée à un haut potentiel. En bombardant la cible, les ions du plasma en arrachent des clusters métalliques, qui en retour se déposent sur l'échantillon. Cette technique produit sans doute un dépôt poly-cristallin, sous forme de micro-cristaux agrégés. Néanmoins, la surface paraît optiquement lisse. Des lamelles de verre couvertes d'une épaisseur d'or entre 5 et 10 nm restent suffisamment transparentes pour servir de fenêtres aux préparations microscopiques. Un film d'or seul n'adhère pas bien au verre : immergé dans une solution, il se décolle spontanément. Ce problème est résolu en utilisant des lames de verre couvertes d'ITO, ou bien, dans le cas d'une lamelle, en déposant une couche de chrome de 5 nm avant l'or[1]. Plusieurs lamelles sont dorées simultanément. En cas d'une utilisation différée, les surfaces sont conservées dans l'éthanol pour éviter leur pollution par l'atmosphère. Avant traitement par un thiol, un passage 15 min sous UV/ozone permet d'oxyder d'éventuelles poussières organiques.

Comme la présence d'un espaceur fluide entre les ancres cholestérol et la paroi n'est finalement peut-être pas indispensable, un greffage direct du thiocholestérol sur des lamelles dorées est essayé. Le protocole consiste simplement à incuber les lamelles pendant une nuit dans une solution de TC 2.5 mM (1 mg/mL) dans l'éthanol absolu (la présence d'eau conduit sinon à une émulsion). Après rinçage à l'éthanol, puis à l'eau, les lamelles se révèlent très hydrophobes.

Mises en présence de vésicules géantes, ces surfaces accrochent les membranes ponctuellement, de façon analogue aux surfaces greffées TC via un espaceur PEG. On observe par ailleurs des tâches circulaires sombres, contenant une forme dendritique brillante. Le contraste de la microscopie RICM est très sensible à l'épaisseur d'un film déposé sur la surface, dans la gamme 0–100 nm (cf. III-1.2). Une trace sombre pourrait représenter le disque d'adhésion d'une ancienne vésicule ayant éclaté, la forme brillante étant un agrégat épais issu du reste de sa membrane. Dans la référence [13], une spectroscopie optique (la résonance des plasmons de surface ou SPR) permet de mesurer l'épaisseur

[1] Par ailleurs, la tenue mécanique du dépôt augmente considérablement après incubation avec le TC.

de lipide déposée, par éclatement de SUV, en fonction de la fraction de chaînes PEG liées à un cholestérol (parmi des chaînes diluantes). Pour les taux de couverture supérieurs à 60%, les phospholipides sont adsorbés à l'état de monocouche plutôt que de bicouche. Une interaction hydrophobe trop forte entre les chaînes grasses des lipides et les ancres cholestérol expliquerait donc l'éclatement des vésicules géantes.

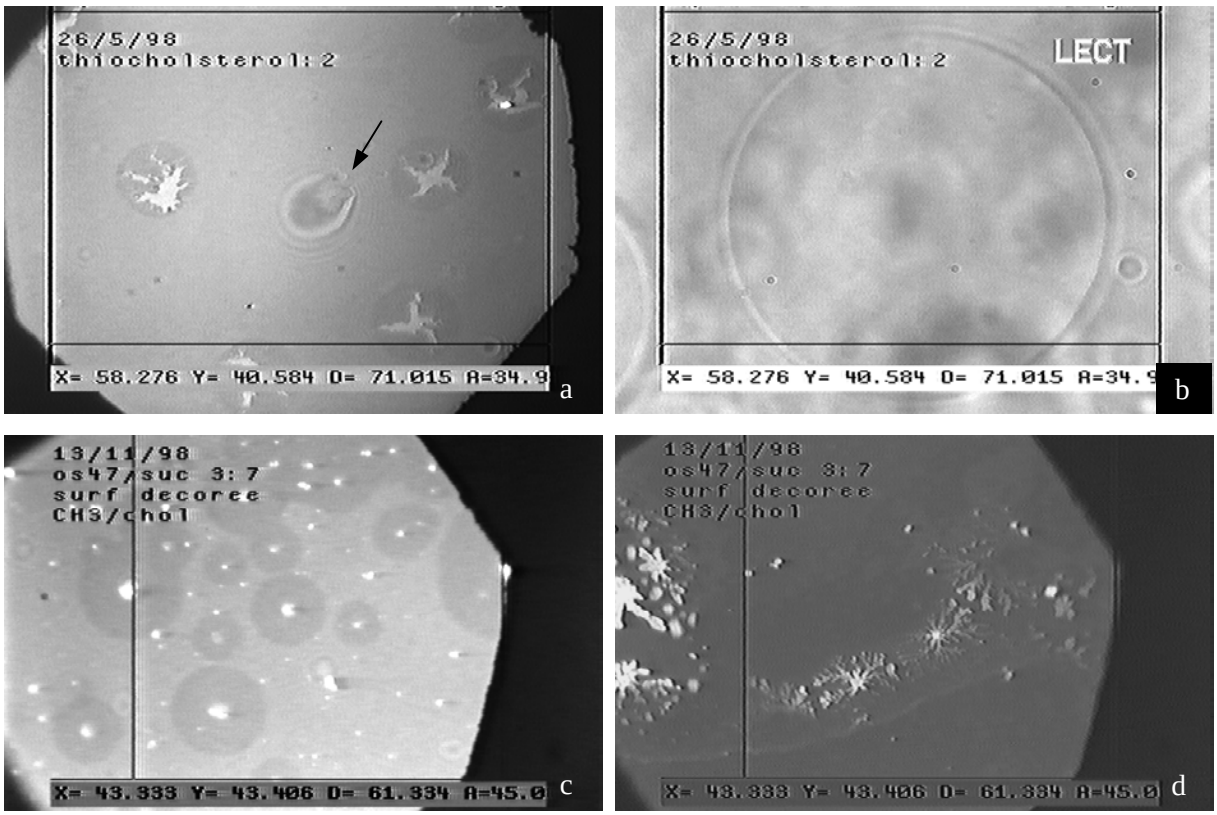


Figure 18 : Monocouche de thiocholestérol pur à la surface du verre, mise en présence de vésicules géantes de DOPC. Quelques vésicules sont attachées à la surface par des zones de contact fort (flèche sur l'image en réflexion, a), et apparaissent intactes sur l'image en transmission (b). Les autres ont éclaté, en laissant sur la surface des disques sombres, contenant une trace brillante à l'intérieur (c). Parfois celle-ci possède une forme dendritique prononcée (a et d). Les images (c) et (d) sont prises dans la zone homogène d'une surface décorée. Les dimensions du champ sont inscrites en bas en µm.

Afin de diminuer l'adhésion des surfaces greffées au cholestérol, on réalise des monocouches mixtes de thiocholestérol et d'un thiol diluant, le dodécanethiol $C_{12}H_{25}$–SH. L'interaction de ce dernier avec les bicouches de phospholipides est *a priori* faible. La seule difficulté réside dans le dosage des deux mercaptans. En effet, leurs proportions à la surface et dans la solution réactive sont différentes, et la relation entre les deux n'est pas linéaire. Avec un thiol diluant très proche, HOOC–$C_{11}H_{24}$–SH, la monocouche mixte résultante est moins riche en TC que le bain de réaction[20]. Par analogie, des fractions molaires de surface croissantes de 30, 40 et 50 mol% sont réalisées en utilisant des proportions de thiocholestérol en solution respectivement de 70, 85 et 90 mol%. Ces trois conditions

ont toutes conduit à des adhésions modérées des bicouches sur les surfaces, ne conduisant pas à l'éclatement des vésicules. On montre ci-dessous l'exemple d'une vésicule initialement liée à la lamelle par un point d'attache fort (flèche), tandis que le reste de la membrane fluctue. En quelques secondes, la zone de contact commence par se tendre (intensité lumineuse réfléchie homogène), puis décroît. La teinte centrale, initialement plus sombre que le fond, devient ensuite plus claire : la membrane s'est donc soulevée d'environ 100 nm par rapport à la paroi.

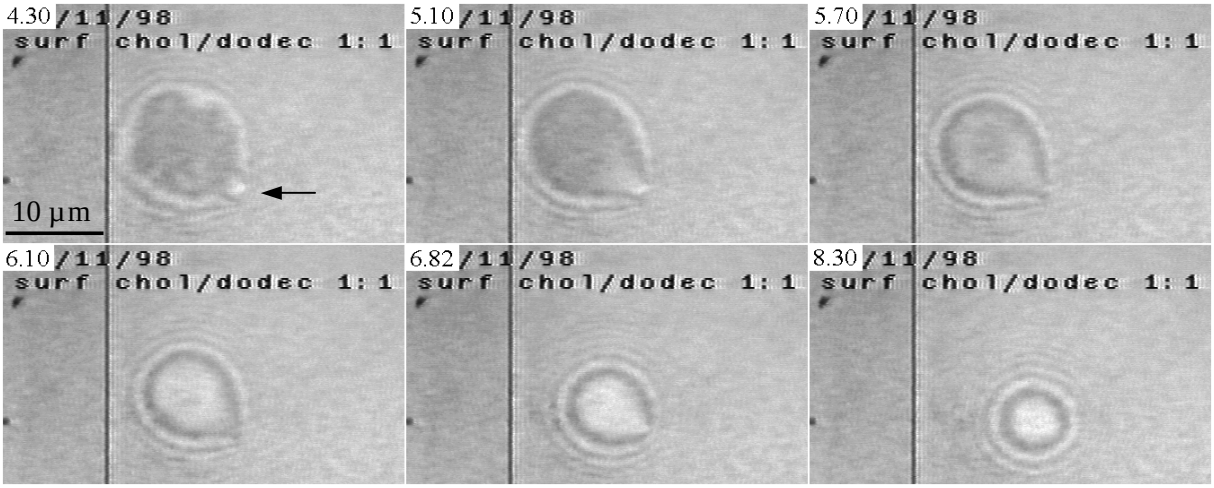


Figure 19 : Monocouche mixte obtenue en traitant la surface d'or par une solution alcoolique de thiocholestérol (2 mM) et de dodécanethiol (0.2 mM). La séquence montre le détachement d'une vésicule, en microscopie RICM. Le temps en secondes est indiqué en encart.

Cette méthode pour réaliser une adhésion faible entre des vésicules géantes et une surface solide présente l'avantage de ne nécessiter que deux manipulations : le dépôt d'or, puis le traitement de surface en une seule étape. La réalisation d'une couche fluide entre le substrat solide et les molécules adhésives n'a pas paru utile. La différence de tension entre des vésicules microscopiques et des vésicules géantes pourrait expliquer cette simplification des conditions. La membrane des SUV est lisse et tendue, tandis que celle des GUV possède suffisamment d'excès de surface pour épouser le profil microscopique de la paroi solide. La présence de molécules greffées non adhésives, qui diminuent l'interaction, s'est révélée par contre indispensable. Au vu du temps passé à le mettre au point, ce traitement de surface a été plutôt sous-exploité par la suite. Sur les surfaces adhésives de thiols sur l'or, l'adhésion des vésicules géantes peut être imagée en microscopie interférentielle RICM et en microscopie de fluorescence classique. Par contre le microscope à deux photons est « ébloui » par la réflexion du faisceau laser sur l'or, et on n'a donc pas pu réaliser de reconstruction volumique des vésicules adhérentes avec cette méthode d'imagerie.

c) Surface décorée par des bandes alternativement hydrophiles et hydrophobes

Une technique très astucieuse pour réaliser des surfaces « décorées » consiste à greffer un premier thiol fonctionnalisé uniquement sur les zones de contact entre la surface d'or et un tampon, puis à

traiter les parties restantes avec un second thiol, portant une fonction chimique différente. Cette impression par micro-contacts[21] permet de réaliser, sur une surface de l'ordre du cm^2, des motifs hydrophiles ou hydrophobes, de plus petite dimension comprise entre 1 et 100 µm. Par exemple, des bandes de charge superficielle alternativement positive et négative adsorbent sélectivement des particules colloïdales de charge opposée[23].

De telles surfaces décorées sont particulièrement intéressantes pour étudier comment une membrane fluide peut s'accommoder d'hétérogénéités chimiques contrôlées sur un substrat. L'adhésion de vésicules géantes sur ces surfaces entraîne l'accroissement de leur perméabilité, dépendant fortement de la géométrie des motifs (carrés, triangles, forme en peigne, lignes dans une seule direction ou bien croisées) et de leur taille[24]. Un cas particulier sera présenté en V–2.2 : un réseau de lignes, de largeur 2.5 µm, alternativement hydrophobes et chargées positivement[1]. On décrit ici le protocole pour imprimer ces lignes[4].

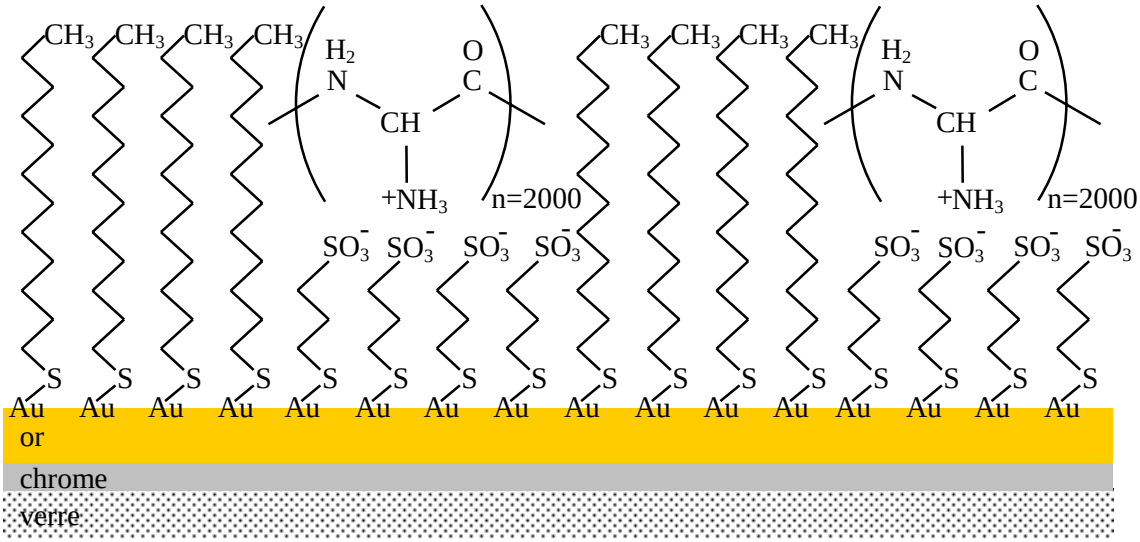


Figure 20 : Monocouche alternée greffée sur l'or, présentant des bandes successives de dodécanethiol (hydrophobe) et de 1-mercaptopropan-3-sulfonate (chargé négativement). Ces dernières sont recouvertes de poly(L-lysine), chargée positivement.

Dans des étapes antérieures, les motifs ont été gravés dans une résine photo-sensible, par une technique de micro-lithographie[2]. Un moule de résine permet de fabriquer plusieurs tampons identiques, en réticulant à l'intérieur un élastomère silicone, le poly(diméthylsiloxane) ou PDMS. Les

---

[1] Deux séries d'expériences ont été réalisées, avec Anne-Laure Bernard et Marie-Alice Guedeau-Boudeville (Lab. Matière Condensée / Collège de France), pour obtenir des informations sur ce système à partir des images en RICM et en fluorescence.

[2] Serge Palacin, Service de Chimie Moléculaire / CEA Saclay.

solutions de thiols sont préparées à 1 mM, le dodécanethiol (liquide) dans l'éthanol absolu, le 1-mercaptopropan-3-sulfonate de sodium (poudre) dans un mélange 1:1 en volume d'eau et d'éthanol. Après rinçage du tampon à l'éthanol, et séchage à l'azote, une goutte du thiol hydrophobe est déposée sur le réseau (dont l'emplacement est visible grâce à l'irisation optique). Le thiol en excès est chassé en insufflant de l'azote pendant 1 min. Ainsi imbibé du thiol hydrophobe, le tampon est imprimé contre une surface d'or (dégraissée peu avant par un traitement à l'ozone). En exerçant une pression légère, on suit la progression de la zone d'adhésion entre le PDMS et la surface, en regardant par transparence à travers le tampon. Le retrait doit être bref, sans glissement. La surface est immédiatement immergée dans le bain du thiol hydrophile, pendant 1 min. Elle est ensuite rincée abondamment à l'eau ultra-pure, puis incubée pendant une nuit dans une solution de poly(L-lysine), diluée à 0.01% w/v. Une fois rincée et séchée, la lamelle est utilisée pour recouvrir une préparation microscopique fermée, selon le mode opératoire décrit au 2.1b).

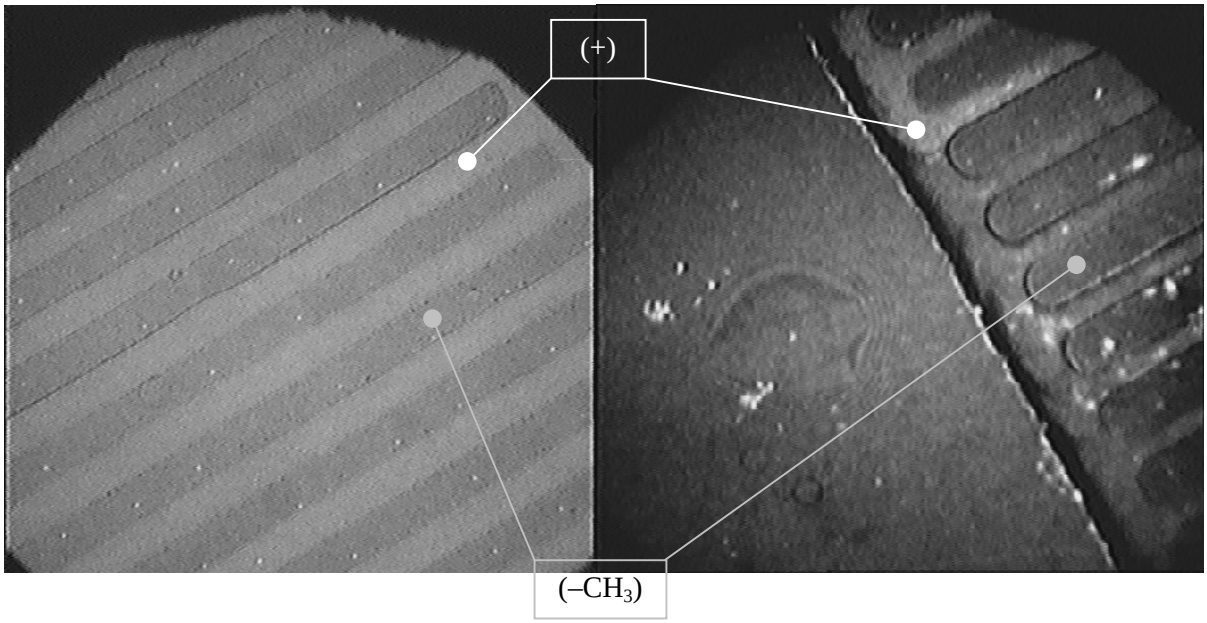


Figure 21 : Images en RICM d'une surface décorée de bandes, de largeur 2.5 µm, alternativement hydrophobes ($–CH_3$), et hydrophiles chargées (+). Le contraste provient de la différence d'indice optique. La zone homogène située à gauche du bord du réseau est adhésive (une vésicule y est collée).

II.3 Références du Chapitre II

1. Angelova, M. I. & Dimitrov, D. S. Liposome electroformation. *Faraday Discuss. Chem. Soc.* **81**, 303-311 (1986).
2. Angelova, M. I., Soléau, S., Méléard, P., Faucon, J. F. & Bothorel, P. Preparation of giant vesicles by external AC electric fields. Kinetics and applications. *Progr. Colloid Polym. Sci.* **89**, 127-131 (1992).
3. Angelova, M. I. *Liposome electroformation* in *Giant vesicles* (eds. Luisi, P. L. & Walde, P.) 27-36 (John Wiley & Sons, Chichester, 2000).
4. Bernard, A.-L. in *Thèse de Chimie Physique: Perméabilité de bicouches lipidiques vésiculaires soumises à une déformation: perceuse moléculaire et autres exemples* (Univ. Paris 6, Pierre et Marie Curie, Paris, 1999).
5. Wolf, A. V., Brown, M. G. & Prentiss, P. G. *Concentrative properties of aqueous solutions: conversion tables* in *CRC Handbook of chemistry and physics, 65th Ed* (ed. Weast, R. C.) D-222-265 (CRC Press, Boca Raton, 1984).
6. Dietrich, C., Angelova, M. I. & Pouligny, B. Adhesion of latex spheres to giant phospholipid vesicles: statics and dynamics. *J. Phys. II France* **7**, 1651-1682 (1997).
7. Ménager, C. in *Thèse de chimie inorganique moléculaire: Ferrofluides ioniques et bicouches chargées: phases lamellaires et vésicules magnétiques* (Univ. Paris 6, Pierre et Marie Curie, Paris, 1995).
8. Angelova, M. I., Hristova, N. & Tsoneva, I. DNA-induced endocytosis upon local microinjection to giant unilamellar cationic vesicles. *Eur. Biophys. J.* **28**, 142-150 (1999).
9. Rädler, J., Koltover, I., Salditt, T. & Safinya, C. R. Structure of DNA-cationic liposome complexes: DNA intercalation in multilamellar membranes in distinct interhelical packing regimes. *Science* **278**, 810-814 (1997).
10. Pitard, B. et al. Virus-sized self-assembling lamellar complexes between plasmid DNA and cationic micelles promote gene transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 14412-14417 (1997).
11. Fromherz, P., Kiessling, V., Kottig, K. & Zeck, G. Membrane transistor with giant vesicle touching a silicon chip. *Appl. Phys. A* **69**, 571-576 (1999).
12. Rädler, J. & Sackmann, E. Functionalization of solids by ultrathin soft polymer films and polymer/lipid film composites: modeling of cell surfaces and cell recognition processes. *Curr. Opin. Solid State & Mater. Sci.* **2**, 330-336 (1997).
13. Williams, L. M., Evans, S. D., Flynn, T. M. & Marsh, A. Kinetics of the unrolling of small unilamellar phospholipid vesicles onto self-assembled monolayers. *Langmuir* **13**, 751-757 (1997).
14. Brzoska, J. B., Shahidzadzeh, N. & Rondelez, F. Evidence of a transition temperature for the optimum deposition of grafted monolayer coatings. *Nature* **360**, 719-721 (1992).
15. Merkel, R., Nassoy, P., Leung, A. & Evans, E. Energy landscape of receptor-ligand bonds explored with dynamic force spectroscopy. *Nature* **397**, 50-53 (1999).
16. Tran, Y. in *Thèse de Physique des Liquides: Interfaces de polyélectrolyte greffé* (Univ. Paris 6, Pierre et Marie Curie, Paris, 1998).
17. Yang, Z. P., Engquist, I., Kauffmann, J.-M. & Liedberg, B. Thiocholesterol on gold: a nanoporous molecular assembly. *Langmuir* **12**, 1704-1707 (1996).

18. Bain, C. D. & Whitesides, G. M. Modeling organic surfaces with self-assembled monolayers. *Adv. Mat. Angew. Chem.* **101**, 522-528 (1989).

19. Sondag-Huethorst, J. A. M. & Fokkink, L. G. J. Potential-dependent wetting of octanethiol-modified polycrystalline gold electrodes. *Langmuir* **8**, 2560-2566 (1992).

20. Yang, Z. P., Engquist, I., Wirde, M., Kauffmann, J.-M., Gelius, U. & Liedberg, B. Preparation and characterization of mixed monolayer assemblies composed of thiol analogues of cholesterol and fatty acid. *Langmuir* **13**, 3210-3218 (1997).

21. Amit Kumar, H. A., Biebuyck, H. A. & Whitesides, G. M. Patterning self-assembled monolayers: applications in materials science. *Langmuir* **10**, 1498-1511 (1994).

22. Mrksich, M. & Whitesides, G. M. Using self-assembled monolayers to understand the interactions of man-made surfaces with proteins and cells. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **25**, 55-78 (1996).

23. Tien, J., Terfort, A. & Whitesides, G. M. Microfabrication through electrostatic self-assembly. *Langmuir* **13**, 5349-5355 (1997).

24. Bernard, A.-L., Guedeau-Boudeville, M.-A., Sandre, O., Palacin, S., di Meglio, J.-M. & Jullien, L. Permeation through lipid bilayers by adhesion of giant vesicles on decorated surfaces. *Langmuir* **16**, 6801-6808 (2000).

Chapitre III: Méthodes d'observation

Les vésicules géantes sont des objets ténus, à la fois macroscopiques par leur diamètre (quelques dizaines de µm), mais dont une dimension essentielle, l'épaisseur de la membrane, appartient au domaine microscopique (3–4 nm). Elles offrent l'avantage de pouvoir être étudiées sur un simple microscope optique, à condition d'utiliser des contrastes adaptés. Loin de constituer un traité d'optique détaillé, ce chapitre fait le point (!) sur les méthodes utilisées pour faire des images et en tirer des informations quantitatives.

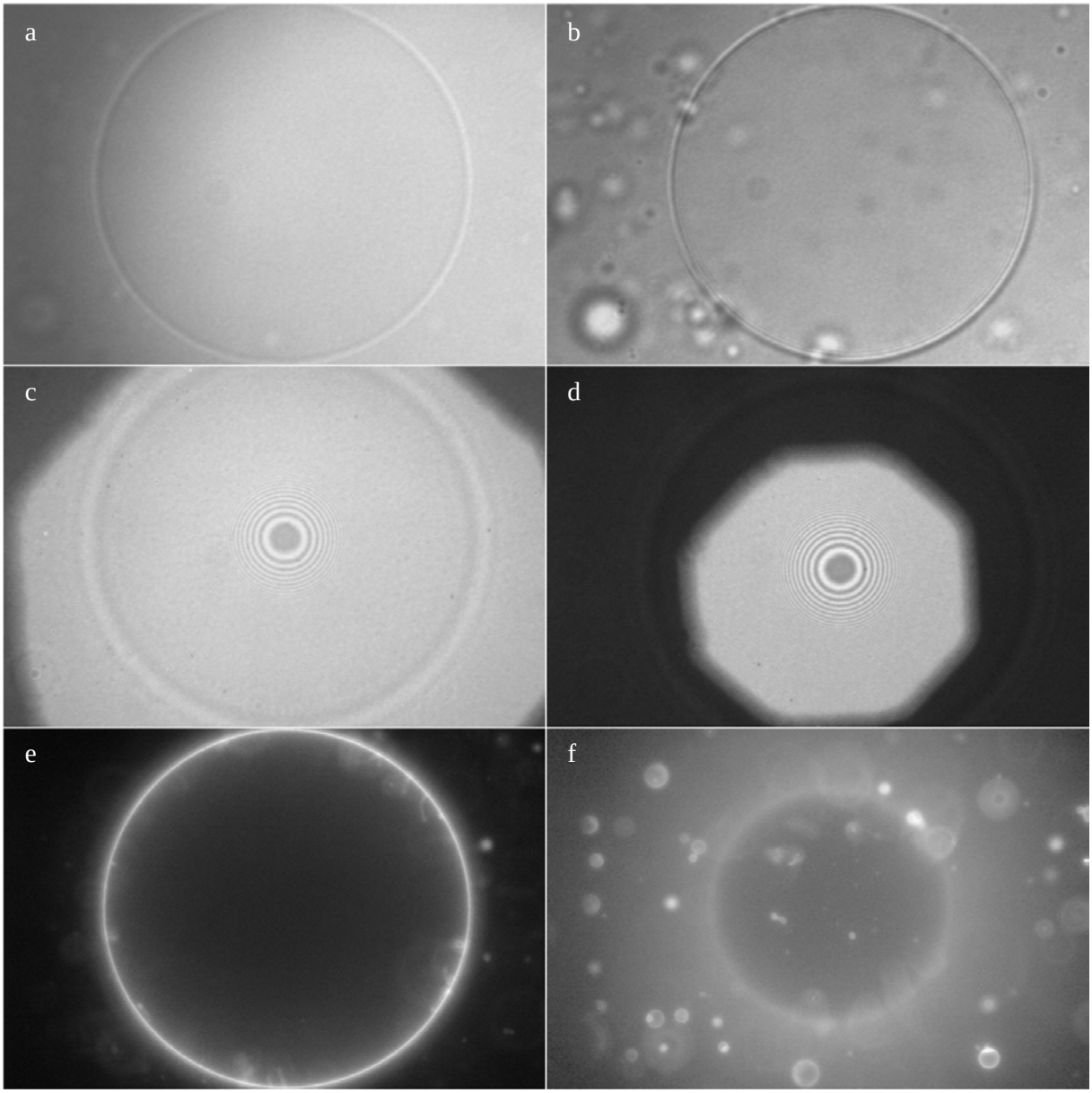


Figure 1 : La même vésicule remplie de glucose 2M et suspendue dans du sucrose 2M (Ø70 µm) est observée par transmission (a), contraste différentiel DIC (b), contraste interférentiel en réflexion RICM (c et d) et fluorescence (e et f).

Les vésicules devraient être complètement transparentes quand on les observe simplement au microscope en transmission. En effet, les lipides absorbent très peu la lumière visible, et de toute façon le trajet optique est beaucoup trop faible (épaisseur moléculaire). Pourtant, à l'aide d'un objectif d'ouverture numérique suffisante (NA[1] au moins égal à 0.40), on peut quand même les deviner. En effet, ce sont des objets de phase : la bicouche, qui possède un indice de réfraction $n_L \approx 1.49$[2], est plongée dans un solution d'indice n_S^{ext} et entoure un milieu d'indice n_S^{int}. La réfraction des rayons lumineux traversant la vésicule suffit à donner un (faible) contraste quand deux aux moins de ces trois indices sont différents. Sur la Figure 1a, le contraste provient de l'écart d'indices entre le glucose 2M interne $n_S^{\text{int}} = 1.384$ et le sucrose 2M externe $n_S^{\text{ext}} = 1.433$ (1). Quand les milieux interne et externe sont identiques, le contraste est plus faible car il doit venir de la bicouche elle-même. Les membranes sont alors visibles dans des solutions aqueuses diluées ($n_S \approx 1.33$), mais le contraste disparaît dans des solutions d'indice élevé (par exemple $n_S \approx 1.431$ pour le glycérol à 66%). L'image en transmission est finalement assez pauvre : on ne voit qu'une simple forme sphérique, dont la mesure est imprécise car la luminosité varie continûment (gris-noir-blanc-gris le long d'un rayon, en partant du centre). Quand on observe en réflexion en utilisant le contraste interférentiel (Nomarski ou DIC), une multitude de petites vésicules, invisibles auparavant, sont révélées autour de la grosse (b). Par ailleurs, l'image a acquis une teinte métallique et un effet d'ombrage (alternance gris-noir-blanc-gris ou gris-blanc-noir-gris suivant la direction). Dans l'image suivante (c), on a utilisé la technique dite RICM, où des interférences apparaissent entre la vésicule et la lamelle de verre. Ces anneaux deviennent plus contrastés lorsque l'on ferme le diaphragme de champ (d). Les deux dernières images (e et f) on été obtenues en fluorescence, à l'aide d'une sonde hydrophobe insérée parmi les phospholipides. Celle de gauche, focalisée sur l'équateur de la vésicule, est bien nette. Elle fait apparaître des détails supplémentaires : des petits tubes de membrane connectés à la vésicule (spaghetti Panzani). Par contre, l'image de droite, focalisée à une hauteur tropicale de l'hémisphère supérieur, est assez floue. Ce défaut de conjugaison optique est inhérent à la fluorescence, qui est excitée sur une profondeur large autour du plan focal. Toutes ces méthodes sont implantées sur un même statif de microscope droit Reichert-Jung Polyvar-MET, et peuvent être alternées rapidement. On passe maintenant en revue les principes et caractéristiques plus détaillés de chacune. Par la suite, un autre dispositif utilisé dans ce travail sera présenté : le microscope de fluorescence à deux photons (TPEF), couplé à une nouvelle imagerie mise au point récemment, la microscopie de génération de second harmonique (SHG).

---

[1] Un objectif collecte un cône de lumière délimité par un angle α défini par $\text{NA} = n \sin\alpha$, où n est l'indice optique, selon les cas de l'air (n=1) ou du milieu d'immersion (eau n=1.33 ou huile n=1.52).

[2] Comme le lipide est un milieu apolaire on a $n_L \approx \sqrt{\varepsilon_L}$.

III.1 Microscopies interférentielles

1.1 Contraste interférentiel différentiel (DIC) en réflexion

Moins connue que le contraste de phase, l'interférométrie différentielle est une technique au moins aussi performante pour imager les cellules, et accessoirement les vésicules géantes. Elle est basée sur un dédoublement du faisceau lumineux en deux ondes, décalées latéralement d'une distance *d*. Le dédoublement de l'image est invisible quand *d* est choisie bien en-dessous de la résolution du microscope. Par contre, la réflexion sur des objets de phase déforme les deux surfaces d'ondes, dont on visualise les interférences différentielles entre polariseur et analyseur croisés. Le dispositif est schématisé sur la figure suivante :

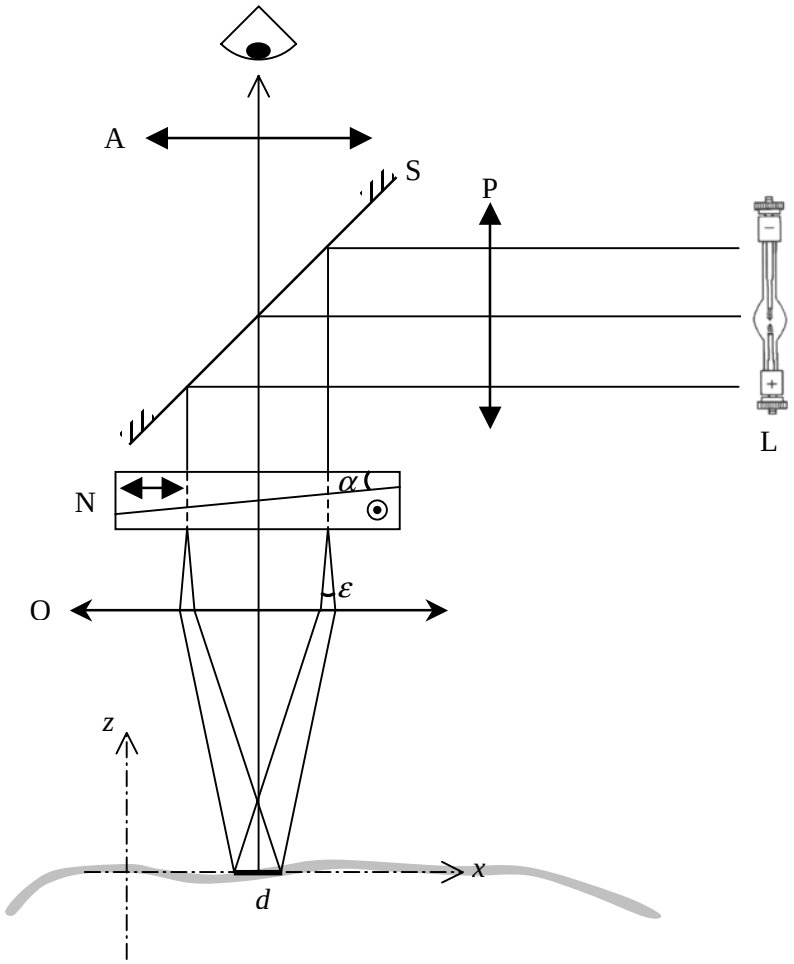


Figure 2 : Schéma optique du microscope en DIC par réflexion (L :lampe HBO, P :polariseur, S :lame séparatrice, N :biprisme de Nomarski, O :objectif, A :analyseur), d'après [(2)].

La source peut être une lumière blanche. En pratique, on a utilisé une lampe à vapeur de mercure[1], qui possède un spectre de raies. Le faisceau est polarisé rectilignement, réfléchi sur une lame séparatrice, puis dédoublé par un biprisme de Nomarski. Les deux rayons émergents font entre eux un

[1] réf. Osram HBO 200W/4, fournisseur Eurosep Instr. BP 8233 95801 Cergy-St-Christophe, tél. 01.34.22.95.22

angle ε relié à l'angle du prisme α (moins de 0.1°) et à sa biréfringence Δn (quartz) par $\varepsilon = 2\Delta n \tan\alpha$. Le décalage latéral, $d = \varepsilon f$, où f est la distance focale de l'objectif, est alors d'environ 0.1 µm. Après réflexion sur la surface de la vésicule, les deux ondes possèdent entre elles une différence de marche $\delta = 2d\dfrac{\partial z}{\partial x}$. Elles retraversent l'interféromètre[1], puis la lame semi-transparente et finalement l'analyseur. Quand celui-ci est croisé avec le polariseur, l'intensité observée est proportionnelle à $\sin^2(\pi\delta/\lambda)$, λ désignant la longueur d'onde. Cette méthode d'imagerie réalise donc un opérateur gradient sur la surface réfléchissante, dans une direction x qui est liée à l'orientation des axes du biprisme. En déplaçant celui-ci, on varie la direction de l'ombrage et on ajuste la teinte du fond.

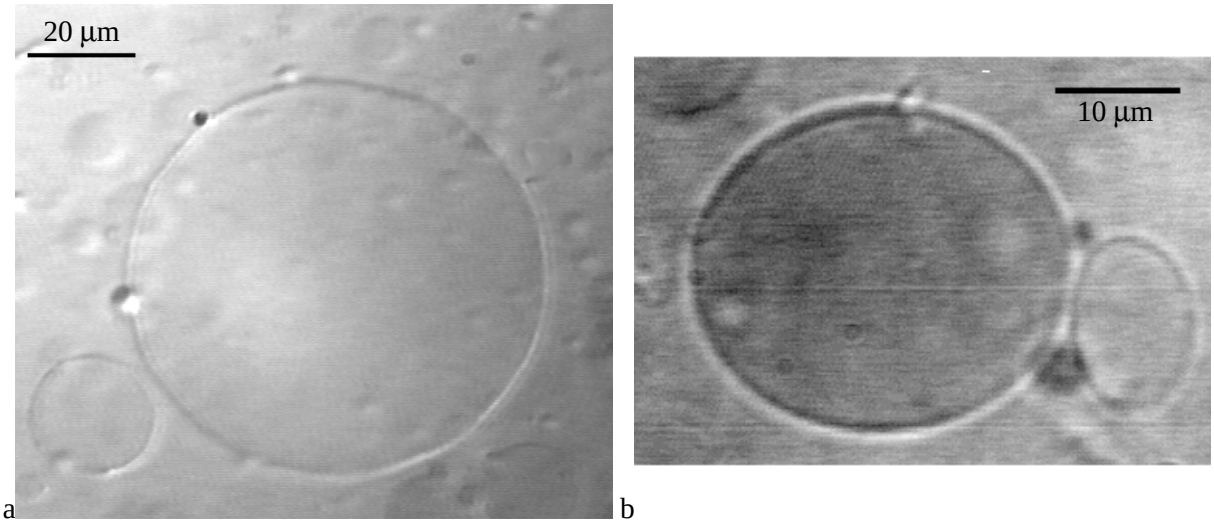


Figure 3 : Vésicule magnétique observée en DIC (a). Le contraste fait ressortir la membrane, qui réfléchit la lumière grâce au saut d'indice $n_L - n_S^{\text{ext}}$. Contrairement au contraste de phase, le fond est identique à l'intérieur et à l'extérieur, malgré $n_S^{\text{int}} \neq n_S^{\text{ext}}$. Ici la solution interne est en plus absorbante, car colorée en rouge par l'oxyde de fer (image b, en transmission).

1.2 Contraste interférentiel en réflexion (RICM)

Cette autre méthode est basée sur des interférences bien connues à l'échelle macroscopique : les franges du coin d'air et les anneaux de Newton. En microscopie, les deux surfaces réfléchissantes sont constituées d'une part par la lamelle de verre, d'autre part par un objet situé à proximité, par exemple une cellule ou une vésicule. On éclaire avec une lumière monochromatique, en pratique en filtrant l'une des raies du mercure, à λ=546.1 ou 435.8 nm. La position des franges ou des anneaux d'égale épaisseur permet de remonter au profil de distance entre la surface et la membrane, de 0.1 à 1–2 µm.

[1] En lumière transmise, le DIC nécessite un second biprisme en sortie, mais pas en réflexion car l'interféromètre est autocompensé.

La RICM est appropriée pour étudier l'adhésion des membranes sur des substrats modèles. Une autre application concerne les films déposés sur le verre, d'épaisseur plus mince que l'interfrange. De l'analyse des teintes on remonte à l'épaisseur, jusqu'à 100 nm, et avec une précision de ±0.5 nm.

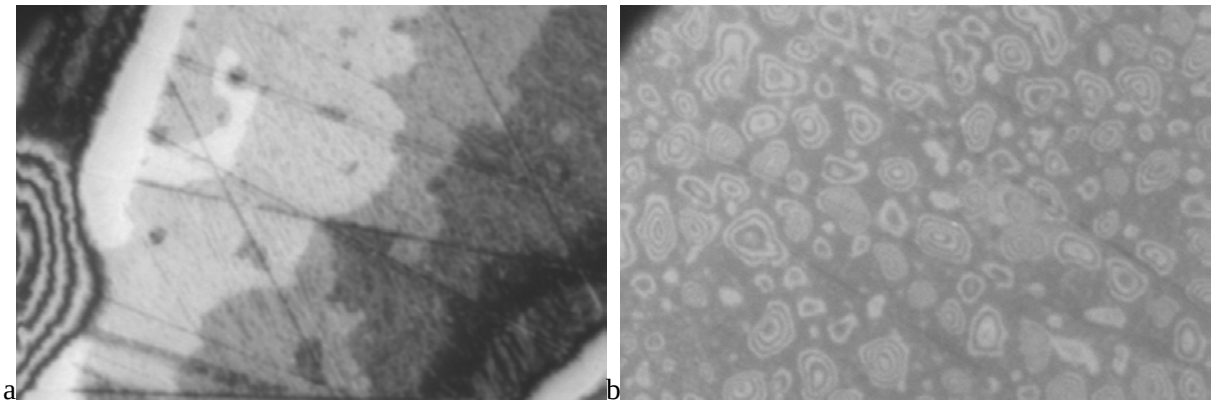


Figure 4 : Illustration des deux champs d'application de la RICM sur l'exemple d'un copolymère $PDMS_{2300}$–PEG_{2000} (synthèse P. Auroy PCC/Institut Curie) déposé sur du verre/ITO, et recuit 75h sous vide à 70°C. Le film sec présente des marches de teinte constante (a). Dans du glycérol 66%, une multitude d'anneaux concentriques apparaît, indiquant des cloques hautes d'une fraction de µm (b).

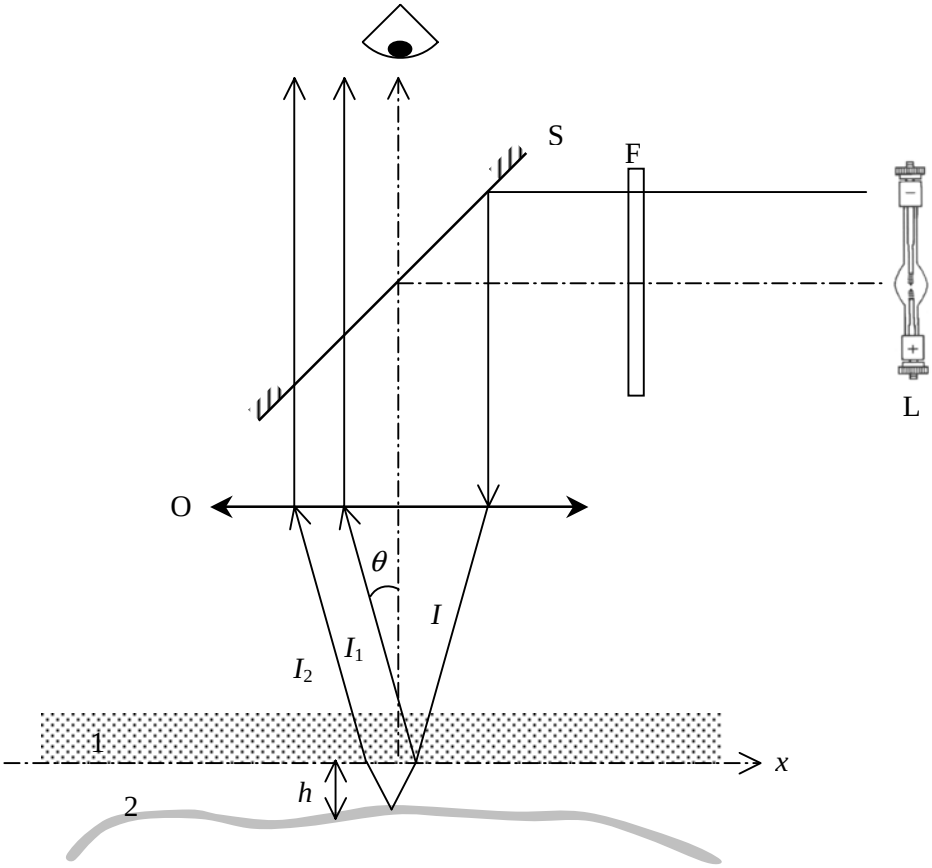


Figure 5 : Schéma optique du microscope en RICM (L :lampe HBO, F :filtre interférentiel, centré sur 545.8nm avec une largeur de 9.2nm, S :séparatrice, O :objectif, 1 :lamelle couvre-objet, 2 :membrane).

La lumière se réfléchit en premier lieu à l'interface entre la lamelle couvre-objet et la solution (rayon I_1). Le second dioptre (rayon I_2) est constitué par la membrane, ou tout autre objet observé, sous réserve qu'il soit suffisamment près de la lamelle (environ 1 µm). La figure d'interférences entre les rayons I_1 et I_2 est localisée dans le film de solution intercalé entre les deux surfaces réfléchissantes. Sur la Figure 6, on a rendu nettes les franges en mettant au point juste au-dessus de la lamelle. Cette expérience illustre aussi les deux types d'informations acquises simultanément en RICM : les interférences donnent accès au profil de distance entre la membrane et le verre ; la technique fournit par ailleurs des images très contrastées de la surface plane elle-même. Ainsi peut-on imager un motif aussi fin sur la lamelle que des bandes d'épaisseur moléculaire, mais d'indice optique différent selon que la monocouche greffée est hydrophile ou hydrophobe. Dans cet exemple, la fine pellicule d'or, transparente, semble avoir eu un effet bénéfique, analogue à certains dépôts diélectriques (MgF_2) préconisés pour améliorer le contraste en RICM[3].

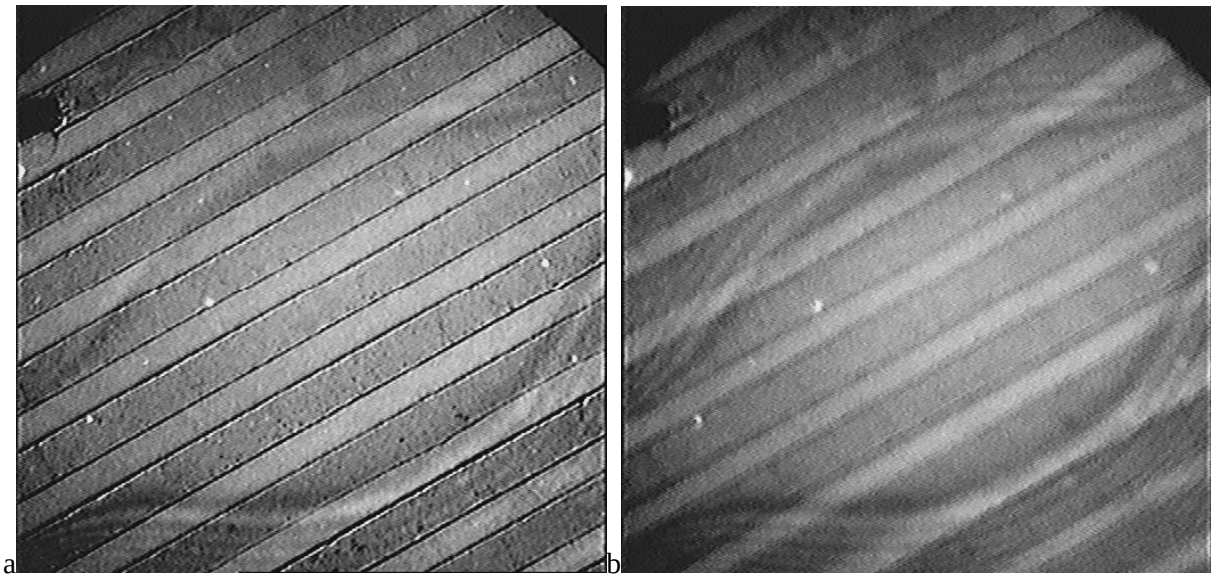


Figure 6 : Mise au point sur la lamelle (a) et sur les franges d'interférence (b), localisées au-dessous d'une vésicule. Le verre est couvert d'un fin dépôt d'or (5 nm), puis d'une monocouche de thiols disposés en bandes alternativement hydrophiles et hydrophobes (II–2.4). Périodicité du réseau :5 µm.

a) Reconstruction du profil de distance

Le déphasage géométrique entre les rayons I_1 et I_2 est $\phi = \frac{2\pi}{\lambda} 2 n_S h \cos\theta$, où λ est la longueur d'onde, n_S l'indice de réfraction de la solution, et θ l'angle entre les rayons et la normale. On considère ici $\theta << 1$, mais l'effet de l'angle d'incidence sera discuté par la suite. Un déphasage supplémentaire de π est à prendre en compte, lorsque la deuxième interface sépare la solution ($1.33<n_S<1.47$, glycérol pur) d'un milieu d'indice plus élevé, comme c'est toujours le cas pour une membrane lipidique ($n_L \approx 1.49$). Dans ce modèle simplifié, le flux lumineux réfléchi est la superposition de deux ondes :

Eq. (1) $$I(x) = I_1 + I_2 - 2\sqrt{I_1 I_2}\cos\left(2\pi \frac{h(x)}{i}\right)$$

où I_1 et I_2 désignent les intensités de chaque onde, et $i = \lambda/2n_S$ l'interfrange, environ 200 nm pour la raie verte du mercure, le milieu étant une solution aqueuse. L'intensité varie ainsi de façon sinusoïdale en fonction de l'épaisseur de liquide traversée, $2h(x)$. Dans la zone de contact subsiste une mince couche d'eau intercalée entre la membrane et la surface, situées à une distance d'équilibre $h_{éq}$ qui dépend du type d'interaction. Si $h_{éq} << i$, le déphasage géométrique est négligeable devant l'inversion de phase que subit l'onde à la réflexion sur la membrane, et le disque d'adhésion apparaît sombre.

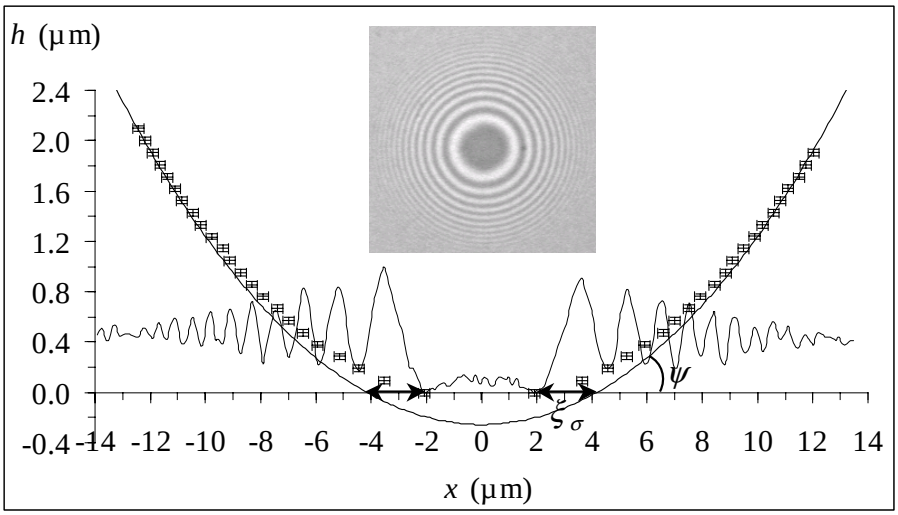


Figure 7 : Profil de la vésicule de la Figure 1, reconstitué à partir des anneaux d'interférence. Rayon de la vésicule : R=24.2 µm. Angle de contact (extérieur) : ψ=7°. Rayon de la zone de contact (disque noir) : r_W=4.2 µm. Indice du milieu (sucrose 2M) : n_S=1.433. Interfrange : $i = \lambda/2n_S = 190\,\text{nm}$. Les double-flèches mesurent la longueur de raccord tangentiel $\xi_\sigma \approx 2\,\mu\text{m}$.

Sur la Figure 7, on a porté (en trait fin) la modulation de l'intensité en parcourant diamétralement l'image du contact. Les bords de la zone sombre définissent les points où la membrane se détache de la surface. Quand on s'éloigne du centre, la hauteur par rapport au verre augmente de $i/2 = 95\,\text{nm}$ entre un extremum relatif de l'intensité et celui qui lui succède. On reconstruit ainsi de proche en proche le profil de distance $h(x)$ entre la membrane et la lamelle. Les barres d'erreur ont été estimées à $\pm 25\,\text{nm}$ sur la hauteur (incertitude sur l'interfrange due à l'ouverture angulaire du faisceau) et $\pm 0.2\,\mu\text{m}$ sur l'abscisse x (la résolution latérale est limitée par la diffraction[1]). Par ailleurs, le rayon à l'équateur de la vésicule est mesuré avec la meilleure précision sur l'image de fluorescence (Figure 1e). Ceci permet de tracer (en trait plus épais) le contour d'une sphère de même rayon, tronquée par la surface, et faisant avec elle un angle de contact ψ (par analogie avec le mouillage d'une goutte liquide). Vers les

[1] Un critère possible est $\Delta x = 1.22\lambda/2\text{NA}$ (diffraction par la pupille de l'objectif), soit 0.37µm pour NA=0.9.

hauteurs élevées, le profil expérimental se raccorde bien à la sphère. Par contre, près de la zone de contact, la membrane rejoint la surface tangentiellement (cf. I–3.3). La longueur de raccord caractéristique est mesurée entre le bord de la zone noire et le point d'intersection de la surface avec le profil sphérique limite[4]. On mesure sur cet exemple $\xi_\sigma \approx 2\,\mu\text{m}$, d'où l'on tire la tension de surface $\sigma = 2\times10^{-8}$ N/m d'après Eq. (I–6) et l'énergie d'adhésion $W = 1.5\times10^{-10}$ N/m d'après Eq. (I–5). L'interaction est due à l'adsorption d'arginine sur la vésicule, qui charge positivement la membrane et la fait coller au verre.

b) Paramètres influençant le contraste

Dans le modèle à deux ondes, le contraste des anneaux s'écrit en fonction des deux intensités :

Eq. (2)
$$C = \frac{I_{\max} - I_{\min}}{I_{\max} + I_{\min}} = \frac{2\sqrt{I_1 I_2}}{I_1 + I_2}$$

Il est d'autant meilleur que les valeurs de I_1 et I_2 sont proches. Le coefficient de réflexion de Fresnel à l'interface entre les milieux *i* et *j*, en incidence normale, s'écrit $R_{ij} = (n_i - n_j)^2 / (n_i + n_j)^2$. Les intensités réfléchies s'écrivent alors, en fonction de l'intensité incidente I_0, d'une part $I_1 = R_{VS} I_0$ et d'autre part $I_2 = 4R_{SL}\sin^2(2\pi n_L e/\lambda) I_0$ (V :verre, S :solution, L :lipide). L'effet de taille finie du milieu lipidique, dont tient compte cette expression[3], est nettement visible dans les expériences : les vésicules multilamellaires donnent des anneaux plus contrastés que les unilamellaires. Pour une bicouche unique (n_L=1.49 et e=4 nm) dans l'eau (n_S=1.33), près d'une surface de verre nu (n_V=1.52), les intensités sont $I_1 \approx 4\times10^{-3} I_0$ et $I_2 \approx 6\times10^{-5} I_0$, et le facteur de contraste est estimé à $C \approx 25\%$. Un traitement diélectrique sur le verre diminue l'intensité réfléchie par le premier dioptre (fluorure de magnésium d'indice n_{MgF2}=1.39), et améliore le contraste jusqu'à $C \approx 70\%$. Le même effet est produit par une couche mince conductrice, d'or ou bien d'oxyde d'indium et d'étain (ITO).

Figure 8 : Inversion du contraste entre une bille de PDMS réticulé (n_{PDMS}≈1.4) et le verre (n_V=1.52) en passant d'une solution de glycérol à 30% (n_S=1.378) à une solution à 40% (n_S=1.394).

L'indice du milieu liquide est un autre paramètre important, comme l'indiquent les images précédentes. Dans cette expérience, l'objet considéré est une bille d'une élastomère silicone (PDMS, Sylgard[(5)]), fabriquée par réticulation à partir d'une émulsion dans le glycérol. Les billes sont ensuite diluées en ajoutant de l'eau. Le PDMS présente une adhésion sur le verre, les contacts étant imagés en RICM. On note alors une inversion du contraste de la zone d'adhésion par rapport au reste de la surface : plus sombre quand l'indice de la solution contient moins de glycérol, et plus claire quand la concentration de glycérol dépasse 40%. La valeur seuil de l'indice de la solution semble être $n_S \approx 1.39$, valeur proche de celui du PDMS. Un point troublant reste néanmoins que l'on puisse ajuster le contraste du disque d'adhésion en changeant la composition de la solution, alors même que le contact PDMS/verre est sec, c'est-à-dire sans film liquide intercalé.

Revenons sur la validité du modèle très simplifié utilisé pour décrire les interférences. Il prévoit une modulation sinusoïdale infinie, de contraste constant. Or, dans les expériences, seulement un nombre fini d'oscillations est observé, le contraste décroissant rapidement en fonction de l'ordre d'interférence. Certains cas ne présentent même pas d'anneaux du tout (par exemple les billes de PDMS adhérant sur le verre, alors qu'elles en possédaient dans leur phase d'approche de la surface). Plusieurs facteurs sont à l'origine de cette dégradation du contraste :

- l'ouverture angulaire d'illumination INA

Les rayons lumineux n'arrivent pas tous perpendiculairement aux surfaces, mais avec des angles θ compris entre 0 et α, l'angle d'ouverture, que l'on peut diminuer en fermant le diaphragme de champ[1]. En raison de la faible cohérence de la source lumineuse, les ondes réfléchies avec des angles différents sont sommées de façon incohérente[(6)]. L'enveloppe des interférences est alors donnée par un sinus cardinal, en fonction de la variable $y = \phi \sin^2(\alpha/2)$. A partir de l'annulation du contraste sur la Figure 7, on estime $\alpha \approx 25°$ dans ce cas (INA=0.6). La fermeture du diaphragme résulte ainsi d'un compromis entre le contraste des anneaux et la luminosité moyenne.

- la pente du profil

Même en incidence proche de la normale, les anneaux sont parfois invisibles. Ce type de brouillage des interférences est provoqué par un profil de distance $h(x)$ trop pentu. Pour être résolus sur l'image, deux anneaux successifs doivent être séparés l'un de l'autre d'une distance au moins égale à la limite de diffraction, $\Delta x \approx 0.4$ µm. L'angle maximum mesurable entre la membrane et la lamelle est donc $\arctan(i/\Delta x)$, soit 27° pour $i \approx 0.2$ µm. La plage d'angles de contact accessibles par RICM est donc limitée à $\psi < 27°$ (adhésion faible) ou $\psi > 153°$ (adhésion forte). On vérifie que l'angle des billes de

[1] Diaphragme grand ouvert, l'angle de collecte maximal est 43° pour l'objectif Olympus LUMPlanFl 60x NA 0.9 à immersion à eau, et 55° pour le Zeiss Achroplan 100x NA 1.25 à huile.

PDMS sur le verre est bien trop abrupt pour donner des anneaux : d'après le rayon de l'équateur et celui de la zone d'adhésion, $\psi = \arcsin(r_W / R)$ soit environ 30°.

- la dilatation des franges

Un second effet du à la pente du profil est à prendre en compte. Comme les rayons I_1 et I_2 émergent avec un écart angulaire $2h'(x)$, leur zone de recouvrement est décalée latéralement. En conséquence, l'interfrange n'est pas constant, mais décroît quand l'ordre d'interférences augmente. Les angles mesurés simplement à partir de l'interfrange théorique sont alors sous-évalués, et les rayons de courbure surévalués. Des abaques permettent néanmoins de les corriger[7].

c) Autres applications de la RICM

La RICM présente des avantages certains pour étudier les conformations d'une membrane près d'une surface solide, même si son analyse quantitative est parfois délicate. Nonobstant les artefacts optiques mentionnés ci-dessus, le passage de l'intensité au profil de distance est parfois équivoque, à cause de l'inversion de la fonction cosinus : la variation de hauteur est connue, mais pas son signe. Comme une seule figure d'interférences contient un grand nombre d'informations de phases, cette technique permet de suivre des phénomènes rapides, comme les fluctuations thermiques près d'une paroi solide[8,9] (voir V–1). On peut aussi en faire une utilisation purement d'imagerie, avec en prime quelques renseignements semi-quantitatifs. Dans la séquence ci-dessous, une vésicule est entraînée par un flux de cisaillement, et glisse sur la surface de verre. La hauteur qui l'en sépare est comprise entre 0.1 et 0.3 µm, au vu des quelques franges situées sous la vésicule, qui sont par ailleurs très fluctuantes. L'asymétrie des anneaux est en accord avec la déformation prédite au paragraphe I–3.7.

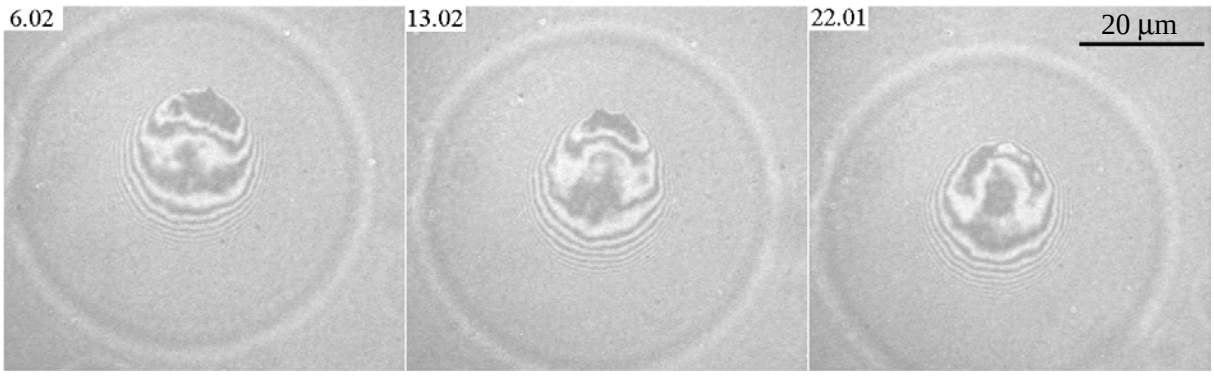


Figure 9 : La RICM permet une analyse très fine de la zone située à proximité du verre. Ici, on observe la déformation d'une vésicule par un flux de cisaillement. Le temps en s est indiqué en encart.

III.2 Microscopie de fluorescence

2.1 Principe

Cette microscopie consiste à imager, sur un fond noir, des objets marqués spécifiquement par des molécules fluorescentes. La fluorescence étant localisée sur la partie de la préparation qui possède une affinité pour le marqueur, des structures très ciblées invisibles par d'autres contrastes sont révélées. Cette grande spécificité en a fait une méthode de choix en biologie, pour laquelle des sondes fluorescentes ont été développées : certaines sont spécifiques d'un milieu ou d'un type de molécule, d'autres sont indicatrices du pH, de la concentration d'un ion ou d'un paramètre physique tel que le champ électrique. Pour imager des membranes, naturelles ou artificielles, on utilisera des marqueurs lipophiles. Des expériences sont aussi possibles avec des molécules fluorescentes solubles dans l'eau, encapsulées dans la vésicule ou au contraire exclues. Dans ce cas, la microscopie de fluorescence en onde évanescente (EWIF ou TIRFM), excitée par un faisceau laser en réflexion totale, permet d'étudier finement les phénomènes d'adhésion et de fusion de cellules[10] et de vésicules[11]. Une autre technique utilise des interférences de la fluorescence entre une membrane et un substrat solide, réfléchissant : le contraste interférentiel en fluorescence[12], FLIC, qui en quelque sorte allie la microscopie de fluorescence et la RICM.

On détaille ici les éléments classiques du module de fluorescence. Comme pour les méthodes précédentes, le trajet optique depuis la lampe HBO emprunte la voie d'illumination épiscopique. Après passage dans le filtre E, la composante bleue de la lumière issue de la lampe est réfléchie sur le miroir dichroïque. Elle passe alors dans l'échantillon, dont elle excite la fluorescence. La lumière émise (verte, jaune ou rouge) traverse cette fois le dichroïque, transparent aux grandes longueurs d'onde. Les rayons d'excitation simplement réfléchis par la préparation sont arrêtés par le filtre A.

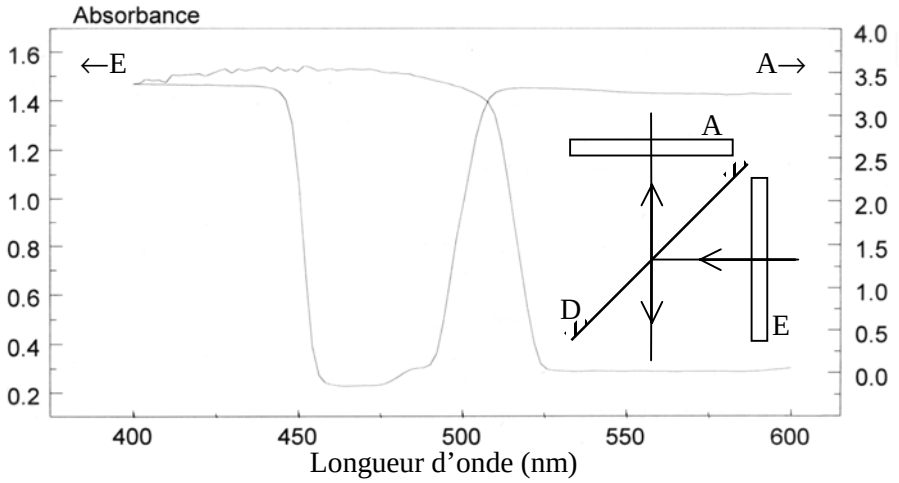


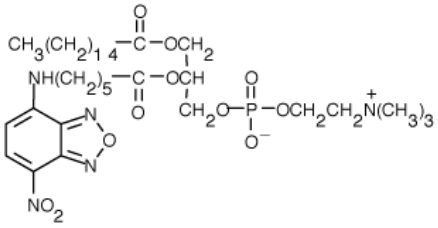
Figure 10 : Spectres en absorbance du filtre d'excitation E passe-bande (BP455–490, à gauche) et du filtre d'arrêt A passe-bas (LP515, à droite). Le seuil du miroir dichroïque D est à 500 nm.

La détection des images de fluorescence nécessite parfois une caméra très sensible, intensifiée ou refroidie. Dans les cellules vivantes, le flux lumineux doit être minimal pour ne par initier de réactions photochimiques destructives. Par contre, avec les vésicules on peut se permettre un éclairage intense. Une simple caméra CCD (Cohu 4910) reliée à un magnétoscope VHS classique permet d'enregistrer des images de bonne qualité. Le choix d'un marqueur fluorescent efficace est néanmoins primordial.

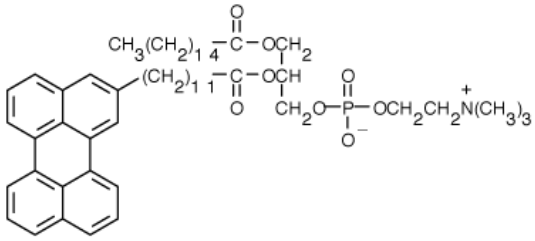
2.2 Marqueurs fluorescents membranaires

a) Phospholipides fluorescents

Des phospholipides marqués sur l'une des chaînes grasses par un fluorophore se mélangent facilement avec un phospholipide diluant, classiquement DOPC. Comme ces molécules sont de véritables phospholipides, elles peuvent être incorporées à une concentration comprise entre 1 et 10 mol% de la quantité total de lipide, sans déstabilisation de la structure en bicouche. Deux marqueurs très courants ont été testés : NBD (maxima d'absorption à 467 nm, et d'émission à 533 nm, valeurs tabulées) et pérylène. Ce dernier présente une structuration particulière de ses spectres (Figure 12).

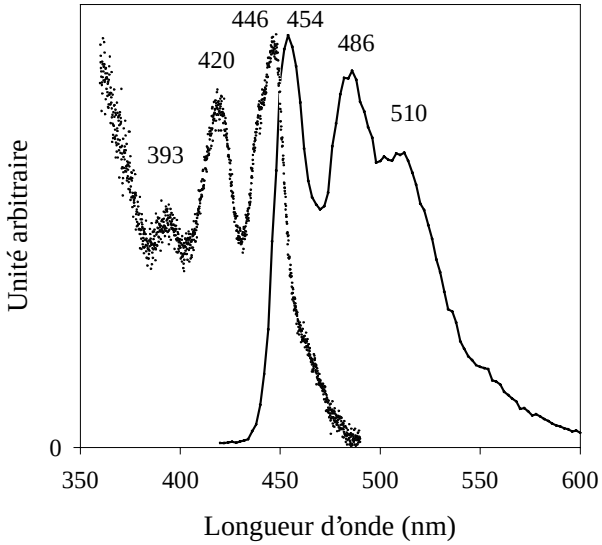


(a)



(b)

Figure 11 : (a) NBD-C6-HPC [1] ;(b) Pérylène-PC [2]



[1] 2-(6-(7-nitrobenz-2-oxa-1, 3-diazol-4-yl)amino)hexanoyl-1-hexadecanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine

[2] 1-hexadecanoyl-2-(3-perylenedodecanoyl)-sn-glycero-3-phosphocholine

Figure 12 : Spectres d'absorption (points) et d'émission (ligne continue) du pérylènePC. Le spectre d'absorption a été réalisé dans une cuve de quartz (épaisseur 200 μm) contenant 75 μL de vésicules soniquées. La montée de l'absorbance du côté des ultra-violets est due à la diffusion de la lumière par les vésicules, dont les tailles après sonication sont comprises entre 0.1 et 1 μm. Le spectre d'émission a été mesuré sur l'image d'une vésicule unique, sur le microscope à 2 photons (excitation à 740 nm).

b) Sondes (aminostyryl)pyridinium et analogues

Les dérivés du chromophore 4-(p-aminostyryl)-1-pyrydinium ont été construits à l'origine pour avoir une fluorescence qui varie en fonction d'un potentiel électrique transmembranaire : Di-10-ASP et Di-10-ASPPS [(13)], Di-6-ASPBS [(14)], et RH237 [(15)], qui est un analogue plus long. Par construction, ces molécules présentent un effet très fort de transfert de charge : le doublet libre de l'atome d'azote est délocalisé à travers un long système de liaisons pi conjuguées jusqu'à l'ammonium. Un tel système de groupements donneur et accepteur conjugués est appelé « push-pull ». Dans RH237, le « bras de levier électronique » comporte deux doubles liaisons supplémentaires. Non seulement ces molécules possèdent un moment dipolaire permanent, mais de plus elles sont extrêmement polarisables (voire hyperpolarisables) dans un champ électrique : externe (appliqué par des électrodes) ou interne (le champ dipolaire créé par le solvant), statique ou variable (jusqu'aux fréquences optiques). Cette grande déformabilité du nuage électronique délocalisé se traduit sur le spectre d'émission de fluorescence par des propriétés comme l'électrochromie (décalage du pic avec un champ électrique) ou la solvatochromie (variation selon la constante diélectrique).

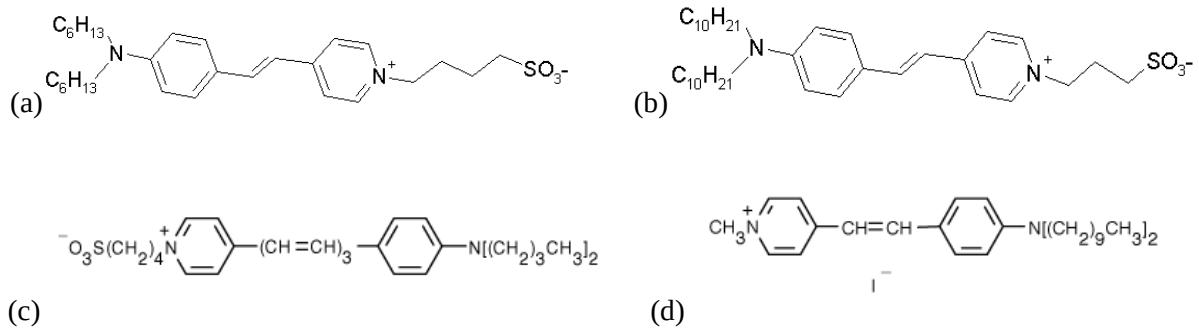


Figure 13 : (a) Di-6-ASPBS [1] ; (b) Di-10-ASPPS [2] ; (c) RH237 [3] ; (d) Di-10-ASP [4].

Ainsi le pic d'émission de la fluorescence est-il très sensible à la polarité du solvant. Par exemple, pour Di-10-ASPPS, on a mesuré λ_{em}=600 nm dans l'éthanol et λ_{em}=575 nm en vésicules de DOPC.

---

[1] N-(4-sulfobutyl)-4-(4-(dihexylamino)styryl)pyridinium, synthétisé dans l'équipe de Mireille Blanchard-Desce, Lab. Synthèse et Electrosynthèse Organique UMR 6510 CNRS / Université de Rennes.

[2] N-(4-sulfopropyl)-4-(4-(didecylamino)styryl)pyridinium

[3] N-(4-sulfobutyl)-4-(6-(4-(dibutylamino)phenyl)hexatrienyl)pyridinium

[4] iodure de 4-(4-(didecylamino)styryl)-N-methylpyridinium

Dans l'eau, le signal du fluorimètre était trop faible pour faire un spectre avec un bruit acceptable. Le décalage vers le bleu en milieu apolaire s'explique par une stabilisation de l'état fondamental, par rapport à l'état excité qui présente une séparation importante des charges. Par ailleurs, le niveau très bas de la fluorescence des molécules dans l'eau, comparé à celui des molécules en membrane, permet d'effectuer un titrage fluorimétrique[14]. Pour une concentration globale en marqueur donnée (par exemple 1 μM), l'intensité de fluorescence est minimale dans l'eau pure (F_0) et maximale quand toutes les sondes sont insérées dans des vésicules (F_∞). Dans le cas intermédiaire, la fraction des sondes situées effectivement dans un environnement membranaire (tandis que le reste est libre en solution) est donnée par :

Eq. (3)
$$\frac{F_c - F_0}{F_\infty - F_0} = \frac{c}{1/K + c}$$

où F_c est l'intensité de fluorescence mesurée pour une concentration massique des lipides c (mg/mL) et K la constante d'association des marqueurs avec les vésicules. Pour Di-6-ASPBS, la valeur $1/K = 10\,\mu\text{g/mL}$ est issue du titrage fluorimétrique. Or les préparations que l'on observe couramment contiennent environ 100 μg/mL de DOPC. On estime donc à $100/110 \approx 90\%$ la fraction des sondes fluorescentes insérées. Par ailleurs, la quantité de lipide DOPC dans les suspensions de vésicules géantes n'a pas trop varié, et peut être rapportée à une concentration molaire[1] d'environ 130 μM. La plupart des images de pores transitoires et de vésicules en adhésion ont été réalisées par « marquage externe » avec 5.6 μM de la sonde Di-6-ASPBS : la concentration du colorant restant en solution est donc 0.6 μM. Sa fraction molaire dans la membrane des vésicules est estimée à $5/135 \approx 4\%$ de la quantité totale de lipide. Cette concentration membranaire est corroborée par un test semi-quantitatif auquel on a procédé sur la sonde Di-10-ASPPS[2]. Avant la préparation des vésicules, on mélange le fluorophore avec le phospholipide en solvant organique. On réalise ainsi un « marquage interne », pour deux concentrations connues du fluorophore : 1% et 4%. Dans le premier échantillon, le marquage des vésicules s'est révélé moins bon que pour une insertion externe de la même sonde à 5.6 μM. Par contre le niveau de la fluorescence est équivalent entre un mélange interne à 4% ou une perfusion externe à 5.6 μM. Pour d'autres observations, on a incubé les vésicules avec 10 μM de la sonde RH237. Comme, on ne dispose pas de valeur mesurée de sa constante d'association K avec le DOPC, on utilise la même que celle de Di-6-ASPBS. La concentration de sonde soluble doit être environ 1 μM, tandis que sa fraction molaire dans les bicouches est estimée à $9/139 \approx 6\%$.

Enfin, on déplorera que la sonde Di-10-ASBPS ait été retirée du catalogue du fournisseur Molecular Probes. La molécule la plus proche encore disponible commercialement est Di-10-ASP,

---

[1] En toute rigueur, le terme « concentration » est abusif car, le phospholipide n'est pas soluble dans l'eau.

[2] Expérience réalisée avec Marie-Alice Guedeau-Boudeville.

dont les spectres d'absorption et de fluorescence sont quasi-identiques à ceux de Di-10-ASPPS et Di-6-ASPBS. Cependant, l'ammonium possède comme contre-ion un iodure dissocié à la place d'un groupement sulfonate attaché par liaison covalente. Insérée dans la membrane, une telle molécule portant une charge nette positive provoque une adhésion forte sur le verre. Après quelques minutes, la quasi-totalité des vésicules ont éclaté sur les parois de la cellule.

2.3 Aspects quantitatifs de l'imagerie de fluorescence

La microscopie de fluorescence possèdent certaines limites physiques, qu'il est important de garder à l'esprit lorsque l'on désire extraire des informations quantitatives sur les images, *a priori* de deux sortes : des mesures de dimensions, ou d'angles, et des mesures de flux lumineux.

a) Mesures spatiales

Avec la microscopie « en fond noir » ou strioscopie, elle partage la propriété remarquable de détecter des objets de très petite taille, des billes Ø100 nm, voire des nanoparticules. Néanmoins, les structures ont toujours une dimension apparente limitée par la diffraction de la lumière. Ainsi la membrane des vésicules apparaîtra-t-elle avec une épaisseur bien plus grande que les 3–4 nm réels. Les résolutions latérale (Δx) et axiale (Δz) du microscope sont caractérisées entièrement par sa fonction d'appareil ou "Point Spread Function". Toutes les images sont convoluées avec la PSF, qui en théorie serait l'image d'un objet ponctuel. En pratique, on a observé une petite bille fluorescente, immobilisée dans une matrice gel (le PDMS réticulé[5] est pour cela un milieu transparent adéquat). Son diamètre de 1 µm est trop grand pour sonder la résolution Δx. Par contre, il met en évidence l'étalement de la PSF en hauteur, supérieur à 2 µm. Les rayons lumineux décrivent autour de la bille une nappe conique, dont la dissymétrie est sans doute due à la réflexion sur le dioptre eau/PDMS. Comme l'indice du milieu (n_{PDMS}≈1.4) est proche de celui des solutions de glycérol à 66% (n_S=1.43), on transpose cette PSF aux conditions d'observation des vésicules.

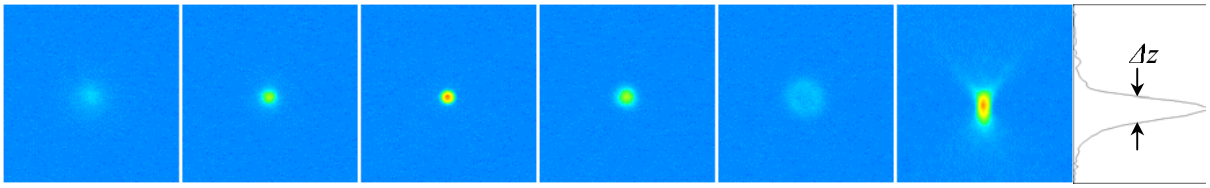
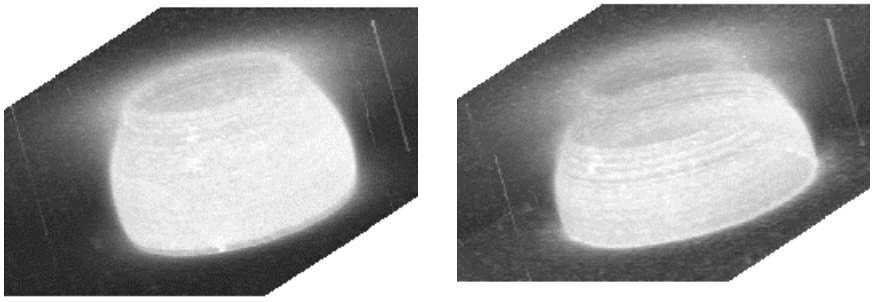


Figure 14 : Images dans le plan (xy) d'une bille fluorescente (Ø1µm), piégée dans une matrice de PDMS réticulé, à des hauteurs z successives (–2, –1, 0, 1 et 2 µm). La coupe (xz) donne une estimation expérimentale de la PSF, pour l'objectif 60x à immersion à eau. Son étalement axial est $\Delta z = 2.1\,\mu\text{m}$.

La PSF montre en particulier qu'une image de fluorescence n'est pas une section infiniment fine de l'objet, mais la superposition d'un ensemble de plans compris dans un intervalle de hauteurs $\Delta z \approx 2\,\mu\text{m}$. Cette profondeur de champ importante s'est révélée un atout pour observer les pores

transitoires (Chapitre IV), puisqu'on les détecte même s'ils sont légèrement défocalisés. Par contre, c'est une gêne importante si l'on cherche à reconstruire un profil, ou une image en perspective d'une vésicule, à partir de ses sections (*xy*). Les deux vues tridimensionnelles de la Figure 15 ont été réalisées par projection d'images de fluorescence, prises à des hauteurs variables. On a monté à cet effet un moteur continu qui, grâce à un système de démultiplication, déplace la platine du microscope verticalement, à vitesse constante et stable (typiquement 1 μm/s). Le temps d'intégration par image (0.1–0.4s) assure un niveau de signal suffisant, sans effet de bougé notable (on a vérifié qu'il n'y avait pas de différence entre un déplacement vers le bas et vers le haut).



a) b)

Figure 15 : Reconstructions tridimensionnelles, obtenues par balayage de la mise au point. La vésicule a sédimenté sur la lame de verre, rendue adhésive par adsorption de poly(L-lysine). Les milieu interne (sucrose) et externe (glucose) contiennent aussi 1mM Na^+Cl^-. L'aire de contact a augmenté d'une image à l'autre. Les colonnes verticales sont des artefacts dus à des pixels saturés sur le capteur CCD.

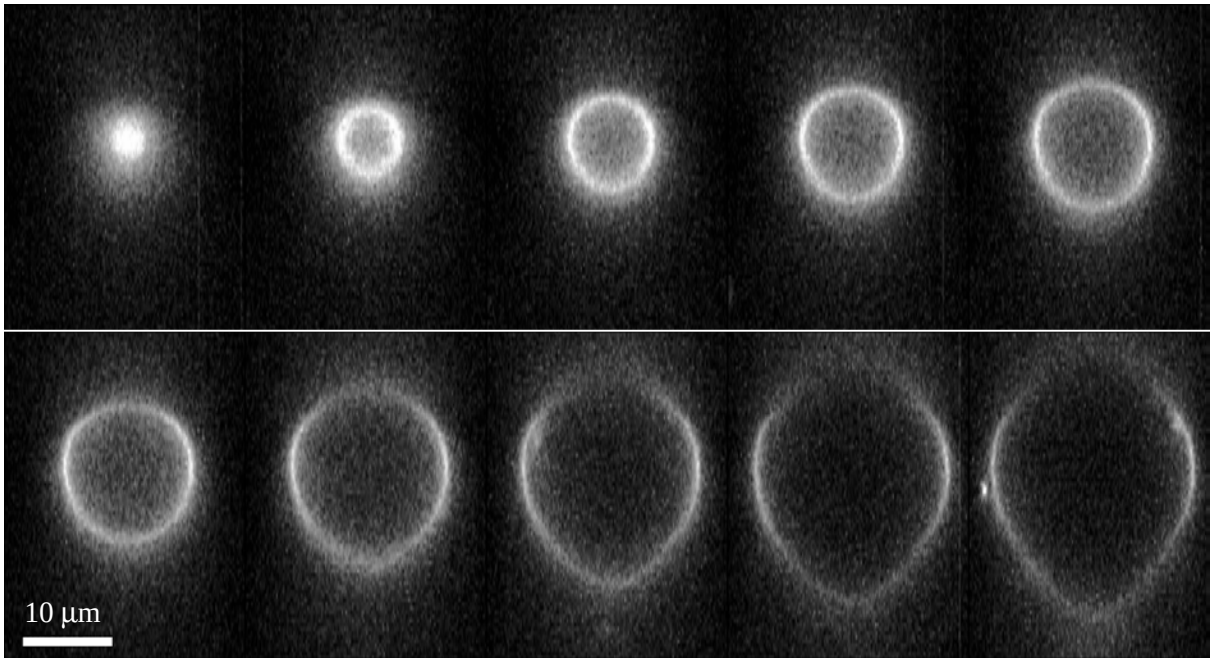


Figure 16 : Coupes transverses (*xz*) d'une vésicule, calculées d'après les images (*xy*). L'aspect ovoïde est du à la convolution avec la PSF : l'effet déformant est critique au pôle, mais pas à l'équateur.

Afin d'estimer la pertinence de ces reconstructions, on s'est mis dans les conditions les plus favorables pour éviter les aberrations optiques : remplies de glucose/glycérol, et suspendues dans du sucrose/glycérol, les vésicules montent à moins de 50 µm de distance de la lamelle couvre-objet. C'est dans cette zone que l'objectif 100x NA 1.25 à huile est parfaitement corrigé des défauts d'aplanétisme. L'asymétrie observée, entre la partie de la vésicule située du côté de la lamelle (en haut) et le pôle inférieur, est liée à celle de la PSF, probablement due à la réflexion des rayons sur la surface de verre.

b) Mesures des niveaux de gris

Si l'on désire tirer des informations quantitatives à partir des niveaux mesurés sur les images, il est indispensable de faire la chasse aux sources de non-linéarités, sur toute la chaîne d'acquisition. La saturation du marqueur fluorescent lui-même est évitée en illuminant avec une intensité modérée. La caméra n'étant pas un instrument de mesure physique (elle est prévue à l'origine pour la vidéosurveillance !), on veille en premier lieu à désactiver ses options spéciales (gain automatique, correction gamma). Le gain du capteur CCD est alors réglé manuellement, de sorte à obtenir un bon rapport signal sur bruit, sans pixels saturés. Une carte d'acquisition 8-bit (LG-3, Scion Corp.) numérise ensuite les images vidéo. A ce niveau encore, on dispose d'un gain et un offset, qui convertissent le signal vidéo en un nombre compris entre 0 et 255. La question est alors de déterminer si les niveaux de gris possèdent une signification physique.

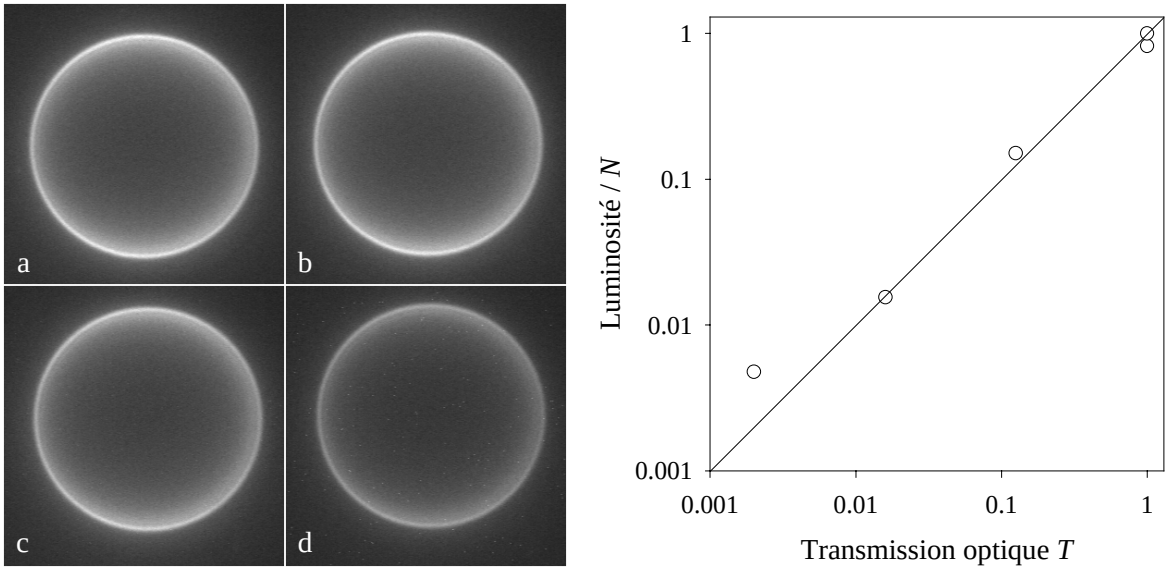


Figure 17 : Etude de la linéarité de la luminosité des images numériques en fonction de l'intensité lumineuse d'éclairage. Ces images de la même vésicule ont été obtenues en plaçant différentes densités neutres devant la lampe, de transmissions *T* calibrées. Chaque image a été intégrée pendant un temps $N \times 40\,\text{ms}$. La luminosité d'une image est définie comme la somme des niveaux de gris de tous les pixels qui la composent. Les valeurs sont normalisées par rapport à celle de la première image. Les paramètres physiques sont : a) *T*=1, *N*=1 ; b) *T*=0.13, *N*=5, c) *T*=0.02, *N*=40, d) *T*=0.002, *N*=100.

Mis à part un écart sur la valeur la plus faible, la linéarité du système d'acquisition d'images est vérifiée sur presque trois ordres de grandeur de l'intensité lumineuse réelle. Les gains et l'offset doivent néanmoins toujours être réglés pour rester dans ce régime linéaire. Comment trouver alors le meilleur compromis entre l'exigence de linéarité et la recherche d'un contraste maximum ? Les niveaux de gris sont souvent trompeurs, car l'œil distingue mal les différences entre des teintes très claires ou très sombres. Un moyen simple pour profiter pleinement de la gamme des 256 niveaux consiste à utiliser, au moins pour les réglages, une échelle en fausses couleurs. L'image est optimisée quand apparaissent d'un côté de l'échelle quelques points rouges, et de l'autre un léger bruit de fond. Cette méthode est appliquée pour mesurer une caractéristique importante des colorants : leur anisotropie de fluorescence.

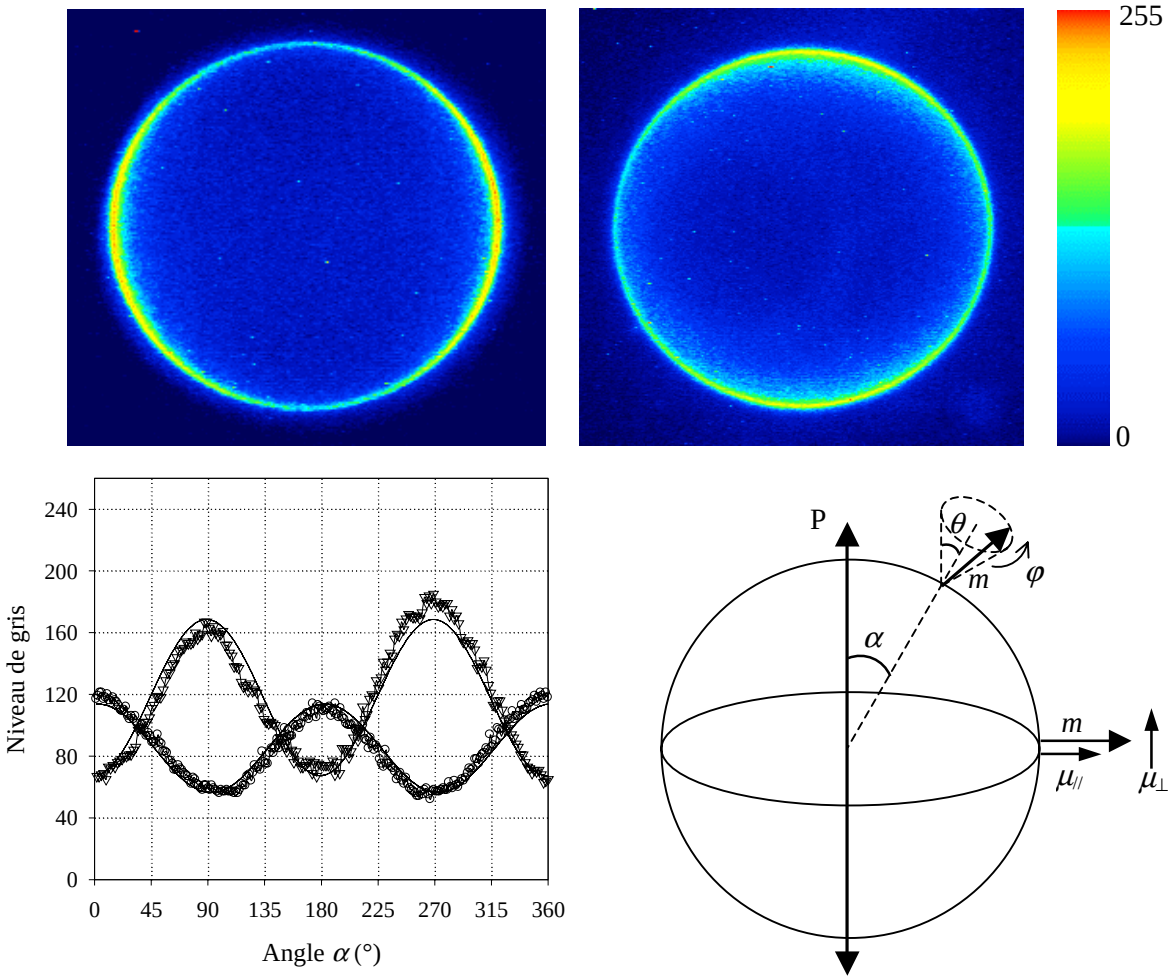


Figure 18 : Analyse de l'intensité de fluorescence par un polariseur P, situé après le filtre d'arrêt. La vésicule de gauche est marquée avec NBD-C6-HPC, celle de droite avec Di-6-ASPBS. Le profil d'intensité le long de la membrane est tracé pour chacune (triangles: NBD-C6-HPC, ronds: Di-6-ASPBS), en fonction de l'angle polaire α (les valeurs sont moyennées sur l'épaisseur apparente de la membrane, égale en théorie à la largeur de la PSF). La direction des molécules est représentée par un vecteur $\vec{m}$, incliné d'un angle θ par rapport à la direction radiale, et tournant autour d'un angle φ.

Une différence notable est constatée entre certaines images réalisées avec le phospholipide marqué par NBD et d'autres avec la sonde lipophile Di-6-ASPBS : l'intensité est modulée sinusoïdalement le long du contour des vésicules, tandis qu'un déphasage de $\pi/2$ entre les deux colorants apparaît clairement. Cet effet n'est pas observé quand les vésicules sont fluctuantes, mais il apparaît systématiquement lorsque les vésicules sont tendues et donc parfaitement sphériques. Un élément polarisant situé dans le trajet de détection du microscope analyse la polarisation de la fluorescence. Une expérience plus rigoureuse consisterait à polariser aussi la lumière d'excitation. L'absorption d'une molécule fluorescente est en effet d'autant plus efficace que le champ électrique de la lumière est parallèle à son moment de transition, $\vec{\mu}$. La lumière émise est aussi polarisée, au moins partiellement (l'anisotropie de fluorescence peut décroître, si la molécule tourne pendant le temps de vie de l'état excité, de l'ordre de 10 ns). Une vésicule sphérique se prête naturellement à l'étude de la polarisation de fluorescence, car sur une seule image, toutes les orientations moléculaires sont représentées. Dans un modèle simple, l'intensité de fluorescence s'écrit sous la forme $I \equiv \left\langle \left(\vec{P}\cdot\vec{\mu}\right)^2 \right\rangle$. On considère les deux cas limites, dans lesquels le moment $\vec{\mu}$ est dirigé soit parallèlement, soit perpendiculairement à la direction moléculaire $\vec{m}$. Si l'ancrage des sondes dans la bicouche était parfaitement rigide, la modulation de l'intensité serait $I(\alpha) = I_0 \cos^2\alpha$ dans le cas où $\vec{\mu}$ est parallèle aux lipides, et $I(\alpha) = I_0 \sin^2\alpha$ s'il est au contraire couché sur la membrane. La mesure d'un minimum d'intensité non nul sur le contour est à mettre au compte d'un désordre partiel de la direction des molécules. Les angles θ et φ définissent l'orientation de $\vec{m}$ par rapport à la normale à la bicouche. Alors que la distribution statistique de φ est uniforme, celle de l'angle d'inclinaison θ est caractérisée par son moment d'ordre 2, écrit sous la forme d'un « paramètre d'ordre » $S = \dfrac{\left\langle 3\cos^2\theta - 1\right\rangle}{2}$. Dans le cas $\vec{\mu} // \vec{m}$, l'intensité moyennée sur toutes les orientations, $I = I_0 \left\langle \left(\cos\theta\cos\alpha - \sin\theta\cos\varphi\sin\alpha\right)^2 \right\rangle$, devient après un calcul simple :

Eq. (4)
$$I(\alpha) = I_0 \left[\frac{1-S}{3} + S\cos^2\alpha \right]$$

On en déduit une mesure simple du paramètre d'ordre, à partir des extrema expérimentaux :

Eq. (5)
$$S = \frac{I_{\max} - I_{\min}}{I_{\max} + 2I_{\min}}$$

Sur l'exemple de Di-6-ASPBS, on vérifie la modulation en $\cos^2\alpha$, et on calcule $S = 0.25$. Pour NBD-C6-HPC, la variation en $\sin^2\alpha$ indique $\vec{\mu} \perp \vec{m}$, avec un paramètre d'ordre $S = 0.33$. Une troisième sonde, pérylènePC, donne des images dénuées d'effet de polarisation. Ce comportement est à rapprocher de la structuration de ses spectres d'absorption et d'émission, mise en évidence

expérimentalement : aux doublets 446/454, 420/486 et 393/510 nm, correspondent trois transitions électroniques indépendantes, associées à deux moments de transition (voire trois) perpendiculaires. Cette absence d'anisotropie de fluorescence avec le pérylène peut être mise à profit pour réaliser des reconstructions spatiales (en microscopie confocale ou à deux photons), sans modulation des contours. Les orientations des fluorophores relativement à la bicouche sont récapitulées sur le schéma de la Figure 19. Les sondes styryles sont des molécules linéaires, parallèles aux phospholipides. L'ancrage du NBD est au contraire perpendiculaire, la chaîne auquel il est greffé faisant un coude à 90°.

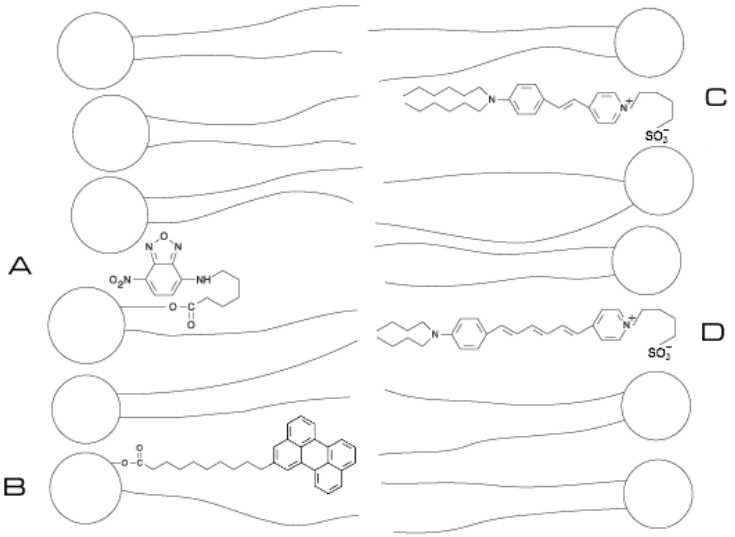


Figure 19 : Orientations moléculaires par rapport à la bicouche, d'après l'analyse de la polarisation des images de fluorescence, pour les différentes sondes utilisées (A :NBD-C6-HPC, B :pérylenePC, C :Di-6-ASPBS et D :RH237). Le dessin est librement adapté du catalogue de Molecular Probes.

Par ailleurs, le niveau des images de fluorescence et susceptible de diminuer au cours temps, en raison du phénomène de photo-blanchiment. Ce nom générique désigne diverses réactions photo-chimiques conduisant à la dégradation des fluorophores, et donc à la diminution progressive du flux lumineux émis. Avec une sonde fluorescente relativement photo-sensible telle que NBD, l'unique moyen d'observer pendant longtemps une vésicule consiste à diminuer son intensité de fluorescence, donc à l'exciter avec une intensité plus faible. L'acquisition d'images de qualité nécessite d'augmenter la sensibilité de la caméra[1]. Le photo-blanchiment est bien moins limitant avec les sonde styryles et dérivées. Comme leur rendement de fluorescence en membrane est très élevé, la probabilité que les fluorophores empruntent une voie de désexcitation non radiative doit être plus faible. Une autre explication pourrait être un effet réservoir du solvant : contenant près de 10% des sondes introduites (non fluorescentes à l'état soluble), il pourrait régénérer les fluorophores de la bicouche lipidique.

[1] A cet effet, la caméra Cohu 4910 offre la possibilité de laisser la carte d'acquisition LG-3 augmenter son temps de pose. Cette fonction "on-chip integration" est très appréciable sur un matériel aussi peu coûteux. En contrepartie, le balayage des images est plus lent, et ne permet plus de suivre des phénomènes rapides.

Au vu des paragraphes précédents, la faible discrimination en hauteur constitue le principal inconvénient de la microscopie de fluorescence classique, pour remonter aux informations de dimensions, d'angles, et de flux. Les molécules sont excitées dans un « diabolo » qui s'étend sur toute l'épaisseur de l'échantillon. L'image résulte alors de la fluorescence émise dans des plans différents, étalés sur une hauteur $\Delta z > 2\,\mu\text{m}$. Par ailleurs, la réflexion sur la lamelle déforme les pôles de la vésicule. Sur des substrats semi-réfléchissants (lamelle dorée), elle peut même générer un reflet symétrique de l'image principale. Dans la section III.3, on présentera le « microscope à deux photons », qui fournit des sections beaucoup plus fines des vésicules. Néanmoins, le « microscopie à un photon », courant dans tout laboratoire, se prête aussi à des mesures quantitatives, à condition de les restreindre sur une zone située autour du plan équatorial des vésicules.

2.4 Traitement d'images

Au delà de la représentation visuelle, une image numérique est un tableau de nombres à deux entrées. L'analyse d'image consiste alors à effectuer des opérations arithmétiques sur les valeurs des pixels. On décrit les procédures utilisées pour effectuer des mesures de rayon, de surface et de volume, à la fois pour étudier les pores transitoires (Chapitre IV), et les phénomènes liées à l'adhésion des vésicules (Chapitre V). Afin de permettre l'analyse d'un grand nombre d'images, ces méthodes ont été programmées dans des procédures automatiques ou « macros ». Le choix du logiciel s'est porté sur Scion Image (version PC de NIH Image), en libre accès sur le réseau Internet, et répandu très largement dans la communauté scientifique. Les macros seront mises à disposition à l'adresse suivante : http://perso.curie.fr/Olivier.Sandre/

a) Détection automatique de contour

On a détaillé sur la Figure 20 les transformations subies par chaque image, dans le but d'extraire les coordonnées qui décrivent la membrane. En présence d'un pore, on dispose alors d'une mesure objective de son rayon. La programmation de cette macro a entraîné un gain de temps considérable dans le dépouillement des données sur les pores transitoires, chaque séquence représentant environ une centaine d'images. Le principe de la détection de contour repose sur la convolution de l'image par la matrice 5x5 ci-contre. En passant sur les pixels, cette forme très piquée amplifie fortement les variations de niveau de gris, simulant l'opérateur mathématique Laplacien. Les transformations suivantes consistent en un lissage, obtenu par convolution avec une matrice 5x5 composée uniquement de 1 (filtre médian), puis un seuillage, après lequel l'image devient binaire. La membrane est ensuite affinée, jusqu'à n'être plus épaisse que d'un pixel. On récupère alors les coordonnées de tous les points qui la compose, grâce à un outil de sélection du logiciel : la baguette magique ! Celle-ci fournit les pixels classés, comme s'ils étaient lus par un observateur mobile qui parcourrait la membrane, d'abord à l'intérieur, puis qui passerait à l'extérieur dans le cas d'un contour ouvert.

$$\begin{pmatrix} -1 & -1 & -1 & -1 & -1 \\ -1 & -1 & -1 & -1 & -1 \\ -1 & -1 & 24 & -1 & -1 \\ -1 & -1 & -1 & -1 & -1 \\ -1 & -1 & -1 & -1 & -1 \end{pmatrix}$$

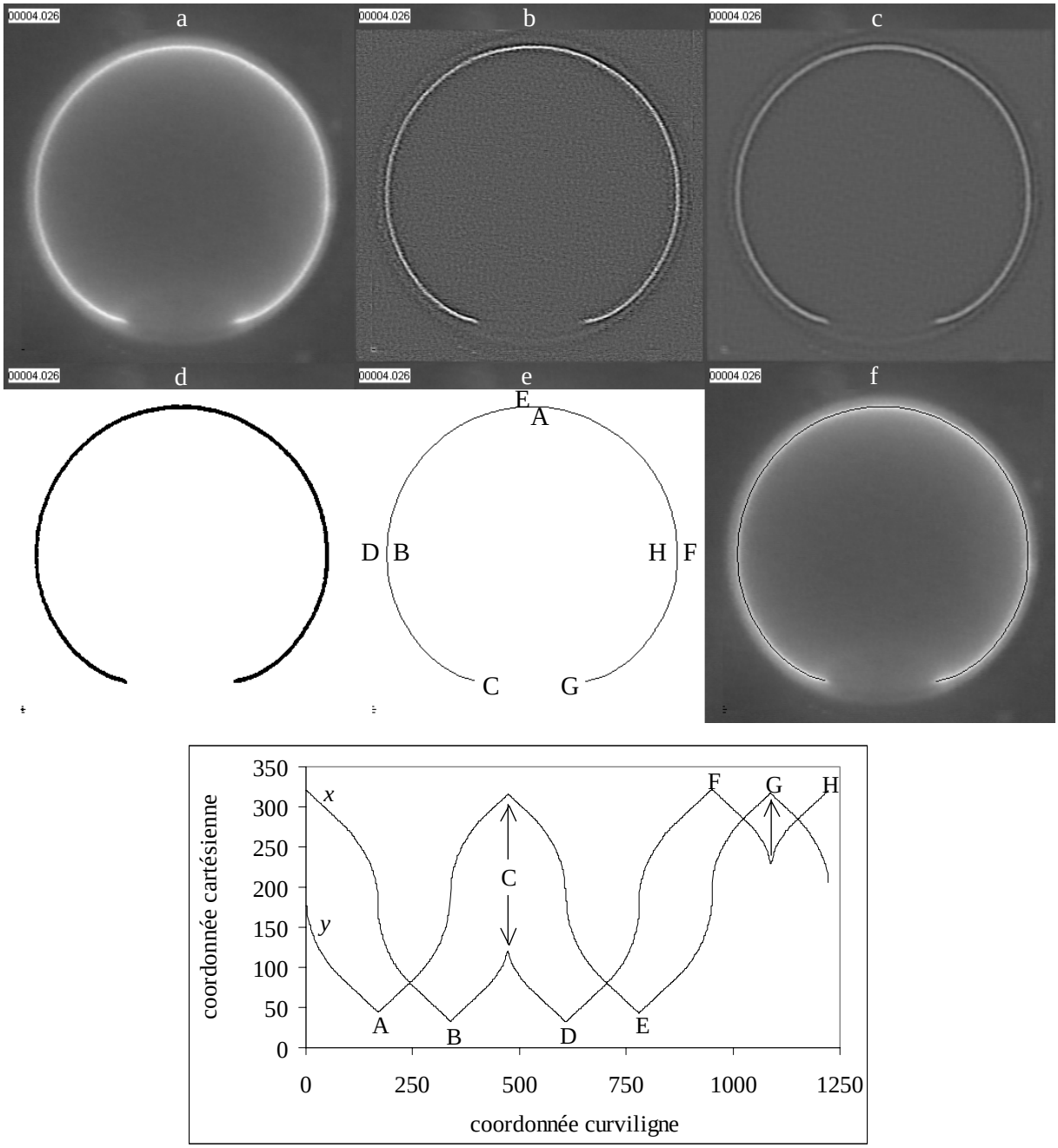


Figure 20 : Détection de la membrane et mesure du rayon *r* du pore. a) image en niveaux de gris ; b) convolution avec un filtre Laplacien 5x5 ; c) convolution avec un filtre médian 5x5 ; d) seuillage 20 niveaux au-dessus du fond ; e) squelettisation ; f) addition des images a) et e). Au final, on obtient les deux séries de coordonnées *x* et *y* d'un point mobile, qui se déplace sur tout le pourtour de la vésicule.

Sur les courbes des coordonnées cartésiennes *x* et *y*, en fonction de la coordonnée curviligne (le numéro du pixel), les lettres A à H ont été attribuées aux points particuliers. Parmi ceux-ci, on reconnaîtra les bords du pore en C et G, qui sont des points de rebroussement à la fois pour *x* et *y*. Ces points particuliers, en lesquels les deux coordonnées cartésiennes changent simultanément leur sens de variation, sont détectés facilement par la macro. Leur distance donne le diamètre du pore, mesuré

d'abord en pixels, puis en µm grâce à un facteur de conversion (0.133 µm/pixel avec l'objectif 60x, 0.072 µm/pixel au 100x).

Quelle qualité d'image est requise pour que la macro de reconnaissance du contour fonctionne ? Sur la Figure 21, on considère une image initialement bruitée. Après les filtres 5x5 Laplacien puis médian, le seuillage est réalisé quelques niveaux au-dessus de l'intensité du fond, mesurée dans un cadre dessiné par l'utilisateur. L'image binaire est mouchetée, car la membrane n'a pas été rehaussée suffisamment par rapport au fond. Néanmoins, le bruit se compose d'îlots isolés, tandis que la membrane constitue un ensemble connexe. On peut alors les séparer en utilisant deux transformations classiques des images binaires : d'abord une érosion, répétée ici trois fois, qui efface les pixels de façon pondérée par leur nombre de voisins ; puis l'opération inverse de dilatation. Au final, les taches ont été définitivement rognées, alors que le contour de la vésicule a retrouvé son épaisseur initiale. Il est facile de combler manuellement les quelques trous restant dans la membrane, en dehors du pore.

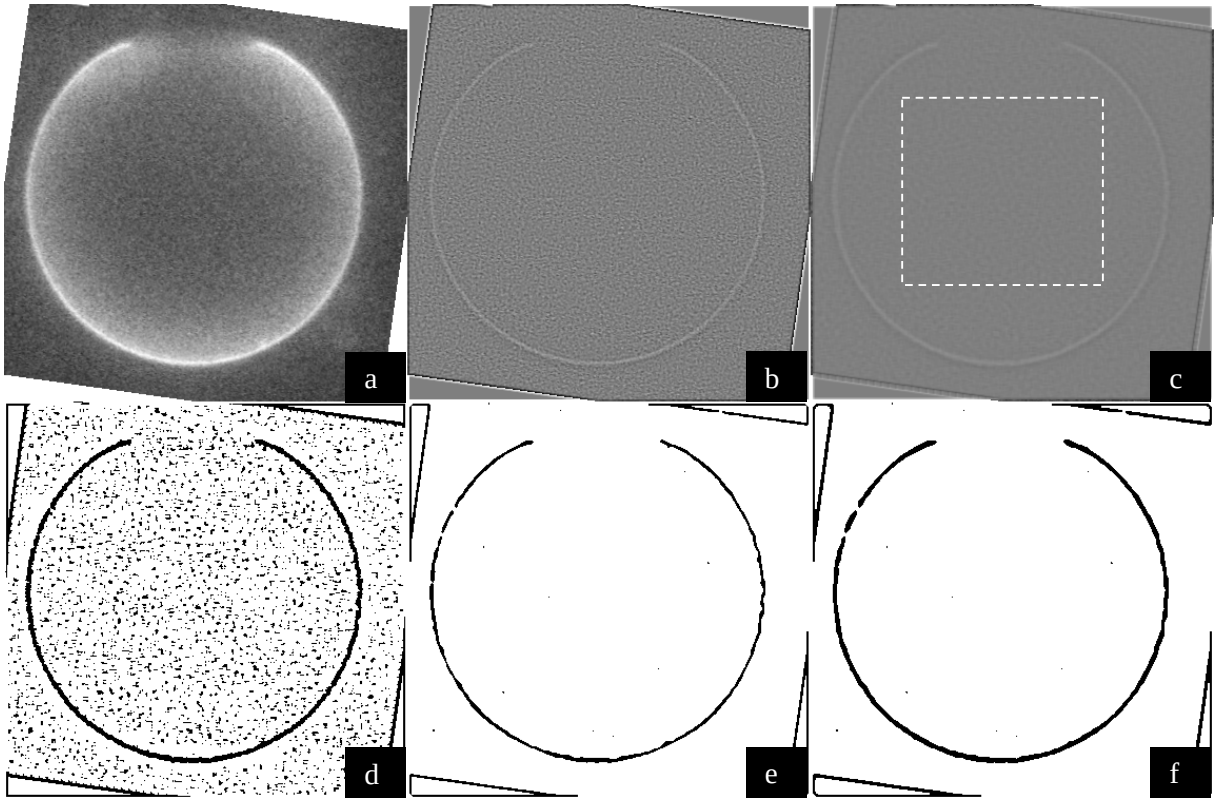


Figure 21 : Méthode appliquée sur une image bruitée. a) image tournée de 8° ; b) filtre Laplacien ; c) filtre médian ; d) seuillage 3 niveaux au-dessus du fond ; e) après 3 érosions ; f) après 3 dilatations.

b) Mesures quantitatives sur les formes de révolution

Lorsque la vésicule possède une forme de révolution, et que l'axe de symétrie est contenu dans le plan de l'image, les coordonnées d'une ligne génératrice permettent de calculer numériquement le volume et la surface projetée :

Eq. (6) $$V = \sum_i \pi x_i^2 \Delta y_i \quad \text{et} \quad A_p = \sum_i 2\pi x_i \sqrt{\Delta x_i^2 + \Delta y_i^2}$$

L'image est redressée au préalable, de sorte à placer l'axe de symétrie verticalement. Avant que la matrice rotation ne soit appliquée, les coordonnées y sont d'abord dilatées d'un facteur 2%, en correction du rapport d'aspect physique des pixels de la caméra (8.6 x 8.4 µm).

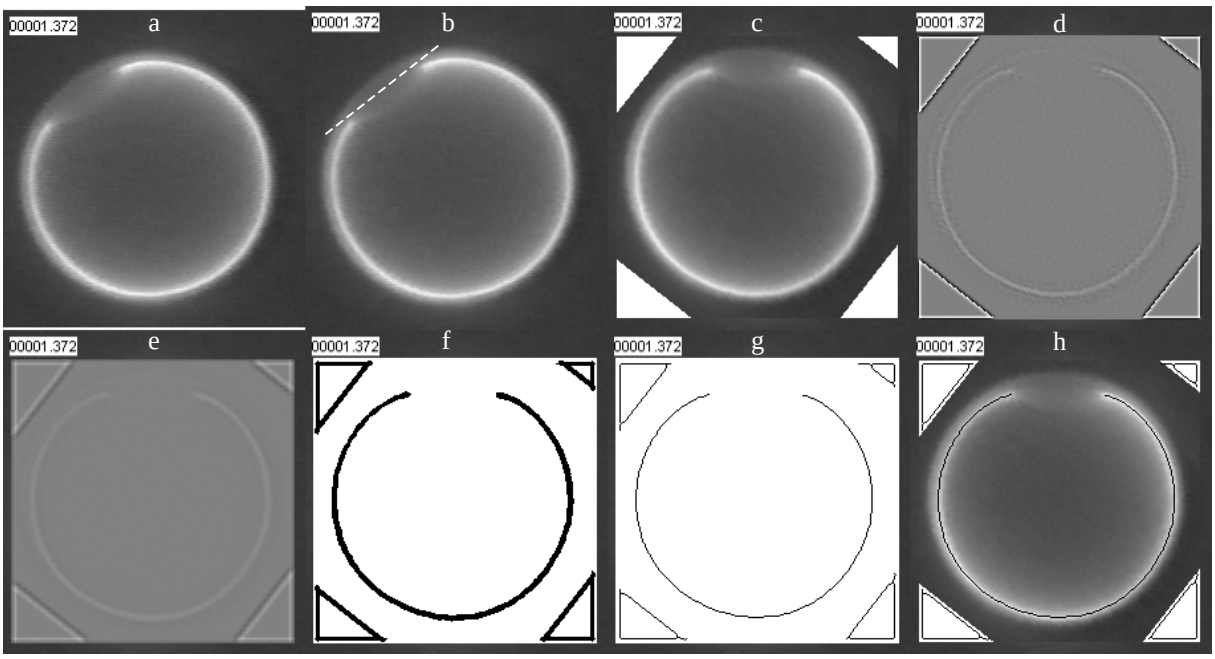


Figure 22 : Redressement de l'image préalable à la détection de contour. a) image initiale ; b) dilatation verticale de 2% ; c) rotation de 38° ; d) filtre Laplacien 5x5 ; e) filtre médian 5x5 ; f) seuillage 5 niveaux au-dessus du fond ; g) squelettisation ; h) addition des images c) et g).

Sur cet exemple, la macro mesure un rayon de pore r=4.65 µm, un volume V=6825 µm^3 et une aire projetée A_p=1689 µm^2. Quand bien même une telle vésicule ouverte n'est plus sphérique, on définit son rayon comme celui de la sphère de même volume, $R = (3V/4\pi)^{\frac{1}{3}}$, soit 11.8 µm (inférieur à la moitié de la largeur, 11.9 µm). Ces calculs numériques de l'aire et du volume des formes de révolution trouveront leur utilité par ailleurs dans l'étude de l'évolution des doublets de vésicules (Chapitre V).

III.3 Microscopies non linéaires sur le « microscope à deux photons »

Le progrès le plus décisif de la microscopie de fluorescence fut sans aucun doute l'invention du microscope confocal. Utilisant comme source d'excitation un laser UV ou visible, et sélectionnant uniquement les rayons émis du foyer de l'objectif grâce à une pupille en position « confocale », il réalise les images les mieux résolues pour un microscope optique ($\Delta x \approx 0.3\,\mu\text{m}$ et $\Delta z \approx 0.6\,\mu\text{m}$). Cependant, le microscope confocal ne résout pas le problème du photo-blanchiment, particulièrement toxique pour les échantillons biologiques. En effet, la majeure partie de l'intensité d'excitation est diffusée par le milieu avant d'atteindre le point focal, et peut donc engendrer des réactions

photochimiques délétères. C'est pourquoi, la plupart des belles images confocales des livres et des catalogues proviennent en fait d'échantillons « fixés », c'est-à-dire morts. Le microscope confocal est par contre l'instrument le plus adapté pour imager des échantillons inertes, comme en science des matériaux. Pour réaliser des images en fluorescence de membranes lipidiques artificielles, la meilleure résolution spatiale est atteinte sur un confocal. Des domaines de phase gel (qui fluorescent dans le rouge), coexistant avec la phase fluide (en vert), ont ainsi pu être visualisés[16], dans des vésicules constituées d'un mélange complexe de lipides (DLPC, DPPC, POPS et cholestérol) et de deux sondes lipophiles de coefficients de partage différents entre les deux phases[1].

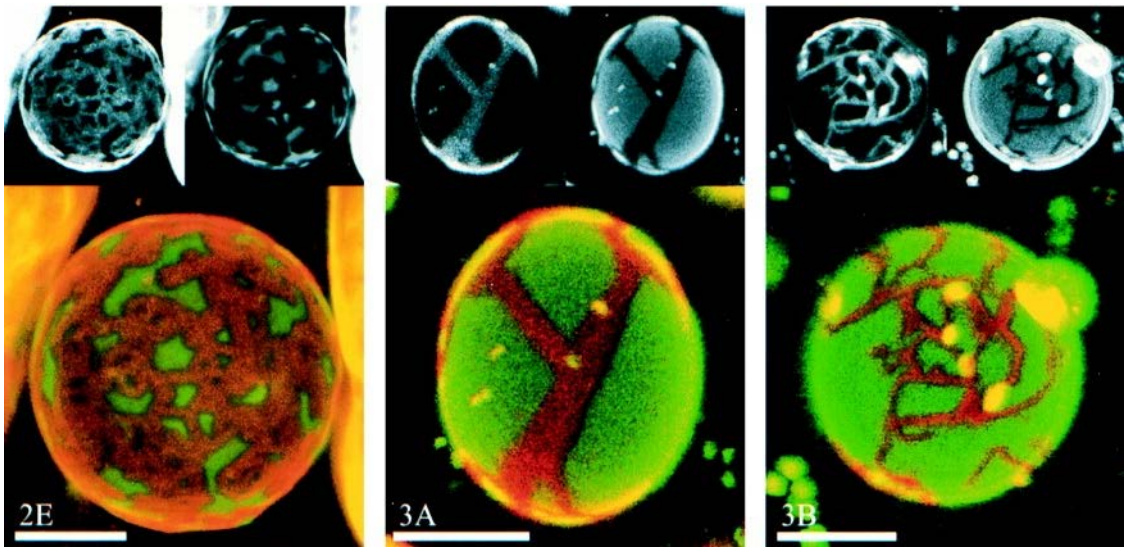


Figure 23 : Images confocales de vésicules de composition DLPC/DPPC/POPS/cholestérol respectives 20:80:5:0 (2E), 50:50:5:0 (3A) et 50:50:5:5 (3B), tirées de[16] (les barres mesurent 10 μm).

En palliant au moins en partie au problème de photo-toxicité, la microscopie à deux photons a ouvert de nouvelles perspectives en imagerie du vivant. Bien qu'elle repose sur un principe simple, sa mise en œuvre expérimentale ne remonte qu'à une dizaine d'années[17], après que les premiers lasers infra-rouges pulsés ont été disponibles commercialement. Le faisceau laser est focalisé dans un volume dont les dimensions sont toujours limitées par la diffraction[2], mais le processus d'excitation des molécules sondes est non linéaire : proportionnel non pas à l'intensité lumineuse mais à son carré. En général, on détecte la « fluorescence excitée par 2 photons » ou TPEF, qui est émise uniquement à partir du point focal. D'autres parties de l'échantillon sont bien traversées par le rayonnement infra-rouge, mais l'intensité n'y est pas suffisante pour engendrer le processus non linéaire. Le pouvoir de

[1] Une telle démixtion est courante dans les monocouches. L'apport du confocal a été aussi d'apporter le preuve que les domaines des deux feuillets de la bicouche se superposent.

[2] Comme en « un-photon », les dimensions du "beam-waist" dépendent uniquement de l'objectif et de la longueur d'onde. Par exemple, $w_x = 0.51\,\mu\text{m}$ et $w_z = 1.9\,\mu\text{m}$ pour un objectif 60x NA 0.9, à λ=880 nm.

sectionnement des structures est un peu moins bon que celui de la microscopie confocale (la résolution étant liée à la longueur d'onde d'excitation, elle est plus faible dans l'infra-rouge que dans le visible). Mais l'avantage immense du deux-photons est de conserver sa résolution dans un milieu diffusant. En effet, tous les photons émis proviennent obligatoirement du foyer de l'objectif. On peut donc les détecter tous, qu'ils soient balistiques ou diffusés ensuite par le milieu. Par ailleurs, les infra-rouges pénètrent plus profondément les tissus que la lumière visible (sur 200 à 300 µm : pour s'en convaincre, il suffit de regarder sa main devant une lampe intense !). Pour toutes ces raisons, la microscopie à deux photons est la méthode d'excellence de l'imagerie *in vivo*.

Pourquoi alors utiliser une imagerie si sophistiquée pour observer les vésicules géantes ? La motivation des expériences qui vont suivre provient de la réalisation de deux phénomènes simultanément : d'une part la fluoresence excitée par deux photons (TPEF), d'autre part la génération de second harmonique (SHG). Ce second type de contraste non linéaire a encore été peu exploré pour réaliser une imagerie à haute résolution (avec un objectif très focalisant) de matériaux inorganiques[18] ou de membranes de cellules biologiques[19,20]. Les vésicules géantes se sont révélées de bons milieux modèles pour établir les principes physiques d'une telle microscopie, inhérents à la cohérence de la SHG[1]. L'atout majeur des vésicules réside dans leur géométrie sphérique, beaucoup plus simple que celle d'une cellule. L'étude des interférences liées à la distribution spatiale des sondes non linéaires est ainsi facilitée. On présentera au chapitre V des résultats préliminaires montrant les applications possibles de la microscope SHG pour l'étude de l'adhésion de membranes artificielles ou naturelles.

Deux processus différents d'interaction non linéaire entre la lumière et les molécules sondes sont schématisés à la Figure 24, sur l'exemple du colorant Di-6-ASPBS. On a déjà mentionné le fait que cette molécule présente un fort transfert de charge entre deux groupements, l'un donneur, l'autre accepteur d'électrons (effet "push-pull"). Elle est donc très polarisable, et même hyperpolarisable : la déformation périodique de son nuage électronique, par l'onde lumineuse, n'est pas simplement linéaire avec le champ électrique E_ω, mais possède des termes d'ordres supérieurs. La valeur instantanée de son moment dipolaire μ s'écrit sous la forme d'un développement :

Eq. (7) $$\mu = \mu_0 + \alpha E_\omega + \beta E_\varpi^2 + \gamma E_\omega^3 + \ldots$$

où μ_0 représente le moment dipolaire permanent, α la polarisabilité classique, β et γ respectivement les première et seconde hyperpolarisabilités. Ce sont des grandeurs moléculaires, liées aux niveaux électroniques de la molécule, et à sa symétrie. Ainsi tous les termes d'ordres pairs sont-ils nécessairement nuls, et en particulier le coefficient β, dans le cas d'une molécule centro-symétrique.

[1] Les expériences et images présentées dans cette section ont toutes été réalisées « en binôme » avec Laurent Moreaux, doctorant au laboratoire « Neurophysiologie et nouvelles microscopies » EPI00-02 INSERM / ESPCI.

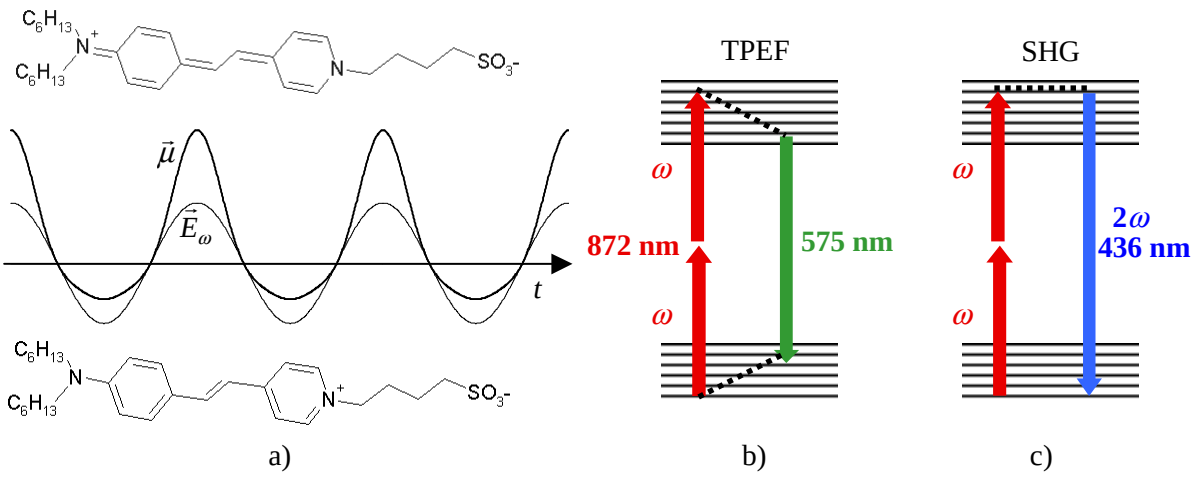


Figure 24 : Processus non linéaires à l'échelle des molécules. a) oscillations à fréquence optique entre les deux formes résonantes de Di-6-ASPBS (les courbes représentent l'évolution temporelle du champ électrique et du dipôle) ; b) absorption non linéaire (TPEF) ; c) diffusion non linéaire (SHG).

Excitée par le champ de pulsation ω, la charge positive oscille entre les deux groupements donneur et accepteur, le long du trajet de délocalisation. Pour une amplitude E_ω élevée, la variation du moment dipolaire en fonction du temps n'est pas sinusoïdale, mais subit une distorsion non linéaire. Décrite alternativement par ses deux formes mésomères limites, la molécule passe néanmoins plus de temps sous la forme la plus polaire. Dès lors, deux types d'événements peuvent se produire. D'une part, la molécule peut basculer vers un état électronique excité : c'est l'absorption de 2 photons, suivie d'une désexcitation par fluorescence. D'autre part, la contribution βE_ω^2 de l'oscillation du dipôle rayonne une onde au second harmonique. La fluorescence et la lumière diffusée à la demi-longueur d'onde du laser peuvent alors être recueilles simultanément sur le même dispositif expérimental.

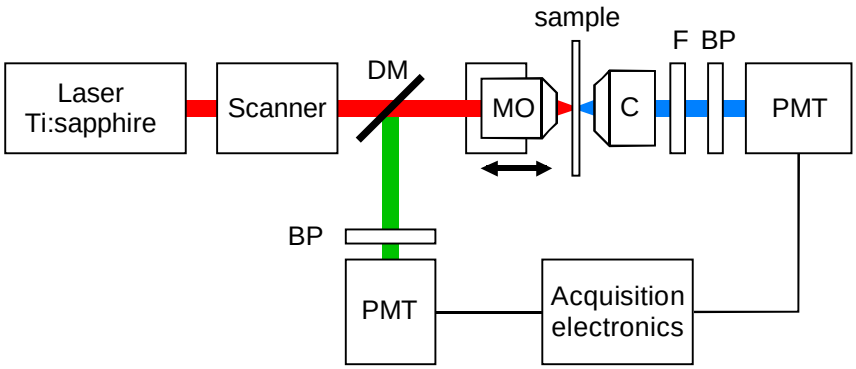


Figure 25 : Schéma de principe du microscope à deux photons combiné[21] (DM :miroir dichroïque, MO :objectif 60x NA 0.9 à eau, C :condenseur NA 1.4, BP :filtre passe-bande 400-440 nm ou 530-630 nm, F :filtre coloré $CuSO_4$, PMT :photomultiplicateur). Cet instrument a été construit par Jérôme Mertz, dans le cadre d'une coopération entre l'Institut Curie et l'Ecole Supérieure de Physique et Chimie Industrielles de la ville de Paris.

La source d'excitation est un laser titane:saphir (Spectra-Physics, Tsunami), délivrant des impulsions de durée t_p environ 80 fs à la cadence f de 81 Mhz : sa puissante crête élevée permet d'engendrer des processus non linéaires. La longueur d'onde est accordable entre 700 et 1010 nm. Un jeu de miroirs galanométriques permet le balayage en *xy* du faisceau, à fréquence élevée (100 kHz). La mise au point de objectif dans l'échantillon est contrôlée par une platine de translation motorisée dans les trois directions *x*, *y*, *z*. La fluorescence (en vert) est récoltée en *épi* (c'est à dire après retraversée de l'objectif), tandis que la SHG (en bleu) est recueillie en transmission, à travers le condenseur du bas. Le sulfate de cuivre arrête la lumière directe du laser, tandis que la TPEF et la SHG sont passées chacune à travers un filtre passe-bande, ou éventuellement un spectromètre. Pour ajuster l'intensité des images (sur une échelle 8-bit), l'expérimentateur dispose de réglages à différents niveaux : l'intensité du laser, le temps de passage par pixel, les tensions de polarisation des deux photo-multiplicateurs, le gain et l'offset de l'amplificateur électronique sur chaque canal, TPEF et SHG. Le montage possède une grande efficacité de détection, permettant de minimiser l'intensité du laser sur l'échantillon.

3.1 Imagerie en fluorescence excitée à 2 photons (TPEF)

L'observation de vésicules géantes en microscopie TPEF a déjà fait l'objet de publications récentes[22,23]. Le but de ces études est le développement de sondes sensibles à l'état physique des phospholipides, fluide ou gel, qui pourraient servir à l'observation de « radeaux » lipidiques solides dans les membranes cellulaires[24]. Néanmoins, l'utilisation quantitative des données de polarisation en TPEF est plus compliquée qu'en microscopie un-photon. L'intensité I_{TPEF} est bien modulée en fonction de l'angle polaire α, mais l'Eq. (4) n'est-elle plus valable[25] (les minima ayant une forme plus creusée que ceux de $\cos^2\alpha$, cf. Figure 29, la variation angulaire est mieux décrite par $\cos^4\alpha$; par ailleurs, en plus du simple paramètre d'ordre *S*, des moments d'ordres supérieurs des distributions angulaires des molécules interviennent). L'utilisation de la sonde pérylène permet de s'affranchir de ces effets de polarisation.

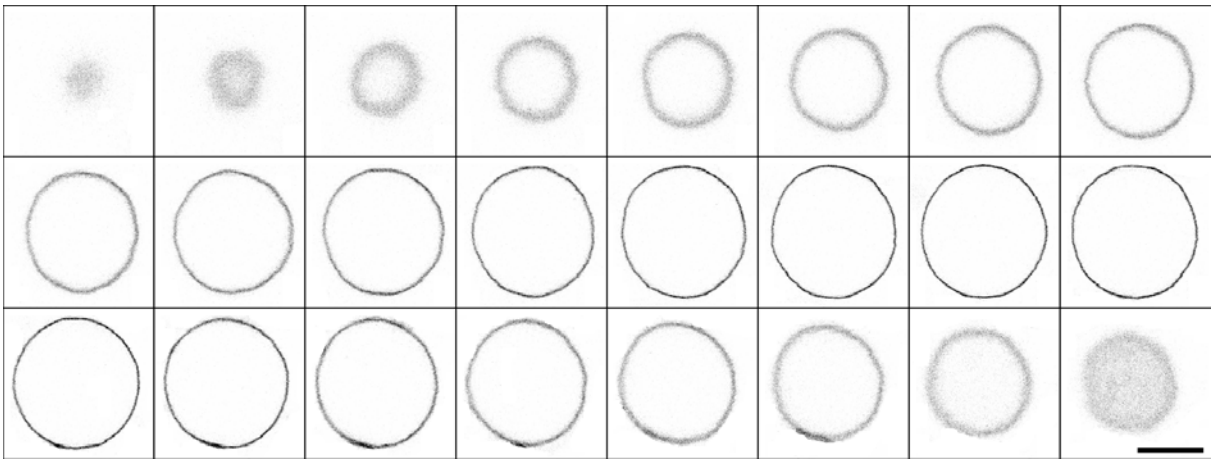


Figure 26 : Illustration du pouvoir de sectionnement de la microscopie TPEF, sur une vésicule DOPC/PérylènePC (9:1). Deux images successives dans la pile sont espacées de 1 µm en hauteur, et mesurent chacune 46 µm de côté. Leur intensité a été inversée ($I' = 255 - I$). La barre mesure 20 µm.

La fluorescence excitée par 2 photons est un rayonnement dipolaire non cohérent. Le flux transmis vers l'avant et celui réfléchi vers l'arrière sont symétriques, et donnés en fonction de l'intensité d'illumination *I*, du nombre *N* de molécules excitées, et de leur « section efficace » d'absorption par :

Eq. (8) $$P_{TPEF} = \sqrt{2} N \sigma_{TPEF} I^2$$

La section efficace en TPEF est reliée à l'hyperpolarisabilité γ des molécules. Pour le colorant Di-6-ASPBS , elle vaut environ 30 Göppert-Mayer, soit $\sigma_{TPEF} \approx 3\times10^{-49}$ cm^4/(photon/s), à la longueur d'onde λ_{ex}=880 nm[1]. Le flux d'illumination mesuré est 1–2 mW. Focalisée sur une surface équivalent à $\pi w_x^2/2 \approx 0.4$ µm^2, l'intensité moyenne d'excitation est $\langle I \rangle \approx 5\times10^5$ W/cm^2 . Pendant une impulsion laser, le flux instantané de photons infra-rouges[2] est $I = \frac{\langle I \rangle}{f\, t_p} \frac{\lambda_{ex}}{hc}$, soit 3×10^{29} photon/s/cm^2. La portion de membrane de la vésicule éclairée à cet instant donné est estimée à $\pi w_x w_z/2 \approx 1$ µm^2. En comptant une surface par tête polaire des lipides a_0≈60Å^2 et un marquage à 4%, on évalue à $N \approx 6\times10^4$ le nombre de fluorophores excités. L'Eq. (8) permet alors d'estimer le flux instantané des photons de fluorescence : $P_{TPEF} \approx 3\times10^{15}$ photon/s. La puissance lumineuse moyenne, à λ_{em}=580 nm, est $\langle P_{TPEF} \rangle = P_{TPEF}\, f\, t_p\, hc/\lambda_{em} \approx 7\times10^{-9}$ W . Un photo-multiplicateur de sensibilité 10^{-1} A/W permet de la convertir en un courant électrique de l'ordre du nA, amplifié ensuite par l'électronique. Les images de vésicules de DOPC/Di-6-ASPBS (96:4) ont été obtenues avec un temps de passage sur chaque pixel entre 10 et 40 µs. Le balayage d'un carré de 50 microns de côté, contenant 250 x 250 pixels, dure environ une seconde. Une trentaine d'images est nécessaire pour une reconstruction volumique.

3.2 Imagerie en génération de second harmonique (SHG)

La première réalisation d'images tridimensionnelles à haute résolution utilisant la SHG est relativement récente[(18)]. L'étude en vésicules géantes a permis de confronter une théorie simple, basée sur le rayonnement cohérent des dipôles, aux images expérimentales[(21)]. La puissance rayonnée à l'harmonique double peut être écrite sous la forme :

Eq. (9) $$P_{SHG} = \tfrac{1}{2} \Theta N^2 \sigma_{SHG} I^2$$

---

[1] Valeur mesurée par L. Moreaux et J. Mertz, en solution dans l'éthanol, et corrigée du "blue-shift"en membrane.

[2] Les flux moyens, mesurés au puissancemètre, sont exprimés en W. Les flux instantanés sont convertis en photon/s, pour traduire directement l'interaction (non linéaire) entre le rayonnement et les molécules.

La section efficace σ_{SHG} est liée au coefficient β, nul pour une molécule centro-symétrique. Deux autres caractéristiques essentielles de la SHG apparaissent dans cette formule : la cohérence et la directivité. La première provient du fait que les molécules diffusent la lumière, mais ne l'absorbent pas. La TPEF ne possède pas cette cohérence, car les molécules « perdent le souvenir » de la phase de l'onde excitatrice pendant le temps passé à l'état excité. Par contre, les N molécules situées dans le volume d'excitation, stimulées par la même impulsion infra-rouge, construisent ensemble une onde harmonique d'amplitude proportionnelle à N, donc d'intensité en N^2. En corollaire, la SHG est aussi sensible à la distribution spatiale des sondes, dont la résultante est en un facteur géométrique, $\Theta < 1$. Une répartition des dipôles centro-symétrique conduit à Θ=0. Dans le cas d'une portion de membrane asymétrique, marquée sur l'un de ses feuillets uniquement, un calcul du « diagramme d'antennes » montre que la SHG est anisotrope, et conduit à une évaluation numérique du facteur $\Theta \approx 10^{-1}$. La Figure 27 illustre alors la différence fondamentale entre l'imagerie en SHG et les expériences de mesure de SHG produite en irradiant un film moléculaire asymétrique par une onde plane.

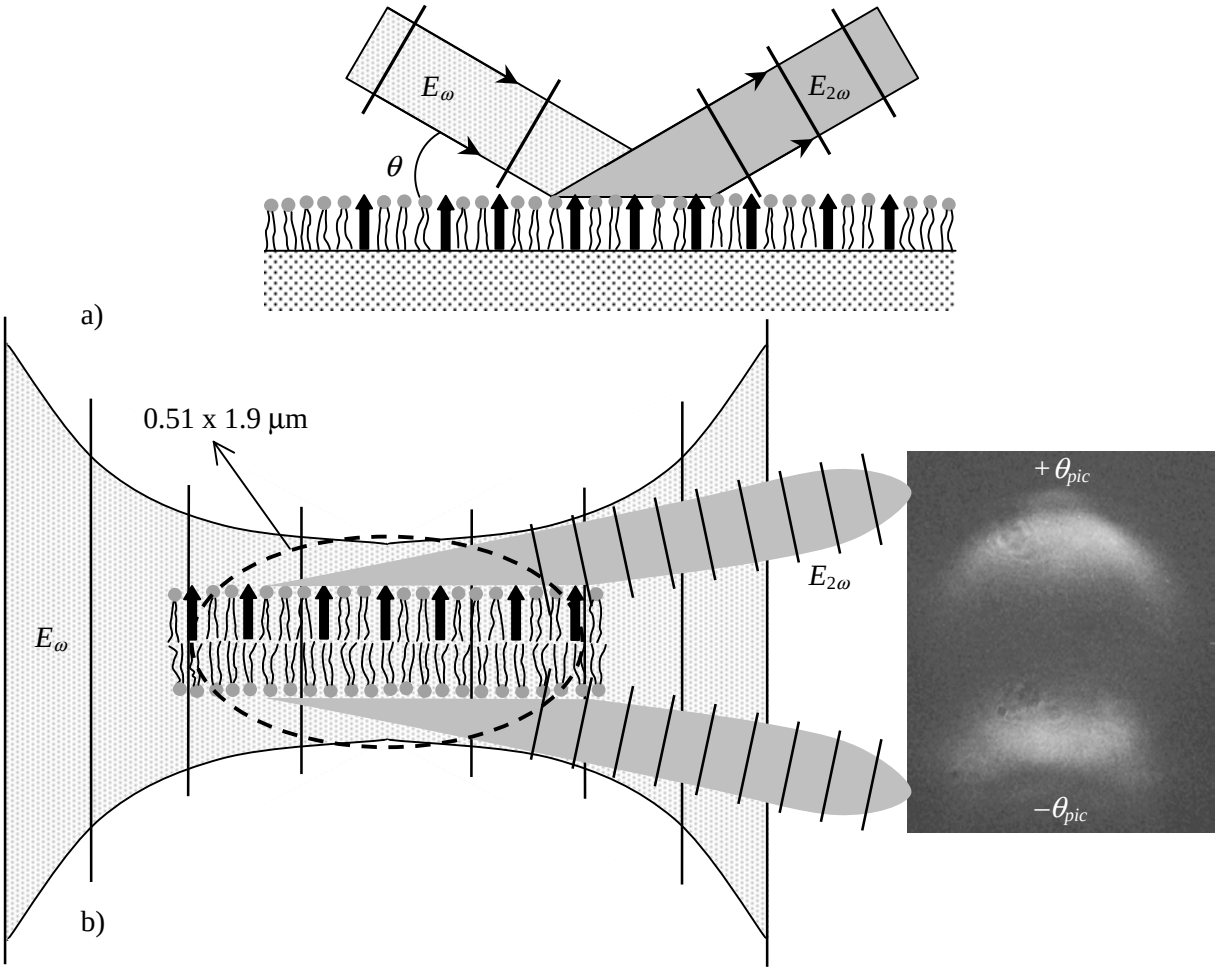


Figure 27 : a) Spectroscopie SHG des surfaces, par réflexion (ou transmission) d'une onde plane ; b) Microscopie SHG, en onde sphérique, focalisée sur une portion de membrane. Les deux lobes de diffusion issus du diagramme d'antennes ont été observés expérimentalement (image en encart). Leur courbure est due à la réfraction (la vésicule contient du sucrose, le milieu extérieur du glucose).

Dans les expériences classiques (Figure 27a), un film moléculaire est déposé sur une surface de manière orientée, par la technique de Langmuir-Blodgett, ou bien grâce à un champ électrique (c'est le cas avec la protéine bactériorhodopsine des « membranes pourpres »[26]). Une large surface est irradiée (quelques mm^2), grâce à un faisceau laser fortement collimaté. Que la SHG soit observée en réflexion ou en transmission, et quelles que soient les positions exactes des sondes sur la surface, elles construisent ensemble une onde plane, à l'harmonique double[27]. La mesure fournit la susceptibilité d'ordre 2, $\chi^{(2)}$, qui est la résultante du coefficient β moléculaire, moyennée à l'échelle du matériau.

La situation est différente en microscopie à fort grandissement, où la SHG est produite à partir d'une onde focalisée (Figure 27b). L'harmonique double rayonné dépend de manière critique d'un paramètre ξ, caractérisant la focalisation de l'onde excitatrice. Il n'est donc plus question de mesurer une susceptibilité moyenne de la membrane. Un phénomène optique d'ordinaire marginal, l'anomalie de phase des rayons focalisés, ou « effet Gouy », revêt alors une importance particulière : la phase de l'onde sphérique est retardée de π lors du passage au foyer de l'objectif. Autrement dit, le vecteur d'onde au voisinage du point focal est $k'_\omega = \xi k_\omega$, où ξ<1. Ce nombre dépend de la longueur d'onde et du NA de l'objectif, et vaut par exemple 0.87 à 880 nm pour NA=0.9. En conséquence, les phases des rayons SHG issus des différentes molécules seront accordées entre elles dans deux directions, inclinées par rapport à la membrane d'un angle $\pm\theta_{pic}$, défini en fonction des vecteurs d'ondes :

Eq. (10) $$\vec{k}_{2\omega}\cos\theta_{pic} = 2\vec{k}'_\omega$$

Le « diagramme d'antennes » théorique, tenant compte du paramètre ξ de focalisation, a pu être comparé avec la figure de diffusion expérimentale de la SHG[25]. Dans ce but, l'image de la pupille arrière du condenseur C (Figure 25) est projetée sur la caméra Cohu (mise à la place du PMT). Les orientations des rayons diffusés sont transformés dans ce plan en des déplacements latéraux. En balayant une petite portion de membrane (la vésicule étant observée par ailleurs sur le canal TPEF), et en laissant le capteur CCD intégrer la lumière pendant quelques secondes, les deux lobes de la SHG sont apparus, piqués autour d'un angle d'environ 30°, en bon accord avec la valeur théorique $\cos^{-1}\xi \approx 30°$. Le rayonnement SHG se propage ainsi vers l'avant, mais dévie d'un angle par rapport à l'axe optique, d'autant plus important que la focalisation est forte.

D'autres expériences avec les vésicules géantes ont permis de tester les différentes propriétés de la microscopie SHG. La plus évidente est la réalisation des spectres de la lumière émise, sur chacun des deux canaux (Figure 28). La SHG apparaît très piquée autour de la demi-longueur d'onde d'excitation, le rapport de la hauteur du pic sur sa largeur étant identique à celui du laser. A l'inverse, la fluorescence s'étale sur une largeur spectrale de près de 150 nm. Les aires situées sous les deux pics étant néanmoins comparables, les flux P_{SHG} et P_{TPEF} sont donc du même ordre de grandeur. La faible section efficace, $\sigma_{SHG}\approx10^{-3}$ GM à cette longueur d'onde, est en effet compensée par la cohérence de la

SHG, associée à N>>1. En pratique, la compatibilité des flux permet d'acquérir les deux images de la vésicule simultanément, sans qu'aucune des deux techniques ne retarde l'autre.

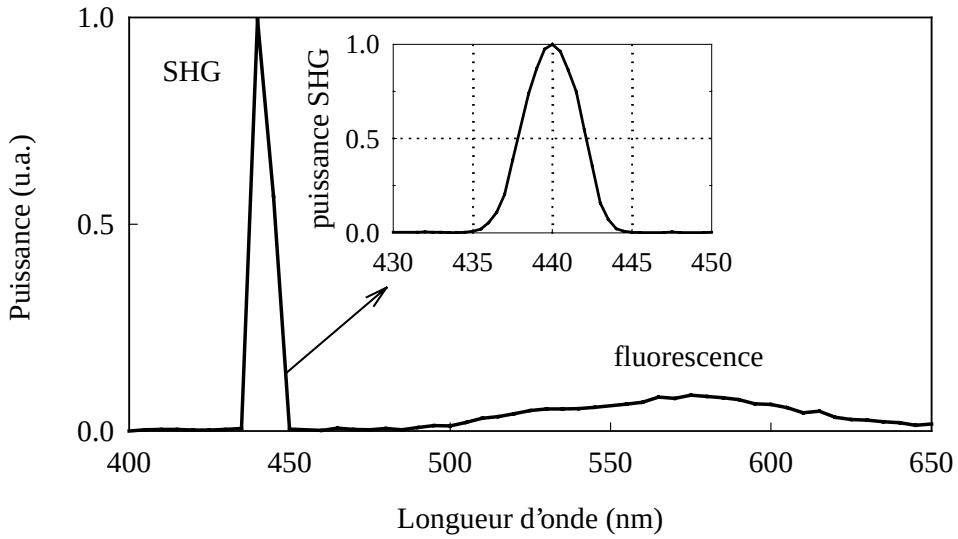


Figure 28 : Spectres de fluorescence et de second harmonique émises par une même vésicule, marquée avec Di-6-ASPBS, excitée à 880 nm et imagée sur les deux canaux, TPEF et SHG[21]. En encart, le pic de SHG a été enregistré en fermant les fentes du spectromètre (résolution de 4 nm).

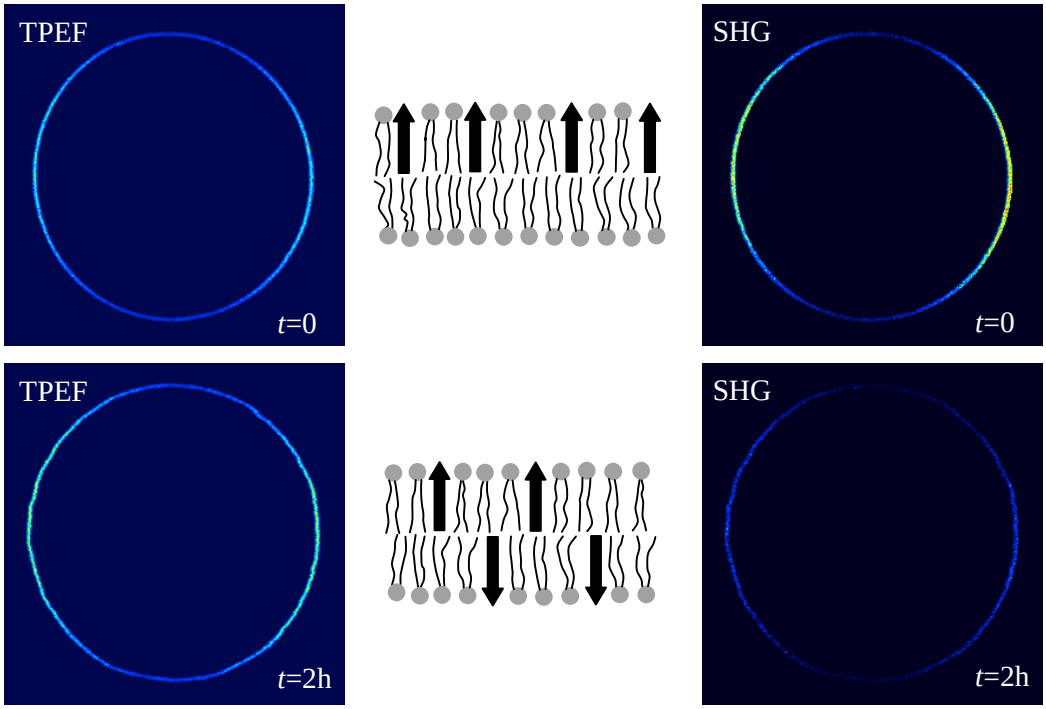


Figure 29 : Images TPEF et SHG d'une vésicule au début de l'expérience, et après deux heures. Au cours du temps, les sondes Di-6-ASPBS se répartissent symétriquement sur les deux feuillets.

La SHG requière la non-centrosymétrie non seulement des molécules non linéaires, mais encore celle de leur distribution spatiale. Cette condition est illustrée sur les images de la Figure 29. Les vésicules ont subi un marquage externe, c'est-à-dire par incubation de colorant dans la solution extérieure (2.2b). Les sondes lipophiles commencent donc à s'insérer entre les phospholipides du feuillet externe. Par la suite, ils peuvent changer de feuillet, par un mouvement de flip-flop. Au bout d'un temps suffisamment long, les concentrations de fluorophores se sont équilibrées des deux côtés de la membrane : sa symétrie est alors devenue incompatible avec la SHG.

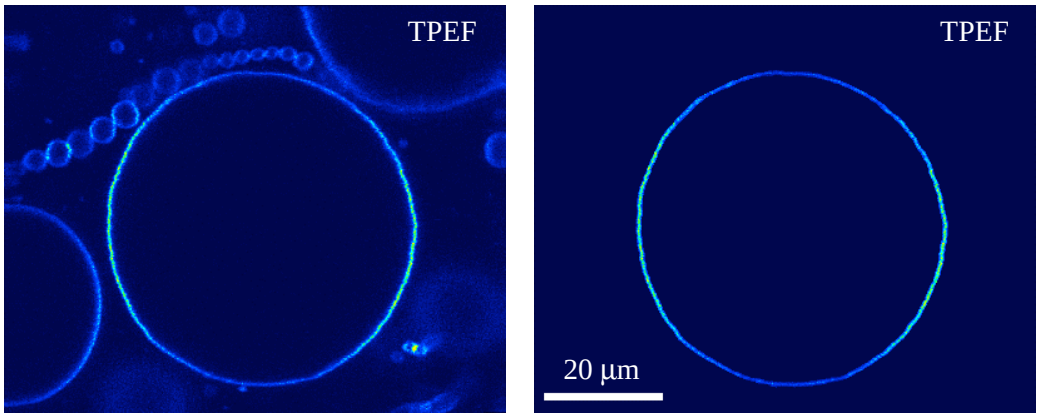


Figure 30 : Suivi du flip-flop dans une vésicule marquée avec Di-6-ASPBS. Pour diminuer le bruit, on découpe l'image autour de la membrane, grâce à la macro de reconnaissance de forme.

Afin de suivre quantitativement la cinétique de flip-flop, il faut fixer un critère précis pour la mesure des intensités de TPEF et de SHG. L'expérience nécessite en effet de suivre la même vésicule pendant un temps très long (plus de 4h). Même en minimisant les perturbations (en cellule fermée, pour éviter les flux), l'entourage de la vésicule change forcément d'aspect : des vésicules plus petites, soumises au mouvement Brownien, passent à proximité. On ne peut donc pas intégrer le flux sur tout le champ de l'image. Afin d'isoler uniquement les fluorophores de la vésicule étudiée, on découpe autour de sa membrane une bande, dont l'épaisseur est environ égale à la largeur du point focal (PSF). La somme des niveaux de tous les pixels contenus dans cette bande définit alors I_{TPEF} et I_{SHG}.

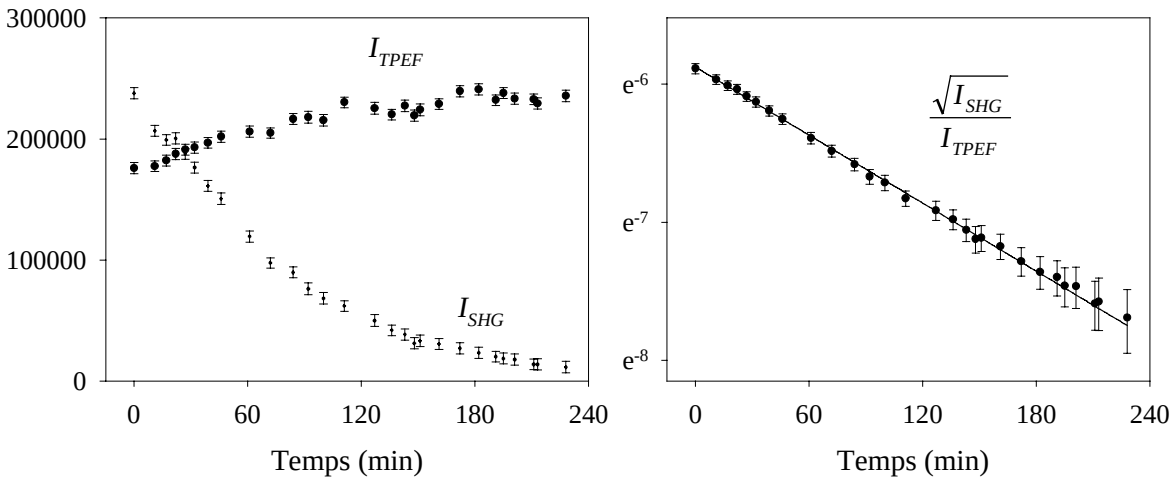


Figure 31 : Evolution temporelle des niveaux de TPEF et de SHG, intégrés sur la membrane d'une vésicule marquée par Di-6-ASPBS. Le colorant a été injecté 30 min avant le début de l'observation. Les barres d'erreur sont estimées à partir du niveau du fond et du nombre de pixels composant la membrane. La courbe normalisée est tracée en échelle semi-logarithmique.

On constate sur le graphe que l'intensité en TPEF, intégrée sur toute la membrane, a augmenté globalement de plus de 30% en 4h. Parallèlement, on observe que la vésicule s'est détendue au cours du temps. Ces deux constats indiquent que les sondes continuent à s'insérer lentement dans la bicouche, à partir de la solution (effet réservoir). Les variations de l'intensité I_{TPEF} d'une image à l'autre reflètent simplement des fluctuations de forme, qui font varier le nombre de sondes dans le plan de mise au point. A l'inverse, la SHG présente une décroissance continue. La fraction de sondes en excès sur le feuillet extérieur est évaluée en normalisant $\sqrt{I_{SHG}}$ par I_{TPEF}. On obtient une exponentielle décroissante, de temps caractéristique τ=122 min. Le temps de flip-flop, au bout duquel la moitié des sondes se retournent, est alors $\tau_{1/2} = \tau \ln 2 \approx 1.5\,\mathrm{h}$. Cette valeur pour Di-6-ASPBS est identique à celle mesurée pour le marqueur C6-NBD-HPC, dans des globules rouges[28] : la méthode consiste alors à utiliser une protéine globulaire, l'albumine de sérum bovin, comme d'une éponge qui capte les phospholipides fluorescents au fur et à partir qu'ils passent sur le feuillet externe. La correspondance des temps de flip-flop n'est peut-être pas totalement fortuite, car les deux marqueurs fluorescents sont des molécules zwitterioniques.

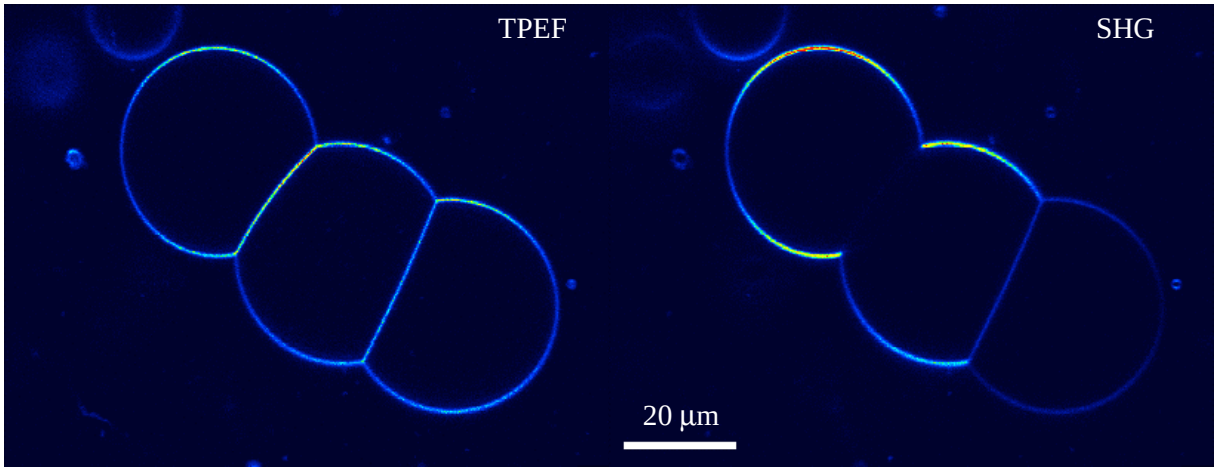


Figure 32 : Images, en TPEF et en SHG, de vésicules adhérant entre elles par adsorption d'ions Ca^{++} (cf. V–1.3). On observe des interférences destructives de la SHG entre les bicouches accolées.

L'extinction de la SHG par restauration de la centro-symétrie peut être obtenue en un temps beaucoup plus court que par flip-flop. Les images ci-dessus montrent trois vésicules adhérant entre elles, en milieu Ca^{++} 0.5 mM (l'interaction peut être vue comme un pontage électrostatique, cf. V–1.3). Bien qu'elles maintiennent encore leur asymétrie propre, les bicouches adhérentes exposent leurs

dipôles tête-bêche (cf. Figure 33a). Sur l'image de fluorescence, les parois entre les vésicules apparaissent intenses : deux membranes situées l'une de l'autre à une distance inférieure à la largeur w_x du faisceau sont indiscernables, mais leurs intensités s'ajoutent. En second harmonique, les rayonnements issus de deux bicouches accolées interfèrent de manière destructive. La vésicule la plus à droite émet moins de SHG que les deux autres, malgré un niveau de fluorescence comparable. On en conclut que l'asymétrie de sa membrane est moins grande. Comme ses fluorophores ne sont pas situés majoritairement sur la monocouche externe, sa membrane n'éteint que partiellement le signal de la vésicule centrale. On ne compare pas plus quantitativement les niveaux mesurés sur ces deux images, car l'anisotropie de l'intensité d'excitation est trop forte. Une solution pratique consisterait à transformer la polarisation rectiligne du laser en une polarisation circulaire parfaite.

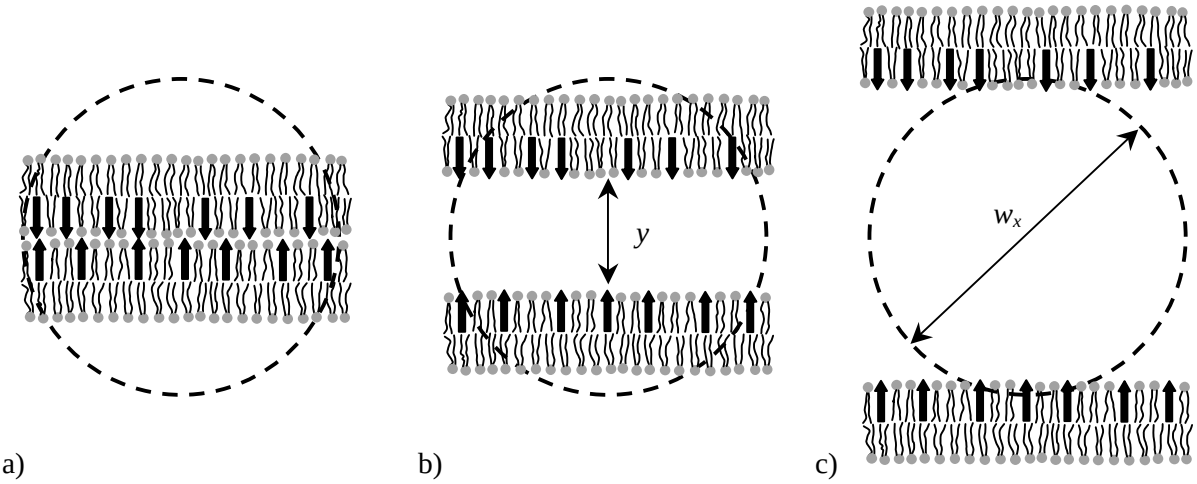


Figure 33 : Positions de deux membranes distantes de y, dans le volume d'excitation de dimension latérale w_x ; a) restauration de la centro-symétrie pour y=0; b) zone d'interférence, $0<y<w_x$; c) lorsque $y>w_x$, les rayonnements SHG ne sont plus corrélés.

L'argument de symétrie du milieu, pour déterminer si une distribution donnée d'antennes rayonne au second harmonique, nécessite toutefois des précautions. Ainsi une vésicule sphérique marquée sur son feuillet externe possède-t-elle bien un centre de symétrie. Mais lorsque les sondes symétriques l'une de l'autre sont séparées d'une distance supérieure à la taille du spot laser (Figure 33c), elles sont excitées par des impulsions lumineuses différentes, dont les phases sont totalement décorrélées. C'est pourquoi l'échelle de distance pertinente sur laquelle deux membranes ont des rayonnement SHG cohérents est la largeur w_x du beam-waist, soit 510 nm dans des conditions de focalisation données (λ=880 nm et NA=0.9). Un régime particulier est celui de deux membranes asymétriques situées à distance non nulle l'une de l'autre, mais néanmoins comprises dans le même volume d'excitation (Figure 33b). Le cas est observé expérimentalement sur les points de tangence entre des vésicules proches, mais non adhérentes (Figure 34). En fluorescence, les bicouches sont indiscernables, et leurs intensités se cumulent. Par contre, en SHG, une modulation de l'intensité rayonnée apparaît.

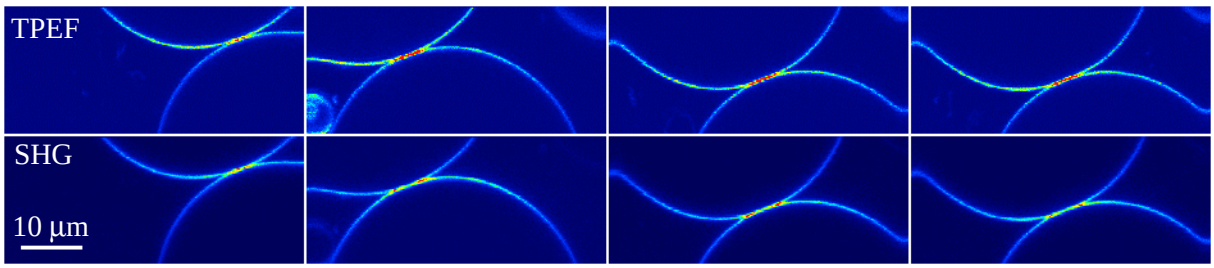


Figure 34 : Interférences constructives en SHG, entre deux vésicules marquées avec Di-6-ASPBS, se rapprochant progressivement. La distance minimale d séparant leurs bicouches est calculée grâce à l'Eq. (11), d'après les mesures de l'écartement des deux points rouges $2x_{max}$ et du rayon de courbure R au point de contact (de gauche à droite) : d= 298, 84±12, 27±1 et 0±2 nm. On a utilisé y_{max}=310 nm (valeur calculée pour λ=880 nm). Les incertitudes tiennent compte uniquement de l'erreur sur R. La déformation sur le bord gauche du champ est un artefact du aux miroirs qui balayent le faisceau.

La présence dans la zone de proximité de deux points rouges, en lesquels I_{SHG} est maximale, est interprétée comme une figure d'interférence entre les signaux issus des deux membranes. Leur profil de distance est noté $y(x)$. Une relation géométrique simple relie alors la distance minimale au rayon de courbure R (supposé identique pour les deux vésicules) et aux coordonnées (x_{max}, y_{max}) de ces points :

Eq. (11)
$$d = y_{max} - \frac{x_{max}^2}{R}$$

Sous réserve de connaître y_{max}, on dispose d'une mesure de la distance entre deux bicouches libres.

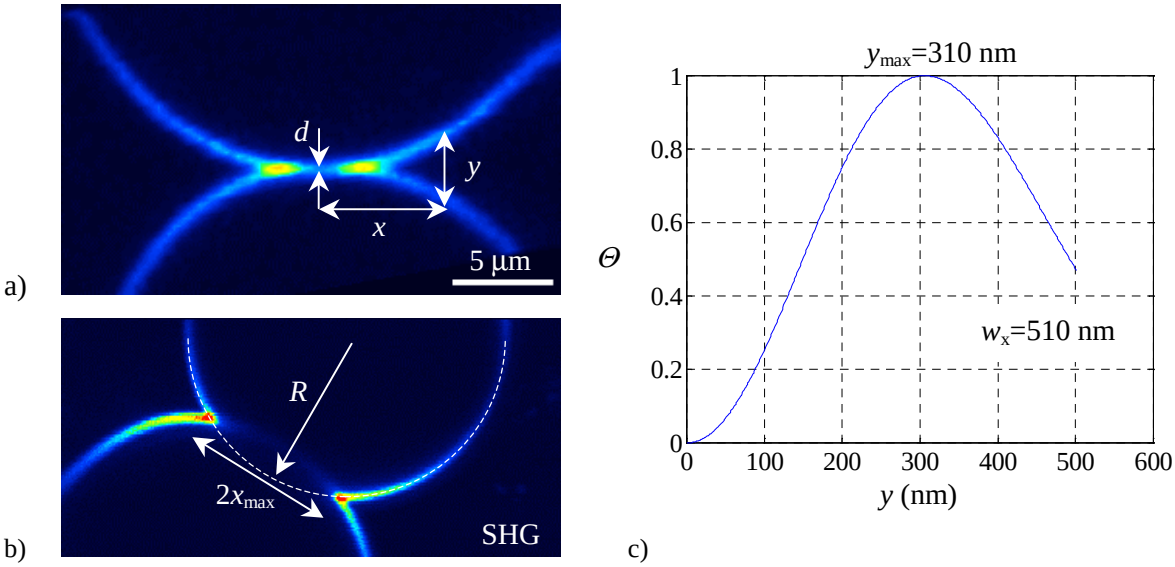


Figure 35 : a) deux vésicules tangentes, marquées avec RH237 et observées en SHG à 930 nm ; b) deux vésicules adhérentes, marquées avec RH237 et observées en SHG à 880 nm ; c) Variation du facteur géométrique Θ de la SHG en fonction de la distance y entre deux portions de membranes (simulations numériques pour λ=880 nm et NA=0.9, L. Moreaux, Neurophysiologie / ESPCI).

Dans le cas d'une seule bicouche placée dans le volume d'excitation, le modèle de rayonnement dipolaire a fourni une figure de diffusion vérifiée expérimentalement. On peut donc lui faire confiance pour simuler le cas de deux bicouches situées l'une en face de l'autre. Le graphe de la Figure 35c a été construit en simulant numériquement la résultante géométrique Θ, qui intervient dans le flux total de SHG, donné à l'Eq. (9). Quand la distance y est variée entre 0 et w_x, ce paramètre passe par un maximum pour y_{max}=310 nm. En répétant les simulations pour d'autres conditions d'éclairement, on aboutit à la formule empirique $y_{\max} \approx 0.6 w_x$, utilisable pour traiter quantitativement les interférences[29].

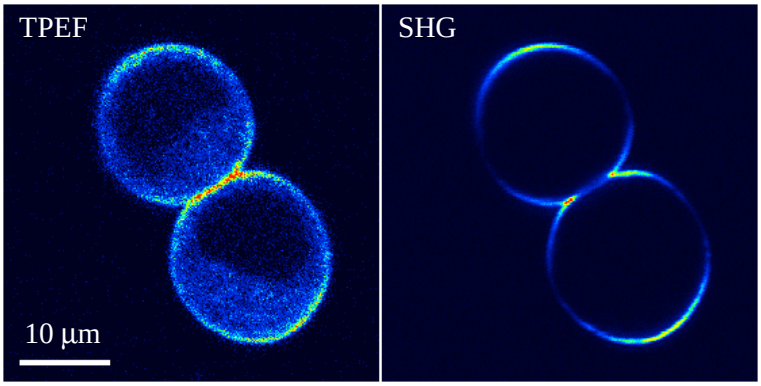
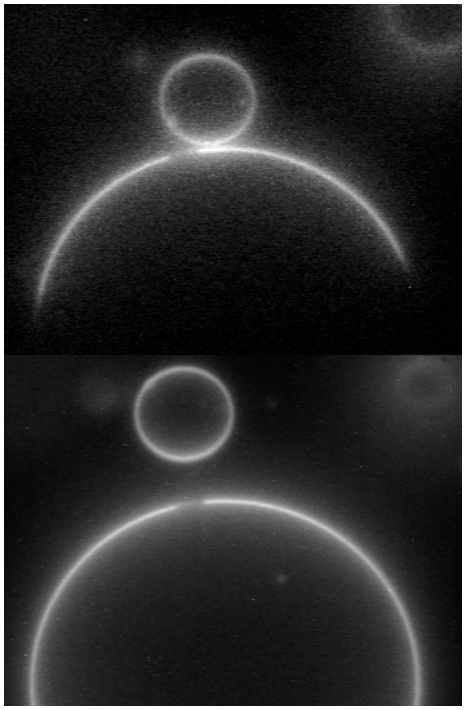


Figure 36 : Interférences en SHG entre des cellules biologiques, marquées avec 1 µM RH237. Ces cellules (Ncad1) expriment une protéine d'adhésion, la N-cadhérine (culture Sylvie Dufour, UMR144 / Institut Curie). Alors que des compartiments internes apparaissent en TPEF, seule la membrane plasmique est visible en SHG : l'entrée du colorant dans la cellule doit rétablir la centro-symétrie. La distance inter-membranes est négative, d=–0.56±0.2 µm (les deux formes sphériques s'interpénètrent).

En conclusion, le choix d'une microscopie optique dépend des informations que l'on désire tirer des images. Les microscopies « en fond clair », en transmission simple ou en DIC, permettent de contrôler les échantillons. Pour suivre des changements rapides de la zone de contact entre une membrane libre (vésicule ou cellule) et une paroi solide, on choisira soit la RICM, soit l'une des techniques concurrentes, basées sur la fluorescence près d'une surface : EWIF (substrat transparent) ou FLIC (substrat réfléchissant). Pour l'étude des phénomènes membranaires, la microscopie de fluorescence classique, à un photon, est une technique simple à mettre en œuvre. Sous réserve des précautions mentionnées plus haut, elle peut fournir des résultats quantitatifs. Avec des sondes fluorescentes efficaces, les images peuvent être acquises à la fréquence vidéo, permettant ainsi de suivre des évènements relativement rapides. Si le but est de reconstruire la géométrie spatiale de membranes lipidiques, et que l'exigence de rapidité est moins grande, la meilleure résolution est donnée par la microscopie confocale, qui, de plus, est relativement répandue dans les laboratoires de biologie. Dès lors, pourquoi avoir utilisé la microscopie à deux photons, alors que les vésicules sont des échantillons robustes et peu diffusants ? Son utilisation prend toute sa valeur quand, en sus de la

fluorescence, on regarde la lumière au second harmonique. Sa cohérence est un précieux indicateur de la distribution géométrique des sondes. Au contraire de la RICM et de la FLIC qui nécessitent une interface solide, la microscopie en SHG réalise des interférences entre des membranes libres (non déposées sur un substrat). Cet effet a été observé également sur des membranes biologiques (Figure 36). On prévoit ainsi une application de la microscopie SHG pour étudier l'adhésion des membranes, naturelles ou artificielles. L'intensité de SHG varie en fonction de la distance quasi-linéairement entre 30 et 300 nm. Elle comble ainsi presque entièrement le fossé séparant d'une part la microscopie optique classique (limitée par la diffraction), d'autre part les techniques optiques de champ proche, comme le transfert résonant d'énergie de fluorescence (FRET), de portée 3–15 nm.

Pour clore le chapitre sur un brin de mystère, on mentionne deux types d'images à l'interprétation plus qu'incertaine. La première fait apparaître un trou dans la membrane d'une grande vésicule. On pourrait croire à un pore transitoire, mais sa taille est restée stationnaire pendant de longues minutes. En fait, la position de ce pore virtuel varie en fonction de la distance d'une autre vésicule, située au voisinage. Il pourrait donc s'agir de l'ombre de la petite vésicule, projetée sur la surface de la grande (les rayons de la lampe seraient déviés par un effet de lentille plutôt qu'absorbés, de sorte que les fluorophores ne seraient plus atteints par la lumière d'excitation dans cette portion de membrane). Un phénomène aussi étrange est visible sur la deuxième image (en projection) : des lobes noires recouvrent la surface de la vésicule. Là encore, un effet d'ombrage pourrait être la cause.



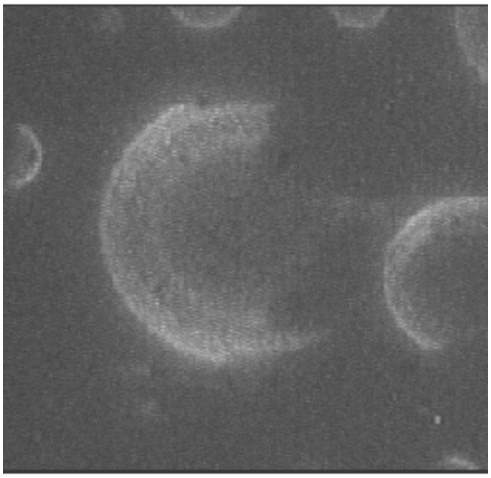


Figure 37 : « L'éclipse » « La main noire » (image E. Karatekin)

Lipide SOPC, intérieur glucose, extérieur sucrose, glycérol 66%

Lipide DOPC, intérieur sucrose / ADN extérieur glucose, glycérol 20%, tampon pH8

III.4 Références du Chapitre III

1. Wolf, A. V., Brown, M. G. & Prentiss, P. G. *Concentrative properties of aqueous solutions: conversion tables* in *CRC Handbook of chemistry and physics, 65th Ed* (ed. Weast, R. C.) D-222-265 (CRC Press, Boca Raton, 1984).
2. *Microscopie des objets de phase* in *Techniques de l'ingénieur* R 6711 4-15.
3. Rädler, J. & Sackmann, E. Imaging optical thicknesses and separation distances of phospholipid vesicles at solid surfaces. *J. Phys. II France* **3**, 727-748 (1993).
4. Albersdörfer, A., Feder, T. & Sackmann, E. Adhesion-induced domain formation by interplay of long-range repulsion and short-range attraction force: a model membrane study. *Biophys. J.* **73**, 245-257 (1997).
5. Martin, P. in *Thèse en Sciences Physiques: Démouillage d'un film liquide intercalé entre un solide et un milieu déformable* (Univ. Paris 6, Pierre et Marie Curie, Paris, 1997).
6. Gingell, D. & Todd, I. Interference reflection microscopy: a quantitative theory for image interpretation and its application to cell-substratum separation measurement. *Biophys. J.* **26**, 507-526 (1979).
7. Wiegand, G., Neumaier, K. R. & Sackmann, E. Microinterferometry: three-dimensional reconstruction of surface microtopography for thin-film and wetting studies by interference contrast microscopy (RICM). *Appl. Opt.* **37**, 6892-6905 (1998).
8. Zilker, A. in *Biophysik These: Analyse von Obserflächenfluktuationen künstlicher und biologischer Membranen mittels Mikrointerferometrie kombiniert mit digitaler Echzeitbildverarbeitung* (Technische Universität München, München, 1991).
9. Zilker, A., Ziegler, M. & Sackmann, E. Spectral analysis of erythrocyte flickering in the 0.3-4 um-1 regime by microinterferometry combined with fast image processing. *Phys. Rev. A* **46**, 7998-8001 (1992).
10. Oheim, M., Loerke, D., Stühmer, W. & Chow, R. H. The fast few milliseconds in the life of a secretary. Docking, dynamics and fusion visualized by total internal reflection fluorescence microscopy (TIRFM). *Eur. Biophys. J.* **27**, 83-98 (1998).
11. Bernard, A.-L., Guedeau-Boudeville, M.-A., Jullien, L. & di Meglio, J.-M. Imaging vesicle adhesion by evanescent wave-induced fluorescence. *Europhys. Lett.* **46**, 101-106 (1999).
12. Braun, D. & Fromherz, P. Fluorescence interference-contrast microscopy of cell adhesion on oxidized silicon. *Appl. Phys. A* **65**, 341-348 (1997).
13. Loew, L. M. & Simpson, L. L. Charge-shift probes of membrane potential. A probable electrochromic mechanism for p-aminostyrylpyridinium probes on a hemispherical lipid bilayer. *Biophys. J.* **34**, 353-365 (1981).
14. Fluhler, E., Burnham, V. G. & Loew, L. M. Spectra, membrane binding and potentiometric responses of new charge shift probes. *Biochemistry* **24**, 5749-5755 (1985).
15. Grinvald, A., Hildesheim, R., Farber, I. C. & Anglister, L. Improved fluorescent probes for the measurement of rapid changes in membrane potential. *Biophys. J.* **39**, 301-308 (1982).

16. Korlach, J., Schwille, P., Webb, W. W. & Feigenson, W. Characterization of lipid bilayer phases by confocal microscopy and fluorescence correlation spectroscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 8461-8466 (1999).
17. Denk, W., Strickler, J. H. & Webb, W. W. Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science* **248**, 73 (1990).
18. Gauderon, R., Lukins, P. B. & Sheppard, C. J. R. Three-dimensional second-harmonic generation imaging with femtosecond laser pulses. *Opt. Lett.* **23** (1998).
19. Campagnola, P. J., Wei, M., Lewis, A. & Loew, L. M. High-resolution nonlinear optical imaging of live cells by second harmonic generation. *Biophys. J.* **77**, 3341-3349 (1999).
20. Peleg, G., Lewis, A., Linial, M. & Loew, L. M. Nonlinear optical measurement of membrane potential around single molecules at selected cellular sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 6700-6704 (1999).
21. Moreaux, L., Sandre, O., Blanchard-Desce, M. & Mertz, J. Membrane imaging by simultaneous second-harmonic generation and two-photon microscopy. *Opt. Lett.* **25**, 320-322 (2000).
22. Bagatolli, L. A. & Gratton, E. Two-photon fluorescence microscopy observation of shape changes at the phase transition in phospholipid giant unilamellar vesicles. *Biophys. J.* **77**, 2090-2101 (1999).
23. Bagatolli, L. A. & Gratton, E. A correlation between lipid domain shape and binary phospholipid mixture composition in free standing bilayers: a two-photon fluorescence microscope study. *Biophys. J.* **79**, 434-447 (2000).
24. Brown, D. A. & London, E. Structure and origin of ordered lipid domains in biological membranes. *J. Membrane Biol.* **164**, 103-114 (1998).
25. Moreaux, L., Sandre, O. & Mertz, J. Membrane imaging by second-harmonic generation microscopy. *J. Opt. Soc. Am. B* **17**, 1685-1694 (2000).
26. Chen, Z., Sheves, M., Lewis, A. & Bouevitch, O. A comparison of the second harmonic generation from light-adapted, dark-adapted, blue and acid purple membrane. *Biophys. J.* **67**, 1155-1160 (1994).
27. Shen, Y. R. *The principles of nonlinear optics* (Wiley, New York, 1984).
28. Dekkers, D. W. C., Comfurius, P., Schroit, A. J., Bevers, E. M. & Zwaal, F. A. Transbilayer movement of NBD-labeled phospholipids in red blood cell membranes: outward-directed transport by the multidrug restistance protein 1 (MRP1). *Biochemistry* **37**, 14833-14837 (1998).
29. Moreaux, L., Sandre, O., Charpak, S., Blanchard-Desce, M. & Mertz, J. Coherent scattering in harmonic light microscopy. *Biophys. J.* **80**, 1568-1574 (2001).

Chapitre IV: Pores transitoires dans les vésicules tendues

Les bulles sont des objets fragiles : quand on y perce un trou, elles éclatent et disparaissent en une fraction de seconde. Les vésicules sont plus robustes, car leur elles peuvent s'accommoder d'un pore béant dans leur membrane pendant plusieurs secondes, voire des minutes. A la différence d'une tension superficielle classique, la tension d'une membrane n'écarte les bords du trou que temporairement, car ensuite elle relaxe très rapidement, pour deux raisons. D'une part, la surface du pore est rendue aux ondulations thermiques ; d'autre part, le liquide interne s'échappe et la vésicule se dégonfle. Quand la tension de surface est redescendue à un niveau bas, la tension de ligne reprend le dessus et ferme le pore. Ce chapitre débute par un bref historique des expériences sur les pores antérieures à ce travail. Le modèle théorique considère, comme point de départ, les lois d'éclatement de bulles visqueuses un peu spéciales, obtenues en soufflant de l'air dans un liquide ultra-visqueux : leur paroi est un film « nu », c'est-à-dire sans tensioactifs. En ajoutant la relaxation de la tension, la vie complète d'un pore dans une vésicule géante peut être décrite. Une mesure précise de la tension de ligne a été effectuée, en fonction de la proportion de cholestérol dans la membrane. La discussion du modèle porte sur les contributions respectives des flux de lipide et de solvant à la dissipation visqueuse. Du point de vue expérimental, la mise sous tension des vésicules par illumination a été caractérisée, et plusieurs mécanismes microscopiques sont proposés. On termine par l'application des pores transitoires à l'expulsion contrôlée d'objets, encapsulés au préalable dans les vésicules.

IV.1 Introduction et revue sur les pores dans les bicouches

Une bicouche lipidique intègre constitue une barrière hydrophobe, relativement étanche, entre les deux solutions aqueuses qu'elle sépare (cf. Encadré I–3 sur la perméabilité). Les solutés chargés, ou bien de haut poids moléculaire, ne peuvent donc la traverser qu'au travers de passages. On distingue deux types de « pores » : les premiers sont dus à des inclusions dans la membrane, soit une petite molécule comme un antibiotique (la valinomycine, constituant un canal spécifique aux ions K^+) ou bien un complexe protéique (pouvant mesurer jusqu'à 100 nm, comme les pores dans la membrane des noyaux cellulaires[(1)]) ; les seconds sont simplement des trous dans la bicouche de phospholipides. De nombreuses études ont déjà été réalisées sur ces pores purement lipidiques. Elles diffèrent par la technique employée pour tendre la membrane. Nous allons donner ici une courte revue des travaux antérieurs au nôtre. L'existence de pores dans les membranes lipidiques des vésicules artificielles et des cellules biologiques ne fait plus aucun doute depuis qu'ils ont été détectés par des méthodes électriques (en leur présence, la résistance membranaire s'effondre), et qu'ils ont même été directement visualisés en microscopie (optique et électronique). L'ouverture des pores est déclenchée presque toujours par un champ électrique (électroporation), appliqué continûment ou par impulsions. Ensuite, selon le type d'expériences, soit ils sont maintenus dans un état stationnaire, soit ils s'étendent

irréversiblement. Un diagramme énergétique permet de discuter la stabilité des pores, et l'existence éventuelle d'une taille d'équilibre.

1a) Pores stationnaires ouverts grâce à un champ électrique

Les champs électriques agissent sur les membranes d'abord en les déformant, puis en les perforant. Appliquée à des vésicules microscopiques, l'électroporation nécessite une étude par diffusion de la lumière[2]. Par contre, les pores peuvent être observés directement sur des vésicules géantes.

(i) Première visualisation de pores stationnaires par microscopie optique

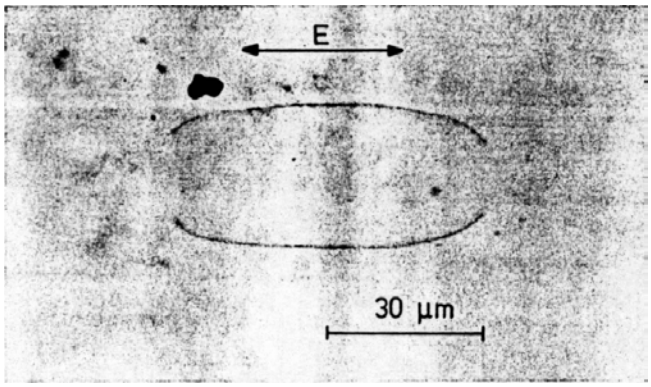


Figure 1 : Vésicule géante d'EPC soumise à un champ électrique E=35 V/cm à 2kHz [3]. Cette forme est intermédiaire, et évolue vers un cylindre ouvert très allongé.

Dans leur expérience fondatrice, Harbich et Helfrich ont appliqué un champ électrique oscillant sur une vésicule géante, par des électrodes similaires à celles représentées au paragraphe I–3.4. Ils observent un allongement très important, qui ne peut se faire à volume constant : la solution interne s'échappe par deux pores béants, situés aux pôles électriques de la vésicule (Figure 1). La déformation se poursuit vers un cylindre ouvert à ses deux extrémités, de longueur L≈300 µm et de rayon r≈1.5 µm (qui est aussi le rayon des pores). Au dessus d'une valeur seuil du champ électrique, l'augmentation de l'intensité accélère l'allongement des vésicules, mais ne change pas leur rapport d'aspect.

(ii) Pores stabilisés par une tension mécanique

Au lieu d'un champ électrique présent en permanence, une brève impulsion intense peut aussi faire apparaître des pores dans une vésicule géante. En appliquant pendant 150 µs un champ E≈10^5 V/m, Zhelev et Needham font nucléer un pore de taille macroscopique dans une vésicule géante, maintenue par une micropipette. Comme la pipette exerce une pression d'aspiration constante sur la vésicule, la langue de membrane cylindrique avance dans la micropipette au fur et à mesure que la vésicule se vide à travers le pore. La présence du pore se devine sur les images (voir la flèche sur la Figure 2), mais son rayon r n'est pas directement mesurable. Par contre, l'avancée de la membrane dans la micropipette

est mesurée avec une grande précision : la longueur L augmente de façon quasi-linéaire avec le temps pendant la durée de vie du pore (quelques s).

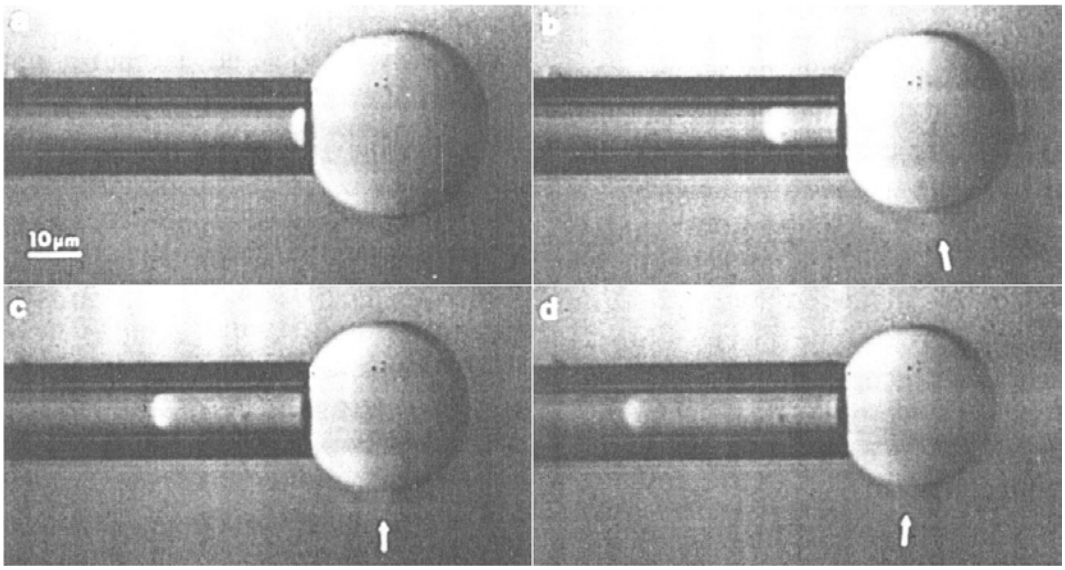


Figure 2 : Expérience d'électroporation d'une vésicule géante de SOPC maintenue par dépression hydrostatique dans une micropipette[4].

Une autre étude encore porte sur l'électroporation de vésicules géantes, dont la membrane est au préalable partiellement polymérisée sous irradiation ultra-violette[5]. Un pore macroscopique peut alors rester stationnaire pendant une à deux minutes après l'impulsion électrique, tandis que l'intérieur de la vésicule s'équilibre avec la solution externe.

(iii) Pores transitoires dans des cellules biologiques

L'électroporation est par ailleurs utilisée couramment en biologie moléculaire pour la transfection des cellules, i.e. l'introduction de gènes étrangers (plasmides). Bien que l'efficacité de la transfection ne soit pas une priorité pour les biologistes (car ils peuvent détruire sélectivement les cellules non transfectées en introduisant des gènes de résistance à des drogues !), quelques études systématiques ont été conduites[6,7], dans le but d'optimiser les paramètres du champ : intensité, durée, etc.. Un résultat remarquable est que l'ADN peut être introduit bien après l'application du champ électrique. On peut donc exclure un mécanisme d'électrophorèse directe des brins d'ADN dans les cellules. On rapporte plutôt que les cellules restent dans un état « perméabilisé » pendant une dizaine de minutes après la fin du choc électrique. Les physiciens se sont intéressés, d'un point de vue théorique, au passage d'une macromolécule telle que l'ADN à travers ces pores transitoires, créés dans la membrane initialement close, d'une vésicule ou d'une cellule[8,9]. L'Encadré 4 présente un peu plus en détails deux exemples dans un environnement biologique : des pores transitoires étudiés dans des globules rouges ; des pores stationnaires et réversibles dans des vésicules géantes, en présence d'une protéine.

Encadré 4 Pores en milieu biologique

- Première étude cinétique de l'électroporation dans des cellules

Par microscopie électronique, des pores ont été observés dans la membrane lipidique de cellules simples (globules rouges) dans leur état de perméabilité accrue, après électroporation[6]. Un dispositif astucieux plonge les cellules dans l'éthane liquide avec un délai contrôlé après l'application de l'impulsion électrique. En variant le temps d'attente, et en déterminant les histogrammes des tailles de pores observées, la dynamique moyenne d'un pore a pu être obtenue. Dans les premières 3 ms, les pores manifestent une expansion très rapide et atteignent déjà 20 à 40 nm. Jusqu'à 40 ms, les diamètres continuent d'augmenter, et s'étalent entre 20 et 120 nm. Au delà (t=54 ms, 220 ms, 1.0 s et 1.7 s), l'histogramme se resserre mais le diamètre maximum n'augmente plus (50–120 nm à 220 ms) : le rayon des pores atteint donc un maximum. Aux temps plus longs (t=5 s et 10 s), les pores apparaissent comme des creux moins prononcés dans la membrane, et les diamètres diminuent : c'est l'étape de cicatrisation.

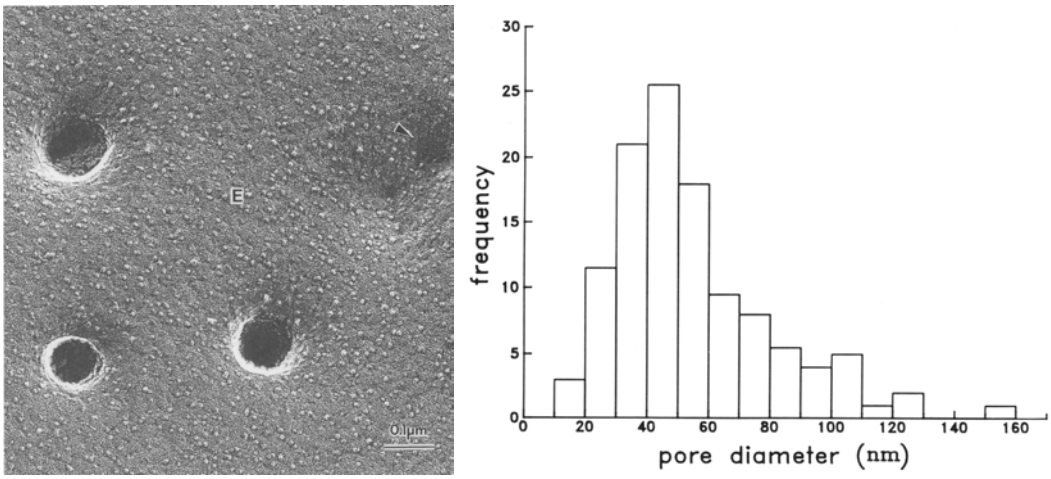


Figure 3 : Pores réalisés par électroporation de globules rouges, visualisés par microscopie électronique en cryofracture[10]. L'histogramme des diamètres de pore correspond à un délai de 40 ms après l'application du champ.

- Pores réversibles assistés par une protéine

Les protéines associées aux membranes biologiques doivent aussi jouer un rôle dans la stabilité des pores. Sur le cliché de la Figure 3, elles apparaissent comme des « grains » qui décorent la membrane, du côté extracellulaire (face E). De l'autre côté (cytoplasmique, face P), on trouve des protéines polymérisées (actine, spectrine) qui forment un maillage élastique, le cytosquelette. D'autres protéines, plus petites, assurent l'ancrage du réseau filamenteux avec la bicouche lipidique. Pour cela, elles forment des complexes liés d'une part au cytosquelette, d'autre part à des protéines transmembranaires (des intégrines, ou certains canaux). Parmi ces protéines de liaison on trouve par exemple l'ézrine, la caténine, et la taline. Cette dernière (la taline) s'est révélée avoir un fort pouvoir tensioactif sur les bicouches de phospholipides : à des concentrations entre 0.25 et 0.5 µM, elle crée des pores stationnaires dans des vésicules géantes formées de mélanges de phospholipides PE/PG ou PC/PG (Figure 4). Au dessus de 1 µM, les bicouches se déplient complètement en un pan de membrane libre. Parfois deux ou trois pores peuvent aussi apparaître dans la même vésicule. Dans tous les cas, le phénomène est réversible : les vésicules se referment et redeviennent sphériques par simple dilution de la protéine dans le milieu. La taline est une protéine hydrosoluble, ayant un domaine N-terminal de 47 kDa qui présente une affinité pour les membranes lipidiques, et un domaine C-terminal de 190 kDa qui se lie au cytosquelettte. Comme elle est localisée exactement sur les bords libres des membranes, et que sa présence diminue la tension de ligne $\Im$ de ces pores, la taline peut être vue comme une molécule tensioactive.

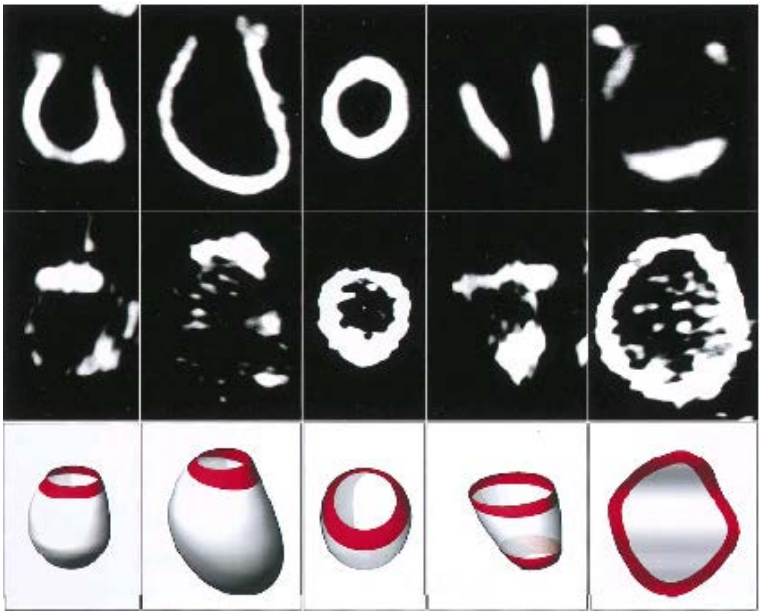


Figure 4 : Pores stationnaires dans des vésicules géantes de composition lipidique PE/PG (1/1), stabilisés par une protéine tensioactive, la taline. La membrane est visualisée par microscopie en fond noir (ou strioscopie, en haut) et la protéine par microscopie de fluorescence (au milieu). La taline est localisée sur le bord libre des pores[11].

1b) Ruptures irréversibles de bicouches

Les « films noirs lipidiques », ou BLM, sont des bicouches planes séparant deux réservoirs de solution aqueuse[1]. En comparaison des membranes courbes et refermées sur elles-mêmes, relativement flasques, de vésicules géantes ou de cellules, les BLM sont des membranes très tendues dès le départ. C'est pourquoi elles éclatent irrémédiablement quand on leur applique une tension électrique U, au-dessus d'une valeur seuil de l'ordre du Volt. Le montage expérimental contient classiquement une détection très sensible du courant électrique circulant entre les deux compartiments aqueux, à travers la BLM. On mesure soit le temps de vie t_1 pour une valeur U de la tension appliquée[12], soit la montée exponentielle du courant après la rupture[13,14]. Ce type d'expériences a donné lieu à des études statistiques d'une population de pores dans une bicouche[15-18].

1c) Diagramme énergétique d'un pore

Revenons d'abord sur la vision énergétique classique d'un pore dans un film liquide mince [19]. Le bord du trou possède un coût énergétique proportionnel à son périmètre, l'énergie de ligne. Cette énergie rapportée à l'unité de longueur est homogène à une force : la tension de ligne $\Im$, dirigée vers

[1] Les BLM ressemblent aux « films noirs de Newton » dans une bulle de savon, quand l'eau s'est complètement évacuée par drainage ou par évaporation. Néanmoins, les molécules présentent leur partie hydrophile à l'extérieur du film dans le cas des phospholipides, et hydrophobe dans celui des détergents.

l'intérieur du pore. Par ailleurs, un film liquide usuel possède deux interfaces avec l'air ou un autre liquide. L'énergie de chacun est le produit de son aire et de la tension interfaciale γ. Cette énergie est donc abaissée par le pore, qui diminue l'aire des deux interfaces.

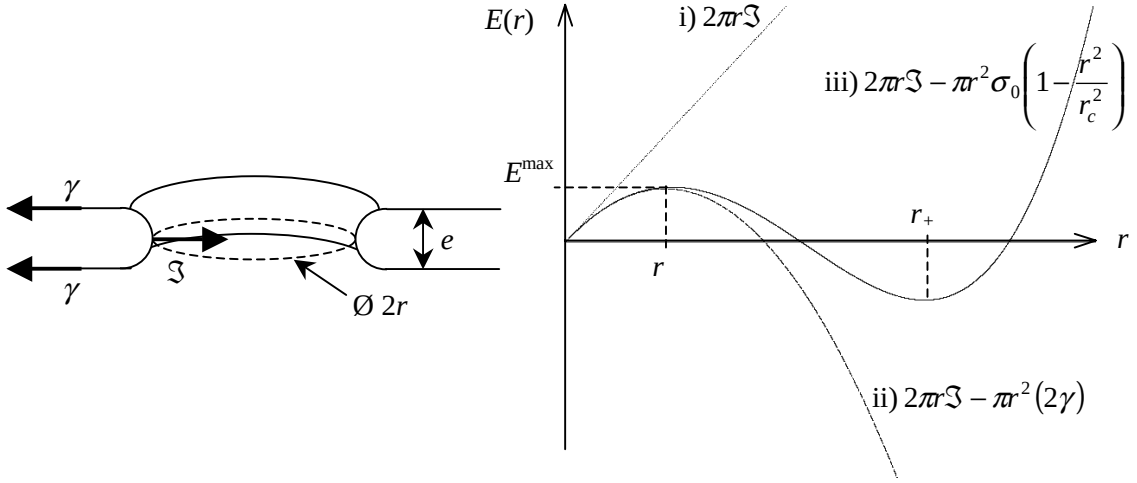


Figure 5 : à gauche, schéma d'un pore de rayon r dans une membrane d'épaisseur e ; à droite, profils énergétiques du pore en fonction de r ; i) énergie de ligne due à une tension de ligne $\Im$; ii) énergie de ligne et énergie de surface créée par une tension interfaciale γ constante ; iii) cas d'une vésicule, où l'on a pris en compte la relaxation de la tension par la surface rendue aux fluctuations.

La courbe ii) ci-dessus représente le profil énergétique d'un pore dans un film liquide usuel, dont la tension interfaciale est constante. La compétition entre γ et $\Im$ se traduit par l'existence d'une barrière, de hauteur $E^{max} = \pi\Im^2/2\gamma$, correspondant à un rayon de nucléation $r_- = \Im/2\gamma$. En deçà de ce rayon r_-, la tension de ligne referme le pore. Si ce seuil est dépassé, la force $F = -\frac{dE}{dr}$ qui agit sur le bord libre du pore devient positive et croissante. Le trou s'étend donc à l'infini (en pratique jusqu'aux limites du récipient).

Ce diagramme de stabilité convient encore pour une membrane plane tendue, comme une BLM. L'Encadré 6 fournit une description microscopique de la tension de ligne d'une bicouche lipidique. Le profil doit par contre être revu dans le cas d'une membrane isolée, telle que celle d'une vésicule[1], dont les ondulations sont au préalable lissées par une tension mécanique σ_0. En effet, au fur et à mesure que le pore s'étend, la membrane se détend et redevient plissée. De ce fait, l'expansion du pore doit s'arrêter pour une valeur finie du rayon. L'existence de pores stationnaires a ainsi été prévue théoriquement[(20,21)].

[1] Aux temps courts, on peut aussi considérer que la membrane plasmique d'une cellule possèdent un nombre constant de lipides.

Nous nous plaçons dans le cadre d'une modèle simplifié pour décrire l'élasticité de la membrane : la tension de surface décroît proportionnellement à la surface du pore qui s'étend. Plus précisément, la vésicule totalement détendue aurait un rayon R_0. Au départ, son rayon est $R_i > R_0$ et sa surface projetée est étirée par la tension de surface σ_0 :

Eq. (1)
$$A_p = 4\pi R_0^2\left(1+\frac{\sigma_0}{E}\right) = 4\pi R_i^2$$

On discute dans l'Encadré 5 le choix du module d'étirement E qui convient, selon que la tension se situe dans le régime d'élasticité entropique ou celui d'étirement des lipides, ou encore entre les deux. Après ouverture du pore, la forme géométrique globale de la vésicule est conservée, sauf que son enveloppe se compose maintenant de la membrane qui se rétracte, et d'un trou qui s'étend, au dépens de la première. Cette conservation de l'aire géométrique totale s'écrit :

Eq. (2)
$$4\pi R_0^2\left(1+\frac{\sigma_0}{E}\right) = 4\pi R_0^2\left(1+\frac{\sigma}{E}\right) + \pi r^2 = 4\pi R_0^2 + \pi r_c^2$$

A la limite, la vésicule peut devenir complètement détendue, tout en conservant son rayon de courbure initial R_i. Il faut pour cela qu'un trou se soit ouvert dans la membrane, jusqu'à un rayon r_c tel que :

Eq. (3)
$$r_c^2 = 4R_0^2\,\frac{\sigma_0}{E}$$

On peut réécrire le bilan des aires de l'Eq. (2) en mettant l'accent sur la relaxation de la tension :

Eq. (4)
$$\sigma(r) = \sigma_0\left(1-\frac{r^2}{r_c^2}\right)$$

où r_c apparaît bien comme le rayon d'un pore qui relaxerait complètement la tension. Cette expression de la tension de surface est utilisée dans le profil énergétique iii) de la Figure 5. Il existe alors deux rayons de pore en lesquels la force $F = -\frac{dE}{dr}$ s'annule : $r_- \approx \Im/\sigma_0$ et $r_+ \approx r_c - \Im/2\sigma_0$. Un pore qui nuclée au-dessus du seuil r_- s'étend jusqu'au rayon r_+, correspondant à un minimum d'énergie, et à un équilibre entre les deux forces antagonistes $\sigma r = \Im$. Une fois arrivés à maturité, les pores resteraient ouverts indéfiniment dans la membrane.

Un modèle plus raffiné, utilisant une expression logarithmique pour décrire l'élasticité entropique des membranes, aboutit à la même conclusion[20]. Pour une tension de surface modérée, $\sigma_0 \approx 8\times10^{-6}$ N/m , les auteurs prévoient qu'un pore stationnaire couvre au minimum 0.5% de la surface projetée. Avec un rayon de la vésicule R_i=20 μm, le rayon prévu d'un tel pore est $r = R_i\sqrt{4\times0.005} \approx 3\,\mu\text{m}$. Pourquoi dès lors des pores aussi larges ne sont-ils pas observés couramment dans les expériences mettant des vésicules géantes sous tension?

La réponse à cette question réside dans un second mode de relaxation de la tension, qui n'a pas été pris en compte jusqu'à maintenant. En effet, tant qu'une tension de surface subsiste, le liquide à l'intérieur de la vésicule est en légère surpression, et s'échappe à travers le pore béant[1]. En se vidant, la vésicule diminue encore son aire projetée, de sorte que le pore n'est finalement plus nécessaire pour relaxer la tension de surface. La vie des pores se termine donc pas leur fermeture finale, sous l'action de la tension de ligne. L'étude quantitative, théorique et expérimentale, de cette dynamique de fermeture, constitue le résultat le plus original de ce mémoire.

Encadré 5 Elasticité de membrane simplifiée

On appelle R_0 le rayon qu'aurait la vésicule dans son état de tension rigoureusement nulle. Sous une tension initiale σ_0, la surface projetée du lipide A_p est plus grande que $4\pi R_0^2$. On rappelle (cf. Chapitre I) que l'étirement de la membrane par une tension latérale σ possède deux contributions, due respectivement à son élasticité entropique, et à l'étirement des têtes polaires :

$$A_p = 4\pi R_0^2 \left[1 + \frac{kT}{8\pi K_b} \ln\left(1 + \frac{R_0^2}{6K_b}\sigma \right) + \frac{\sigma}{K_s} \right]$$

Cette relation permet de décrire l'élasticité de la membrane sur plus de 4 ordres de grandeur de tension σ, par exemple dans les expériences de micropipettes. Dans notre modèle, on suppose que la tension varie dans une gamme plus faible autour de la valeur σ_0 (environ 1 ordre de grandeur). Ceci permet d'utiliser une relation d'élasticité simplifiée :

$$A_p = 4\pi R_0^2 \left(1 + \frac{\sigma}{E} \right)$$

Le module élastique E s'identifie au module d'étirement des phospholipides $K_s \approx 0.1$ N/m si σ_0 se situe dans le régime des fortes tensions ($\sigma_0 > 10^{-3}$ Nm^{-1}). Si au contraire la tension est très faible ($\sigma_0 < 10^{-8}$ Nm^{-1}), E est obtenu par linéarisation du terme logarithmique :

$$E = \frac{48\pi K_b}{R_0^2} \frac{K_b}{kT}$$

Pour une vésicule de rayon $R_0 \approx 20\,\mu\text{m}$ et de module de courbure $K_b \approx 10^{-19}$ J, on évalue alors $E \approx 10^{-6}$ N/m. Dans le cas d'une tension intermédiaire entre les deux régimes limites, E est un module effectif que l'on peut définir comme la pente locale $E = \left(\frac{dA_p}{d\sigma} \right)^{-1}$. On aura par exemple $E \approx 10^{-4}$ N/m, permettant de décrire des changements de surface projetée de 1 à 10% pour une tension de surface σ qui varie entre 10^{-5} et 10^{-6} N/m.

[1] Cette fuite du liquide interne apparaît dans les articles 4. Zhelev, D. V. & Needam, D. Tension-stabilized pores in giant vesicles: determination of pore size and pore line tension. *Biochim. Biophys. Acta* **1147**, 89-104 (1993). et 22. Moroz, J. D. & Nelson, P. Dynamically stabilized pores in bilayer membranes. *Biophys. J.* **72**, 2211-2216 (1997)., qui ne tiennent pas compte par ailleurs de la relaxation de la tension par diminution de l'aire projetée due à l'expansion du pore.

Encadré 6 La tension de ligne à l'échelle moléculaire

D'une manière générale, certaines molécules déstabilisent la structure en bicouche de la membrane. Dans de nombreux cas, un calcul simple de l'énergie de courbure dans le cadre du modèle de Helfrich suffit pour expliquer cet effet. Les molécules coniques ont une courbure spontanée c_0 positive. C'est le cas des lysolécithines (lysoPC), qui ont perdu une chaîne grasse par hydrolyse, et s'agrègent en micelles. En s'insérant dans les bicouches, elles stabilisent les pores. Les phospholipides bicaténaires à tête polaire PC, PS ou PG ont une forme cylindrique et pas de courbure spontanée : ils s'auto-assemblent en bicouches planes (phase L_α). Enfin, les lipides dont la tête polaire possède une section plus petite que celle de leur squelette carboné, tels les PE ou le cholestérol, conduisent à une courbure c_0 négative, et favorisent des structures de type hexagonal inverse (phase H_{II}). Cette structure micellaire inverse intervient de façon transitoire dans les étapes de fusion de deux membranes (hypothèse du "stalk" qui sera discutée dans le chapitre V, à propos de l'hémifusion des vésicules). C'est pourquoi les lysoPC diminuent l'énergie de ligne des pores mais défavorisent la fusion membranaire, tandis que le cholestérol fait exactement l'inverse[12]. On peut évaluer numériquement la tension de ligne $\Im$ à partir de l'énergie de courbure du pore. On suppose que les molécules de courbure spontanée c_0, représentant une fraction θ de la quantité totale de lipides, imposent à la bicouche une courbure spontanée égale à θc_0. On calcule ainsi l'énergie de courbure d'un pore circulaire de rayon r, dans une membrane d'épaisseur e (cf. Figure 5) :

$$E_b = \frac{1}{2} K_b \left(\frac{2}{e} + \frac{1}{r} - \theta c_0 \right)^2 \pi^2 r e$$

En égalant à l'énergie de ligne intégrée sur le bord du pore $E_l = 2\pi r \Im$, on trouve au premier ordre (pour r>>e et θ<<1) :

$$\Im \approx \frac{\pi K_b}{e} \left(1 - \theta c_0 e\right)$$

Cette expression rend bien compte de la diminution de $\Im$ par les molécules à c_0>0 , et de son augmentation par celles à c_0<0. Pour un phospholipide pur, par exemple EPC ($K_b \approx 5kT$ et $e \approx 4$ nm), la tension de ligne est estimée à $\pi K_b / e \approx 15 \times 10^{-12}$ N. Cette valeur de $\Im$ semble surévaluée, car la formule précédente donne des résultats trop grands, par rapport aux valeurs expérimentales, pour d'autres phospholipides de constante de courbure K_b plus élevées ($K_b \approx 20kT$ pour SOPC et DOPC).

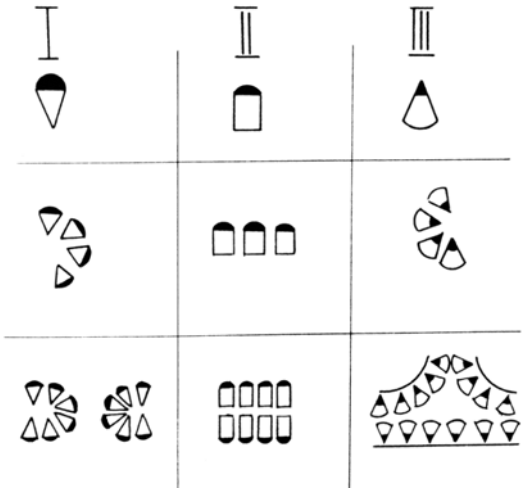


Figure 6 : Relation entre la forme des molécules élémentaires (I : cône, II : cylindre, III : cône inversé), la courbure spontanée (I : c_0>0, II : c_0=0, III : c_0<0) et la structure favorisée des agrégats (I : pore, II : bicouche, III : tige ou « stalk »), d'après [12].

IV.2 Pores transitoires : résultats expérimentaux globaux qualitatifs

2.1 Vésicules adhérant sur un substrat solide

1a) Adhésion faible : fuite lente

La perméabilité d'une vésicule géante augmente lorsqu'elle est collée à une surface solide rugueuse[23], ou bien plane mais décorée par des motifs de fonctions chimiques différentes[24]. Une vésicule se vide aussi, partiellement, quand elle adhère sur une surface lisse et homogène chimiquement : le suivi de la zone d'adhésion au cours du temps, par microscopie EWIF, montre que la perméabilité de sa membrane augmente alors de plusieurs ordres de grandeur[25]. De même, on observe bien qualitativement une telle diminution du volume entre deux instants successifs, sur les images de la Figure III–15. Seule la présence de pores transitoires permet d'expliquer cette fuite lente de la solution interne. Alors qu'ils ont été détectés sur les surfaces décorées, les pores n'ont jamais pu être observés directement par microscopie optique, dans le cas d'une vésicule mise sous tension uniquement par l'adhésion faible sur une surface homogène. Deux raisons peuvent l'expliquer : leur localisation probable près du bord, à l'endroit de courbure maximale de la membrane ; l'absence de défaut nucléateur de taille supérieure au µm.

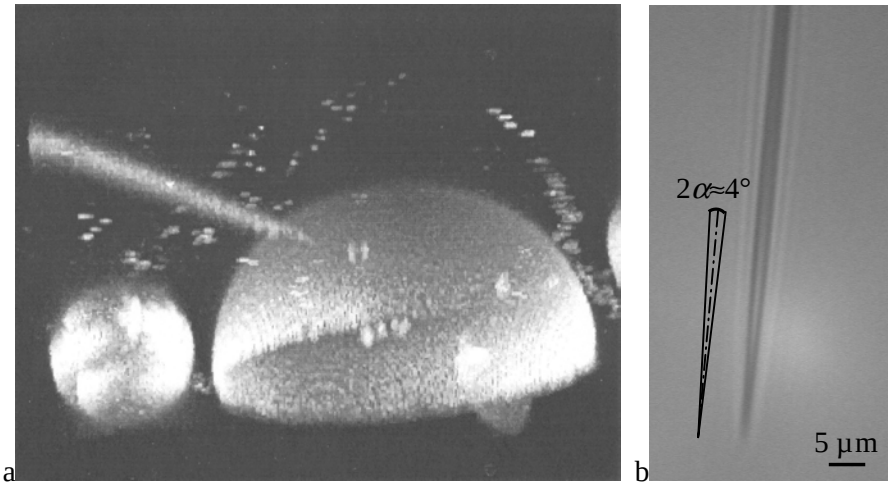


Figure 7 : a) Micropipette d'électrophysologie intracellulaire, insérée dans une vésicule géante adhérant sur une surface de verre, en milieu Na^+Cl^- et Ca^{2+},$2Cl^-$. L'image provient de coupes de fluorescence, prises sur le microscope à deux photons ; b) Micropipette observée en transmission.

Nous apportons une autre preuve expérimentale de cette perméabilité accrue d'une vésicule géante en adhésion faible, basée sur une mesure électrique[26]. L'expérience consiste à insérer dans la vésicule une micropipette très fine[1], permettant de mesurer *in situ* la résistance de membrane.

---

[1] Remplie d'une solution de K^+Cl^- 1M et de calcéine 1mM, de conductivité électrique $\gamma_S \approx 10^{-2}$ S/cm, la pipette possède une conductance $G_{tip}=10^{-8}$ S. Son rayon interne à l'extrémité est estimé à $r_{int}=G_{tip}/(\pi\alpha\gamma_S)\approx 100$ nm.

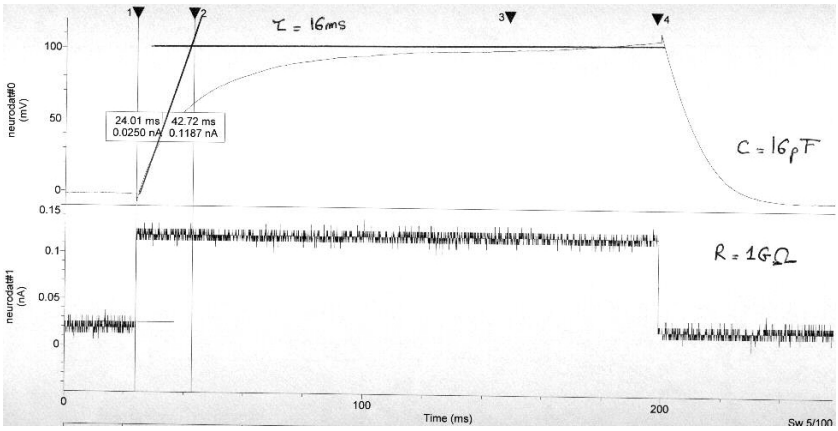


Figure 8 : Trace électrique typique d'une membrane de vésicule géante. Une impulsion de courant d'intensité 100 pA est injectée dans la vésicule pendant environ 200 ms. La membrane se charge avec un temps caractéristique de 16 ms, jusqu'à atteindre une tension transmembranaire de 100 mV. La bicouche possède une résistance de 1 GΩ, ou inversement une conductance de 1000 pS.

La membrane d'une vésicule en suspension possède une conductance faible, typiquement $G_m \approx 100\,\text{pS}$: un courant de 10 pA suffit à assurer un potentiel transmembranaire de 100 mV. Pour établir la même tension électrique entre l'intérieur et l'extérieur d'une vésicule en adhésion sur le verre, le courant injecté doit être plus fort (100 pA ou plus). On écrit formellement un incrément de conductance dû à la présence de pores : $G = G_m + G_p$. La valeur moyenne de G_p, mesurée sur plusieurs vésicules de tailles proches, est corrélée avec la force de l'adhésion. Ainsi, G_p passe de 100–150 pS dans un milieu contenant 0.5 mM d'ions Ca^{2+}, à 200–400 pS quand ces ions divalents qui s'adsorbent sur les bicouches ont leur concentration doublée. L'effet est encore plus prononcé pour les vésicules collées sur le verre grâce à la poly(L-lysine) : G_p≈900 pS à pH6.6 et G_p≈2400 pS à pH4.3, quand la charge positive du verre est augmentée. De ces mesures, on déduit que la perméabilité de la membrane à l'électrolyte (Na^+Cl^- 1mM) croît lorsque l'énergie d'adhésion augmente, et donc aussi la tension de surface. Compte tenu de la conductivité électrique de la solution, $\gamma_S = 1.2 \times 10^{-4}$ S/cm, cette conductance G_p≈100–1000 pS peut être créée par un unique pore de taille $G_p / \gamma_S \approx 10 - 100\,\text{nm}$, ou de façon équivalente, par plusieurs pores de plus petite dimension. Dans tous les cas, la microscopie optique ne permet pas de les observer autrement que par une diminution du volume, ou bien une disparition de contraste optique par mélange des solutions interne et externe.

1b) <u>Adhésion forte : éclatement irréversible</u>

Des vésicules en adhésion forte sur une paroi solide éclatent par expansion d'un pore unique. Après une période d'approche puis d'étalement, la vésicule est fortement tendue par l'adhésion sur le solide. Elle possède une forme très aplatie, s'écartant beaucoup de celle d'une sphère. L'angle de contact de la membrane sur la surface est θ <<1. Si L désigne la taille caractéristique de la zone de contact, la

hauteur de la vésicule est $h \approx L\theta$, de l'ordre de 1–2 µm. Elle est en effet inférieure à la profondeur de champ Δz de l'objectif. De multiples taches fluorescentes sur le verre indiquent que des vésicules ont déjà éclaté. L'observation attentive permet d'enregistrer plusieurs événements de rupture. Au départ, un trou de rayon $r_i \approx 1$ µm nuclée au bord de la membrane fluorescente. Son rayon présente une croissance exponentielle, puis tend vers un rayon r_c. Cette saturation n'est pas un effet de bord, car elle s'amorce alors que le pore ne couvre qu'une fraction modérée de la surface de la vésicule (image b). Sur les images apparaît aussi une avancée de la tache fluorescente sous la vésicule, et donc un étalement de la membrane sur le verre (la ligne verticale à gauche de l'image peut servir de repère pour voir cet effet). Contrairement aux expériences qui vont suivre, le milieu des vésicules ne contient pas de glycérol, et sa viscosité est proche de celle de l'eau pure. La courbe maîtresse en trait continu rassemble les points issus de trois expériences sur le même graphe. Elle résulte d'un modèle hydrodynamique, tenant compte uniquement du flux de lipide accompagnant l'ouverture du pore.

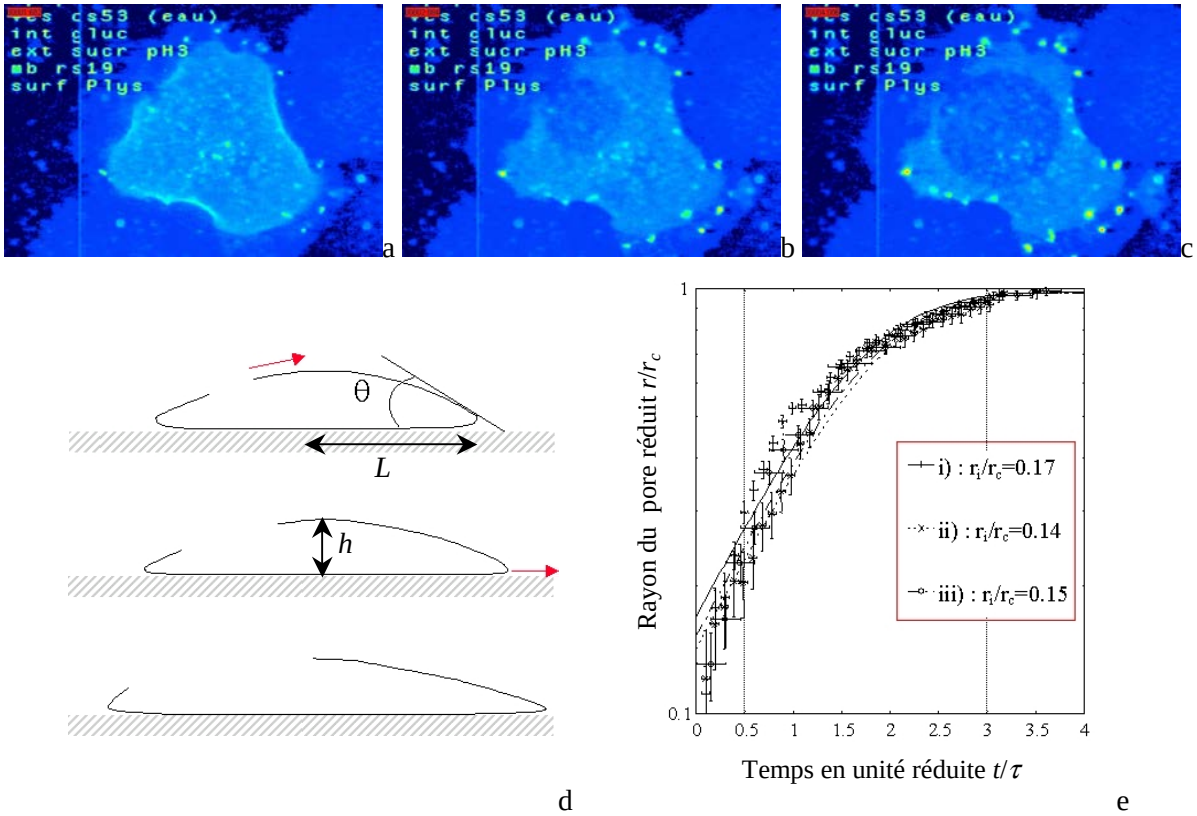


Figure 9 : Eclatement d'une vésicule de DOPC, marquée par Di-6-ASPBS, contenant du glucose 100 mM et suspendue dans du sucrose 100 mM à pH3, sur une surface très adhésive de poly-(L-lysine). Le pore s'est ouvert sur l'image a), juste à droite du mot « Plys ». Le graphe est tracé en cordonnées semi-logarithmiques, en fonction des unités réduites de rayon r/r_c et de temps t/τ, où est τ le temps caractéristique d'ouverture. Le rayon de nucléation r_i est mesuré, tandis que le rayon r_c est choisi légèrement supérieur au rayon maximum. L'équation de la courbe maîtresse sera donnée dans la section IV–3, dans laquelle le modèle théorique est exposé.

2.2 Vésicules dans un mélange d'eau et de glycérol

A l'origine, on avait à l'idée de ralentir le drainage du liquide intercalé entre la vésicule et la surface solide. Pour cela, on a préparé des vésicules dans une solution visqueuse d'eau et de glycérol. Mais un résultat imprévu nous a détourné du but initial : au fur et à mesure qu'on les observait, les vésicules se tendaient, puis un trou apparaissait furtivement dans la membrane fluorescente, avant de se refermer. Le phénomène était reproductible, et allait changer le cours de ce travail…

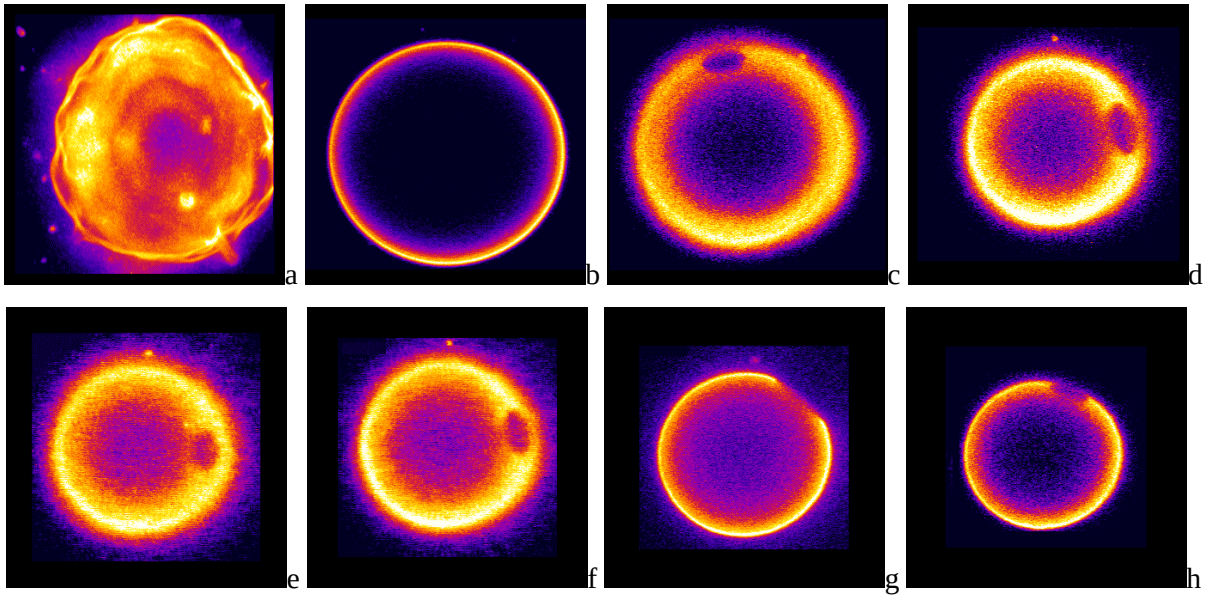


Figure 10 : Succession de pores transitoire photo-induits dans une vésicule de DOPC marquée avec Di-6-ASPBS ; au départ la vésicule est fluctuante (a) ; après 15 min d'éclairement elle est devenue tendue (b) ; par la suite, des pores apparaissent successivement, à différents endroits et à intervalle régulier (environ 4 min), tandis que la vésicule se vide peu à peu de sa solution interne (c à h).

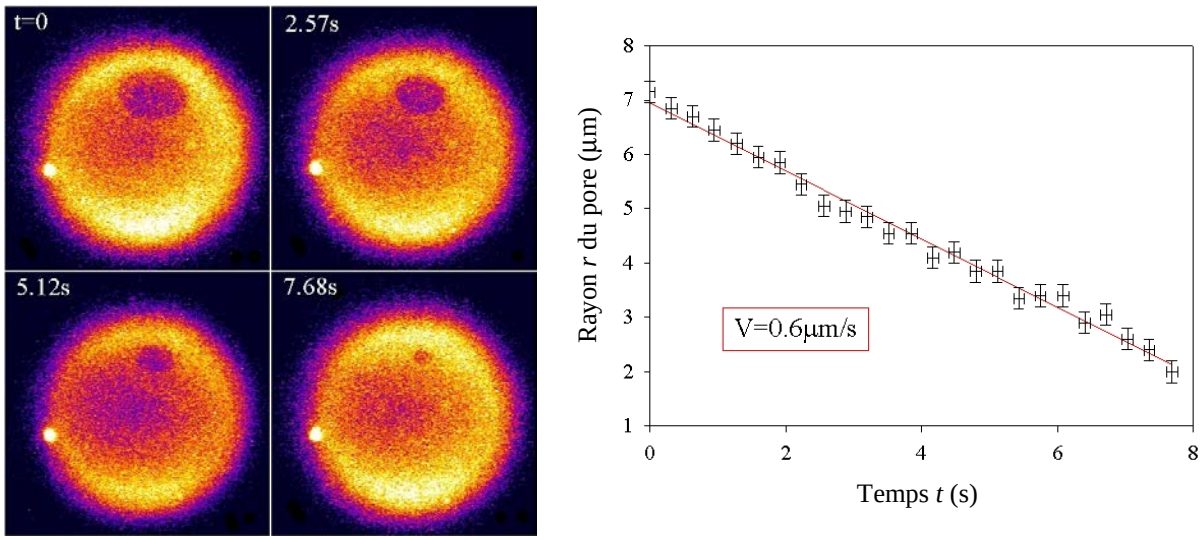


Figure 11 : Fermeture d'un pore transitoire à vitesse lente, mesurable sur les images vidéo, car ralentie par la viscosité accrue du solvant (glycérol 66%), qui doit s'évacuer lentement à travers le pore.

Pourquoi les pores transitoires ont-ils une taille si grande dans ces conditions, alors qu'ils sont invisibles au microscope optique dans une solution dépourvue de glycérol ? Les modèles de relaxation de la tension de surface présentés au 1c) prévoient des pores stationnaires macroscopiques. Néanmoins, la fuite du liquide interne diminue rapidement la tension de surface, et empêche les pores d'atteindre leur maturité. En rendant le solvant des vésicules plus visqueux, on allonge la durée pendant laquelle la tension de surface subsiste, permettant aux pores d'atteindre leur taille maximale. Dans ces expériences en milieu riche en glycérol, la mise sous tension des vésicules est assurée par une illumination intense avec la lampe du microscope, qui provoque la sortie de la membrane d'un flux constant de lipides. Ce phénomène un peu mystérieux est caractérisé à la section IV–5. Il ne change en rien la description théorique, selon laquelle la membrane est tendue par une tension latérale.

Par rapport aux premières images de pores transitoires, celles de la Figure 12 représentent l'amélioration technique réalisée pour acquérir, de façon précise et automatisée, les rayons *r* du pore et *R* de la vésicule. L'algorithme présenté en III–2.4 détecte le contour de la membrane (liseré) et calcule numériquement les deux rayons. Celui de la vésicule est défini comme le rayon de la sphère de même volume que celui de la forme expérimentale, calculé grâce à la symétrie de révolution[1].

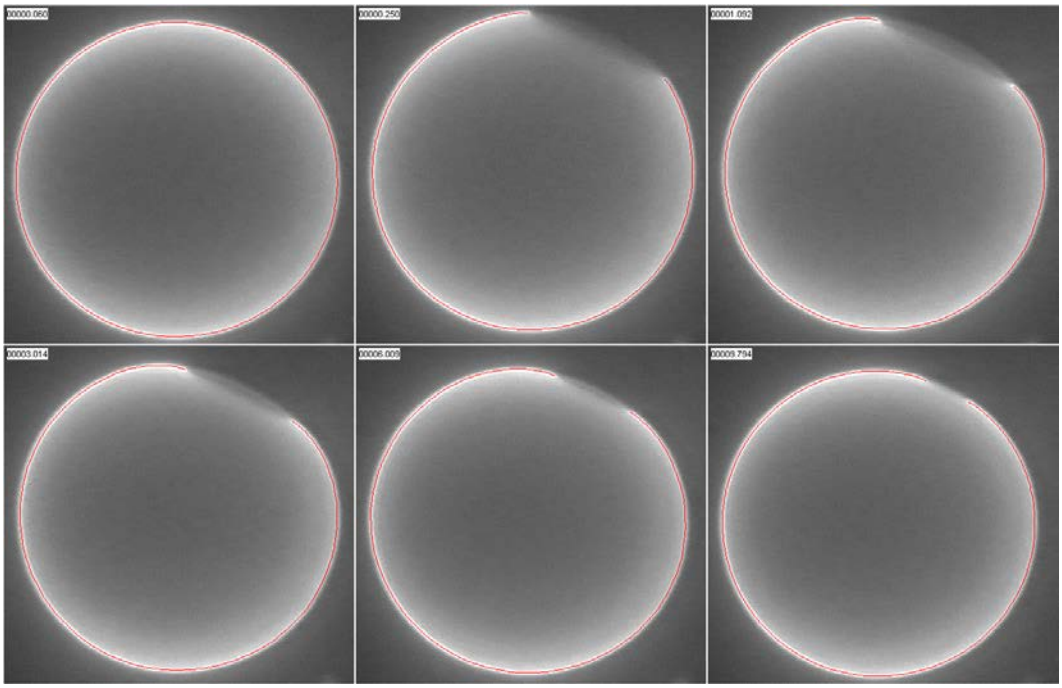


Figure 12 : Séquences d'un pore transitoire dans une vésicule, à des instants *t* successifs (indiqués en s). La membrane se compose d'un mélange DOPC / cholestérol (8:2), marqué par Di-6-ASPBS. Les solutions interne et externe contiennent du glucose 0.1M dans un mélange eau 34% / glycérol 66%.

[1] Le rayon *R* n'est pas défini à partir de la surface calculée numériquement, car sa mesure est plus bruitée que celle du volume. De plus la fuite de solution interne est quantifiée par un débit volumique à travers le pore. Il semble donc plus judicieux de calculer la diminution du volume interne pour comparer l'expérience à la théorie.

IV.3 Modèle de pore transitoire : de la bulle visqueuse à la vésicule

Une bulle visqueuse, dont la paroi est sous tension mécanique, éclate irrémédiablement quand on la perce. Nos vésicules mises sous tension ont un comportement plus singulier : le pore s'ouvre, atteint sa taille mature, mais se referme ! La différence entre les deux systèmes est la suivante. La force qui ouvre le trou est la tension superficielle. Dans les bulles visqueuses, cette force est constante, et le trou ne cesse de s'étendre. Dans les vésicules, la tension de surface s'effondre au cours du temps, parce que la croissance du pore restitue de la surface libre, et que notre « ballon » percé fuit. Pour modéliser ces pores transitoires, on a généralisé le modèle de l'éclatement des bulles à notre système, plus subtil, où la tension varie au cours du temps. Nous allons commencer par rappeler les lois de l'éclatement des bulles visqueuses.

3.1 Le ballon mou

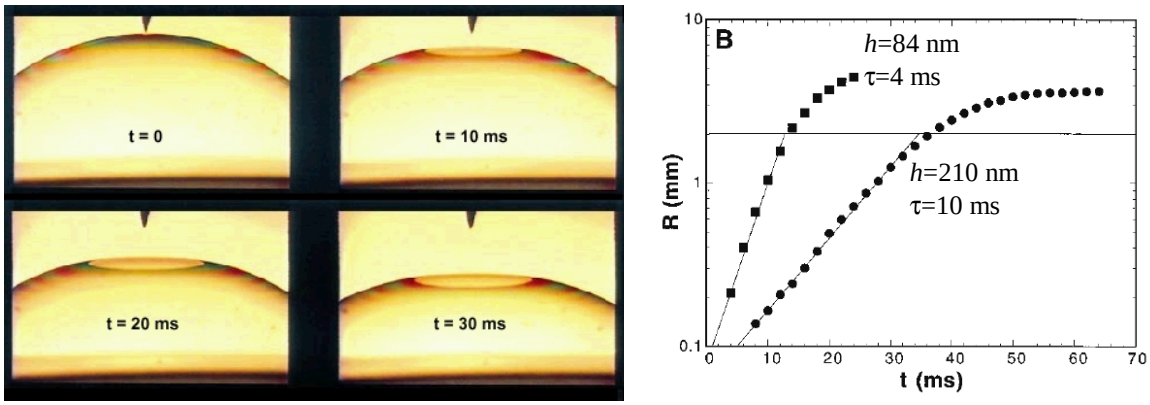


Figure 13 : Eclatement d'une bulle d'air à la surface d'un bain d'huile silicone (viscosité η=10^3 Pas), percée par une aiguille à t=0 ; le trou s'étend très rapidement, tandis que la bulle s'effondre sous le poids du liquide ; mesuré grâce à une caméra ultra-rapide, le rayon présente une augmentation exponentielle, de temps caractéristique τ proportionnel à l'épaisseur h du film [27].

Une bulle d'air remonte à la surface d'un liquide ultra-visqueux. Sa paroi s'amincit par drainage du liquide, sous l'effet de la gravité. La bulle éclate spontanément quand sa paroi est devenue suffisamment fine (environ 70 nm), ou bien si on la perce avec une aiguille, pour une épaisseur du film h supérieure. L'éclatement suit les lois suivantes[27,28] :

- la vitesse V est centrale, comme dans tous les autres cas d'éclatement de films. Le rayon R du trou[1] suit une croissance exponentielle, exprimée par la relation suivante en fonction de la tension de surface γ du polymère (21 mN/m), de sa viscosité η et de son épaisseur h :

[1] Les notations de ce paragraphe respectent celles des articles cités : R désigne le rayon du trou, et r une distance quelconque par rapport au centre.

Eq. (5) $$V = \dot{R} = \frac{\gamma}{\eta}\frac{R}{h}$$

- Contrairement à l'éclatement des bulles de savon, aucun bourrelet de liquide ne se développe autour du trou. Les interférences d'un laser, réfléchi en différents points du film, indiquent que son épaisseur locale $h(r)$ croît uniformément. L'évacuation du liquide produit donc un épaississement global du film.
- Le champ de vitesse $V(r)$, mesuré par des traceurs de flux, est radial et décroît en $1/r$:

Eq. (6) $$V(r > R) = \frac{R\dot{R}}{r}$$

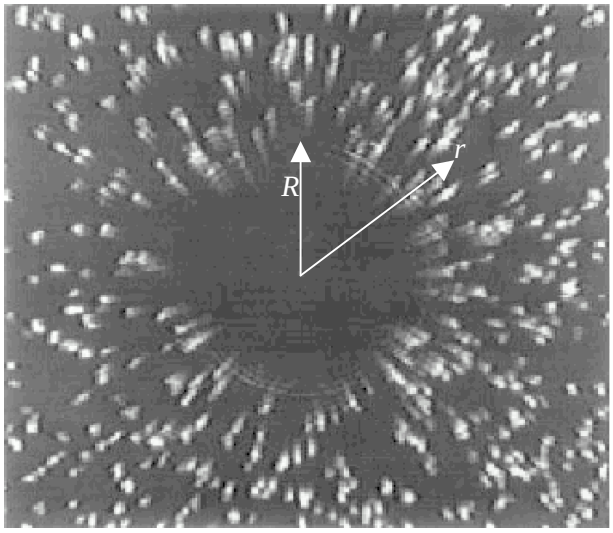


Figure 14 : Mise en évidence des flux radiaux pendant l'ouverture du trou[28]. Un film du même polymère visqueux que celui des bulles est tendu à l'intérieur d'un anneau métallique. Des billes de verre argentées posées sur le film se déplacent radialement, loin en avant du trou. La superposition des images permet de mesurer une décroissance de la vitesse en $1/r$.

Ces trois lois sont compatibles entre elles. On peut calculer en effet la chaleur dissipée, par frottement visqueux, en utilisant l'expression précédente du champ de vitesse :

Eq. (7) $$T\dot{S} = \int_R^\infty 2\eta\left[\left(\frac{\partial V}{\partial r}\right)^2 + \left(\frac{V}{r}\right)^2\right]2\pi r h dr = 4\pi\eta h\dot{R}^2$$

L'Eq. (5) est retrouvée en égalant cette dissipation visqueuse avec la puissance motrice FV, où $F = 2\pi R(2\gamma)$ est la force agissant sur le bord du trou (l'énergie de ligne est négligeable). Le temps de montée du rayon est donc :

Eq. (8) $$\tau = \frac{\eta h}{\gamma}$$

Malgré une viscosité très élevée (10^6 fois plus que l'eau), ces bulles ultra-visqueuses peuvent éclater à une vitesse presque aussi grande que celle des bulles de savon. En effet, la vitesse d'ouverture est proportionnelle au facteur $R/h \approx 10^4$. Par ailleurs, le modèle du ballon mou s'est avéré efficace pour décrire l'ouverture de trous dans d'autres films visqueux, de paramètres très différents :

- une lame de verre en fusion ($\tau \approx 2500$ s, $h \approx 0.5$ mm, $\eta \approx 10^6$ Pas, $\gamma \approx 200$ mN/m) ;
- un film mince de polystyrène[29] ($\tau \approx 2000$ s, $h \approx 200$ nm, $\eta \approx 10^9$ Pas, $\gamma \approx 34$ mN/m).

3.2 Le ballon mou qui se détend

On s'apprête à adapter le modèle du ballon mou au cas des vésicules, dont les échelles de taille et de tension de surface sont bien plus petites que celles des systèmes précédents. Les trois hypothèses à la base du modèle sont examinées :

- les pores sont circulaires, et la loi de croissance aux temps courts, lorsqu'elle est mesurable expérimentalement, est exponentielle (2.1b) ;
- la surface de lipide évacuée n'est pas collectée dans un bourrelet. Autrement, le bord du pore serait plus fluorescent que le reste de la membrane, ce qui n'est jamais observé. L'analogue de l'épaississement homogène du film visqueux est l'augmentation des fluctuations transverses de la membrane lipidique ;
- la forme de la décroissance du champ de vitesse est supposée encore valable pour les vésicules géantes. Pour vérifier cette hypothèse, il faudrait trouver de bons traceurs de flux à l'échelle de la bicouche, qui ne perturbent pas les écoulements de lipide. On peut penser à des « radeaux lipidiques » en phase gel, tels que les domaines imagés sur la Figure III–23, ou bien à des nanocristaux fluorescents de type CdS…

2a) <u>Equations générales</u>

L'analogie avec le modèle précédent est réalisée en remplaçant la tension interfaciale 2γ par la tension latérale σ de la membrane. De plus, la tension de ligne $\Im$ est réintroduite, car elle ne pourra plus être négligée quand la tension de surface est devenue très faible. Enfin, le produit de la viscosité du lipide par son épaisseur est défini comme la viscosité de surface η_s de la membrane (en Ns/m). L'équation donnant la dynamique du pore, dérivée de l'Eq. (5), s'écrit alors :

Eq. (9)
$$2\eta_s \frac{\dot{r}}{r} = \sigma - \frac{\Im}{r}$$

La limite exponentielle aux temps courts possède un temps caractéristique τ vérifiant :

Eq. (10)
$$\frac{1}{\tau} = \frac{\sigma_0}{2\eta_s} = \frac{r_c^2 E}{8\eta_s R_0^2}$$

où σ_0, E et R_0, désignant respectivement la tension de surface initiale, le module élastique de la bicouche et le rayon de la vésicule sous tension nulle, ont tous été introduits précédemment.

(i) La fuite du liquide interne est négligeable

Nous examinons en premier lieu le cas d'une vésicule de volume constant, dont la tension de surface relaxe uniquement par le phénomène décrit au 1.1c). Afin d'obtenir une solution analytique simple, on continue de négliger la tension de ligne $\Im$ devant la force d'ouverture $r\sigma$. En injectant dans l'Eq. (9) la relation $\sigma(r)$ entre la tension de surface et le rayon du pore, donnée par l'Eq. (4) on trouve une équation qui régit la croissance du rayon :

Eq. (11)
$$\dot{r} = \frac{r}{\tau}\left(1 - \frac{r^2}{r_c^2}\right)$$

Cette expression est intégrée, entre le rayon initial r_i et le rayon r à l'instant t :

Eq. (12)
$$\ln\frac{r}{r_i} - \frac{1}{2}\ln\frac{1 - r^2/r_c^2}{1 - r_i^2/r_c^2} = \frac{t}{\tau}$$

ou exprimée sous une forme équivalente, comme dans [21] :

Eq. (13)
$$\frac{r}{r_c} = \frac{r_i}{\sqrt{r_i^2 + \left(r_c^2 - r_i^2\right)exp(-2t/\tau)}}$$

L'expansion du pore est approximativement exponentielle, mais pour les temps $t>\tau$, le rayon commence à saturer à la valeur r_c. La relaxation de la tension de surface au cours du temps possède aussi une forme analytique :

Eq. (14)
$$\frac{\sigma}{\sigma_0} = \frac{r_c^2/r_i^2 - 1}{r_c^2/r_i^2 - 1 + exp(2t/\tau)}$$

Le temps caractéristique de relaxation de la tension est donc $\tau_c = \tau/2$. Au paragraphe suivant, on examinera un second mode de relaxation, dans le cas où le volume ne reste plus constant.

L'Eq. (12) s'ajuste bien sur les ouvertures de pores expérimentales, quand les vésicules éclatent par adhésion forte sur un substrat solide (Figure 9e). Le rayon de nucléation r_i est mesuré, de même que la pente initiale $1/\tau$. Le paramètre r_c est choisi quant à lui pour ajuster au mieux la saturation du rayon. Trois exemples différents ont conduit aux valeurs suivantes :

- i) τ=1.0 s, r_i=1.9 µm et r_c=11.3 µm ;
- ii) τ=1.0 s, r_i=0.8 µm et r_c=5.6 µm ;
- iii) τ=0.27 s, r_i=1.3 µm et r_c=8.4 µm.

L'hypothèse d'un volume constant pendant l'éclatement est bien vérifiée sur ces vésicules en adhésion forte, car elle sont très aplaties. La courbure de la membrane est en effet trop faible pour provoquer une surpression du liquide interne par rapport au milieu, et donc une fuite notable.

(ii) Le rayon R de la vésicule diminue

La surface projetée A_p de la membrane peut en fait diminuer de deux façons différentes :

- par augmentation de la surface du pore ;
- par diminution du volume contenu, provoquée par la fuite de liquide à travers le pore.

Pour tenir compte des deux modes de relaxation simultanément, nous reprenons le bilan des aires exposé au paragraphe 1.1c), en considérant cette fois que le rayon R de la vésicule n'est plus constant :

Eq. (15) $$A_p = 4\pi R_0^2\left(1+\frac{\sigma}{E}\right) = 4\pi R^2 - \pi r^2$$

qu'on réécrit de sorte à mettre en évidence la relaxation de la tension de surface :

Eq. (16) $$\sigma(r,R) = E\left(\frac{R^2 - R_0^2}{R_0^2} - \frac{r^2}{4R_0^2}\right)$$

En particulier, les valeurs initiales sont R=R_i, r=0 et $\sigma_0 = E\frac{R_i^2 - R_0^2}{R_0^2} = E\frac{r_c^2}{4R_0^2}$, ce qui permet de réarranger l'expression de la tension en éliminant le module E :

Eq. (17) $$\frac{\sigma(r,R)}{\sigma_0} = 1 - \frac{r^2}{r_c^2} - \frac{R_i^2 - R^2}{R_i^2 - R_0^2}$$

Cette relation fait bien apparaître les deux phénomènes distincts qui diminuent la tension : d'une part, l'expansion du pore, quantifiée par le rapport r/r_c ; d'autre part, la diminution du rayon de la vésicule, qui part d'une valeur élevée R_i et se rapproche du rayon à tension nulle R_0.

Il manque encore une équation qui décrive la dynamique du rayon R de la vésicule. Elle va être fournie par l'étude du débit à travers le pore. Comme le gaz dans une bulle de savon, le fluide à l'intérieur de la vésicule tendue est en surpression par rapport au liquide externe. La différence de pression suit la loi de Laplace : $\Delta p = \frac{2\sigma}{R}$ [1]. Lorsqu'un pore de rayon r est présent dans la membrane, cette surpression provoque une fuite de liquide interne. Le fluide est alors mis en mouvement à une distance du pore environ égale à son rayon[2]. Soit V_L la vitesse de sortie au centre du pore, et η_0 la viscosité du milieu interne. La contrainte de cisaillement est de l'ordre de $\eta_0 V_L / r$. En l'égalant à Δp, on obtient une estimation du débit à travers le pore $Q \equiv V_L r^2 \equiv \frac{\sigma}{\eta_0 R} r^3$. Le calcul rigoureux d'un flux à travers une ouverture circulaire est un problème classique de mécanique des fluides : la nappe des lignes de courant est un hyperboloïde de révolution, dont la partie la plus resserrée coïncide avec l'ouverture(30). La formule exacte du débit s'écrit alors :

---

[1] En toute rigueur, la loi de Laplace devrait être écrite avec la courbure H de la membrane, mesurée loin du pore. La relation H=2/R est valable seulement si la vésicule est une sphère tronquée parfaite.

[2] Le gradient de pression chute aussi sur une distance égale environ à r, comme l'indique l'aplatissement du contour autour du pore, souvent observé, qui est dû au relâchement de la pression exercée sur la membrane.

Eq. (18) $$Q = -4\pi R^2 \dot{R} = \frac{2\sigma}{3\eta_0 R} r^3$$

Cependant, notre problème est plus compliqué, car la taille de l'orifice évolue au cours du temps. Dans la suite, on garde cependant cette formule, valable en toute rigueur pour un rayon du pore r constant. On présume qu'elle reste une bonne approximation tant que la vitesse de sortie V_L est plus grande que la vitesse $\dot{r}$ d'ouverture ou de fermeture du pore.

Au final, deux équations cinétiques contrôlent l'évolution temporelle des deux rayons $r(t)$ et $R(t)$. Elles sont couplées entre elles par l'expression de la tension de surface $\sigma(r,R)$:

Eq. (19) $$\begin{cases} 2\eta_s \dfrac{\dot{r}}{r} = \sigma - \dfrac{\Im}{r} \\ -4\pi R^2 \dot{R} = \dfrac{2\sigma}{3\eta_0 R} r^3 \\ \dfrac{\sigma}{\sigma_0} = 1 - \dfrac{r^2}{r_c^2} - \dfrac{R_i^2 - R^2}{R_i^2 - R_0^2} \end{cases}$$

2b) <u>Solutions numériques</u>

Ce système d'équations différentielles couplées, du premier ordre, est réécrit en variables sans dimension, en vue d'une résolution par un simple algorithme de Newton. On introduit naturellement le temps $\tilde{t} = t/\tau$, la tension $\tilde{\sigma} = \sigma/\sigma_0$ et le rayon du pore $\tilde{r} = r/r_c$. La variation du rayon de la vésicule entre R_i et R_0 est représentée par la variable réduite $\Delta = \dfrac{R_i^2 - R^2}{R_i^2 - R_0^2} = \dfrac{R_i^2 - R^2}{r_c^2/4}$, comprise entre 0 et 1. Quelques étapes de calcul[1] conduisent à :

Eq. (20) $$\begin{cases} \dfrac{d\tilde{r}}{d\tilde{t}} = \tilde{r}\tilde{\sigma} - \tilde{\Im} \\ \dfrac{d\Delta}{d\tilde{t}} = \tilde{\sigma}\dfrac{\tilde{r}^3}{\tilde{r}_L} \\ \tilde{\sigma} = 1 - \tilde{r}^2 - \Delta \end{cases}$$

Ce système comporte seulement deux paramètres ajustables :

Eq. (21) - la tension de ligne $$\tilde{\Im} = \frac{\Im}{\sigma_0 r_c}$$

[1] En particulier, dans $\dfrac{d\Delta}{d\tilde{t}} = -\tau \dfrac{2R\dot{R}}{r_c^2/4} = \dfrac{8\eta_s}{\sigma_0} \dfrac{\sigma}{3\pi\eta R^2} \dfrac{r^3}{r_c^2}$ on considérera $R \approx R_0$ au dénominateur.

Eq. (22) - le rayon de fuite $$\tilde{r}_L = \frac{3\pi\eta_0}{8\eta_s}\frac{R_0^2}{r_c} = \frac{r_L}{r_c}$$

Ce dernier fait apparaître le quotient de la viscosité du solvant sur celle de la membrane. Sa valeur par rapport à 1 permet de distinguer deux situations différentes, selon la rapidité de la fuite :

(i) Fuite lente : $\tilde{r}_L > 1$

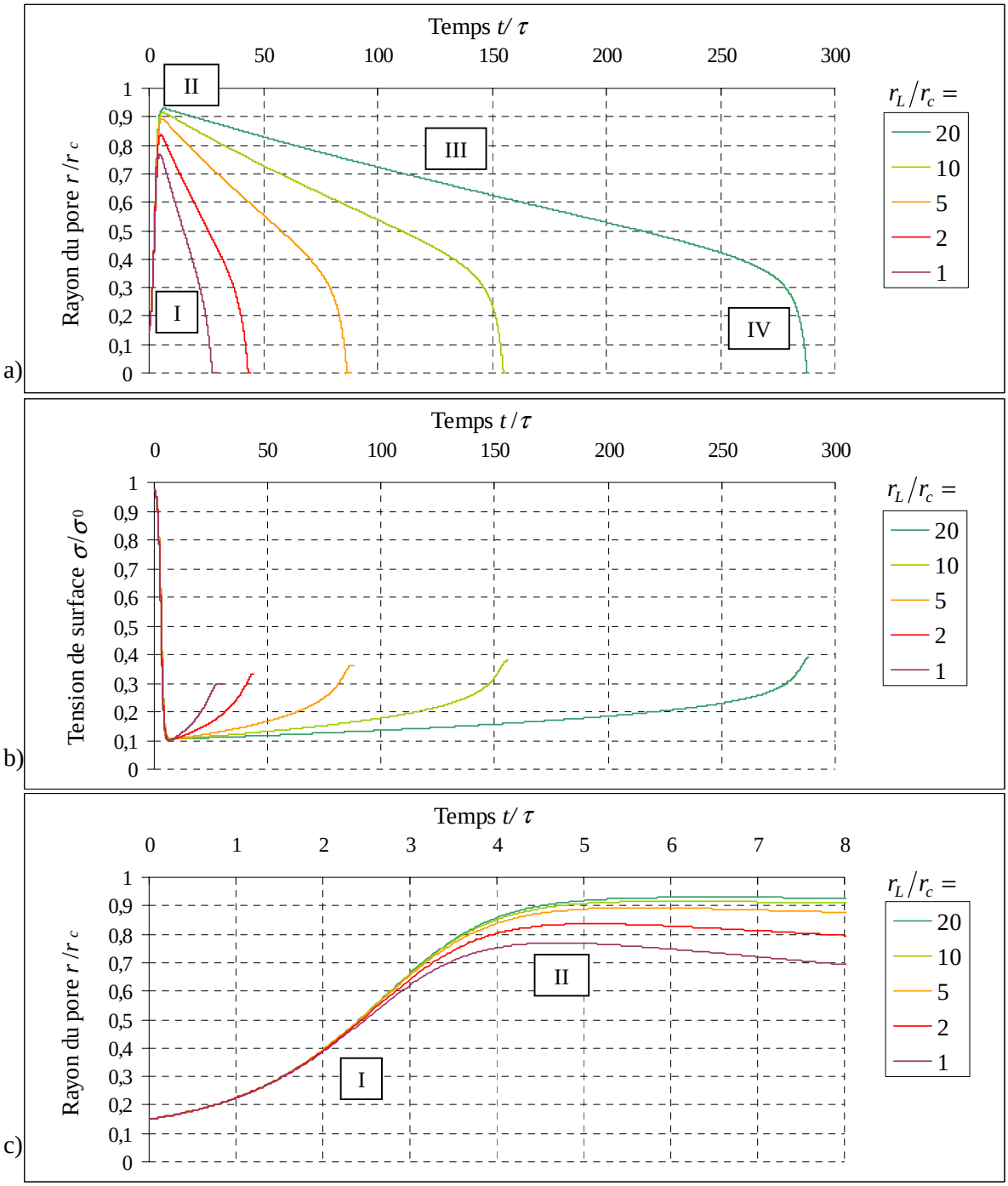


Figure 15 : Simulations numériques pour une tension de ligne $\tilde{\Im} = \Im/\sigma_0 r_c = 0.1$ et dans des conditions de fuite lente $\tilde{r}_L = r_L/r_c > 1$. Le pas de la simulation est $\Delta\tilde{t} = 0.02$. A $\tilde{t} = 0$, $\tilde{r}_i = 0.15$ et $\Delta_i = 0$. Le graphe c) est un agrandissement du régime d'ouverture I.

(ii) Fuite rapide : $\tilde{r}_L < 1$

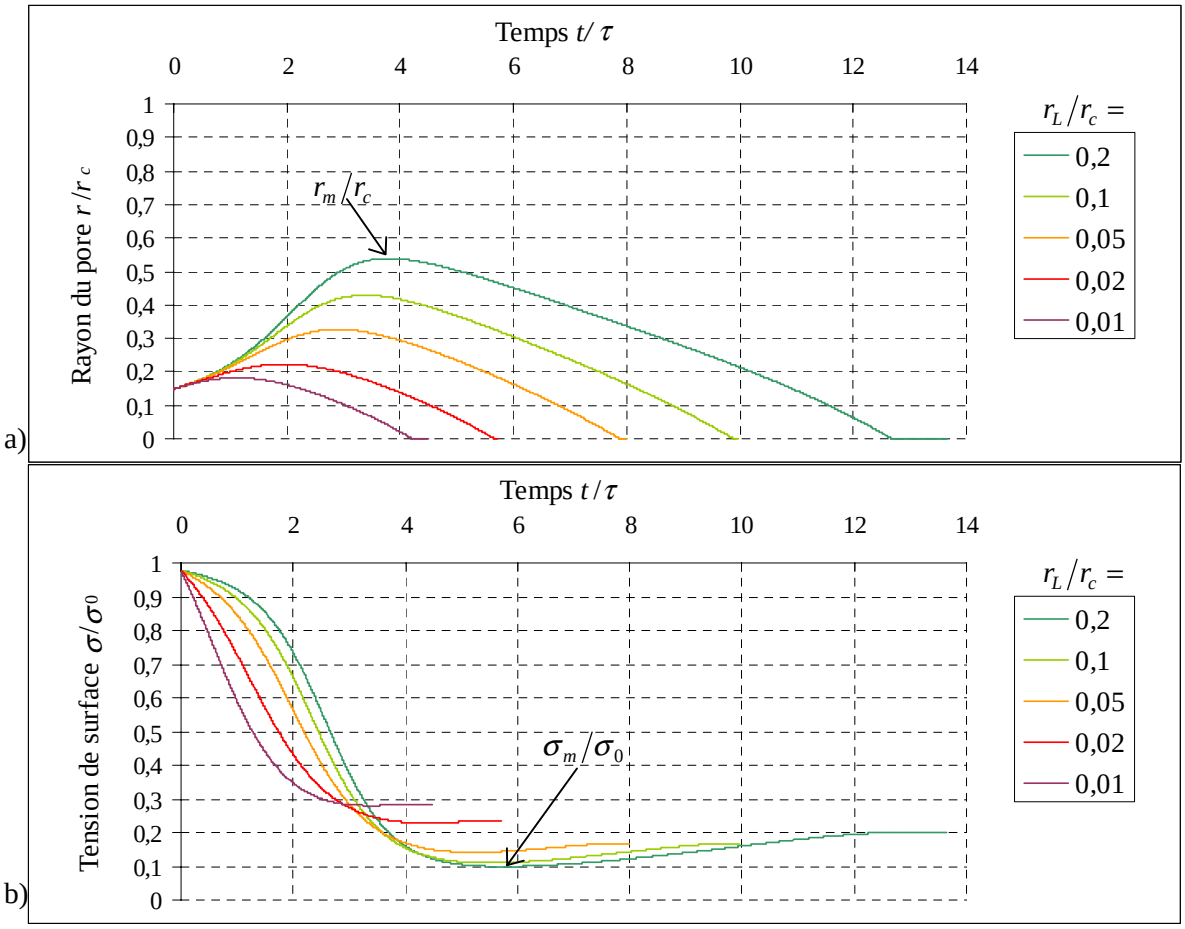


Figure 16 : Simulations numériques pour une tension de ligne $\tilde{\Im} = \Im/\sigma_0 r_c = 0.1$ et dans des conditions de fuite rapide $\tilde{r}_L = r_L/r_c < 1$. Le pas de la simulation est $\Delta\tilde{t} = 0.002$. A $\tilde{t} = 0$, $\tilde{r}_i = 0.15$ et $\Delta_i = 0$.

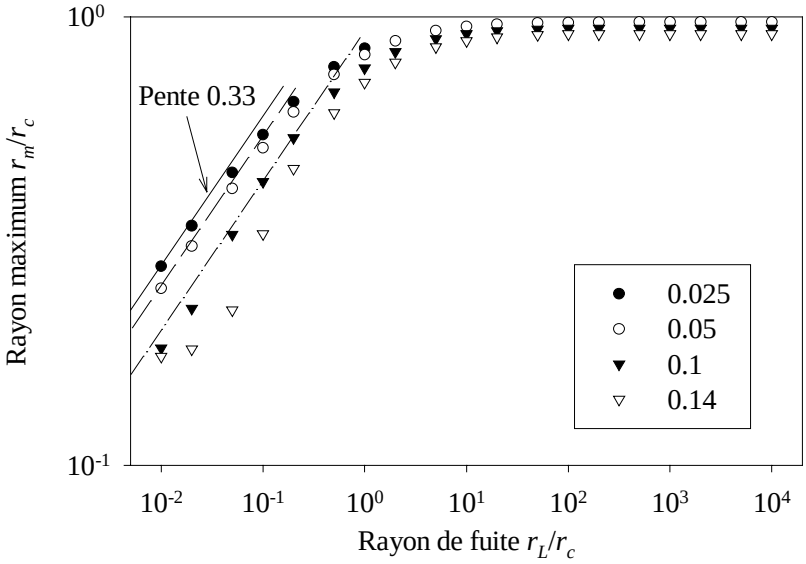


Figure 17 : Rayon maximum du pore issu de simulations numériques, en fonction du rayon de fuite $\tilde{r}_L$. Les nombres en légende indiquent des valeurs de la tension de ligne en unité réduite $\tilde{\Im} = \Im/\sigma_0 r_c$.

On observe ainsi que la courbe d'évolution du pore présente des étapes successives d'autant mieux différenciées que $\tilde{r}_L$ est grand :

- I) Ouverture très rapide
- II) Maximum
- III) Fermeture lente
- IV) Accélération finale

Dans le cas $\tilde{r}_L < 1$ au contraire, la fermeture a lieu en une seule étape, sans rupture de pente. Une autre différence flagrante entre le cas de fuite rapide et celui de fuite ralentie par la viscosité du solvant concerne le rayon maximum. Lorsque $\tilde{r}_L$ tend vers zéro, $\tilde{r}_m$ vérifie une loi d'échelle asymptotique $\tilde{r}_m \propto \tilde{r}_L^{\,0.33}$ (la déviation pour la valeur $\tilde{\Im} = 0.14$ est due à sa proximité du rayon initial $\tilde{r}_i = 0.15$). Dans les conditions d'une fuite lente, le maximum sature à une valeur qui ne dépend plus de $\tilde{r}_L$, mais seulement de la tension de ligne réduite, approximativement selon $\tilde{r}_m \approx 1 - \tilde{\Im}/2$. Enfin, dans toutes les simulations, la tension de surface $\tilde{\sigma}$ a une évolution en sens inverse de celle du rayon du pore : elle commence par décroître rapidement jusqu'à un minimum $\tilde{\sigma}_m$, puis elle remonte lentement tandis que le pore se referme. Dans la section suivante, on montre que tous les régimes peuvent être calculés analytiquement, en étudiant l'évolution temporelle de la tension de surface.

2c) <u>Solutions analytiques</u>

La tension de surface est le moteur à la fois de l'expansion du pore et de la fuite du liquide : c'est pourquoi σ intervient dans les deux équations donnant la dynamique de *r* et *R*. En retour, les deux phénomènes tendent à relaxer cette tension, dont on rappelle l'écriture dans l'Eq. (16) :

$$\sigma(r,R) = E\left(\frac{R^2 - R_0^2}{R_0^2} - \frac{r^2}{4R_0^2}\right)$$

Il apparaît ainsi clairement que σ peut être diminuée soit par une augmentation de *r*, soit par une diminution de *R*. On propose ici une résolution analytique, basée sur l'étude dynamique des deux modes de relaxation de la tension. La dérivée de $\sigma(r,R)$ par rapport au temps s'écrit :

Eq. (23)
$$\frac{d\sigma}{dt} = \frac{E}{R_0^2}\left(2R\dot{R} - \frac{r\dot{r}}{2}\right)$$

En remplaçant par les expressions de $\dot{R}$ et $\dot{r}$ donnée par l'Eq. (19), puis en factorisant, on obtient :

Eq. (24)
$$\frac{d\sigma}{dt} = \frac{E}{8\eta_s R_0^2}\left[-\frac{8\eta_s}{3\pi\eta_0 R^2}\sigma r^3 - 2r^2\left(\sigma - \frac{\Im}{r}\right)\right]$$

On peut assimiler $R \approx R_0$ au dénominateur, car le rayon de la vésicule varie en fait très lentement au cours du temps. Le rayon de fuite est alors introduit naturellement :

Eq. (25)
$$r_L = \frac{3\pi\eta_0}{8\eta_s} R_0^2$$

On obtient ainsi une expression plus simple pour la relaxation de la tension :

Eq. (26)
$$\frac{d\sigma}{dt} \cong -2\frac{\sigma}{\tau}\frac{r^2}{r_c^2}\left(\frac{r}{2r_L} + 1 - \frac{\Im}{r\sigma}\right)$$

Deux approches légèrement différentes[26,31] ont conduit précédemment à la même expression du rayon r_L. Il est utilisé pour discuter la rapidité de la fuite à travers le pore, en étudiant les deux cas limites opposés : $r_L >> r_c$ et $r_L < r_c$. Nous proposons ici une discussion équivalente, en faisant apparaître les deux temps caractéristiques de relaxation de la tension, par l'ouverture du pore (τ_c) et par la fuite (τ_L) :

Eq. (27)
$$\frac{d\sigma}{dt} = -\sigma\left(\frac{1}{\tau_L} + \frac{1}{\tau_c}\right) + \frac{\Im}{r}\frac{1}{\tau_c}$$

où les temps de relaxation sont donnés par :

Eq. (28)
$$\begin{cases} \tau_L^{-1} = \tau^{-1}\dfrac{r^3}{r_c^2 r_L} \\ \tau_c^{-1} = \tau^{-1}\dfrac{2r^2}{r_c^2} \end{cases}$$

(i) <u>Fuite lente :</u> $r_L >> r_c$

Comme la condition $r < r_c << r_L$ est toujours vérifiée, $\tau_c^{-1} >> \tau_L^{-1}$ et la relaxation de la tension s'écrit simplement :

Eq. (29)
$$\tau_c \frac{d\sigma}{dt} + \sigma = \frac{\Im}{r}$$

Regime I : <u>Croissance</u>

On peut négliger la fuite du liquide pendant l'ouverture du pore. Dans ce cas, on suppose $R \approx R_i$ et l'ouverture est bien approchée par l'Eq. (12).

Regime II : <u>Maximum</u>

Après un temps supérieur à τ_c, l'Eq. (29) indique que $r\sigma$ devient égal à $\Im$. De l'Eq. (9) découle alors que $\dot{r}$ s'annule. Le rayon passe donc par un maximum r_m, dont la valeur est proche de r_c. La tension de surface qui subsiste alors est $\sigma(r_m) = \Im / r_m$. La tension de surface minimale σ_m est quant à elle donnée par $\dot{\sigma} = 0 \approx -\sigma_m\left(\tau_L^{-1} + \tau_c^{-1}\right) + \tau_c^{-1}\,\Im / r_m$, d'où :

Eq. (30) $$\sigma_m = \frac{\Im}{r_m}\frac{\tau_c^{-1}}{\tau_L^{-1}+\tau_c^{-1}} < \sigma(r_m)$$

Un léger décalage temporel est ainsi prévu entre le maximum du rayon r_m et le minimum de la tension de surface σ_m. Par ailleurs, on peut donner une autre estimation de la tension de surface au maximum, en continuant de négliger la diminution du rayon de la vésicule causée par la fuite : $\sigma(r_m) \approx \sigma_0\left(1 - r_m^2/r_c^2\right)$. En l'égalant à $\Im/r_m$, on déduit une expression approchée du rayon maximum :

Eq. (31) $$r_m \cong r_c - \frac{\Im}{2\sigma_0}$$

On retrouve la limite supérieure au rayon, r_+, qu'on avait calculée au début de ce chapitre uniquement en minimisant l'énergie du pore.

Regime III : <u>Fermeture lente</u>

En l'absence de fuite, le rayon du pore resterait égal à la valeur r_m, en lequel la tension de surface et la tension de ligne se compensent exactement. On s'attend donc à ce que la cinétique de fermeture soit un processus très lent, contrôlé par la fuite du liquide interne. Plus précisément, la diminution du rayon du pore nécessite que la membrane se retende, tout doucement. Ainsi $\frac{d\sigma}{dt} << \frac{\sigma}{\tau_c}$ dans l'Eq. (29), de sorte que la tension de surface suive une évolution quasi-statique :

Eq. (32) $$\sigma \approx \frac{\Im}{r}$$

Le régime III s'étend sur toute la durée pendant laquelle l'Eq. (32) est vérifiée. La force $2\pi(\Im - \sigma r)$, qui tire sur le bord du trou et le referme, reste extrêmement faible. En écrivant $\dot{\sigma} \approx 0$ dans l'Eq. (23), on déduit $2R\dot{R} = \frac{r\dot{r}}{2}$, soit d'après l'Eq. (19), $\dot{r} = \frac{4R\dot{R}}{r} = -\frac{2\sigma}{3\pi\eta_0 R^2}r^2$, et finalement, comme $r\sigma \approx \Im$:

Eq. (33) $$\dot{r} = -\frac{2\Im}{3\pi\eta_0 R^2}r$$

Le logarithme du rayon doit décroître linéairement avec le temps. La vitesse initiale de ce régime est :

Eq. (34) $$V_3 = \frac{2\Im}{3\pi\eta_0 R_0^2}r_m$$

Le régime III a ceci de particulier que la vitesse de fermeture du pore varie comme l'inverse de la viscosité de la solution aqueuse, et non celle de la membrane lipidique. En rendant la solution plus visqueuse, on augmente le temps de vie des pores. De plus, on prévoit une vitesse de sortie du liquide qui est aussi sensiblement constante :

Eq. (35) $$V_L \equiv \frac{r\sigma}{\eta_0 R} \approx \frac{\Im}{\eta_0 R_0}$$

En outre, la condition $V_L > V_3$, nécessaire pour utiliser la formule exacte du débit Q, est vérifiée tant que $r_m << R_0$. Cette hypothèse est discutable si le rayon du pore atteint la moitié de celui de la vésicule…

Regime IV : <u>Fermeture rapide</u>

Quand le rayon du pore a beaucoup diminué, la condition de stationnarité ne peut plus être vérifiée, et la tension de ligne a elle seule contrebalance la friction visqueuse dans le film : $2\eta_s \dot{r} \approx -\Im$. On en déduit la vitesse finale de fermeture :

Eq. (36) $$V_4 = \frac{\Im}{2\eta_s}$$

Le rapport des vitesses de fermeture V_4 et V_3 conduit, en théorie, à la mesure de la viscosité η_s.

(ii) <u>Fuite rapide : $r_L < r_c$</u>

Dans le cas d'une solution interne peu visqueuse, la fuite du solvant intervient avant que le pore ait atteint sa maturité. Le raisonnement analytique sur les deux modes de relaxation de la tension peut être conduit[1]. On résume ici les trois étapes successives :

Regime I : <u>Croissance</u>

La croissance du rayon suit une exponentielle de temps de montée τ seulement aux temps très courts. Elle est en effet vite ralentie par la relaxation de la tension, décrite par deux exponentielles décroissantes, de temps caractéristique τ_c et τ_L.

---

[1] Il faut revenir à l'équation complète de relaxation $\frac{d\sigma}{dt} = -\sigma\left(\tau_L^{-1} + \tau_c^{-1}\right) + \frac{\Im}{r}\tau_c^{-1}$. Aux temps courts, et tant que le rayon du pore satisfait $r < r_L$ donc $\tau_c < \tau_L$, la tension relaxe selon le premier mode : $\sigma \approx \sigma_0 \exp(-t/\tau_c)$. Le rayon vérifie $\frac{\dot{r}}{r} = \frac{1}{\tau}\exp(-t/\tau_c) \approx \frac{1}{\tau}$. En effet, au début de la croissance, $r << r_c$ donc $\tau << \tau_c$: l'ouverture initiale est exponentielle, avec un temps caractéristique beaucoup plus court que celui de la relaxation de la tension. Mais comme le rayon augmente, au bout d'un certain temps il dépasse le seuil $r > 2r_L$. Dans ce cas $\tau_L < \tau_c$ et le deuxième mode de relaxation par la fuite devient plus rapide et donc prépondérant. L'évolution du rayon du pore est alors donnée par $\frac{\dot{r}}{r} \approx \frac{1}{\tau}\exp(-t/\tau_L)$. Si, comme pour le premier mode de relaxation, la condition $\tau < \tau_L$ est toujours vérifiée, le rayon est encore en expansion quasi-exponentielle, de temps caractéristique τ. Par contre, au bout d'un certain temps, la relation s'inverse nécessairement : $\tau_L < \tau$. C'est alors que la tension est presque complètement relaxée par la fuite, et la vitesse d'expansion du pore $\dot{r}$ s'annule. On prédit le rayon maximum r_m atteint par le pore à partir de la relation $\tau_L = \tau$.

Regime II : <u>Maximum</u>

Le pore s'arrête de grandir lorsque la fuite a suffisamment relaxé la tension de surface. Un critère pour trouver le maximum est l'égalité entre le temps de montée τ et le temps de relaxation τ_L (voir la note au bas de la page précédente), soit d'après l'Eq. (28) :

Eq. (37) $$r_m = r_L^{1/3} r_c^{2/3}$$

Cette formule est comparée aux rayons maxima issus des simulations numériques (en coordonnée réduite $\tilde{r}_m$), pour de faibles valeurs du paramètre de fuite, $\tilde{r}_L < 1$. On constate que les courbes s'approchent effectivement d'une asymptote de pente 1/3 quand $\tilde{r}_L \to 0$:

Eq. (38) $$\tilde{r}_m \cong \tilde{r}_L^{1/3}$$

Comme dans le cas a), on prévoit un décalage entre le maximum du rayon r_m et le minimum de la tension $\sigma_m = \frac{\Im}{r_m} \frac{\tau_c^{-1}}{\tau_L^{-1} + \tau_c^{-1}} \approx \frac{\Im}{r_m} \frac{\tau_L}{\tau_c}$. Il est néanmoins d'autant plus prononcé que la fuite est rapide, car si $\tau_L << \tau_c$ alors $\sigma_m << \sigma(r_m) = \Im / r_m$ (cf. Figure 16).

Regime III : <u>Fermeture</u>

La remarque précédente sur le grand décalage entre r_m et σ_m joue un rôle important pour l'étape de fermeture. L'équilibre quasi-statique, nécessaire pour que s'établisse un régime de fermeture lente, contrôlé par la fuite, ne peut avoir lieu. Il faudrait en effet que la tension de surface se remette à augmenter lentement, dès que le trou commence à se refermer. Au contraire, elle continue de chuter jusqu'à son minimum σ_m. Dès lors, la fermeture est rapide, et résulte du simple équilibre entre la tension de ligne et la friction dans la membrane, à la vitesse $V_4 = \Im / 2\eta_s$.

Bilan : les pores transitoires géants se referment lentement…

Un pore ouvert dans une vésicule continue de croître tant que subsiste une tension de surface. Quand celle-ci est relaxée, le bord du trou est fermé par la tension de ligne. Ce faisant, la membrane est retendue légèrement, ce qui continue de pousser du liquide interne à travers le pore. Dans un solvant plus visqueux, la vésicule se dégonfle très lentement et reste tendue. Dans la limite $\eta R_0^2 >> \eta_s r_c$, le pore atteint quasiment le rayon critique r_c. Ensuite, la fermeture s'effectue à vitesse quasi-constante : $$V_3 = \frac{2\Im}{3\pi\eta_0 R_0^2} r_m$$

La fermeture est ainsi limitée cinétiquement par la fuite du solvant. Elle constitue la période la plus longue dans l'existence du pore. Le temps de vie, estimé par $t_{vie} \approx r_m / V_3$, est proportionnel à la viscosité du solvant, au carré du rayon de la vésicule, et à l'inverse de la tension de ligne.

3.3 Et si la dissipation en volume domine celle dans la membrane ?

3a) Equations générales

La forme exacte des lignes de courant du solvant n'est pas connue. Celles qui sortent de la vésicule ont été modélisées par le cas limite d'une ouverture circulaire de rayon constant. Par contre les flux tangentiels à la membrane et les recirculations à l'intérieur de la vésicule ne possèdent pas de description analytique simple. On peut néanmoins raisonner en loi d'échelle: la dissipation produite par ces flux s'exerce dans un volume proche de r^3 et met en jeu des gradients de vitesse de l'ordre de $\dot{r}/r$. La friction visqueuse est ainsi proportionnelle à $\eta_0 r\dot{r}$, et peut être introduite dans l'équation dynamique du pore :

Eq. (39)
$$\left(2\eta_s + \alpha\eta_0 r\right)\dot{r} = \sigma r - \Im$$

où α est un coefficient multiplicatif inconnu.

On estime l'importance de cette dissipation volumique en comparant η_s et $\eta_0 r_c$. Le rapport r_L/r_c doit dépasser 1 pour que le régime III soit plus long que le régime IV, limité par la viscosité η_s : en pratique, une valeur entre 1 et 2 est déjà suffisante (cf. Figure 15). La condition de fuite lente s'écrit donc simplement $\eta_0 R_0^2 > \eta_s r_c$. Or $r_c/R_0 \approx 1/2$, les vésicules s'ouvrant sur un disque de près de la moitié leur rayon (mais seulement $1/16 \approx 6\%$ de leur surface). L'inégalité précédente entraîne donc $2\eta_s < 8\eta_0 r_c$. De plus, le coefficient numérique α pourrait bien être supérieur au préfacteur 2, connu exactement pour les flux surfaciques. En conséquence, la dissipation volumique doit être prise en compte, surtout au voisinage du maximum, quand le rayon du pore approche la valeur critique r_c.

On examine ici le cas limite d'une membrane très peu visqueuse, vérifiant $2\eta_s << \alpha\eta_0 r_c$. Aux temps courts, le pore s'ouvre alors à vitesse constante $\dot{r}_g = \sigma_0/\alpha\eta_0$. On donne le système d'équations décrivant la dynamique du pore, en variables sans dimension :

Eq. (40)
$$\begin{cases} \tilde{r}\,\dfrac{d\tilde{r}}{d\tilde{t}'} = \tilde{r}\,\tilde{\sigma} - \tilde{\Im} \\ \dfrac{d\Delta}{d\tilde{t}'} = \tilde{\sigma}\,\dfrac{\tilde{r}^3}{\tilde{r}'_L} \\ \tilde{\sigma} = 1 - \tilde{r}^2 - \Delta \end{cases}$$

où les seuls paramètres qui diffèrent par rapport aux équations du paragraphe 3.2b) sont :

Eq. (41)
$$\tau' = \frac{r_c}{\dot{r}_g} = \frac{r_c \alpha\eta_0}{\sigma_0}$$

Eq. (42)
$$\tilde{r}'_L = \frac{3\pi}{4\alpha}\frac{R_0^2}{r_c^2}$$

3b) Solutions numériques

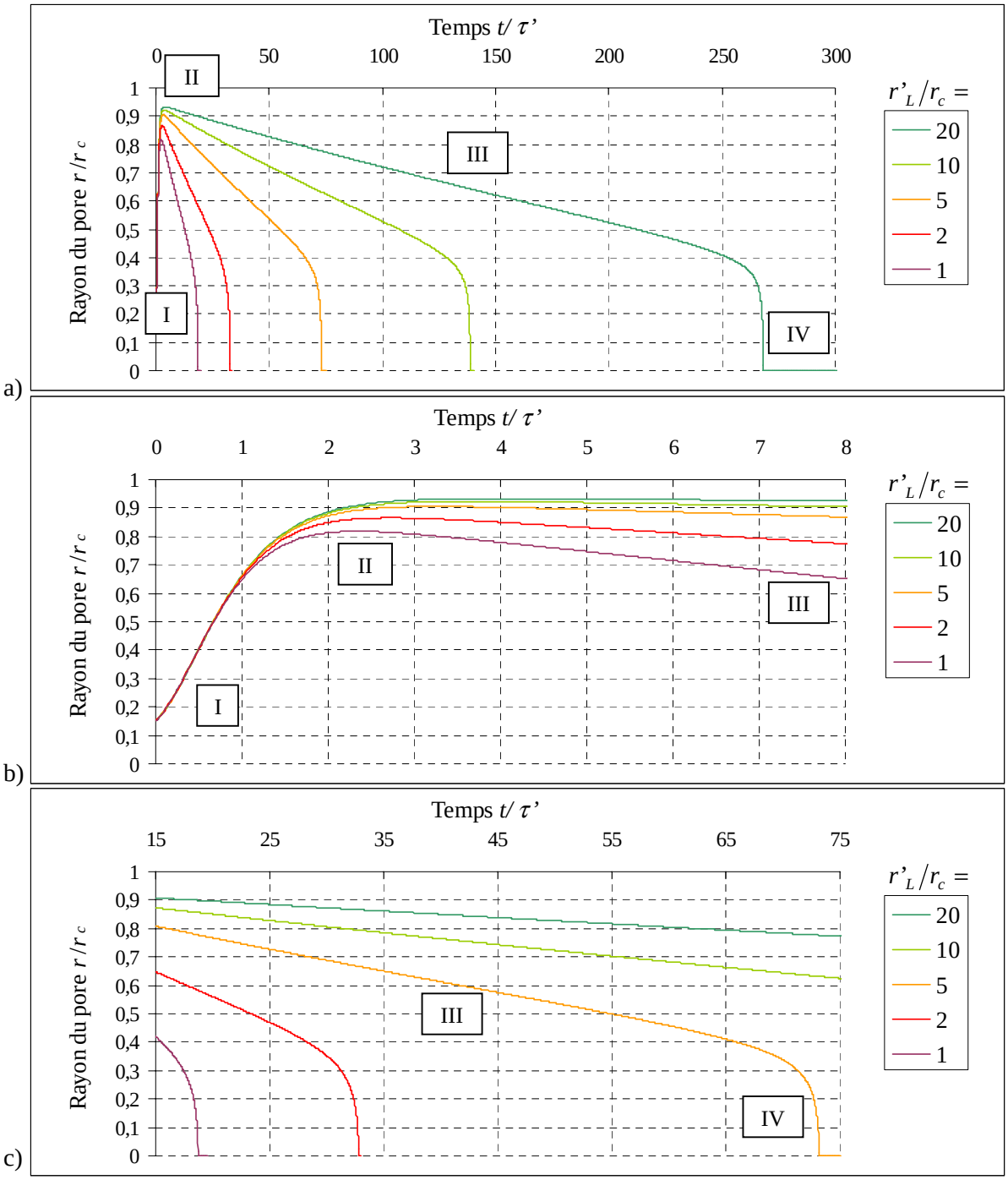


Figure 18 : Simulations numériques quand la dissipation visqueuse a lieu uniquement dans le solvant. La tension de ligne est maintenue constante à la valeur $\tilde{\Im} = 0.1$, tandis que le paramètre de fuite $\tilde{r}'_L$ est varié (nécessairement supérieur à 1). Le pas de la simulation est $\Delta\tilde{t}' = 0.02$. A $\tilde{t}' = 0$, $\tilde{r}_i = 0.15$ et $\Delta_i = 0$. Les graphes b) et c) sont des agrandissements respectivement de l'ouverture I et de la fermeture finale IV.

3c) Solutions analytiques

Cette hypothèse d'une dissipation visqueuse en volume conduit aussi à une évolution des pores en quatre étapes :

- I) Ouverture initiale, à vitesse $\dot{r}_g = \sigma_0 / \alpha\eta_0$
- II) Maximum
- III) Fermeture lente, à vitesse $V_3 = \dfrac{2\Im}{3\pi\eta_0 R_0^2} r_m$
- IV) Accélération finale, avec une pente abrupte non physique

Singulièrement, on trouve que le régime III de fermeture lente est parfaitement identique au cas où la dissipation visqueuse a lieu majoritairement dans le film lipidique[1]. Par contre, le régime IV n'a pas de signification physique. En effet, lorsque le rayon du pore tend vers zéro, la fermeture est encore freinée par la friction visqueuse dans la membrane : la vitesse finale ne peut dépasser $V_4 = \Im / 2\eta_s$.

Seul le régime I d'ouverture permet de déterminer si la dissipation visqueuse est dominée par les écoulements de surface ou bien de volume. En effet, aux temps courts (jusqu'à τ ou τ'), les graphes de la Figure 15c ont une concavité dirigée vers le haut, alors que ceux de la Figure 18b sont linéaires.

Pour les vésicules qui éclatent irréversiblement sur une surface (2.1b), la loi d'ouverture exponentielle aux temps courts prouve *a posteriori* que la dissipation visqueuse est dans ce cas dominée par les écoulements de lipide et non ceux du solvant. Elles ont un forme de crêpe, de hauteur *h* n'excédant pas 1–2 µm. Le volume de solution s'échappant du pore reste faible, mais le liquide est cisaillé entre la membrane et le substrat. Si la dissipation était dominée par cet écoulement de volume, la dynamique du pore s'écrirait, en loi d'échelle : $\eta_0 (\dot{r}/h)^2 \; r^2 h = \sigma_0 r\dot{r}$, soit $r\dot{r} = \sigma_0 h / \eta_0$. Le rayon du pore augmenterait en fonction du temps comme une loi puissance, $t^{0.5}$, qui est suffisamment reconnaissable d'une loi exponentielle pour que l'on puisse exclure cette possibilité.

Quant aux vésicules suspendues dans un mélange d'eau et de glycérol, de viscosité η_0 environ 30 fois plus élevée que celle de l'eau, la question de la dissipation dans le solvant se pose plus sérieusement pour elles. Malheureusement, les tous premiers instants de l'ouverture des pores, créés alors par une tension de surface photo-induite (2.2), sont trop rapides pour être enregistrés par vidéo-microscopie. Nous verrons cependant que les meilleurs ajustements des courbes expérimentales, d'ouverture et de fermeture des pores, sont réalisés avec un modèle de dissipation mixte, c'est-à-dire en tenant compte à la fois des d'écoulements de lipide en surface et de solvant en volume.

---

[1] La condition quasi-statique $d\sigma / dt = 0$ s'écrit toujours $2R\dot{R} = \dfrac{r\dot{r}}{2}$, avec $\sigma r \approx \Im$, d'où $\dot{r} = -\dfrac{2\Im}{3\pi\eta_0 R^2} r$.

IV.4 Résultats expérimentaux détaillés

Dans un tableau de chasse qui contient des centaines de pores enregistrés, tous ne se prêtent pas aussi facilement à la comparaison quantitative avec le modèle. Les pores les plus nombreux sont positionnés aux tropiques de la sphère, et sont donc vus en projection. Ils apparaissent ainsi comme des ellipses, dont le grand axe n'est une mesure fiable de r seulement si le plan de coupe passe par le centre du pore. Comme un défaut de mise au point induit un biais important sur cette mesure, de tels pores n'ont pas été utilisés pour les analyses quantitatives. Cette difficulté n'a plus lieu avec les pores situés aux pôles : vus de face, ce sont des disques noirs parfaits, dont le rayon est mesuré avec précision. Malheureusement, ils sont plutôt rares. Enfin, la position équatoriale est rencontrée dans une bonne proportion (environ 25% des cas). C'est ici que le contraste entre la membrane et le trou non fluorescent est le meilleur, autorisant ainsi une détection de contour et une mesure (presque) automatisée des courbes $r(t)$ et $R(t)$ (cf. III–2.4).

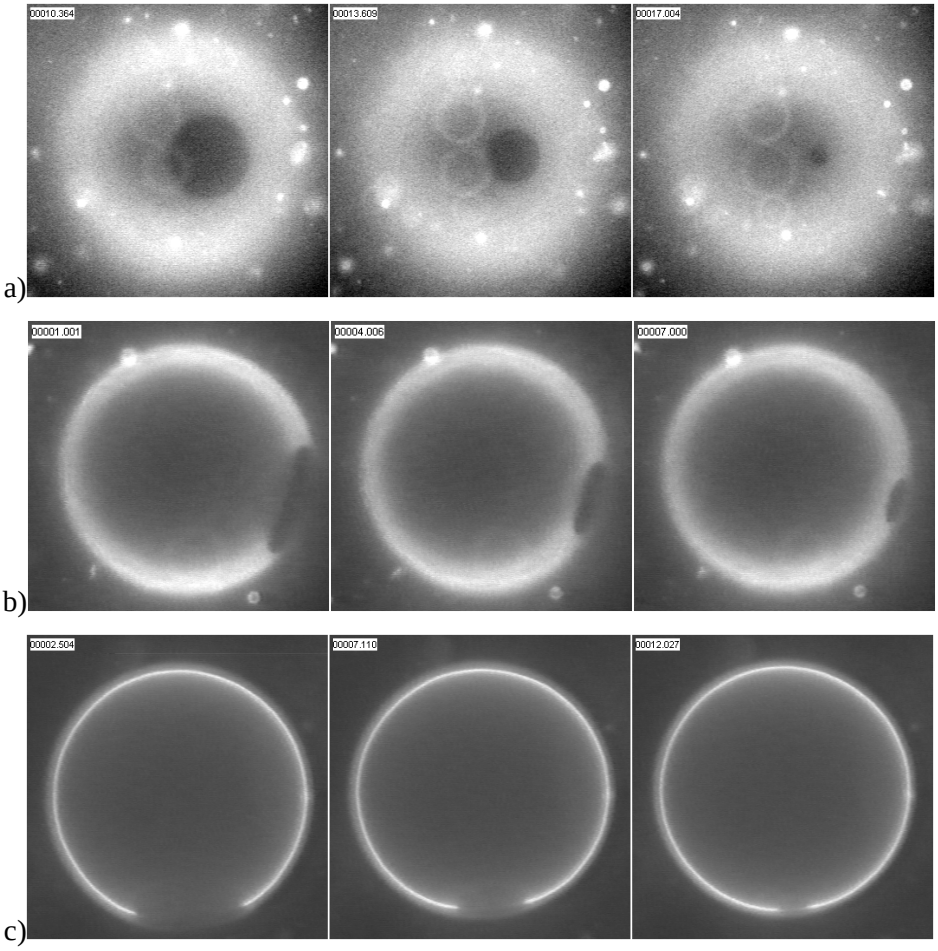


Figure 19 : Pores transitoires photo-induits situés a) au pôle, b) au tropique ou c) à l'équateur de la vésicule. Les pôles sont définis par rapport à l'axe optique.

Nous montrerons d'abord quelques exemples choisis, pour lesquels les dynamiques des deux rayons $r(t)$ et $R(t)$ sont reproduites assez fidèlement par le modèle. Les cas moins favorables, par

exemple ceux où manquent les phase I, II ou IV, sont toutefois parfaitement utilisables pour mesurer la vitesse de fermeture durant la phase III contrôlée par la fuite. Une représentation graphique particulière permettra de classer de nombreuses vésicules, de tailles et même d'échantillons différents. La synthèse de toutes ces expériences sera établie en une seule courbe, décrivant l'évolution de la tension de ligne en fonction de la composition lipidique. L'hypothèse du modèle, selon laquelle la dissipation visqueuse a lieu majoritairement dans la membrane, sera discutée. On montrera que le début des courbes expérimentales (régimes I et II) peut être mieux décrit, en prenant en compte dans le modèle une dissipation mixte, à la fois dans la bicouche et dans la solution. Enfin, on présentera des résultats préliminaires sur l'utilisation des pores transitoires pour faire sortir des objets, initialement encapsulés dans la vésicule.

4.1 Où l'expérience et la théorie se rencontrent…

Les pores s'ouvrant à l'équateur permettent une comparaison quantitative avec le modèle.

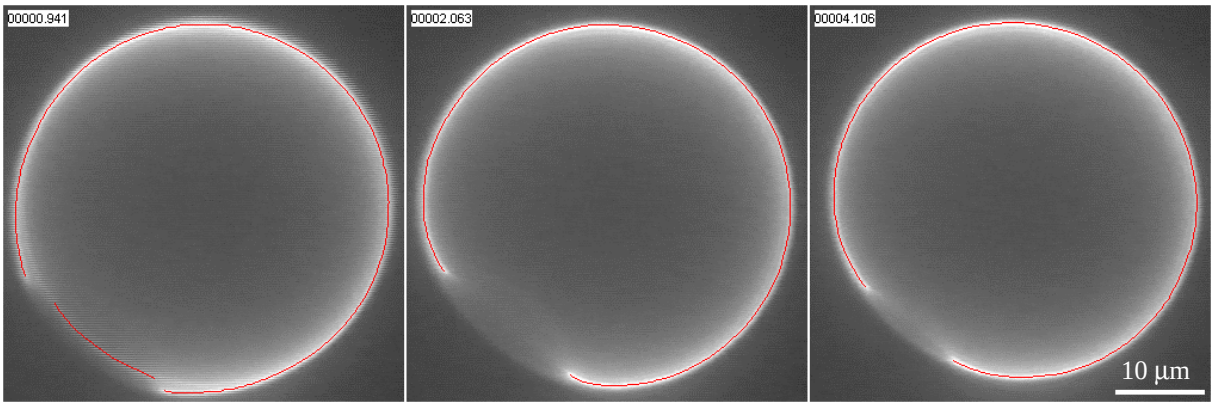


Figure 20 : Pore transitoire dans une vésicule de composition lipidique DOPC/cholestérol (8/2), dans glucose 0.1M / glycérol 66%. La première image est floue à cause de la rapidité de l'ouverture.

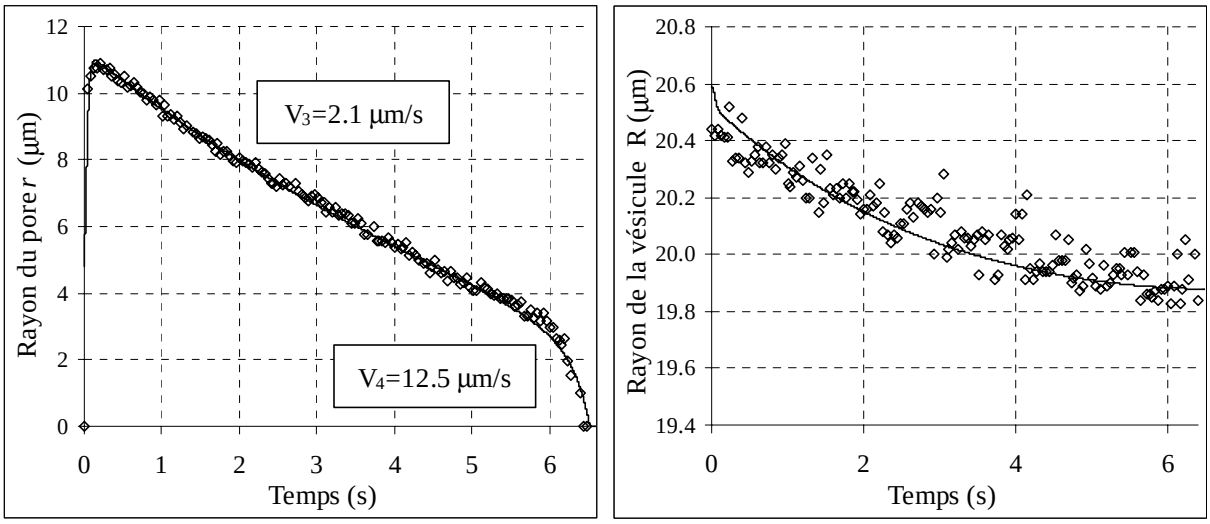
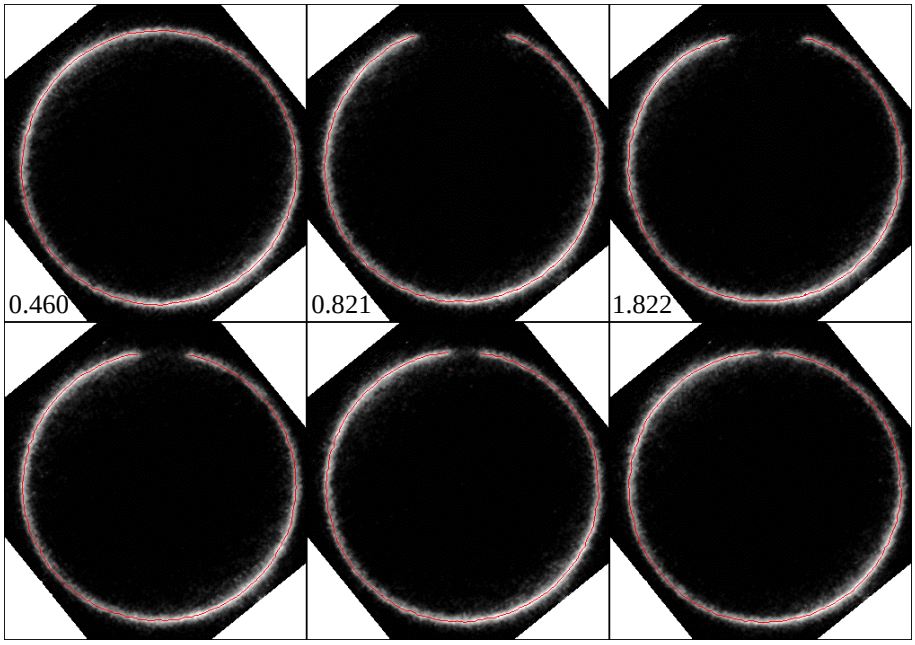


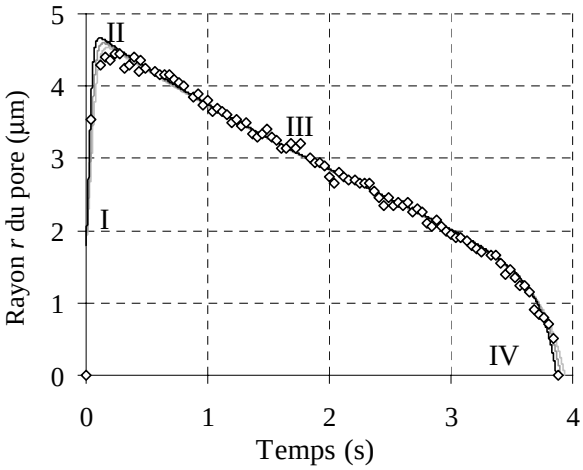
Figure 20 (suite) : Dynamiques complètes du rayon du pore $r(t)$ et du rayon de la vésicule $R(t)$, mesurées sur les images précédentes. Les paramètres de simulation sont $\tilde{\Im} = 0.042$ et $\tilde{r}_L = 2.75$.

L'exemple de la Figure 20 est assez représentatif d'une vésicule de taille moyenne (Ø≈40 μm), ayant présenté une série de pores, dont chacun dura pendant plusieurs secondes. Bien que la courbe du rayon R de la vésicule paraisse bruitée, le traitement d'image fournit en fait des points dont la dispersion (≈0.2 μm) est plus petite que la résolution du microscope(≈0.4 μm). La diminution globale du rayon (≈0.6 μm) est ainsi bien détectée.

On procède à l'ajustement de simulations numériques issues du modèle sur les deux courbes expérimentales $r(t)$ et $R(t)$ simultanément. Une première catégorie de paramètres découle de grandeurs mesurées directement. Comme $r_m \approx r_c - \Im/2\sigma_0$, le rayon critique doit être supérieur d'environ 1 μm au rayon maximum du pore, ici r_m=10.9 μm. Ainsi y-a-t-il peu de marge pour estimer r_c=12 μm. De même, il est légitime de choisir un rayon sous tension nulle R_0=19.7 μm, une fraction de μm en-dessous de la valeur finale du rayon de la vésicule, R=19.8 μm. En effet, on note souvent la reprise des ondulations thermiques macroscopiques après la fermeture du pore. Enfin, le flou de la première image indique que l'ouverture exponentielle possède un temps caractéristique très court, de l'ordre de la période du balayage vidéo. Mais au contraire des autres grandeurs, le temps τ n'est pas défini très précisément : seule une estimation grossière, τ=40 ms, peut être avancée. On essaye alors d'ajuster, sur les courbes expérimentales entières, des courbes simulées par notre modèle d'évolution du pore. En choisissant un jeu de paramètres sans dimension, $\tilde{\Im} = 0.042$ et $\tilde{r}_L = 2.75$, on simule des courbes d'évolution $\tilde{r}(\tilde{t})$ et $\Delta(\tilde{t})$. Puis on rétablit les unités en calculant le temps $t = \tilde{t}\,\tau$, le rayon du pore $r = \tilde{r} r_c$, et le rayon de la vésicule $R = \sqrt{R_i^2 - \Delta\left(R_i^2 - R_0^2\right)}$. D'autres paramètres du modèle découlent alors : la tension de ligne $\Im = 11.1\times10^{-12}$ N , la viscosité de surface $\eta_s = 4.4\times10^{-7}$ Ns/m , la tension de surface initiale $\sigma_0 = 2.2\times10^{-5}$ N/m , le rayon de nucléation r_-=0.5 μm, et le module effectif d'élasticité de la membrane $E = 2.4\times10^{-4}$ N/m .

Les simulations reproduisent globalement les variations temporelles des deux rayons. Néanmoins, on reste prudent quant aux valeurs numériques exactes de ces grandeurs, car elles sont extraites d'un ajustement à plusieurs paramètres. Dans la suite, on montrera une méthode plus précise pour mesurer la tension de ligne, basée sur une simple régression linéaire dans le régime III de fermeture lente (cf.4.2). Pour cette même vésicule, on déterminera une valeur plus exacte : $\Im = 12.1\times10^{-12}$ N . L'exemple qui va suivre illustre le caractère équivoque des simulations numériques.





τ (ms)	$\tilde{r}_L$	$\tilde{\Im}$	η_s (Ns/m)
50	3.0	0.067	4.6×10^{-7}
40	3.5	0.073	4.0×10^{-7}
30	4.3	0.078	3.2×10^{-7}

Figure 21 : Incertitude sur le régime d'ouverture I. Les données expérimentales proviennent de la vésicule ci-dessus, préparée avec du DOPC pur dans du glucose 0.1M/glycérol 66% et suspendue dans du sucrose 0.1M/glycérol 66% (les instants t sont exprimés en s). Les grandeurs utilisées dans le modèle sont r_c=5.1 µm, R_0=13.65 µm et $\Im = 7.3$ pN. Les trois courbes simulées correspondent à des choix différents du temps τ caractéristique de l'ouverture (cf. tableau).

On trouve ainsi plusieurs jeux des deux paramètres réduits du modèle, $\tilde{r}_L = r_L / r_c$ et $\tilde{\Im} = \Im / \sigma_0 r_c$, qui simulent parfaitement la fermeture lente III, pour une valeur de $\Im$ toujours identique. La rupture de pente signalant le passage au régime de fermeture rapide IV est aussi bien reproduite. Par contre, l'expansion initiale I et le maximum II ne sont décrits qu'approximativement. Comparés au régime III qui représente la quasi-totalité du temps de vie du pore, les autres évènements sont très fugaces. La fréquence vidéo (25 Hz) ne permet d'acquérir qu'une ou deux images au cours de l'ouverture quasi-exponentielle, dont on évalue le temps caractéristique τ au mieux à ±10 ms (l'image vidéo est

renouvelée par demi-trame chaque 20 ms). Par ailleurs, les maxima des courbes théoriques (régime II) sont systématiquement supérieurs à celui de la courbe expérimentale du rayon du pore. On explique ce dépassement par la friction due aux écoulements du solvant en volume, qui intervient surtout pour les rayons de pore élevés. Dans un paragraphe suivant, on ajoutera un terme dans l'équation donnant la dynamique du pore, afin de tenir compte de ce ralentissement visqueux supplémentaire. Enfin, pendant la fermeture ultime (régime IV), le rayon du pore passe en-dessous de la résolution du microscope, tandis que la vitesse de fermeture devient plus grande. Sa mesure est donc très approximative : $V_4 = 10 \pm 2$ µm/s. Or seuls les régimes I et IV font intervenir explicitement la viscosité de surface ($\tau^{-1} = \sigma_0 / 2\eta_s$ et $V_4 = \Im / 2\eta_s$). On ne peut donc pas espérer déduire η_s avec une bonne précision.

4.2 Mesure de la tension de ligne

La tension de ligne $\Im$ est la force qui s'exerce sur le bord du pore et tend à le refermer. Cette force infime, de l'ordre de 10^{-12}–10^{-11} N, est bien inférieure aux forces capillaires des liquides usuels. Nous en proposons une détermination simple et directe, à partir des mesures des deux rayons *r* et *R* pendant le régime III, allongé par la viscosité du milieu. La variation de $\Im$ dans les deux sens est envisagée :

- i) Augmentation avec le cholestérol, qui rigidifie la bicouche en s'intercalant entre les lipides;
- ii) Diminution par un détergent naturel, le cholate de sodium (l'acide cholique est l'un des constituants de la bile).

Le temps a manqué pour aborder ce second type d'expériences, qui serait néanmoins très intéressant pour fournir une mesure quantitative de l'effet des détergents sur les bicouches lipidiques.

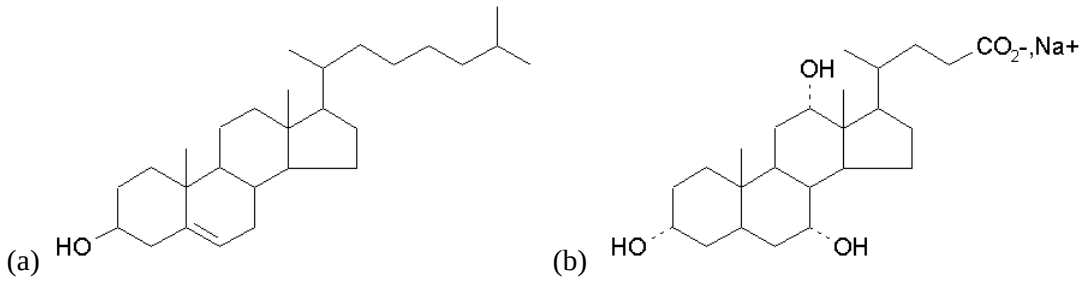


Figure 22 : (a) Cholestérol M_w=386.7 ;(b) Cholate de sodium M_w=430.4

Il est apparu dans le modèle que, sous réserve d'une grande viscosité de la solution, la majeure partie de la fermeture des pores est régie par la fuite (régime III). Comme le rayon de la vésicule *R* varie plus lentement (≈0.01 µm/s) que le rayon du pore *r* (≈1 µm/s), on peut les considérer découplés pour intégrer simplement l'Eq. (33) :

Eq. (43)
$$R^2 \mathrm{Ln}(r) = -\frac{2\Im}{3\pi\eta_0}(t - t_{23}) + R_{23}^2 \mathrm{Ln}(r_{23})$$

où t_{23}, r_{23} et R_{23} correspondent au début du régime III.

On en déduit une définition pratique et univoque du régime de fermeture lente : il s'étend sur tout le domaine de validité de cette relation linéaire en temps. Les points expérimentaux sont donc retracés en portant $R^2\mathrm{Ln}(r)$ en fonction du temps. La portion linéaire possède une pente *k*, d'où la tension de ligne est tirée directement par :

Eq. (44) $$\Im = \frac{3\pi\eta_0}{2}k$$

Dans un milieu de viscosité mesurée $\eta_0 = 32\times10^{-3}$ Ns/m^2 (glycérol 66%), cette relation s'écrit numériquement $\Im = 0.15k$ ($\Im$ en pN, *k* en µm^2/s).

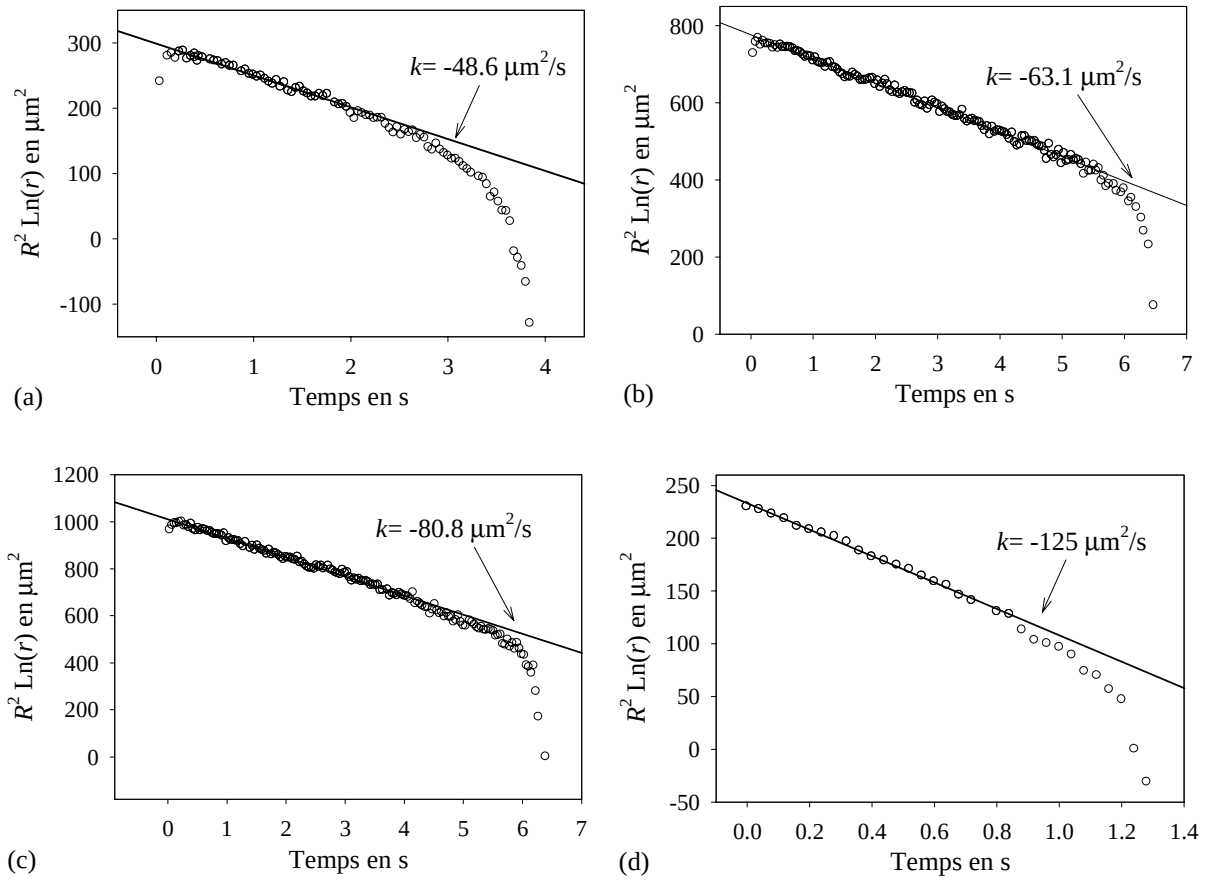


Figure 23 : Définition précise des limites du régime III par le tracé de $R^2\mathrm{Ln}(r)$ en fonction de *t*. Des valeurs des pentes, on déduit $\Im = 7.3\,\mathrm{pN}$ pour DOPC pur (a, vésicule de la Figure 21), $\Im = 9.5\,\mathrm{pN}$ pour DOPC avec 10 mol% de cholestérol (b, cf. Figure 19c) , $\Im = 12.1\,\mathrm{pN}$ avec 20 mol% (c, cf. Figure 20) et $\Im = 18.8\,\mathrm{pN}$ pour 30 mol% (d).

La précision de cette méthode de mesure est estimée à partie des erreurs expérimentales. La viscosité du solvant a été mesurée à 1% près. Le traitement d'image permet de mesurer les rayons avec une résolution de 0.2 µm. Pour le temps, on évalue l'erreur à la durée d'une demi-trame du balayage

vidéo (20ms). Au total, l'incertitude relative de la mesure est $\frac{\Delta\Im}{\Im} \approx \frac{\Delta\eta_0}{\eta_0} + 2\frac{\Delta R_0}{R_0} + 2\frac{\Delta r_m}{r_m} + \frac{\Delta t_{vie}}{t_{vie}}$.

Numériquement, on trouve $\Delta\Im/\Im \approx 0.01 + 0.4/20 + 0.4/10 + 0.02/10 \approx 7\%$, pour un pore de durée de vie longue (10 s). Avec des pores plus furtifs (moins d'1 s), la mesure comporte plus de 10% d'erreur.

Un autre avantage de cette représentation de $R^2\mathrm{Ln}(r)$ en fonction du temps est de pouvoir rassembler les données issues de nombreuses vésicules sur un même graphe. On obtient des faisceaux de droites, décalées verticalement suivant les tailles, mais dont la pente est reproductible d'une vésicule à l'autre (Figure 24). La variation de cette pente entre des échantillons de compositions lipidiques différentes est ainsi nettement supérieure à sa dispersion au sein d'une même préparation.

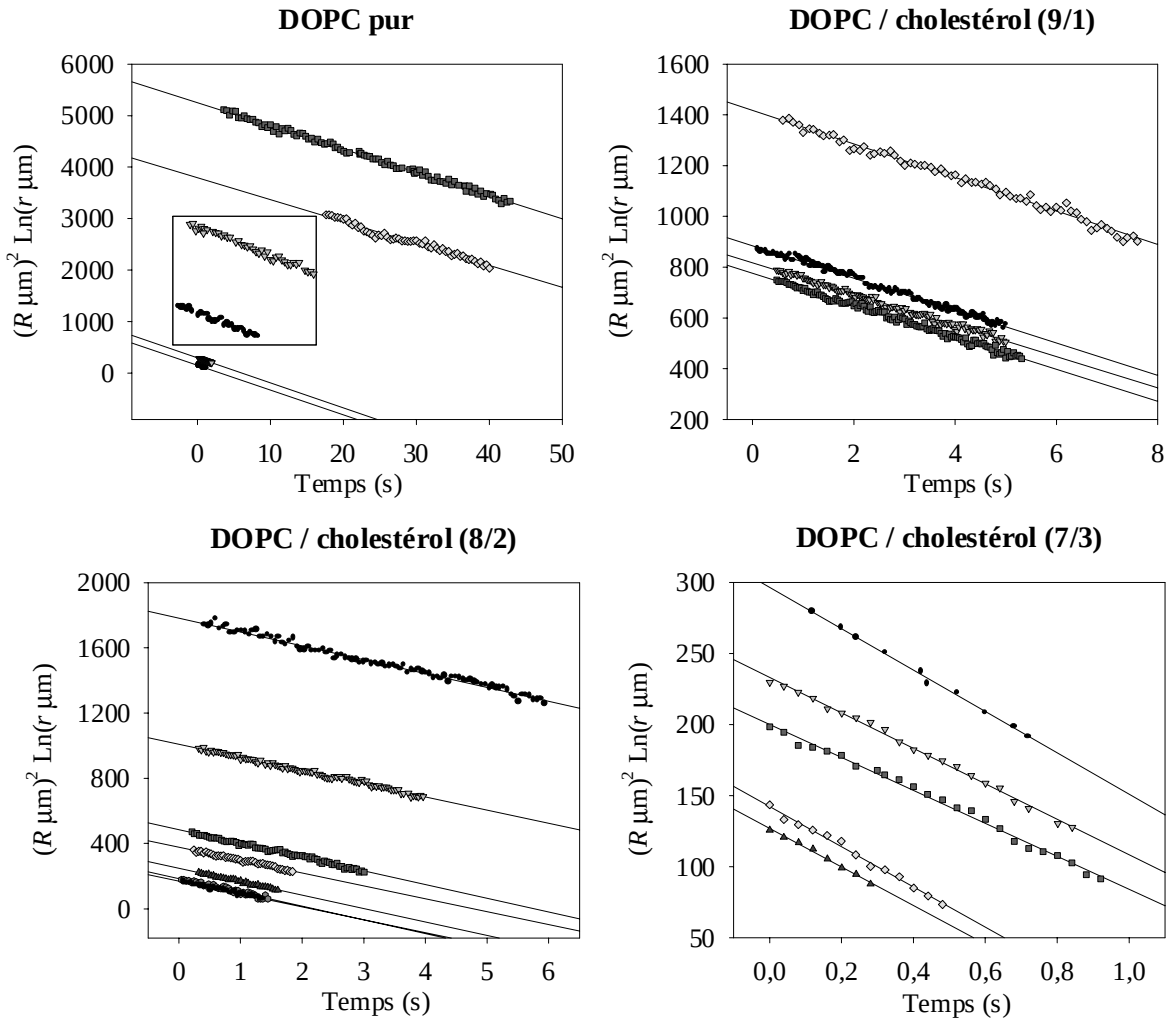


Figure 24 : Dynamique des pores limitée par la fuite (régime III). La représentation graphique permet de comparer des vésicules de même composition lipidique, malgré des tailles différentes.

En compulsant un grand nombre de mesures, on déduit la courbe de variation de $\Im$ avec la fraction molaire θ de cholestérol dans un mélange avec le DOPC (Figure 25). Jusqu'à θ=20%, l'évolution est linéaire, puis elle commence à s'écarter de la linéarité à partir de θ=30%. Les mesures apparaissent

aussi plus dispersées : $\Im(30\%) \approx 20 \pm 2$ pN . Mais elles restent dans la marge d'erreur expérimentale de 10%, estimée pour des pores de petites tailles et de durées de vie courtes (moins d'1 s). Par ailleurs, cette courbe d'évolution a été déterminée dans un domaine de concentrations sur lequel le cholestérol est entièrement soluble dans la bicouche[1]. En effet, avec un phospholipide très analogue, SOPC, la limite de solubilité du cholestérol se situe aux alentours de 55 mol%[32].

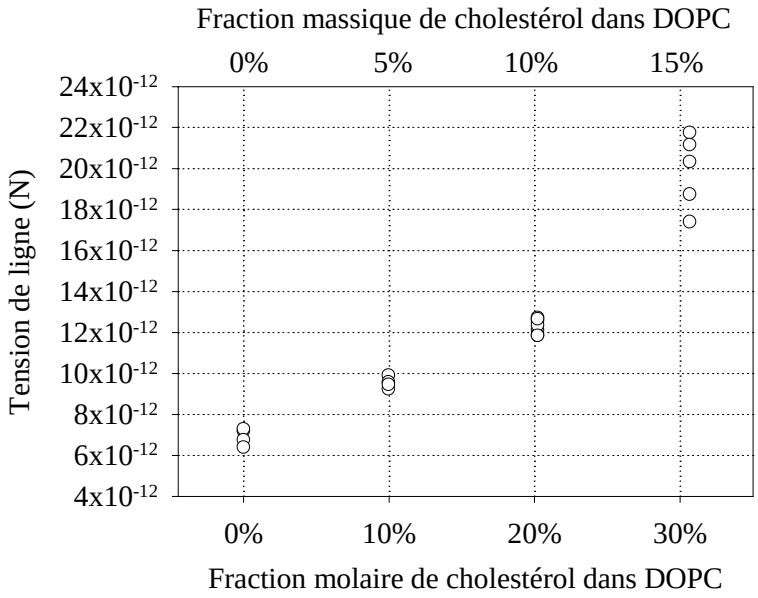


Figure 25 : Tension de ligne en fonction des fractions molaire et massique de cholestérol incorporé dans des vésicules géantes de DOPC, mesurée à partir des cinétiques de fermeture de pores.

La modélisation de l'énergie de ligne en termes d'énergie de courbure a donné précédemment une formule approchée $\Im \propto \frac{K_b(\theta)}{e}(1-\theta c_0 e)$ (cf. Encadré 6, le préfacteur ayant été omis, car il donne un résultat dix fois trop grand pour θ=0). Deux effets conjugués du cholestérol permettent d'expliquer l'augmentation de la tension de ligne : d'une part, il augmente le module de courbure de la bicouche, d'autre part, il introduit une courbure spontanée négative. L'effet majoritaire est probablement l'augmentation de rigidité mécanique, due au renforcement de la cohésion des lipides.

4.3 Les mesures de la tension de ligne mises à l'essai

Dans les deux premières méthodes présentées au 1.1a), les pores sont stabilisés par l'étirement de la membrane, soit par un champ, soit par une aspiration. Les auteurs estiment alors $\Im$ d'après la taille du pore dans cet état stationnaire. Dans les expériences de ruptures irréversibles, l'étape de nucléation, durant laquelle la tension de ligne joue un rôle primordial, est traitée de manière statistique. Enfin,

[1] Un échantillon préparé pour une concentration nominale de 50 mol% en cholestérol n'a pas donné de pores transitoires, mais faisait apparaître dans la solution des paillettes, sans doute des cristaux de cholestérol.

dans notre expérience sur les pores transitoires, on mesure précisément une vitesse de fermeture, qui, en milieu visqueux, est directement reliée à la force $\Im$.

3a) Mesures de $\Im$ d'après la taille d'équilibre d'un pore géant

Quand le cylindre ouvert de la Figure 1 n'évolue plus, il est considéré comme une forme d'équilibre, minimisant la somme de l'énergie de courbure et de l'énergie de ligne de la vésicule :

Eq. (45)
$$E_t = \frac{1}{2} K_b \frac{1}{r^2} A + 2\Im 2\pi r$$

où $A = 2\pi r L$ est la surface constante de la membrane. En annulant la dérivée de l'énergie totale E_t par rapport au rayon r, on obtient une relation entre la tension de ligne et les paramètres géométriques :

Eq. (46)
$$\Im = \frac{L K_b}{2 r^2}$$

Par cette formule simple, les auteurs ont abouti à une évaluation expérimentale de $\Im$ pour la lécithine d'œuf EPC (cf. Tableau 1). Cependant, ils indiquent que les vésicules se prêtant à cette mesure constituent une fraction très faible de la préparation. En effet, la plupart donne sous champ des cylindres de rapport d'aspect moindre, et surtout qui varie avec l'intensité du champ. Ils attribuent ce comportement aux vésicules plurilamellaires (majoritaires) : dans ce cas, il faudrait ajouter une contribution électrique à l'énergie totale.

L'Encadré 7 décrit la méthode pour déterminer $\Im$ à partir de l'expérience de la Figure 2, où le pore est stabilisé par aspiration de la vésicule dans une micropipette[4].

3b) Mesures de $\Im$ d'après une statistique de ruptures

Deux méthodes[12,33] ont été décrites pour mesurer quantitativement la tension de ligne, à partir de statistiques d'éclatement, réalisées respectivement :

- sur des films noirs lipidique (BLM), tendus entre deux compartiments aqueux, qui restent isolés électriquement tant que la membrane est intègre. On mesure le délai t_1 entre l'établissement d'une tension U constante de part et d'autre de la bicouche, et le moment auquel un courant électrique appréciable signale la rupture. L'expérience est reproduite pour différentes valeurs de U entre 0.1 et 0.6 Volt ;
- des vésicules géantes, pressurisées avec une micropipette jusqu'à ce qu'elles éclatent. Plus précisément, une rampe temporelle de la pression d'aspiration est exercée sur la vésicule. La tension de surface est augmentée à vitesse $\dot{\sigma}$ constante, ajustable entre 10^{-5} et 10^{-1} N/m/s .

La distribution statistique des évènements de rupture est comparée à la théorie de Kramers, qui décrit comment un système soumis à l'agitation thermique peut dépasser une barrière de potentiel. Le

profil énergétique, en fonction du rayon r du pore, présente une barrière de hauteur[1] $E^{max} = \pi \Im^2 / \sigma$ (cf. 1.1c). Activées thermiquement, les ruptures de membranes obéissent à une loi stochastique universelle. Dans le cas de la mise sous tension mécanique, l'histogramme des ruptures à taux de charge $\dot{\sigma}$ est centré autour d'une tension σ vérifiant :

Eq. (47)
$$\mathrm{Ln}(\dot{\sigma}) \propto \frac{\pi}{kT} \frac{\Im^2}{\sigma}$$

Dans la rupture des films noirs, la tension mécanique σ est exercée par un ménisque de solvant résiduel reliant la membrane à la paroi solide(34). L'énergie de surface comporte en plus une contribution électrostatique[2] $\frac{1}{2} C_m (\varepsilon_s / \varepsilon_m - 1) U^2$. Les durées t_1 entre l'application de U et la rupture sont distribuées selon :

Eq. (48)
$$\mathrm{Ln}(t_1) \propto \frac{\pi}{kT} \frac{\Im^2}{\sigma + \frac{1}{2} C_m (\varepsilon_s / \varepsilon_m - 1) U^2}$$

Ces lois statistiques ont été vérifiées en répétant un grand nombre d'évènements de rupture, pour chaque valeur de U ou de $\dot{\sigma}$ appliquée. En reportant les données en échelle semi-logarithmique, on mesure une pente d'où l'on tire aisément $\Im$. Ces deux méthodes de rupture irréversible ont permis la mesure précise de la modulation de $\Im$ par incorporation de molécules à courbure spontanée non nulle.

---

[1] Si $\Im \approx 10^{-11}$ N, on évalue $E^{max} \approx kT$ à $\sigma_r \approx 10^{-1}$ N/m, valeur communément admise pour la tension de rupture. Sous une tension classique de BLM, $\sigma \approx 10^{-3}$ N/m, la barrière est plus élevée : $E^{\max} \approx 10^2 kT$.

[2] La mesure de la résistance R_m de la bicouche intègre et de son temps caractéristique de charge τ_m conduit à la valeur de sa capacité, qui divisée par la surface du film noir lipidique, est égale à $C_m = \varepsilon_m \varepsilon_0 / e$.

Encadré 7 Pore nucléé par une impulsion et stabilisé par la tension mécanique

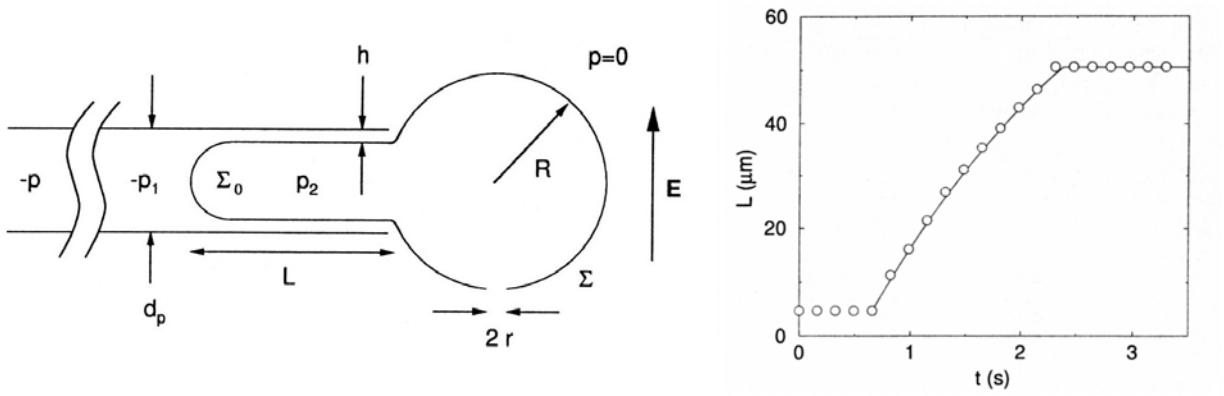


Figure 26 : Modélisation de l'expérience de Zhelev et Neeham[4] par Moroz et Nelson[22]. Le graphe représente l'avancée du tube de membrane au cours du temps.

Le flux de solution à travers le pore peut facilement être calculé à partir des mesures géométriques sur les deux portions (cylindrique et sphérique) de la vésicule. La taille du pore serait alors accessible par le calcul, sous réserve que l'on connaisse la pression p_2 du fluide à l'intérieur de la vésicule, qui provoque cette fuite. En conditions statiques, la loi de Laplace relie simplement la pression hydrostatique p mesurée, la tension de surface imposée à la bicouche σ_0, et la différence de courbure :

$$p = 2\sigma_0 \left(2/d_P - 1/R\right)$$

Mais en présence d'écoulements dans la micropipette, il faut tenir compte en plus d'une perte de charge. L'écoulement de Poiseuille en avant de la membrane provoque une première diminution de p à p_1. Pour la calculer, il faut connaître « la longueur effective » de la micropipette, L_{eff}. Comme le diamètre interne d_P varie le long de la micropipette (à cause de se fabrication par étirement à chaud), L_{eff} est en fait un paramètre ajustable, et non une grandeur géométrique mesurable. Une deuxième correction a été apportée par Moroz et Nelson : elle est due à l'écoulement dans la couche de lubrification d'épaisseur h, située entre la membrane et le verre. La tension de surface de la bicouche est alors :

$$\sigma = \sigma_0 - \eta_0 \dot{L}/h$$

La prise en compte de ces deux écoulements permet ainsi de simuler numériquement l'avancée de la membrane $L(t)$ dans la micropipette (courbe en trait continu à la Figure 26). Dans ce modèle, le rayon r du pore reste constant pendant toute sa durée de vie (excepté la nucléation et la fermeture finale, qui ne durent chacune que quelques ms). La tension de ligne est calculée à partir de la taille du pore dans cet état stationnaire, stabilisé par les écoulements de solution et de membrane.

Néanmoins, la théorie ne tient pas compte de la relaxation de la tension de surface due à la présence même du pore. Cette approximation apparaît dans la formule (5) de l'article :

$$4\pi R^2 + \pi d_v L = 4\pi R_i^2$$

où $d_v = d_p - h$. Ce bilan des aires ne fait pas apparaître la surface du pore πr^2.

Au final, la complexité des équations hydrodynamiques, la présence de paramètres non mesurables h et L_{eff}, ainsi que le recours indispensable à la simulation numérique, sont autant de freins pour utiliser cette expérience, *a priori* très contrôlée, afin de mesurer la tension de ligne.

3c) Comparaison des résultats

Méthode	Paramètres mesurés	Mesures indépendantes Nécessaires	Valeurs de $\Im$
Déformation en tube ouvert par un champ E *Harbich, Helfrich*	L et r	K_b	14–21 pN (EPC)
Pore stationnaire dans une vésicule aspirée *Zhelev, Needham / Moroz, Nelson*	p, R, d_P $L(t)$	h, L_{eff}, η_0	8–10 pN (SOPC)
Rupture électrique d'un film noir lipidique *Chernomordik, Chizmadzhev*	$t_1(U)$	σ, C_m n=10 /valeur de U	8–9 pN (EPC)
Statistique de rupture de vésicules aspirées *Ludwig, Evans*	$\sigma(\dot{\sigma})$	n=100 /valeur de $\dot{\sigma}$	11-12 pN (SOPC)
Pore transitoire dans une vésicule sphérique *Sandre, Brochard-Wyart*	$r(t)$, $R(t)$	η_0	7–8 pN (DOPC)

Tableau 1 : Comparaison des paramètres nécessaires dans les différentes méthodes pour mesurer la tension de ligne d'une membrane lipidique (r : rayon du pore, L : longueur de la partie cylindrique, R : rayon de la partie sphérique, t : temps, p : pression hydrostatique, d_P : diamètre de la micropipette, L_{eff} : longueur effective de la micropipette pour calculer la perte de charge, h : couche de cisaillement entre la bicouche et le verre, η_0 : viscosité de la solution, t_1 : temps de vie d'une bicouche soumise à une tension électrique U avant rupture, C_m : capacité par unité de surface de lipide, σ: tension de surface, $\dot{\sigma}$: vitesse de la rampe de tension, n : nombre d'expériences répétées, K_b : module de courbure).

4.4 Peut-on mesurer la viscosité de surface ?

L'hydrodynamique des pores transitoires mêle à la fois les écoulements bidimensionnels des phospholipides dans la membrane, et les flux volumiques du solvant. Dans le modèle en l'état, l'équation dynamique du rayon r du pore tient compte uniquement des écoulements radiaux dans la membrane, de viscosité de surface η_s. La viscosité du solvant η_0 intervient quant à elle pour décrire la diminution du rayon R de la vésicule, due au flux transverse de liquide qui s'écoule à travers le pore. Quand cette viscosité de volume est élevée, d'une part les pores atteignent des tailles plus grandes, d'autre part leur cinétique de fermeture est limitée par la fuite, et donc uniquement par la viscosité η_0. On a ainsi identifié le régime III, qui dure d'autant plus longtemps que le solvant est plus visqueux. La

question est ici de déterminer si l'on peut malgré tout déduire la viscosité de surface η_s à partir des autres régimes. La réponse serait négative si la dissipation visqueuse dans le lipide était totalement masquée par celle dues aux écoulements du solvant, entraîné tangentiellement par les mouvements de la membrane. On a déjà évoqué le décalage entre les données expérimentales et les courbes théoriques à l'ouverture I et au maximum II : il pourrait provenir de ce ralentissement visqueux supplémentaire.

Quand la friction dans la membrane et dans le solvant interviennent tous deux, la dynamique du pore est donnée par l'Eq. (39), dont on rappelle l'expression :

$$\left(2\eta_s + \alpha\eta_0 r\right)\dot{r} = \sigma r - \Im$$

Elle est réécrite avec exactement les mêmes variables sans dimension que celles introduites au 3.2b) :

Eq. (49)
$$\begin{cases} \left(1+\tilde{\alpha}\,\tilde{r}\right)\dfrac{d\tilde{r}}{d\tilde{t}} = \tilde{\sigma}\tilde{r} - \tilde{\Im} \\ \tilde{\alpha} = \dfrac{\alpha\eta_0 r_c}{2\eta_s} \end{cases}$$

Les autres équations sont reprises à l'identique. Afin de tester ce **modèle de dissipation mixte**, on considère le cas d'une vésicule plus grosse que la moyenne ($2R_i \approx 80$ µm pour ce pore, mais au début de l'expérience elle mesurait 130 µm). Ses pores ont atteint des records de taille (jusqu'à 50 µm de diamètre) et de temps de vie (environ une minute). Le temps caractéristique d'ouverture τ apparaît aussi court que celui de vésicules plus petites. De même la vitesse de fermeture finale V_4 est aussi rapide. Néanmoins, comme le pore est plus large et sa durée de vie plus longue, le nombre de points expérimentaux dans les régimes rapides I et IV est accru.

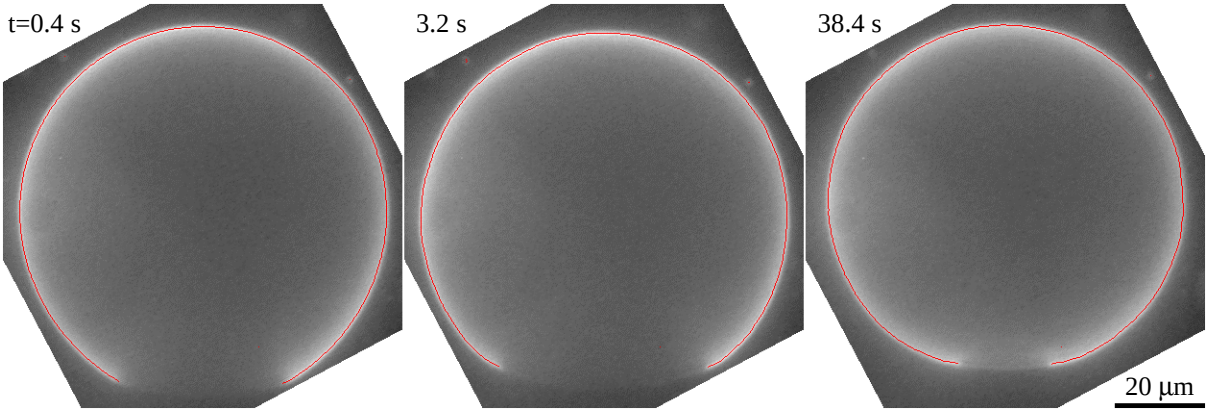


Figure 27 Vésicule de grande taille, dans laquelle un pore est resté ouvert pendant près d'une minute. La membrane est constituée de DOPC, et marquée par incubation de Di-6-ASPBS. Les solutions interne et externe sont identiques (glucose 0.1M/glycérol 66%).

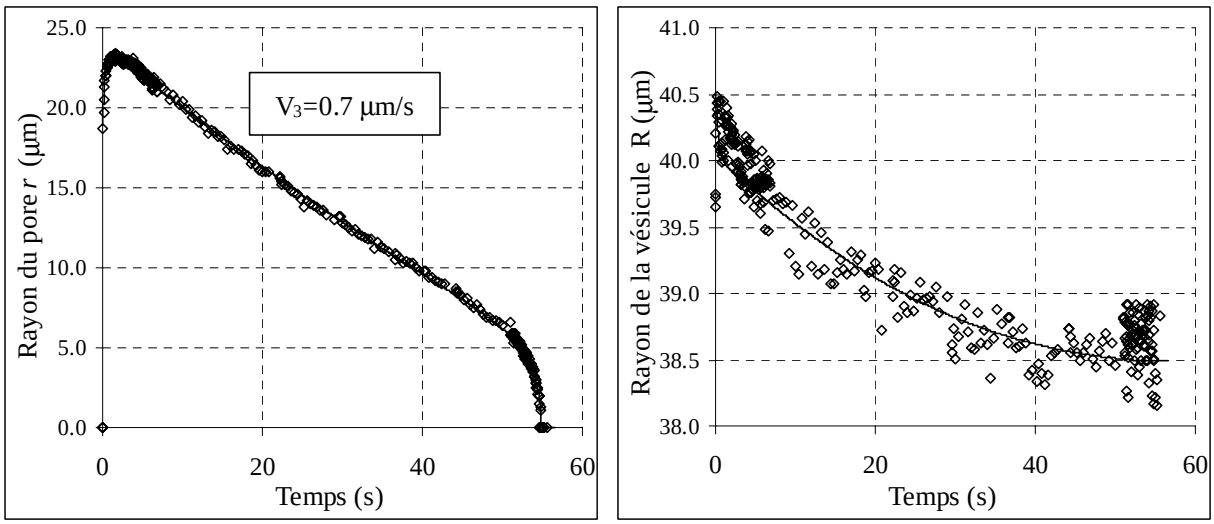


Figure 27(suite) : Ajustement des courbes complètes grâce au modèle de dissipation mixte. Les courbes ont été simulées avec les grandeurs estimées suivantes : r_c=27 µm, R_0=38.2 µm et τ=40 ms. Les autres paramètres sont donnés dans le tableau de la Figure 28. En raison de la durée de vie très longue du pore, la simulation a été conduite avec un pas temporel variable, assurant un incrément du rayon $|\delta\tilde{r}| = 5\times10^{-5}$ constant. Le rayon initial est $\tilde{r}_i = 0.65$.

La prise en compte de la dissipation en volume améliore sensiblement le début de la courbe du rayon r : l'ouverture est ralentie à l'approche du rayon maximum, qui n'est plus systématiquement surestimé. Par contre, le régime III de fermeture lente reste inchangé (comme dans la limite $\tilde{\alpha} >> 1$ examinée au paragraphe 3.3). Dans la dernière étape, quand le rayon passe en-dessous de $2\eta_s/\alpha\eta_0 = r_c/\tilde{\alpha}$, la dissipation volumique devient négligeable devant celle causée par l'écoulement dans le film lipidique. C'est pourquoi la vitesse finale est toujours donnée par $V_4 = \Im/2\eta_s$. En théorie, la viscosité de surface pourrait être déduite à partir du rapport des vitesses mesurées dans les deux régimes de fermeture :

Eq. (50)
$$\frac{V_4}{V_3} = \frac{3\pi R_0^2}{4r_m}\frac{\eta_0}{\eta_s}$$

Malheureusement, la vitesse V_4 est grande, et sa détermination très imprécise : comme l'indique la Figure 28, on ne peut trancher entre deux valeurs pourtant éloignées, 14.6 et 23.4 µm/s. La troisième courbe, simulée pour un temps de montée τ=2 ms, donne une vitesse supérieure d'un ordre de grandeur. Bien qu'elle passe par les points expérimentaux, si l'on tient compte des barres d'erreur, sa courbure paraît trop exagérée. Le coefficient de friction réduit $\tilde{\alpha}$ doit donc se situer aux alentours de 20 ou 30, mais pas plus. Avec la circonspection habituelle à garder envers les simulations à plusieurs paramètres, on peut toutefois noter que les trois courbes simulées fournissent à peu près la même valeur numérique du coefficient de friction α≈10. Il serait intéressant de comparer cette constante phénoménologique à un calcul exact de la friction visqueuse exercée par le solvant sur la membrane.

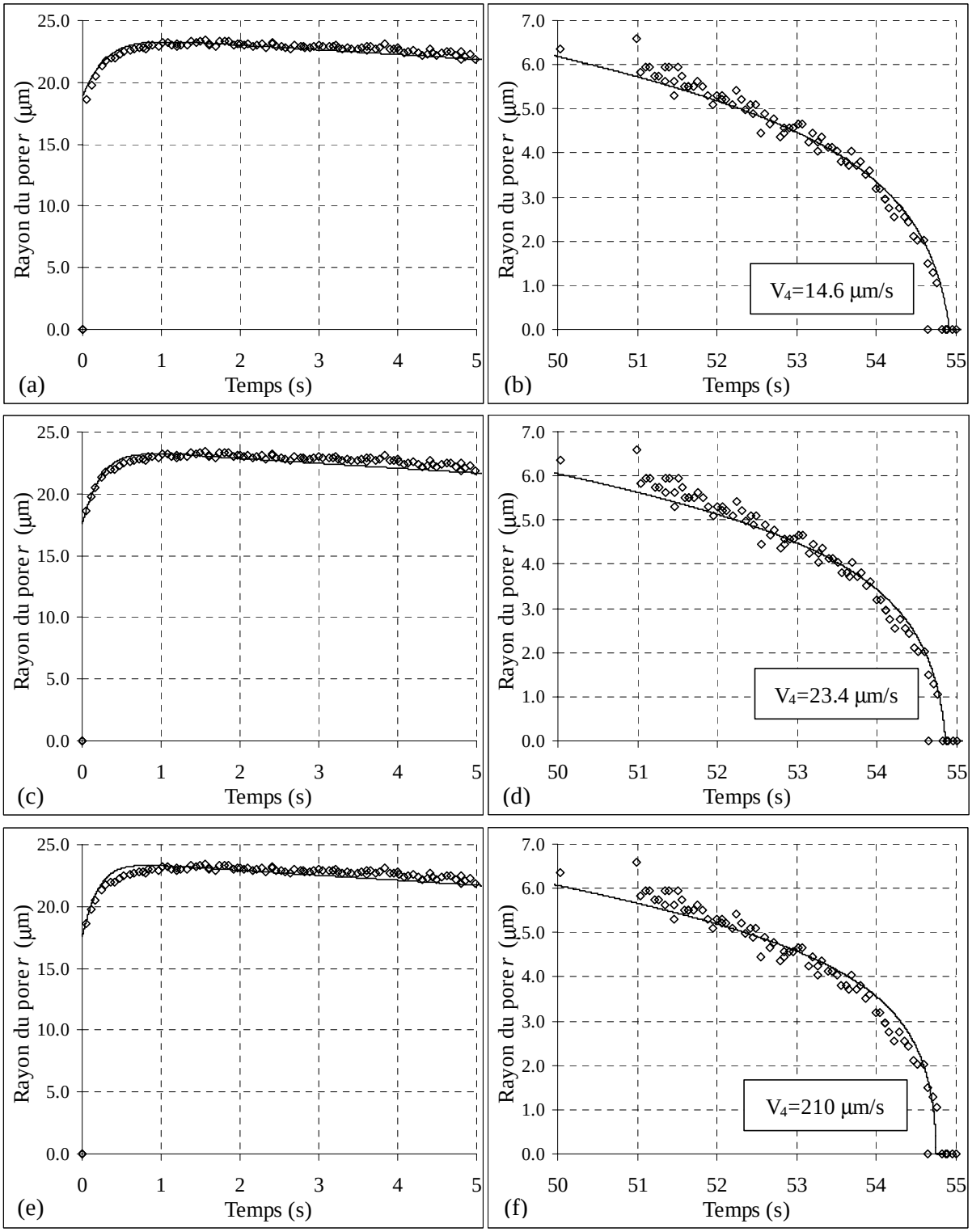


Figure 28 : Influence du temps caractéristique d'ouverture dans le modèle de dissipation mixte.

Courbe	$\tilde{\alpha}$	$\tilde{\Im}$	$\tilde{r}_L$	τ (ms)	α	$\Im$ (pN)	r_- (µm)	η_s (Ns/m)	σ_0 (N/m)	E (N/m)
(a), (b)	20	0.022	8.8	40	10.6	6.75	0.6	2.3×10^{-7}	1.2×10^{-5}	9.3×10^{-5}
(c), (d)	30	0.017	14.1	20	9.7	6.75	0.5	1.4×10^{-7}	1.4×10^{-5}	1.2×10^{-4}
(e), (f)	270	0.016	127	2	10.0	6.75	0.4	1.6×10^{-8}	1.6×10^{-5}	1.3×10^{-4}

Une autre approche pour mettre en évidence un effet de la viscosité η_s consiste à renormaliser plusieurs courbes expérimentales sur le même graphe, en divisant le rayon du pore par son maximum r_m, et le temps par sa durée totale d'existence t_{vie} (Figure 29). Dans cette représentation, les régimes III sont nécessairement superposés, du moins pour les cas où ils constituent l'essentiel du temps de vie du pore[1]. On met ainsi l'accent sur des différences éventuelles de la rupture de pente accompagnant le passage au régime IV de fermeture rapide. On a pu trouver quatre exemples, de compositions lipidiques différentes, pour lesquels les courbes se confondent, même dans les régimes rapides I et IV. Si l'on compare à une étude de la diffusion d'un marqueur fluorescent en monocouches (DPLC/chol/NBD) à l'interface eau/air[(35)], on s'attend à ce que la viscosité de surface augmente d'un facteur deux environ pour une insertion de cholestérol à 20mol%. De même, l'ancrage de chaînes PEG sur une fraction des lipides, aurait dû *a priori* augmenter la viscosité de la membrane. Toutefois, la précision de la méthode des pores transitoires s'est révélée insuffisante pour détecter un tel effet de la composition sur la viscosité de surface η_s.

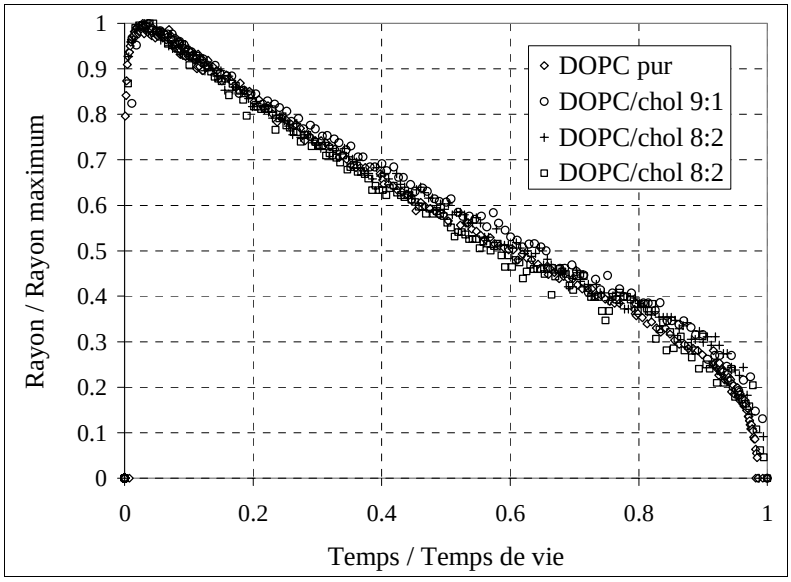


Figure 29 : Renormalisation du rayon et du temps par leurs valeurs maximales r_m et t_{vie}.

En conclusion, la vitesse de fermeture finale des pores transitoires donnerait accès en théorie à la viscosité de surface, mais en pratique la mesure est trop bruitée. Des conditions expérimentales mieux résolues en temps pourraient sans doute améliorer la précision[2]. Le modèle de pores transitoires fournit néanmoins le bon ordre de grandeur pour la viscosité de surface η_s d'une bicouche lipidique : entre

---

[1] Lorsque la cinétique est limité par la fuite, $V_3 \approx r_m / t_{vie}$, donc $\dfrac{d\, r/r_m}{d\, t/t_{vie}} \approx -1$ pendant le régime III.

[2] Certaines caméras numériques permettent actuellement d'accéder à des fréquences de balayage supérieures à 50Hz, en diminuant en contrepartie la taille du champ d'observation.

10^{-8} et 4×10^{-7} Ns/m, suivant le choix arbitraire de τ entre 1 et 40 ms. Peu de méthodes ont été décrites dans la littérature pour mesurer directement cette viscosité bidimensionnelle sur une membrane lipidique[1]. La première historiquement consiste à tirer un filament (une extension de membrane tubulaire), à partir d'une vésicule géante ou d'une cellule(36). La viscosité de surface est déduite de mesures de la vitesse d'extraction. Sur des vésicules de lécithine EPC, la méthode conduit à une distribution très large de valeurs, entre 3×10^{-9} et 10^{-7} Ns/m. Les viscosités les plus élevées sont attribuées à des vésicules multilamellaires. Une nouvelle méthode a récemment été mise au point, basée sur l'analyse des mouvements de particules sphériques piégées dans la membrane(37). Les billes de plus petits diamètres (0.8–2 μm) présentent une diffusion Brownienne à la surface de la vésicule. Par contre les plus grosses (Ø3–10 μm) sont soumises à la gravité. Une pince optique permet de lâcher une telle bille depuis le pôle supérieur de la vésicule, un peu comme dans un viscosimètre à bille macroscopique. A partir d'un modèle de friction visqueuse dans la membrane et dans le solvant, l'analyse des trajectoires donne une gamme de viscosités assez étroite : $3-7\times10^{-9}$ Ns/m, mesurée pour le phospholipide SOPC. La même plage de valeurs est obtenue avec un autre lipide, DMPC, fluide à T>24°C(38). Pour expliquer la dispersion des résultats, les auteurs avancent une explication différente de celle due à une membrane composée de plusieurs bicouches : des filaments liant les vésicules entre elles gênent la rotation d'ensemble qui doit accompagner le mouvement de la bille, ce qui a pour effet d'augmenter le coefficient de friction apparent[2]. Enfin, l'ouverture exponentielle de pores dans des films noirs lipidiques (BLM), suivie par une méthode électrique, a conduit à des valeurs de viscosité de surface $1-5\times10^{-7}$ Ns/m, pour une bicouche de phospholipides négatifs et recouverts de poly(L-lysine)(13). En l'absence de polymère adsorbé sur la membrane, la BLM s'ouvre à vitesse constante, de l'ordre de 10 cm/s, attribuée par les auteurs à un régime inertiel. Une cinétique limitée par la viscosité du solvant est plus plausible (cf. 3.3). En comparaison des résultats issus des deux premières méthodes, notre estimation de la viscosité de surface paraît surévaluée au moins d'un facteur trois. Il est possible qu'une interaction entre le glycérol du solvant et les têtes polaires des phospholipides produise un épaississement visqueux : en effet, les temps caractéristiques de rotation d'une sonde fluorescente pérylène[3], insérée dans de petites vésicules (SUV) de DOPC, sont multipliés par trois quand le solvant contient 90% de glycérol(39). Une autre explication pourrait être l'anisotropie de la viscosité de surface. En effet, le déplacement d'une bille met en jeu la viscosité de cisaillement, tandis que l'ouverture et la fermeture d'un pore produisent un écoulement élongationnel, donc mesureraient plutôt la viscosité de dilatation.

---

[1] Dans les publications, elle est souvent exprimée en unité CGS : $1\,\text{surface Poise} = 1\,\text{g/s} = 10^{-3}\,\text{kg/s} = 10^{-3}\,\text{Ns/m}$.

[2] Un moyen simple de tester cette hypothèse consisterait à sortir les vésicules de leur chambre de préparation avant de les manipuler, afin de casser ces fils qui connectent les vésicules aux électrodes et entre elles.

[3] Etude par spectroscopie de fluorescence polarisée résolue en temps.

IV.5 Mise sous tension des vésicules par fluorescence

5.1 Mécanismes responsables de la photo-induction des pores

1a) Facteurs expérimentaux

(i) Paramètres optiques

Quand on éclaire continûment une vésicule, marquée avec le colorant à transfert de charge Di-6-ASPBS, et baignant dans une solution contenant du glycérol, le scénario observé est toujours à peu près le même. On décrit ici le cas le plus défavorable pour tendre rapidement la membrane, quand la vésicule possède beaucoup de lipide excédentaire, sous forme de petites vésicules cylindriques emprisonnées à l'intérieur (Figure 30a). Dans les premières minutes, on observe que l'amplitude des ondulations de la membrane augmente fortement (b). Comme ces fluctuations sont aussi très lentes à cause de la viscosité accrue par le glycérol, on a le temps de balayer la mise au point à différentes hauteurs : en projetant ensemble les images, on obtient un rendu de la géométrie tridimensionnelle de ces ondes. Plus tard, l'excès de lipide s'est rassemblé sous forme de deux vésicules internes, dont l'une au moins semble reliée à la grande vésicule (c). Elle va progressivement fusionner avec la membrane qui l'enveloppe, tandis qu'une autre vésicule s'en approche du côté extérieur (d). La deuxième vésicule interne fusionne avec la vésicule mère, qui est alors très flasque (f). La grande vésicule se rapproche peu à peu de la forme sphérique, mais on note encore une grande amplitude des ondulations (g). Quand au final, tous les agrégats de lipide ont disparu, à l'intérieur et dans le voisinage, la vésicule peut atteindre un état parfaitement sphérique et tendu (h). La modulation de l'intensité due à la polarisation de la fluorescence est apparente, l'orientation des sondes n'étant plus moyennée par les fluctuations. C'est à partir de cet état que les pores photo-induits vont apparaître.

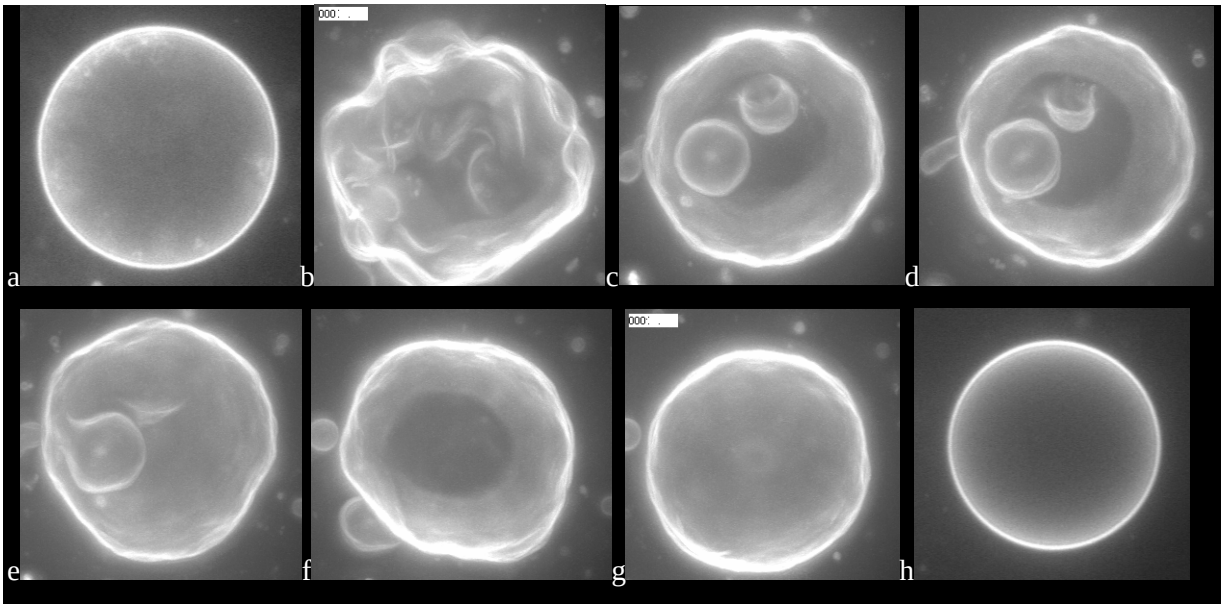


Figure 30 : Premières étapes de transformation d'un vésicule de DOPC/Di-6-ASPBS, sur laquelle est focalisé le faisceau de la lampe à vapeur de mercure. Cette mise sous tension varie entre 15 et 30 min.

Il faut attendre encore quelques minutes avant que n'apparaisse le premier pore. Il reste ouvert plusieurs secondes, puis disparaît. A partir de cet instant, d'autres pores vont s'ouvrir et se refermer à la suite, à intervalle très régulier.

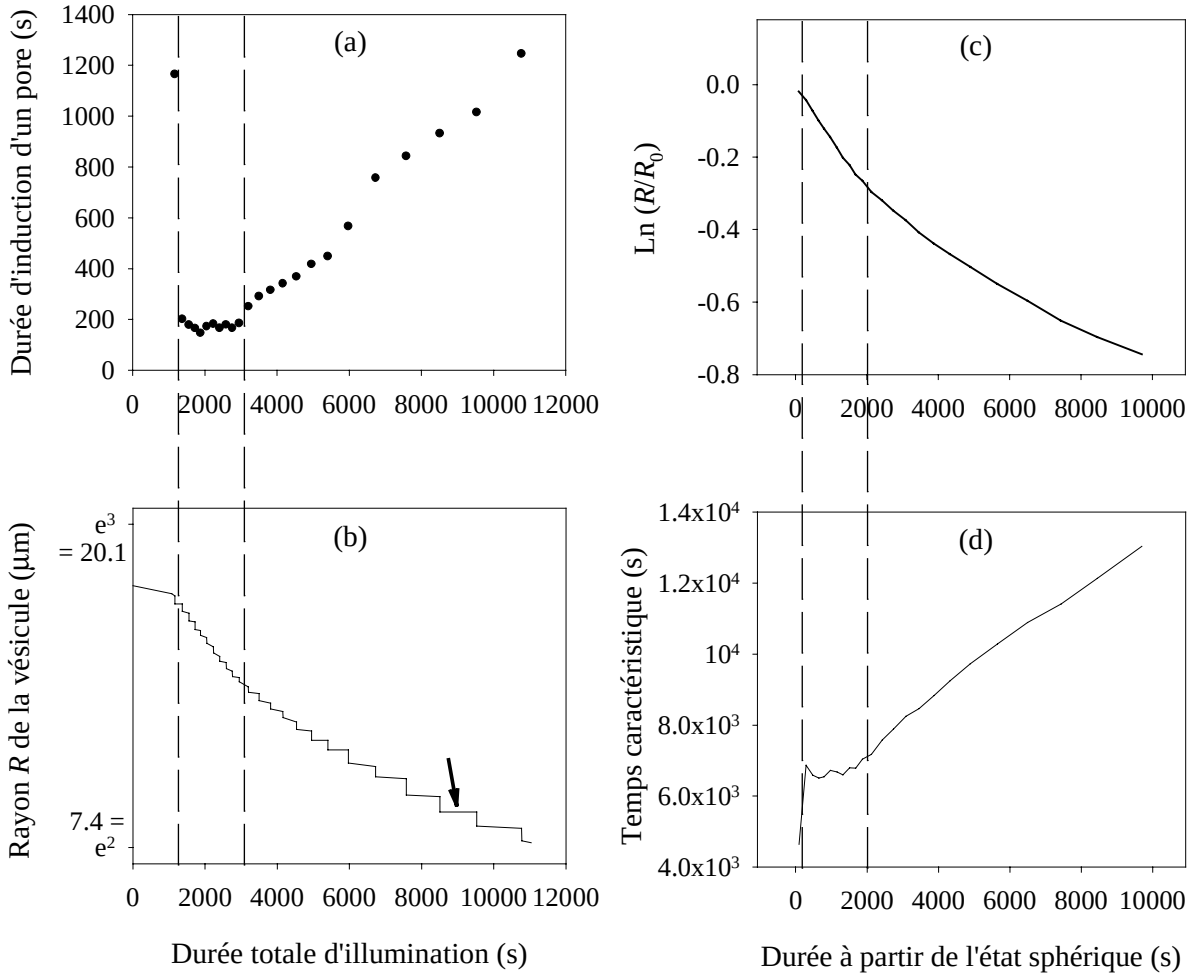


Figure 31 : Etude quantitative de la mise sous tension photo-induite d'une vésicule de DOPC/cholestérol (8/2), remplie de glucose 0.1M/glycérol 66% et suspendue dans du sucrose 0.1M/glycérol 66%/Di-6-ASPBS 2.8 µM. (a) Temps d'attente entre deux pores consécutifs ; (b) Rayon de la vésicule, en échelle logarithmique ; (c) Ln(R/R_0) où R est la moyenne des rayons de la vésicule juste avant et juste après chaque pore et R_0 est le rayon à t_0=1080 s ; (d) Temps caractéristique local de décroissance. A gauche on a porté en abscisse le temps d'éclairage depuis le début de l'expérience, à droite le temps à partir de t_0. La flèche indique l'apparition d'agrégats fluorescents.

On a porté sur la Figure 31a le délai qu'il faut attendre pour observer un pore, en fonction de la durée totale d'éclairement. On voit que pour les premiers pores (une douzaine), ce temps d'induction est relativement constant. Ce régime est signalé sur le graphe par les deux barres verticales en pointillés. Si l'on trace le rayon de la vésicule en fonction du temps (b), on obtient des marches d'escalier : les diminutions abruptes correspondent aux courtes périodes pendant lesquelles un pore est ouvert (perte de 0.4–0.5 µm en quelques secondes). Par contre, entre deux pores consécutifs, la

diminution du rayon est très faible (0.1–0.2 μm en 3 min environ). On obtient une bonne régression linéaire de la décroissance moyenne du rayon en échelle semi-logarithmique (c). Un état initial (R_0, t_0) a été choisi arbitrairement avant le premier pore, quand la vésicule a déjà atteint son état sphérique et tendu. On caractérise la décroissance du rayon à l'instant t par une constante de temps locale $\tau_i = \frac{t - t_0}{\mathrm{Ln}(R_0/R)}$. Ce temps caractéristique τ_i et la durée d'induction des pores t_i ont des évolutions relativement bien parallèles (comparer les courbes a et d), alors qu'ils sont calculés de façon indépendante (t_i par différence entre l'instant d'une ouverture et celui de la fermeture précédente, τ_i à partir du rayon R au temps t). Ils sont tous deux constants pendant la même période, puis dans un second régime, ils se mettent à augmenter linéairement avec le temps.

En outre, l'analyse des courbes permet une évaluation numérique de la tension photo-induite. En effet, entre la fermeture d'un pore et l'ouverture du suivant, le rayon de la vésicule a diminué d'un facteur $\exp(-t_i/\tau_i)$. Avec les valeurs mesurées t_i≈200 s et τ_i≈6600 s, on calcule que le rayon diminue de 3%, et donc la surface de la membrane de 6%. Cette fraction de surface qui a disparu sous l'action de la lumière est à comparer avec la portion de membrane qui peut être rendue aux fluctuations par l'ouverture d'un pore : $\sigma_0/E = \pi r_c^2/4\pi R_0^2$. Expérimentalement, les plus grands pores peuvent avoir un rayon égal à la moitié de celui de la vésicule ($r_c/R_0 \approx 1/2$, ce qui ne représente finalement qu'une ouverture angulaire de 60° dans la sphère). On évalue donc à 1/16≈0.06 la fraction de surface initialement étirée qu'un pore peut relaxer.

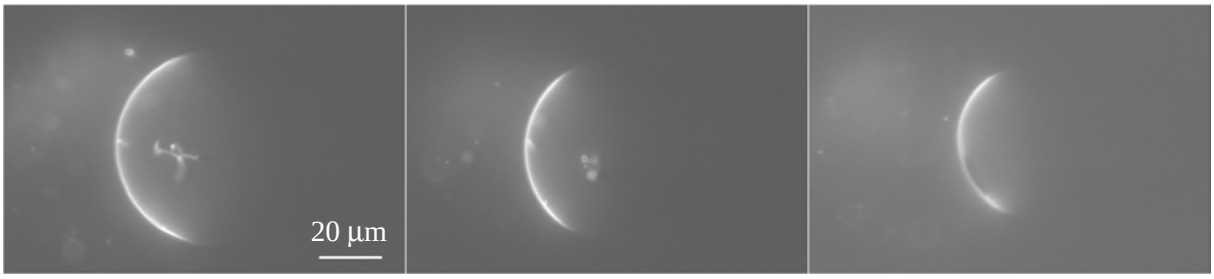


Figure 32 : Mise sous tension d'une vésicule par un éclairage partiel avec la lampe HBO, grâce au diaphragme de champ du microscope. La période d'attente avant l'apparition du premier pore a duré 1h 10min, tandis que deux pores consécutifs se sont suivis à un intervalle de 8-9 min.

L'apparition pulsée des pores serait donc liée à une variation cyclique de la tension de surface : elle croît continûment sous l'action de la lumière, jusqu'à une valeur maximale à la laquelle un pore apparaît, entraînant une relaxation rapide. Puis après sa fermeture, la tension se remet à augmenter, au même rythme (pendant le premier régime quand t_i reste constant) ou bien avec une vitesse d'induction moindre (second régime, associé à un allongement continu de t_i). La période d'induction t_i, qu'on a constatée être comprise entre 3 et 4 min sur de nombreux exemples, doit être reliée à l'énergie lumineuse absorbée par la vésicule. En éclairant avec une intensité lumineuse (c'est-à-dire une

puissance) x fois plus faible, le temps d'induction doit être augmenté par un facteur x. Bien que l'on n'ait pas vérifié quantitativement cette hypothèse, on a procédé quand même à un test qualitatif simple, où seulement une portion de la vésicule est éclairée, l'autre partie étant laissée dans l'ombre. Le résultat escompté a été observé : les pores ont toujours lieu, mais l'intervalle de répétition est plus long (environ 9 min). En outre, quand on ouvre brièvement le diaphragme pour observer la vésicule dans son ensemble, on note que les fluctuations ont été lissées aussi bien du côté caché que du côté éclairé. Malgré l'asymétrie de l'éclairage, la tension de surface est homogène, en accord avec l'état fluide de la membrane.

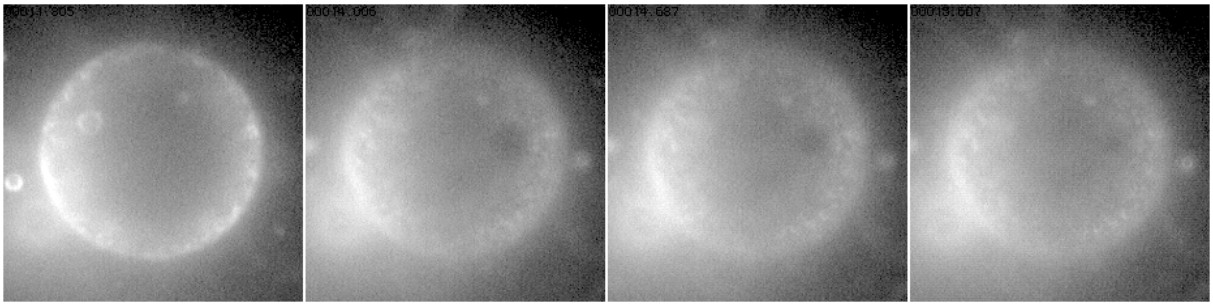


Figure 33 : Pore transitoire déclenché par focalisation d'un laser, à gauche sur la vésicule. On a utilisé pour cela un microscope doté d'un montage de pince optique (Manuel Sickert, PCC/Institut Curie).

Enfin, on s'est posé la question du rôle de la longueur d'onde d'éclairage sur le déclenchement des pores, pour voir en particulier si les rayons ultra-violets de la lampe à vapeur de mercure sont impliqués. Comme un laser continu à argon ionisé (Beamlock, Spectra Physics), accordé sur la longueur d'onde 488 nm et focalisé de manière excentrée sur des vésicules, a provoqué plusieurs ouvertures de pores (Figure 33), on peut exclure un phénomène photo-chimique déclenché par les ultra-violets. Ces pores ont eu par ailleurs des durées de vie assez courtes (environ 0.4 s). L'éclairement par laser est à rapprocher de l'expérience avec le faisceau de la lampe de fluorescence en partie masquée par un iris. Aucune tendance nette de la durée d'induction t_i n'est apparue quand on a varié la puissance du laser d'un facteur trois. Cette constatation pourrait indiquer que la tension photo-induite ne dépend pas de façon linéaire de l'intensité lumineuse. Ce serait le cas, par exemple, si l'illumination provoquait simplement un échauffement, de sorte que la température de la membrane dépasse un seuil.

(ii) Paramètre physico-chimiques

La plupart des pores présentés dans ce mémoire ont été observés grâce à un marquage fluorescent « externe », par perfusion de la sonde lipophile Di-6-ASPBS depuis la solution vers les bicouches de DOPC. Le phénomène de tension photo-induite se produit également en marquage « interne », quand le colorant est mélangé au lipide DOPC avant la préparation des vésicules. D'autres marqueurs ont permis d'observer des pores transitoires : Di-10-ASPPS (4 mol%), RH237 (marquage externe à 10 μM

ou interne à 7 et 19 mol%), de même que des phospholipides fluorescents greffés sur une chaîne hydrophobe par un groupement NBD[1] (10 mol%).

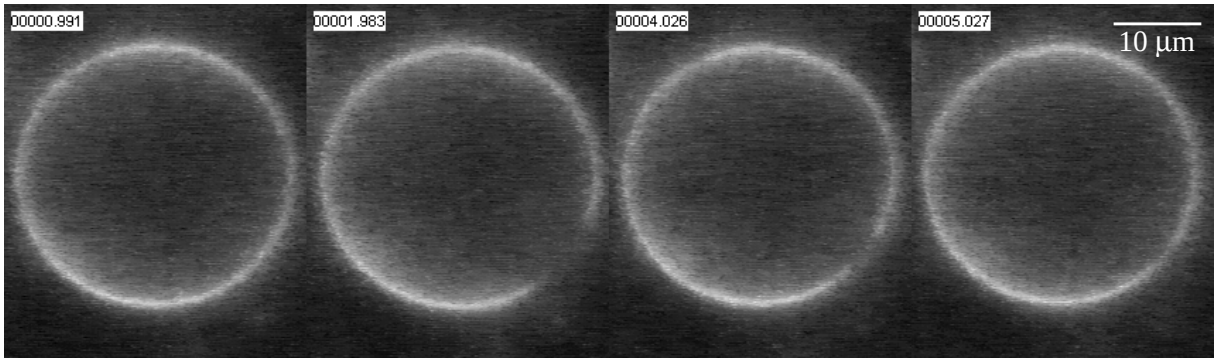


Figure 34 : Pore transitoire observé dans une vésicule de DOPC marquée à 7 mol% avec RH237, (images Erdem Karatekin et Hicham Guitouni, PCC/Institut Curie). Les tampons sucrose et glucose sont dépourvus d'azide de sodium.

Par ailleurs, on a changé la nature du solvant tout en conservant une viscosité d'environ 30 cPoise. Pour cela, le glycérol 66% est remplacé par une solution sirupeuse, du sucrose très concentré (2M soit 56% en poids). Cet exemple a permis de tester un cas asymétrique, quand la viscosité est moins élevée à l'extérieur (glucose 2M, 32% en poids, environ 3 cP) qu'à l'intérieur des vésicules (sucrose 2M, 30 cP). Qualitativement, les temps de vie des pores transitoires sont plus courts que dans le cas symétrique (une seconde tout au plus). La situation opposée, dans laquelle la viscosité interne (3 cP) est inférieure à celle du milieu externe (30 cP), n'a pas permis de déceler de pores de taille visible. Cependant, ces expériences de contraste entre les viscosités interne est externe ne sont pas totalement concluantes. En effet, à la différence des viscosités s'ajoute un écart des pressions osmotiques, celle du sucrose 2M étant plus élevée que pour le glucose 2M.

1b) Tension photo-induite : la piste moléculaire…

Pour expliquer l'apparition des pores transitoires sous une illumination prolongée, les molécules fluorescentes semblent constituer des suspects idéaux. Mais comme la disparition de surface est estimée à 6% en quelques minutes, la tension photo-induite ne peut être uniquement imputée à l'expulsion des marqueurs. L'aire de membrane perdue devait comporter initialement aussi des phospholipides. Sinon, l'intensité de fluorescence diminuerait au cours du temps, ce qui n'est pas le cas, du moins pendant la phase où les pores se succèdent à intervalles réguliers. De toutes façons, les taux de marquage fluorescent n'excèdent pas quelques pourcents. On examine alors différentes hypothèses qui pourraient rendre compte de l'interaction entre la lumière et la membrane :

[1] Erdem Karatekin, étude en cours

(i) réaction photo-chimique

Une partie de l'énergie lumineuse absorbée par les sondes pourrait servir à initier des réactions chimiques. Comme on n'observe pas de photo-blanchiment (le niveau de fluorescence est relativement constant), la réaction impliquerait plutôt les phospholipides : oxydation des chaînes grasses (en particulier si elles sont insaturées) ou rupture des liaisons esters du glycérol. Des produits de dégradation solubles permettraient d'expliquer la disparition de membrane. L'excitation directe des phospholipides par la lumière n'est pas possible, car ils ne possèdent pas de bande d'absorption dans le visible, alors que les pores sont apparus avec des fluorophores excités à différentes longueurs d'onde. Les molécules fluorescentes serviraient ainsi de relais pour initier ces réactions. Cette hypothèse serait définitivement écartée si l'on montrait que les vésicules rétrécissent sous éclairement intense, en l'absence de marqueur.

(ii) expulsion des sondes de la membrane

Les colorants (aminostyryl)piridinium sont des molécules lipophiles insérées entre les phospholipides. Nonobstant leur forte affinité pour les vésicules, dont ils représentent entre 4 et 7 mol% de la membrane, ils peuvent repasser dans le milieu volumique. La fraction de colorants en solution en équilibre avec la phase lipidique a été estimée à environ 10% (cf. III–2.1). En excitant continûment la fluorescence, on force les molécules à osciller à fréquence optique entre l'état fondamental et l'état excité. On a déjà fait remarquer que le décalage vers le bleu du maximum de fluorescence en membrane correspond à une déstabilisation de l'état excité, à cause du transfert de charge vers l'intérieur de la bicouche. On pourrait donc craindre que le coefficient de partage des sondes entre la bicouche et la solution, moyenné sur les deux états, devienne moins favorable à la membrane sous une illumination intense. Comme en plus le solvant contient 66% de glycérol en volume, il possède une constante diélectrique plus faible que l'eau pure, et cet effet de solubilisation des sondes initiée par la fluorescence pourrait être amplifié. Afin de valider l'hypothèse, il faudrait détecter des variations de la fraction des sondes fluorescentes en solution, par exemple par le titrage fluorimétrique décrit au paragraphe III–2.1. Le test serait concluant si l'on montrait une diminution de la fluorescence totale (par sortie des chromophores dans la solution polaire), qu'on distingue d'un photo-blanchiment grâce à une remontée de la fluorescence de l'échantillon replacé à l'obscurité. Un tel remarquage lent des vésicules a d'ores et déjà été constaté sur les images de microscopie de fluorescence[1].

[1] Sur des images de microscopie à deux photons, plus quantitatives que celles issues d'un microscope classique, on a mesuré une hausse de 10% de la fluorescence d'une vésicule en 30 min (dans un milieu de viscosité 1 cP).

(iii) photoisomérisation cis/trans et agrégation des chromophores

Plusieurs études ont montré que l'on pouvait augmenter la perméabilité de petites vésicules (SUV) sous illumination, en utilisant l'isomérisation *cis*/*trans* de chromophores de la famille de l'azobenzène (C_6H_5–N=N–C_6H_5) : libération de carboxyfluorescéine initialement contenue dans des vésicules de phospholipides dont certains ont leurs deux chaînes substituées par un groupement azobenzène[40], augmentation d'un facteur 5 de la perméabilité aux ions K^+ dans des vésicules de dicétylphosphate et d'une marqueur lipophile azobenzène[41], etc.. A partir de leur état le plus stable, de géométrie *trans*, les groupements azobenzènes peuvent être convertis en configuration *cis* par une irradiation ultra-violette, à leur maximum d'absorption (λ_{abs}≈325 nm)[1]. Ces chromophores provoquent une déstabilisation des bicouches et une fuite du contenu, initiée par la lumière, à condition que leur densité surfacique soit suffisamment élevée (plus de 10 mol% des lipides). Les auteurs s'accordent sur le fait que les chromophores forment alors des agrégats organisés quand la double liaison qui lient les deux noyaux aromatiques est en configuration *trans*[42]. Ces structures sont détruites quand on provoque l'isomérisation sous la forme *cis*. Deux arguments expérimentaux vont à l'encontre de ce mécanisme dans le cas de nos marqueurs :

– le spectre d'absorption comporte toujours une seule bande (même après une irradiation intense), et ne révèle donc pas clairement deux populations différentes de molécules *cis* et *trans*. Les colorants (aminostyryl)piridinium sont en effet constitués autour d'un noyau stilbène (C_6H_5–CH=CH–C_6H_5) et non azobenzène[2] ;

– les concentrations de colorants utilisées (de 4 à 6–7 mol%) sont plus faibles que le seuil requis pour former des agrégats (>10 mol%). Or la photoisomérisation de molécules isolées ne suffirait pas à provoquer une déstabilisation importante de la bicouche (d'après la littérature sur les azobenzènes). Une étude de l'agrégation en fonction de la concentration a été décrite pour les molécules Di-6-ASPPS[43] : la fluorescence en vésicules croît linéairement avec la concentration de marquage jusqu'à 10 μM ; pour des bains d'incubation plus concentrés, on note un écart à la linéarité suivi d'une décroissance, de sorte que l'intensité de fluorescence passe par un maximum situé vers 18 μM, qu'on convertit en une concentration membranaire de 11 mol%. Cette extinction de la fluorescence (quenching) est une signature de la formation d'agrégats. Dans un échantillon marqué à 19 mol% avec RH237, on a observé à l'oculaire du microscope un changement de couleur de la fluorescence : en quelques secondes d'illumination, les vésicules passaient du rouge au jaune. Un tel décalage vers le bleu du pic d'émission pourrait être dû à l'agrégation des chromophores. Il s'agit cependant d'un

---

[1] Le retour à la forme *trans* se fait soit spontanément par voie thermique, soit de manière accélérée en irradiant au maximum d'absorption de la molécule *cis* (λ_{abs}≈450 nm).

[2] On peut expliquer avec les mains que, malgré la mésomérie, la liaison entre les deux carbones possède un caractère double plus prononcé que celle entre deux atomes d'azote, et donc l'isomérisation est plus difficile.

phénomène marginal, déconnecté de la mise sous tension des vésicules qui s'opère déjà à faible concentration en marqueur. D'ailleurs, les cinétiques de disparition de surface[1] n'ont pas montré de différence significative entre 7 et 19 mol% de RH237.

(iv) transition de phase des phospholipides

Ainsi la piste des fluorophores s'est-elle révélée trompeuse, de sorte que l'on est donc tenté d'incriminer les phospholipides eux-mêmes. L'hypothèse est hardie, mais corrobore une étude sur la stabilité des vésicules géantes(44), formées à partir de phosphocholine naturelle (lécithine d'œuf) ou artificielle (DOPC). Alors que certaines préparations peuvent être conservées plusieurs semaines à 4°C sans modification apparente, d'autres au contraire se dégradent, et au bout de quelques jours ne contiennent plus que des débris de lipide. Les enregistrements vidéos montrent que l'effondrement d'une vésicule est un événement extrêmement rapide[2]. Au contraire des vésicules stables, dont la membrane apparaît fluctuante, mais sans défaut visible au microscope optique, celles qui disparaissent sont initialement sphériques et tendues, et surtout présentent en maints endroits des points noirs de Ø 1 à 2 µm. Au fur et à mesure que la vésicule géante se dégonfle, elle semble se faire « dévorer » par les petites particules qui la décorent. Ce faisant, leur teinte en contraste de phase passe du noir au blanc brillant, ce qui signifie que la densité volumique du lipide à l'intérieur des particules augmente. Le solvant n'occuperait ainsi que 70% du volume dans cette structure lipidique concentrée. Les auteurs avancent l'hypothèse selon laquelle il existerait une phase cubique L_3, plus stable que la phase lamellaire diluée L_α. En microscopie électronique, des échantillons de DOPC dispersés globalement à 2% dans l'eau montrent d'une part des vésicules unilamellaires classiques, d'autre part des membranes très froissées, remplies d'une structure lipidique granuleuse(45). Les images semblent bien indiquer un enchevêtrement de bicouches, dont les rayons de courbure et les distances de séparation se situent à environ 6 nm. Cette superstructure correspondrait à une phase cubique bicontinue. Lorsqu'on déclenche une série de pores transitoires dans une vésicule, marquée aussi bien avec RH237 que Di-6-ASPBS, on remarque parfois, en fin d'expérience, des points chauds répartis à différents endroits de la surface (Figure 35, vue en projection). Ces accroissements très localisés de la concentration en sonde fluorescente s'expliqueraient bien par la présence de petites particules très denses en lipide, issues de l'effondrement de la bicouche.

[1] Mesures analogues à celles de la Figure 31 : Hicham Guitouni, mémoire de Maîtrise, Université Paris 6 (2000).

[2] Les auteurs mentionnent un effet de bougé sur la première image, également observé pour les pores transitoires.

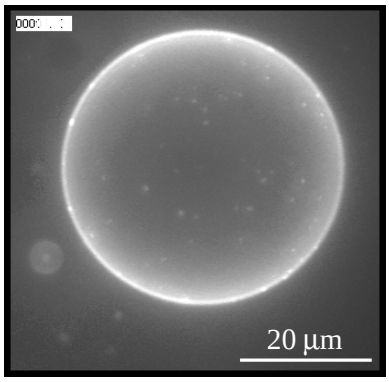


Figure 35 : Agrégats fluorescents à la surface d'une vésicule de DOPC/cholestérol (8/2), observés après de nombreux pores (pour la vésicule de la Figure 31, leur apparition est signalée par la flèche).

La tension photo-induite des vésicules posait l'énigme de la disparition des phospholipides. La dernière interprétation permet de résoudre ce mystère, sans faire appel à une dégradation chimique ni à une solubilisation, mais seulement à une propriété intrinsèque des lipides de type phosphocholine : la membrane s'effondre sur elle-même, en de multiples repliements. Reste à comprendre pourquoi l'irradiation lumineuse déclenche le phénomène. Une étude récente[46] réalisée sur un autre lipide neutre, mais de plus non ionique, le digalactosyldiacylglycérol, a révélé une séparation entre deux phases lipidiques, l'une concentrée, l'autre dispersée, au-dessus d'une température de transition $T_c \approx 24°C$. Si l'hypothèse d'Helfrich est exacte, les bicouches planes de DOPC seraient seulement métastables. Dans ce cas, les fluorophores ne serviraient qu'à provoquer un échauffement très local au niveau de la membrane (une partie de l'énergie lumineuse est toujours dissipée sous forme de chaleur, à cause d'une fraction de désexcitation non radiative des molécules fluorescentes). Ce gain d'agitation thermique précipiterait la bicouche vers sa phase cubique dense.

On pourrait imaginer observer nos vésicules, après illumination intense, au microscope électronique. La tâche risque cependant d'être très longue : il faudrait focaliser la lumière pendant 1 h environ sur chaque vésicule de la préparation, qui en compte des centaines…

5.2 Nucléation des pores

La position du pore à la surface de la vésicule est la plupart du temps aléatoire (Figure 19), ce qui oblige à ajuster la mise au point dès que la présence d'un pore est décelée par un léger tressaillement de la vésicule. Quand le pore n'apparaît jamais deux fois de suite au même endroit, on pourrait penser à un processus de nucléation homogène : une simple fluctuation thermique fragilisant la bicouche serait l'élément déclencheur. Il faut cependant se méfier, car la rotation aléatoire de la vésicule conduirait au même résultat. Dans d'autres cas, plusieurs pores se sont ouverts successivement à la même position. Un défaut nucléateur particulier est parfois clairement identifié : petite vésicule proche, micropipette de verre, agrégat très fluorescent collé à la membrane (peut-être constitué de phase lipidique dense). La taille des germes doit dépasser le rayon minimum d'ouverture

$r_{-} = \Im/\sigma_0 \approx 10^{-11}/10^{-5}$ m soit 1 µm environ. L'énergie à franchir ($E^{\max} = \pi \Im^2/\sigma_0$) représente alors $10^4 kT$. Les études statistiques de ruptures irréversibles vues au paragraphe 4.3b) font intervenir des barrières de l'ordre de $10^2 kT$ (soit 250 kJ/mol), hauteur franchissable par nucléation homogène. Dans le cas des pores transitoires, qui apparaissent à tension cent fois plus faible, la nucléation hétérogène est beaucoup plus probable.

On note cependant que la hauteur de la barrière énergétique varie rapidement avec la tension de ligne (en $\Im^2$). Or celle-ci est diminuée par des impuretés dans la membrane, en particulier des produits de dégradation des lipides. La présence de phospholipides monocaténaires (lysoPC), en concentration aussi faible que 1 µM, diminue d'un facteur trois environ la tension de ligne, mesurée par la statistique de rupture d'une BLM[12]. De même, ils abaissent la tension seuil de rupture dans une expérience de micropipettes[47]. L'énergie d'activation doit en effet diminuer d'environ un ordre de grandeur.

IV.6 Expulsion d'objets encapsulés à travers les pores

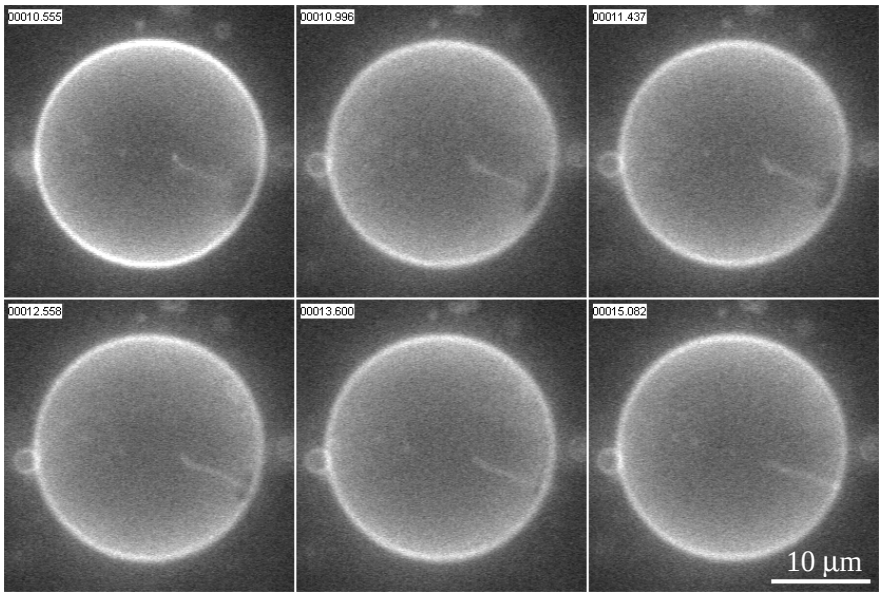


Figure 36 : Alignement d'un filament de membrane par le flux de sortie à travers un pore, dans une vésicule dont la bicouche contient 10 mol% de phospholipides liés à une chaîne de PEG_{2000}.

L'étanchéité présupposée des vésicules géantes a été mise à mal par notre étude des pores transitoires, qui apparaissent quand leur membrane est étirée par une faible tension, $\sigma \approx 10^{-5}$ N/m. Différentes expériences tirant partie de ces ouvertures déclenchées peuvent être imaginées. A l'inverse de l'électroporation, grâce à laquelle de l'ADN étranger est introduit à l'intérieur des cellules, la mise sous tension des vésicules pourrait faire sortir des objets, comme des macromolécules. Les lignes de courant sont en effet dirigées vers l'extérieur, à travers le pore. On a essayé d'utiliser des billes

fluorescentes (Ø 0.1–1 μm), comme traceurs de flux. Cependant, l'adhésion du latex sur la bicouche pose problème, surtout lorsque la vésicule contient un grand nombre de billes encapsulées (II–1.4d).

La préparation de vésicules géantes contenant des brins d'ADN fluorescents a conduit, après quelques essais, à des résultats préliminaires intéressants (II–1.4e). Une étude est en cours pour observer ces vésicules sous tension[1] :

- par adhésion sur une surface couverte de poly(L-lysine) ;
- par illumination d'une partie de la membrane, marquée par un colorant membranaire (RH237) dont la fluorescence (rouge) est bien différentiée de celle de l'ADN (YOYO-1 vert).

Un phénomène intéressant a été observé lorsque les vésicules éclatent sur le verre : l'ADN est étiré, avant de se coller lui aussi sur la poly(L-lysine). Plusieurs brins d'ADN contenus dans la même vésicule forment, après étalement, une figure pareille aux rayons d'une roue de vélo… La sortie d'un filament de membrane, à travers un pore photo-induit, s'est accompagné d'un alignement du tube lipidique parallèlement au flux (Figure 36). Qu'en serait-il avec un brin d'ADN ? Peut-être la friction visqueuse serait-elle suffisante pour le débobiner pendant sa sortie…

[1] Erdem Karatekin, PCC / Institut Curie

IV.7 Références du Chapitre IV

1. Nachury, M. V. & Weiss, K. The direction of transport trough the nuclear pore can be inverted. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 9622-9627 (1999).
2. Kakorin, S., Redeker, E. & Neumann, E. Electroporative deformation of salt fileld lipid vesicles. *Eur. Biophys. J.* **27**, 43-53 (1998).
3. Harbich, W. & Helfrich, W. Alignment and opening of giant lecithin vesicles by electric fields. *Z. Naturforsch.* **34a**, 1063-1065 (1979).
4. Zhelev, D. V. & Needam, D. Tension-stabilized pores in giant vesicles: determination of pore size and pore line tension. *Biochim. Biophys. Acta* **1147**, 89-104 (1993).
5. Bradley, J.-C., Guedeau-Boudeville, M.-A., Jandeau, G. & Lehn, J.-M. Toposomes bearing stable perforations by the action of an electric field on partially polymerized giant vesicles. *Langmuir* **13**, 2457-2462 (1997).
6. Chang, D. C. & Reese, T. S. Changes in membrane structure induced by electroporation as revealed by rapid-freezing electron microscopy. *Biophys. J.* **58**, 1-12 (1990).
7. Tekle, E., Astumian, R. D. & Chock, P. B. Selective and asymmetric molecular transport across electroporated cell membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 11512-11516 (1994).
8. Park, P. J. & Sung, W. Polymer release out of a spherical vesicle through a pore. *Phys. Rev. E* **57**, 730-734 (1998).
9. de Gennes, P.-G. Passive entry of a DNA molecule into a small pore. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 7262-7264 (1999).
10. Chang, D. C. *Structure and dynamics of electric field-induced membrane pores as revealed by rapid-freezing electron microscopy* in *Guide to Electroporation and Electrofusion* (eds. Chang, D. C., Chassy, B. M., Saunders, J. A. & Sowers, A. E.) 9-27 (Academic Press, San Diego, 1992).
11. Saitoh, A., Takiguchi, K., Tanaka, Y. & Hotani, H. Opening-up of liposomal membranes by talin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 1026-1031 (1998).
12. Chernomordik, L. V., Kozlov, M. M., Melikyan, G. B., Abidor, I. G., Markin, V. S. & Chizmadzhev, Y. A. The shape of lipid molecules and monolayer membrane fusion. *Biochim. Biophys. Acta* **812**, 643-655 (1985).
13. Diederich, A., Bähr, G. & Winterhalter, M. Influence of polylysine on the rupture of negatively charged membranes. *Langmuir* **14**, 4597-4605 (1998).
14. Schuster, B., Sleytr, U. B., Diederich, A., Bähr, G. & Winterhalter, M. Probing the stability of S-layer-supported planar lipid membranes. *Eur. Biophys. J.* **28**, 583-590 (1999).
15. Bivas, I. Pores and their numbers in bilayer lipid membranes. *J. Physique Lett.* **46**, L-513 - L-521 (1985).
16. Bivas, I. Molecular theory of the lifetime of black lipid membranes. *J. Colloid Interface Sci.* **144**, 63-71 (1990).
17. Shillcock, J. C. & Seifert, U. Thermally induced proliferation of pores in a model fluid membrane. *Biophysical Journal* **74**, 1754-1766 (1998).
18. Neu, J. C. & Krassowska, W. Asymptotic model of electroporation. *Phys. Rev. E* **59**, 3471-3482 (1999).

19. Taupin, C., Dvolaitzky, M. & Sauterey, C. Osmotic-Pressure Induced Pores in Phospholipid Vesicles. *Biochemistry* **14**, 4771-4775 (1975).

20. Sens, P. & Safran, S. A. Pore formation and area exachange in tense membranes. *Europhys. Lett.* **43**, 95-100 (1998).

21. Isambert, H. Understanding the electroporation of cells and artificial bilayer membranes. *Phys. Rev. Lett.* **80**, 3404-3407 (1998).

22. Moroz, J. D. & Nelson, P. Dynamically stabilized pores in bilayer membranes. *Biophys. J.* **72**, 2211-2216 (1997).

23. Guedeau-Boudeville, M.-A., Jullien, L. & di Meglio, J.-M. Drug delivery: piercing vesicles by their adsorption onto a porous medium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 9590-9592 (1995).

24. Bernard, A.-L., Guedeau-Boudeville, M.-A., Sandre, O., Palacin, S., di Meglio, J.-M. & Jullien, L. Permeation through lipid bilayers by adhesion of giant vesicles on decorated surfaces. *Langmuir* **16**, 6801-6808 (2000).

25. Bernard, A.-L. in *Thèse de Chimie Physique: Perméabilité de bicouches lipidiques vésiculaires soumises à une déformation: perceuse moléculaire et autres exemples* (Univ. Paris 6, Pierre et Marie Curie, Paris, 1999).

26. Sandre, O., Moreaux, L. & Brochard-Wyart, F. Dynamics of transient pores in stretched vesicles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 10591-10596 (1999).

27. Debrégeas, G., de Gennes, P.-G. & Brochard-Wyart, F. The life and death of "bare" viscous bubbles. *Science* **279**, 1704-1707 (1998).

28. Debrégeas, G., Martin, P. & Brochard-Wyart, F. Viscous bursting of suspended films. *Phys. Rev. Lett.* **75**, 3886-3889 (1995).

29. Dalnoki-Veress, K., Nickel, B. G., Roth, C. & Dutcher, J. R. Hole formation and growth in freely standing polystyrene films. *Phys. Rev. E* **59**, 2153-2156 (1999).

30. Happel, J. & Brenner, H. *Axisymmetrical flow* in *Low Reynolds number hydrodynamics* (ed. Nijhoff, M.) 97-158 (Kluwer Academic Pub., The Hague, 1983).

31. Brochard-Wyart, F., de Gennes, P. G. & Sandre, O. Transient pores in stretched vesicles: role of leak-out. *Physica A* **278**, 32-51 (2000).

32. Needam, D. & Nunn, R. S. Elastic deformation and failure of lipid bilayer membranes containing cholesterol. *Biophys. J.* **58**, 997-1009 (1990).

33. Evans, E. & Ludwig, F. Dynamics strengths of molecular anchoring and material cohesion in fluid biomembranes. *J. Phys.: Condens. Matter* **11**, 1-6 (1999).

34. Brochard-Wyart, F., de Gennes, P.-G. & Pfeuty, P. Surface tension and deformations of membrane structures: relation to two-dimensional phase transitions. *J. Physique* **37**, 1099-1104 (1976).

35. Tanaka, K., Manning, P. A., Lau, V. K. & Yu, H. Lipid lateral diffusion in dilauroylphosphatidylcholine/cholesterol mixed monolayers at the air/water interface. *Langmuir* **15**, 600-606 (1999).

36. Waugh, R. E. Surface viscosity measurements from large bilayer vesicle tether formation. *Biophys. J.* **38**, 19-37 (1982).

37. Dimova, R., Dietrich, C., Hadjiisky, A., Danov, K. & Pouligny, B. Falling ball viscosimetry of giant vesicle membranes : Finite-size effects. *Eur. Phys. J. B* **12**, 589-598 (1999).

38. Dimova, R., Danov, K., Pouligny, B. & Ivanov, I. B. Drag of a solid particle trapped in a thin film or at an interface : Influence of surface viscosity and elasticity. *J. Colloid Interface Sci.* **226**, 35-43 (2000).

39. Johansson, L. B.-Å. et al. Phase equilibria and formation of vesicles of dioleoylphosphatidylcholine in glycerol/water mixtures. *Biochim. Biophys. Acta* **1149**, 285-291 (1993).

40. Song, X., Perlstein, J. & Whitten, D. G. Photoreactive supramolecular assemblies: aggregation and photoisomerization of azobenzene phospholipids in aqueous bilayers. *J. Am. Chem. Soc.* **117**, 7816-7817 (1995).

41. Lei, Y. & Hurst, J. K. Photoregulated potassium ion permeation through dihexadecyl phosphate bilayers containing azobenzene and stilbene surfactants. *Langmuir* **15**, 3424-3429 (1999).

42. Whitten, D. G., Chen, L., Geiger, H. G., Perlstein, J. & Song, X. Self-assembly of aromatic-functionalized amphiphiles: the role and consequences of aromatic-aromatic noncovalent interactions in building supramolecular aggregates and novel assemblies. *J. Phys. Chem. B* **102**, 10098-10111 (1998).

43. Loew, L. M. & Simpson, L. L. Charge-shift probes of membrane potential. A probable electrochromic mechanism for p-aminostyrylpyridinium probes on a hemispherical lipid bilayer. *Biophys. J.* **34**, 353-365 (1981).

44. Kummrow, M. & Helfrich, W. Collapse of giant phosphatidylcholine vesicles. *Chem. Phys. Lipids* **79**, 147-156 (1996).

45. Klösgen, B. & Helfrich, W. Cryo-transmission electron microscopy of a superstructure of fluid dioleoylphosphatidylcholine (DOPC) membranes. *Biophys. J.* **73**, 3016-3029 (1997).

46. Helfrich, W., Klosgen, B. & Thimmel, J. The fragmented state of lipid bilayers in water: discovery of a lower consolute point. *Pramana-J. Phys.* **53**, 13-23 (1999).

47. Zhelev, D. V. Material property characteristics for lipid bilayers containing lysolipid. *Biophys. J.* **75**, 321-330 (1998).

Chapitre V: Adhésion des vésicules tendues

De par leur très faible résistance aux déformations, due principalement à l'énergie de courbure, les vésicules géantes peuvent être vues comme des capteurs de forces minimes, typiquement de l'ordre de $\sqrt{K_b\sigma} \approx \sqrt{10^{-19-7}}$ N, soit une fraction de pN. En d'autres termes, ce sont des ressorts de raideur très faible. Elles sont couramment soumises aux mêmes forces intermoléculaires qu'on rencontre dans les systèmes colloïdaux classiques (Van der Waals, électrostatique, stérique, etc..). A celles-ci s'ajoutent des interactions supplémentaires, d'origine entropique, qui sont liées à la fluidité de la bicouche lipidique : à la différence de la surface d'un solide, une membrane possède d'une part une mobilité des molécules dans le plan (qui autorise des séparations de phase), d'autre part des fluctuations thermiques transverses de grande amplitude. Les différentes interactions qui agissent entre deux surfaces, dont l'une au moins est une membrane lipidique, seront présentées brièvement. Une bibliographie détaillée des nombreux travaux sur ce sujet peut être trouvée dans la référence [(1)]. Ce dernier chapitre présente, de manière surtout descriptive, des expériences d'adhésion de vésicules géantes : entre elles, sur des substrats solides, ou bien les deux simultanément. Dans la deuxième partie, nous verrons l'augmentation de perméabilité induite par l'adhésion sur une surface, renforcée par des homogénéités chimiques contrôlées. La troisième section aborde les interactions entre deux membranes libres. Suivant leurs types, l'adhésion de deux vésicules géantes peut être stable, ou bien conduire à leur fusion complète. Dans ces cas, les bicouches passent par une étape intermédiaire « d'hémifusion ». Ce réarrangement fin des molécules de lipides a pu être mis en évidence par une simple observation des doublets de vésicules au cours du temps. Enfin, nous présenterons des résultats préliminaires sur la préparation de vésicules décorées par des protéines d'adhésion : les cadhérines.

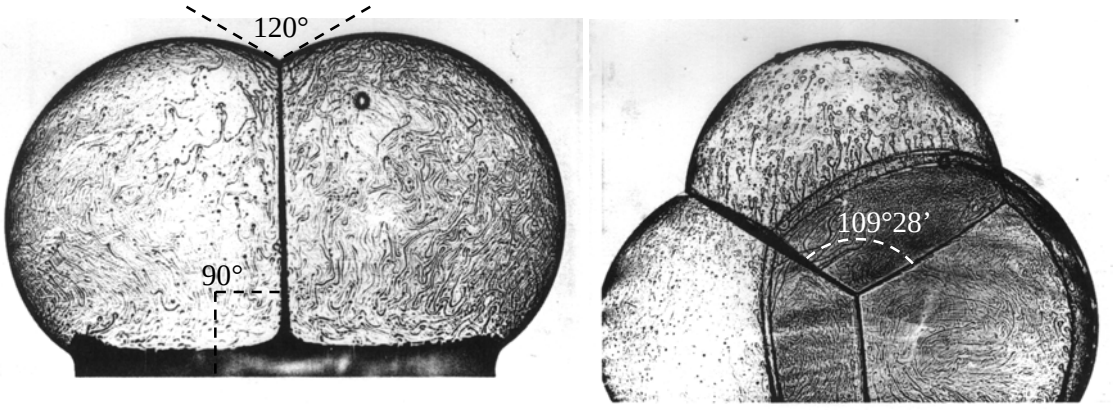


Figure 1 : Bulles de savon[(2)]. Les angles respectent les règles de Plateau.

Par delà leur aspect esthétique, les figures 1 à 3 illustrent l'analogie entre un agrégat de vésicules et une mousse de savon polyhédrique. Pour ces dernières, ont sait que les angles entre les films d'eau et de tensioactif séparant les bulles d'air ne peuvent prendre que certaines valeurs : 90°, 120° ou 109°28'.

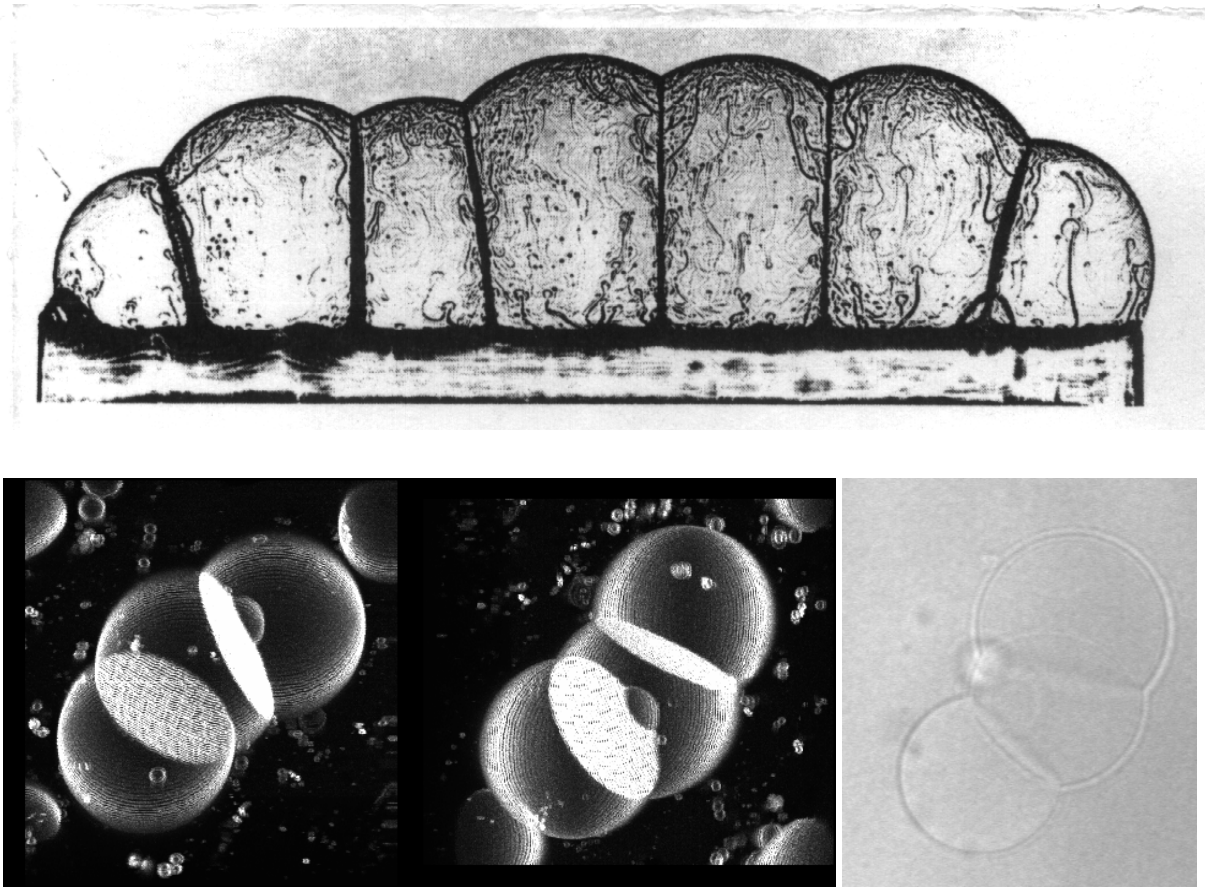


Figure 2 : Chenille avec des bulles (en haut) et avec des vésicules (en bas). L'adhésion des vésicules de DOPC entre elles est provoquée par des ions calcium (0.5 mM). La paroi de verre, couverte de poly(L-lysine), est alors répulsive.

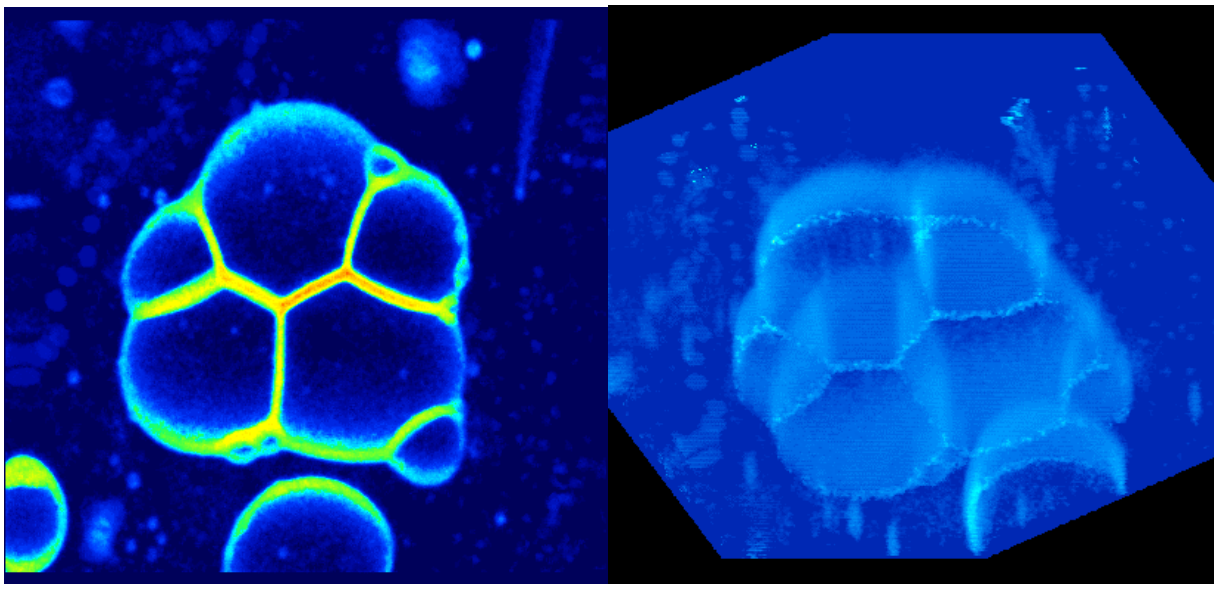


Figure 3 : Mousse de vésicule, imagée au microscope à 2 photons (en mode TPEF). Dans ce cas, l'adsorption de poly(L-lysine) sur le verre fait adhérer les vésicules de DOPC à la surface et entre elles (adhésion induite par la tension, sans calcium).

Sur le triplet de la Figure 2, reconstruit dans l'espace, les parois entre deux vésicules apparaissent comme des disques plats. D'après la loi de Laplace, les pressions des solutions internes doivent être égales. Comme les rayons de courbure des trois vésicules sont à peu près identiques, on déduit que leurs tensions de surface le sont également. En bas, le regroupement de vésicules, qui collent par ailleurs à la lame de verre, permet d'observer des angles de 120° entre trois parois. Les vésicules ont donc atteint un état d'équilibre, dans lequel leurs tensions de surface sont égales, de même que leurs énergies d'adhésion. D'après ces observations, les mousses de vésicules représenteraient un exemple somme toute classique de structure cellulaire. Certaines différences entre les vésicules et les bulles sont triviales : les unes emprisonnent de l'air, les autres de l'eau ; les films de savon sont aqueux et leur épaisseur peut diminuer par drainage ou évaporation, tandis que la membrane des vésicules est une unique bicouche lipidique, de taille constante. Les vésicules disposeraient de peu de degrés de liberté pour s'assembler si chacune possédait un nombre fixé de phospholipides, délimitant un volume constant de solution. Mais nous verrons sur l'exemple simple de doublets que ces deux préjugés sont faux : elles peuvent en effet s'échanger des lipides, voire une partie de leur solution interne (cf. V.3).

V.1 Les forces intermoléculaires entre bicouches

1.1 Répulsions à longue, moyenne et courte portées

a) <u>Répulsion due aux ondulations à 100 nm</u>

L'expérience montre qu'une bicouche détendue, approchée d'une surface plane solide à une distance moyenne *d* inférieure au µm, est parcourue par d'incessantes ondulations thermiques (Figure 4). A l'approche de la surface, l'amplitude des fluctuations est restreinte à cette taille *d*, et une force de répulsion entropique apparaît, variant en $1/d^3$. On présente une démonstration approchée de cette célèbre force de Helfrich[3,4]. En l'absence de tension de surface, une portion carrée de membrane, de côté *L*, présente des fluctuations thermiques dont l'amplitude quadratique moyenne est proportionnelle à sa surface projetée[1] : $\langle u^2 \rangle \approx L^2\, kT/K_b$. Or la surface solide agit comme un mur qui coupe les ondulations de plus grande amplitude. La distance *d* définit donc une dimension latérale caractéristique $\xi \approx d\sqrt{K_b/kT}$: c'est la largeur *L* maximale d'une portion de membrane non perturbée par la présence du mur.

[1] Cette propriété vient de ce que la plus grande longueur d'onde accessible est 2*L*.

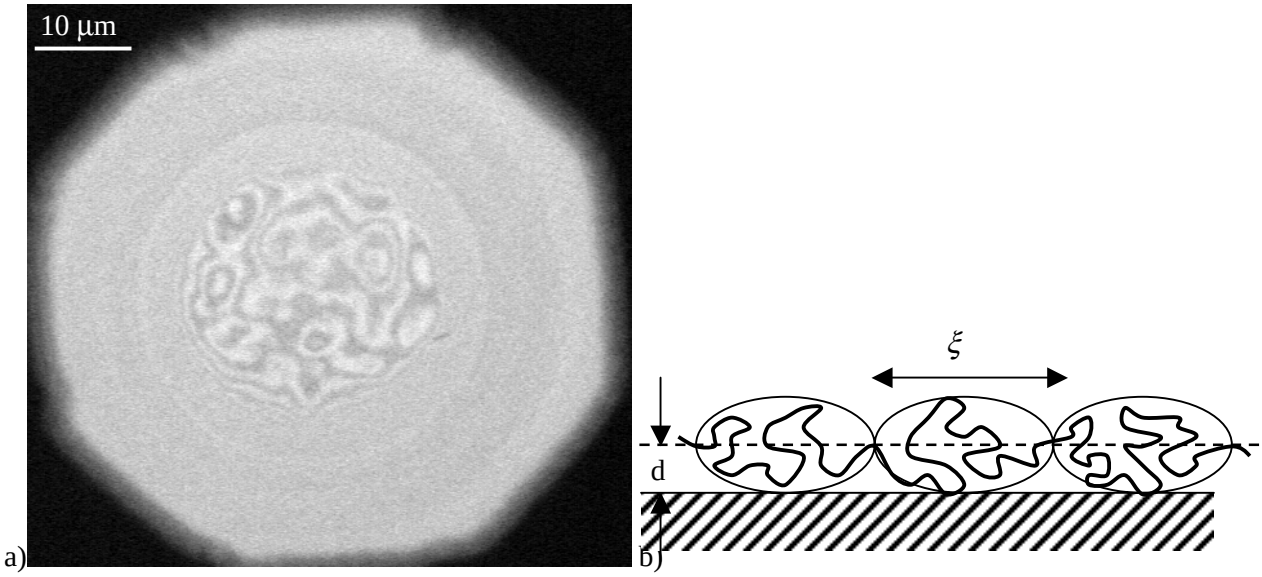


Figure 4 : a) Fluctuations de Helfrich entre une vésicule géante et une lamelle de verre, visualisées par RICM. Les lignes de niveau de la bicouche par rapport à la surface plane fluctuent sans cesse (la hauteur varie d'environ 0.2 µm entre deux franges noires). Ce type d'expérience permet d'étudier le spectre des fluctuations[5,6] ; b) Modèle des « blobs » appliqué à une membrane.

Par analogie avec les lois d'échelle dans la théorie des polymères, on considère la membrane comme un patchwork de « blobs » indépendants les uns des autres, d'extension latérale ξ, et d'épaisseur 2*d*. Ils exercent sur la paroi une pression donnée par la loi des gaz parfaits $P = ckT$, où $c = 1/2d\xi^2$ est simplement leur concentration volumique. On obtient ainsi la force de répulsion entropique, par unité de surface :

Eq. (1)
$$F_H \approx \frac{(kT)^2}{2K_b d^3}$$

On calcule alors par simple intégration l'énergie de répulsion par unité de surface :

Eq. (2)
$$g_H \approx \frac{(kT)^2}{K_b d^2}$$

Bien sûr, cet argument d'échelle ne conduit pas au préfacteur numérique exact. On peut néanmoins estimer l'énergie de répulsion d'ondulation à $g_H \approx 10^{-9}$ N/m lorsque la vésicule est située à environ 400 nm de la surface, et $g_H \approx 10^{-7}$ N/m quand elle s'en est rapprochée jusqu'à 40 nm. Ces valeurs sont du même ordre de grandeur que l'énergie de courbure estimée au chapitre I. On prévoit donc une déformation (sans doute un aplatissement), avant même que la membrane soit rentrée en contact avec la surface. Par ailleurs, l'Eq. (2) peut s'appliquer aussi à l'approche de deux vésicules fluctuantes (au préfacteur près), en définissant alors *d* comme la distance moyenne entre les deux bicouches.

b) Répulsion stérique à 10 nm

La répulsion d'ondulation n'est en fait pas aussi efficace qu'elle n'y paraît. Elle nécessite en effet que la tension de surface de la membrane soit négligeable. Cette condition est facilement réalisée pour les vésicules géantes, mais elle n'est plus vérifiée pour les vésicules plus petites (SUV, LUV) et pour les membranes des cellules. Or nous verrons par la suite qu'il existe de nombreuses interactions attractives, qui provoqueraient l'agrégation systématique des bicouches tendues. Heureusement ces attractions sont, on le verra, de courte portée. La solution adoptée par les cellules est tout simplement d'éviter que leurs membranes ne s'approchent de trop près[1]. A cet effet, elles sont tapissées de longues molécules hydrophiles (des polysaccharides et des glycoprotéines, par exemple les mucines), qui induisent une répulsion stérique quand on essaye de les faire s'interpénétrer. Ce procédé est aussi classique en physico-chimie des colloïdes, où le greffage de polymères sur des surfaces permet de stabiliser des suspensions de particules, qui autrement flocculeraient. Un polymère hydrosoluble couramment utilisé est le polyéthylèneglycol (PEG). Dans le cas des membranes lipidiques, des « vésicules furtives » ont été obtenues en greffant des chaînes PEG (M_w entre 750 et 5000) sur une partie des têtes polaires des phospholipides[(7,8)].

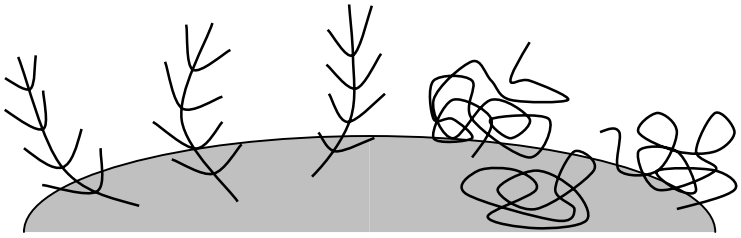


Figure 5 : Tapissage de la membrane par des polymères hydrophiles branchés (à gauche, mucines) ou globulaires (à droite, PEG).

En vue des applications médicales, de nombreuses études ont portées sur la durée de vie de petits liposomes (Ø100 nm) dans la circulation sanguine. Dans ce cas, le danger n'est pas l'adhésion des liposomes entre eux, mais celle avec les macrophages, destinés à les éliminer. Les durées de vie les plus longues (quelques heures) ont été obtenues avec 5 mol % de lipides greffés par du PEG_{2000}, c'est-à-dire comportant environ 50 monomères. Le rayon de Flory de ces chaînes étant alors quasi identique à la distance entre points de greffage (3.5 nm), les pelotes de PEG forment un tapis dense sur la membrane, mais ne s'interpénètrent pas.

c) Répulsion d'hydratation à moins de 1 nm

A plus courte distance encore, une répulsion a toujours lieu, même en l'absence de polymère greffé. Pour que les membranes s'approchent à moins de 1 nm, il faut en effet vaincre la barrière d'énergie due aux molécules d'eau « de structure », associées aux têtes polaires des lipides, et qu'il

[1] Françoise Brochard-Wyart, « Babar sur la planète molle » (Archimède, émission du 18/04/2000 sur Arte).

faut retirer. La répulsion d'hydratation décroît exponentiellement, avec une distance caractéristique de 3 Å dans le cas précis du DOPC[9].

1.2 Interaction électrostatique

Le dispositif SFA ("surface force apparatus") permet de mesurer des forces électrostatiques **répulsives**, entre deux membranes lipidiques dont une partie des lipides possède une tête polaire chargée, telle que PA, PG ou PS (cf. I.1.1). Ces forces sont en partie écrantées par les ions de la solution[10], créant une longueur d'écran électrostatique κ^{-1}, ou « longueur de Debye » : environ 10 nm dans Na^+Cl^- 1mM par exemple. Quand bien même les membranes des cellules biologiques sont chargées, elles baignent dans un milieu très salin, dans lequel la portée des répulsions électrostatiques est inférieure à 1 nm. Les cellules font donc appel à d'autres répulsions pour rester à distance les unes des autres (cf. 1.1).

Tout au long de ce travail, on a utilisé des lipides portant une tête polaire phosphatidylcholine PC, qui est un zwitterion (+/–), de charge nominale nulle. Pourtant, des expériences de SFA révèlent une force répulsive entre des bicouches de PC, dont la décroissance est caractéristique d'une interaction électrostatique[11]. Cette répulsion n'est pas rencontrée entre des bicouches zwitterioniques d'un autre type (PE), excluant ainsi que cette interaction puisse provenir simplement des dipôles. Pour rendre compte de leur répulsion, on doit attribuer aux lipides PC une faible fraction de charges, environ 0.1–0.5%. Elle permet d'expliquer également des mesures électrocinétiques réalisées sur des vésicules (LUV), conduisant à un potentiel zeta négatif[12,13] : –4mV pour la lécithine naturelle (EPC), environ –10 mV pour des phosphocholines synthétiques (DMPC, DPPC, DSPC), variant avec la température et la salinité. Une autre preuve indirecte de la charge effective négative des membranes de lipides PC est apportée par leur interaction avec des nanoparticules magnétiques : les particules « citratées » négatives forment une couche de déplétion (cf. I.3.5) de part et d'autre de la membrane, tandis que les colloïdes positifs précipitent dessus. Cet effet a été démontré, par des expériences macroscopiques et par microscopie électronique, sur des bicouches enroulées en tubules[14]. Les impuretés chargées dans les bicouches de lipides PC pourraient être de l'acide phosphatidique PA (Figure I–4), produit par hydrolyse. Un test par simple chromatographie sur couche mince (éluant : chloroforme / méthanol / eau 65:25:4) ne permet pas de déceler une fraction aussi faible de lipide chargé. Dans les expériences d'adhésion, on gardera à l'esprit que **les vésicules géantes de DOPC se comportent comme des objets faiblement chargés négativement**.

Des phénomènes complexes sont attendus de l'**attraction** entre une bicouche lipidique chargée et une surface de signe opposée : une autre bicouche, un substrat plan, une particule sphérique ou une macromolécule (pour l'ADN, qui forme des complexes électrostatiques très denses avec les lipides positifs, voir les références du paragraphe II.1.4e). On recense ici les études expérimentales impliquant l'adhésion électrostatique de vésicules géantes :

(i) Formation d'un cristal colloïdal par adsorption de billes négatives sur une vésicule positive[15,16]

Des billes (Ø≈1μm) portant des groupements de surface négatifs sont attirés par une vésicule géante fluctuante, préparée à partir d'un lipide bicaténaire positif (DDAB), d'un amphiphile neutre et d'un cosurfactant. La vésicule capture un maximum de billes, jusqu'à ce qu'elle devienne tendue, et que les particules forment sur sa membrane un cristal bidimensionnel. Ainsi décorée par les billes, la vésicule possède une charge globale négative.

(ii) Séparation de phases dans la bicouche d'une vésicule fluide positive, adhérant sur une monocouche de phospholipides, de charge négative variable[17,18]

Immobilisés à la surface, les lipides négatifs de la monocouche sont des acides faibles, de sorte que la densité surfacique de charges négatives σ_1 est modulée par le pH. La densité surfacique σ_2 de charges positives est fixée en moyenne par les lipides positifs de la bicouche, des ammoniums quaternaires. Par augmentation du pH, la surface solide peut devenir plus chargée que la vésicule ; les lipides positifs, mobiles dans la bicouche, vont démixer si l'énergie électrostatique compense leur perte entropique[1]. La zone d'adhésion de la vésicule sur le substrat devient alors inhomogène, avec d'une part des plaques d'adhésion forte, d'autre part des cloques ("blisters"), où la membrane, appauvrie en lipides positifs, se détache de la surface.

(iii) Dynamique de l'adhésion électrostatique entre des vésicules négatives et une surface solide positive[19]

L'adhésion est réalisée par un "sandwich" verre/ITO/or/thiol sulfonate/poly(L-lysine)[2]. La dynamique se déroule en trois temps : (1) sédimentation de la vésicule et drainage du film d'eau intercalé entre la membrane et la surface, jusqu'au contact (30 s) ; (2) progression très rapide d'un disque d'adhésion (50 ms), à volume constant, au dépens de l'excès de surface de la membrane ; la distance entre la bicouche et la paroi n'évolue plus ($d_{\text{éq}}$, voir ci-dessous) ; (3) élargissement de l'aire de contact (pendant quelques secondes), tandis que les vésicules perdent environ 7% de leur volume. Bien qu'ils ne soient pas visualisés, seuls des pores transitoires permettent d'expliquer un débit aussi important de solution interne. Cette étude met ainsi en lumière l'augmentation de perméabilité d'une membrane tendue par adhésion.

(iv) Adhésion stable d'une vésicules géante un substrat de silicium oxydé[20]

Réalisée dans des conditions qui semblent très proches des nôtres, cette expérience d'adhésion électrostatique, sur une galette de silicium couverte d'un réseau de transistors, conduit néanmoins à

---

[1] Cette condition s'écrit formellement $\frac{\varepsilon_s \varepsilon_0 \sigma_2^2}{2\kappa^{-1}} > \frac{\sigma_2}{e} kT$, d'où une inégalité $\sigma_1 > \sigma_2 > \sigma_2^*$.

[2] Le traitement de surface est analogue à celui des bandes chargées décrites au II.2.3c), excepté qu'il recouvre ici la totalité de la surface solide.

des membranes plus imperméables. Ainsi la conductance électrique G_m n'est que de 10 pS pour une vésicule en adhésion stable sur le silicium. Par contre, celle de fragments d'une vésicule éclatée sur la surface (en présence de poussières) devient identique à notre mesure de G_p, environ 1000 pS (cf. IV.2.1a). Les vésicules qui adhèrent sur le silicium oxydé présentent une faible perméabilité à l'électrolyte. Ce substrat est certes lisse à l'échelle atomique (d'après mesure ellipsométrique, cf Figure II-16a). Cependant, la surface est composée d'un réseau de lignes, de largeur 1.8 µm, entre lesquelles la hauteur d'oxyde SiO_2 alterne entre 10 et 400 nm. D'après les auteurs, la bicouche épouse cette rugosité périodique sans se rompre. Deux différences par rapport à nos conditions expérimentales sont importantes à préciser : les chaînes de poly(L-lysine) utilisées ici sont plus courtes (M_w 10.000 au lieu de 150.000–300.000 g/mol), donc l'adhésion pourrait être moins forte ; le milieu extérieur est clairement hyperosmotique, de sorte que les vésicules sont au départ dégonflées.

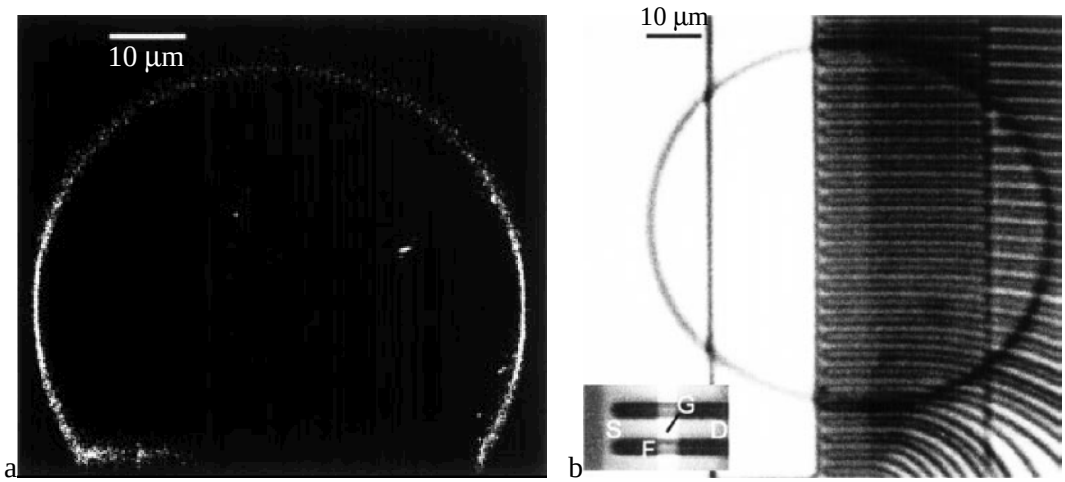


Figure 6 : a) Profil d'une vésicule adhérente sur une pastille de silicium, obtenu à partir de sections de fluorescence[20] ; contenant 1% de charges négatives, la membrane adhère sur une couche de poly(L-lysine) adsorbées sur le silicium oxydé ; la vésicule est remplie de sucrose 300 mM et baigne dans du glucose 300 mM, contenant par ailleurs Na^+Cl^- 40 mM et Tris/HCl 10 mM ; b) Image en microscopie FLIC de la zone d'adhésion, sur un réseau de transistors de pas 3.6 µm.

Du point de vue théorique, la distance d'équilibre entre deux surfaces chargées de signes opposés résulte de la compétition entre l'attraction électrostatique et la pression des contre-ions, confinés entre les parois[21]. Elle est reliée aux densités surfaciques de charges et à la longueur de Debye :

Eq. (3)
$$d_{\text{éq}} = \kappa^{-1} \ln \frac{-\sigma_1}{\sigma_2}$$

Dans les expériences (iii), et dans les nôtres, la salinité est faible (1 mM) de sorte que κ^{-1} se situe aux alentours de 10 nm. Par ailleurs, la paroi de verre est beaucoup plus chargée que les vésicules[19] : la distance d'équilibre, estimée par la formule précédente, se situe entre 20 et 80 nm. Les adhésions sur le silicium oxydé décrites au (iv) sont effectuées dans un milieu contenant 40 mM de sel et 10 mM

d'un tampon acido-basique : $\bar{\kappa}^{-1}$ est de l'ordre de 1–1.5 nm. Sur ce substrat réfléchissant, l'épaisseur de solution intercalée est mesurée précisément par microscopie FLIC (cf. III.2.1). Comme $d_{\text{éq}}$=1.1±0.2 nm est très proche de $\bar{\kappa}^{-1}$, les deux surfaces doivent porter des densités de charges équivalentes ($\sigma_1 \approx \sigma_2$). L'absence de regroupements des lipides chargés, par le mécanisme décrit au (ii), pourrait expliquer la relative stabilité des vésicules sur le silicium oxydé, par rapport aux expériences sur le verre.

1.3 Effets du calcium sur les phospholipides

L'ion calcium joue un rôle majeur dans de multiples processus biologiques (propagation de l'influx nerveux, changement de conformation de protéines, etc..). Il possède aussi des effets simplement physiques sur les bicouches artificielles de phospholipides. Sous certaines conditions, il devient un élément fusogène. Comme d'autres cations multivalents (Mg^{++}, La^{+++}), Ca^{++} s'adsorbe sur les têtes polaires phosphatidyles, aussi bien zwitterioniques que négatives[22]. Au moment de la préparation des vésicules, certaines concentrations de calcium empêchent le gonflement du film lipidique, les bicouches restant collées les unes aux autres[23] (un excès de calcium peut néanmoins restaurer le gonflement, en saturant les membranes de charges positives). Plusieurs mécanismes d'action du calcium interviennent suivant les cas : simple pontage électrostatique, déshydratation des têtes polaires ou démixtion des lipides. Des bicouches composées d'un mélange 3:1 de phospholipides zwitterioniques PC et négatifs PG, déposées sur du mica, deviennent biphasiques en milieu calcium[24]. Aux domaines, observables en microscopie interférentielle, sont associées en SFA des courbes de force différentes : les unes présentent une répulsion électrostatique à longue distance, et sont attribuées à des zones enrichies en lipides PG liés à Ca^{++} ; sur les zones neutres restantes, les bicouches approchées à moins de 3.7 nm se rejoignent spontanément, par attraction hydrophobe. L'adhésion devient irréversible quand les deux bicouches accolées n'en forment plus qu'une, par la mise en commun de leurs feuillets lipidiques externes. Ce mécanisme d'hémifusion, nécessitant au préalable une séparation de phases, est peut-être spécifique aux bicouches adsorbées. Nous allons montrer par la suite que l'hémifusion peut avoir lieu entre des bicouches fluctuantes, même si elles ne comportent que des lipides PC.

1.4 Attractions à longue portée

a) <u>Forces de Van der Vaals à 100 nm</u>

Deux milieux apolaires, plongés dans une solution aqueuse, et séparés par une distance d, sont attirés l'un vers l'autre par les forces de Van der Vaals. L'énergie d'attraction s'écrit, par unité de surface[10] :

Eq. (4)
$$g_{\text{VdW}} = -\frac{A}{12\pi d^2}$$

où la valeur de la constante de Hamaker est A=5.6x10^{-21} J entre des bicouches de DOPC[9]. Cette attraction varie en $1/d^2$, comme la répulsion due aux ondulations thermiques, avec un préfacteur quasi-identique (1.1a). La répulsion de Helfrich est donc suffisante pour empêcher des vésicules fluctuantes de s'agréger (tant que leur tension de surface reste inférieure à 10^{-8} N/m). Par contre, toute action extérieure qui retire de l'excès de surface aux membranes déclenche potentiellement leur adhésion : la pressurisation de l'une des vésicules par aspiration dans une micropipette[25], un gonflement osmotique[26], un abaissement de la température[27], ou encore l'adhésion sur une surface plane, que nous avons couramment utilisée (3.1). La suppression des fluctuations thermiques permet ainsi aux membranes de s'approcher au plus près, à une distance minimale où l'attraction de Van der Waals est contrebalancée par la répulsion d'hydratation. Cette distance d'équilibre est vraisemblablement proche de l'écart entre bicouches dans une phase lamellaire, qui est de 3.2 nm pour DOPC[9].

b) Effet de déplétion

Des chaînes de PEG en solution, suffisamment longues (M_W 8.000 ou 10.000), sont exclues du voisinage des membranes lipidiques, dans une couche d'épaisseur de l'ordre de 50 nm[28]. Une pression entropique s'exerce alors, renforçant considérablement l'attraction des membranes par rapport aux seules forces de Van der Waals. Si la concentration du PEG est suffisamment élevée, l'adhésion fait place à l'hémifusion. Cette attraction par effet de déplétion pourrait être rencontrée avec d'autres colloïdes : le dextran (M.-A. Gudeau-Boudeville, communication personnelle), ou une protéine globulaire comme l'albumine de sérum bovin (sur des lames de verre traitées à la BSA, une recrudescence des mousses de vésicules a été notée ; la BSA possède aussi la propriété de capter certains lipides de la monocouche externe, cf. p. III–91).

1.5 Forces spécifiques

Les bicouches lipidiques ont été décrites jusqu'à présent comme un continuum, caractérisé par des paramètres moyens, comme la densité de charge ou la polarité. Les forces physiques universelles sont néanmoins incapables à elles seules de décrire l'adhésion des cellules biologiques, qui est intimement reliée à leur fonction. D'innombrables exemples viennent à l'esprit, sans doute simplifiés avec la naïveté du physicien : les cellules embryonnaires s'agrègent, mais restent suffisamment mobiles pour s'organiser et construire des tissus ; les globules blancs glissent et roulent sur la paroi des vaisseaux sanguins, mais collent sur la surface d'un corps étranger comme une bactérie ; les cellules épithéliales (de l'intestin, des muqueuses) sont soudées les unes aux autres, de sorte à former une barrière très étanche envers l'extérieur, etc.. L'adhésion des cellules est en effet régulée par des molécules, certaines attractives, d'autres répulsives. Les molécules d'adhésion d'une membrane reconnaissent spécifiquement des partenaires sur la membrane en vis à vis. Ces interactions de type clef-serrure

mettent en jeu des énergies très faibles, du même ordre de grandeur que l'énergie d'agitation thermique.

Quelques expériences de biophysique ont utilisé des vésicules géantes comme milieu de reconstitution, afin d'étudier des molécules d'adhésion. Il est alors indispensable de contrôler par ailleurs les interactions physiques, qui pourraient autrement masquer les liaisons spécifiques. Pour mesurer l'énergie d'interaction entre deux bases azotées complémentaires de l'ADN, l'**adénosine** et la **thymidine**, une répulsion électrostatique est introduite, modulable par la force ionique[29]. L'interaction entre une petite molécule, la **biotine**, et une protéine, la **streptavidine**, est très forte et hautement spécifique. Des expériences ont été réalisées entre une surface couverte de streptavidine et une vésicule géante biotinylée[30], ou bien entre deux vésicules biotinylées, pontées par l'avidine[31]. Dans les deux cas, une contribution répulsive entre les membranes est apportée par des chaînes PEG, greffées sur une fraction des lipides.

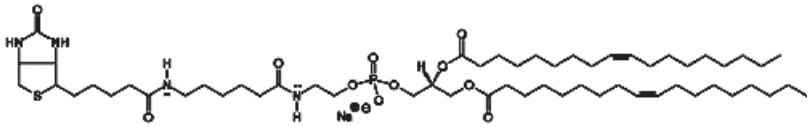


Figure 7 : Lipide biotinylé permettant de lier l'avidine ou la streptavidine à la bicouche (1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-n-(cap biotinyl) ou DOPE-biotine, M_w=1105.5).

Ces deux études en vésicules géantes ont montré l'importance des effets coopératifs, quand des molécules d'adhésion sont libres de diffuser dans une membrane fluide. La figure d'interférences en microscopie RICM, entre la vésicule et la surface plane, permet de détecter des plaques d'adhésion, dont la cinétique de croissance est déterminée par le recrutement des lipides ligands. Entre deux vésicules, seule a pu être mise en évidence l'accumulation de protéine (fluorescente) dans la zone de contact. La démixtion des molécules d'adhésion résulte de la compétition entre l'adhésion à courte portée et la répulsion stérique due au PEG. Des simulations numériques de type Monte Carlo, basées sur ces deux interactions antagonistes, ont modélisé la répartition des récepteurs d'adhésion entre deux vésicules[32] : elles montrent effectivement une ségrégation, qui débuterait à partir des bords du disque d'adhésion.

Le complexe streptavidine-biotine (de stœchiométrie 1:4) constitue un outil très pratique pour lier des molécules d'intérêt biophysique entre elles, et éventuellement pour calibrer les expériences d'adhésion. L'objectif par la suite est d'étudier de véritables molécules d'adhésion. Parmi celles-ci, les **cadhérines** constituent une famille très importante, puisqu'elles interviennent aussi bien pour faciliter la migration des cellules pendant le développement embryonnaire, que pour maintenir la cohésion des tissus cellulaires adultes (jonctions adhérentes). Ancrées au cytosquelette, ces protéines traversent la membrane plasmique et dépassent à l'extérieur de la cellule. Leur partie extracellulaire, responsable de l'adhésion, se compose d'un enchaînement de cinq domaines, EC1–5, qui ont grossièrement la forme

de bâtonnets, réalisant une longueur totale de 23 nm[33]. L'interaction *trans* des cadhérines est homophile (les segments extracellulaires en vis à vis adhèrent entre eux) et n'a lieu qu'en présence d'ions Ca^{++} (qui fixe la conformation des segments). Dans le modèle le plus couramment admis, les membranes adhèrent par une interdigitation de leurs domaines EC, à la manière d'une fermeture Eclair[34]. Plusieurs questions d'intérêt biologique sont toujours d'actualité. L'adhésion met-elle en jeu la totalité des segments EC1–5, ou bien seulement les deux segments externes EC1 et EC2 ? Les interactions *cis* entre les cadhérines d'une même membrane, qui regrouperaient les protéines en dimères, sont-elles nécessaires à l'adhésion ? Quelles sont les forces et les temps caractéristiques des liaisons, et comment varient-ils suivant le type de cadhérine ?

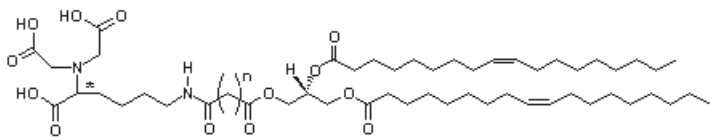


Figure 8 : Lipide chélateur du nickel, synthétisé par Renée Pontikis (UMR 176 CNRS / Institut Curie) (M_w=1020.7 pour n=2, avec Ni^{++}).

Pour répondre à ces questions, les biologistes purifient des cadhérines tronquées, liées par ailleurs à un oligomère de 6 acides aminés hystidine (6xHis-tag), qui complexe l'ion Ni^{++}. Cette terminaison a permis de fixer la protéine à la surface de billes, et de réaliser des tests d'adhésion en chambre de flux[35]. Pour greffer les fragments de cadhérine sur une membrane lipidique, on utilise un lipide lui-même chélateur du nickel, grâce à un groupement NTA (Figure 8). Des vésicules géantes décorées par des cadhérines constituent des « cellules artificielles » ultra-simplifiées. Le protocole pour les préparer sera décrit au paragraphe 3.3, ainsi que les premiers essais d'adhésion en milieu calcium. La microscopie RICM nécessite que l'une des deux membranes soit tendue, afin de constituer un dioptre plan. Pour tester la formation de domaines entre deux membranes libres et fluctuantes, on projette de mettre plutôt à profit la cohérence de la microscopie SHG (cf. 3.4). Si les domaines existent, l'étude de leur dynamique pourrait peut-être déterminer si le regroupement des cadhérines est déclenché par des interactions *cis*, ou bien simplement par un effet coopératif, tel que celui qui a été décrit avec la streptavidine.

V.2 Adhésion entre une membrane et une surface solide

La dynamique complète de l'adhésion de vésicules géantes sur une surface solide, homogène[19] ou bien décorée de motifs chimiques[36], a pu être établie, principalement grâce à la microscopie EWIF (III.2.1). Nous en décrivons ici simplement les grandes lignes, ainsi que les informations complémentaires apportées par nos expériences en microscopie RICM et en microscopie de fluorescence (conventionnelle).

2.1 Surface homogène

a) Croissance des contacts

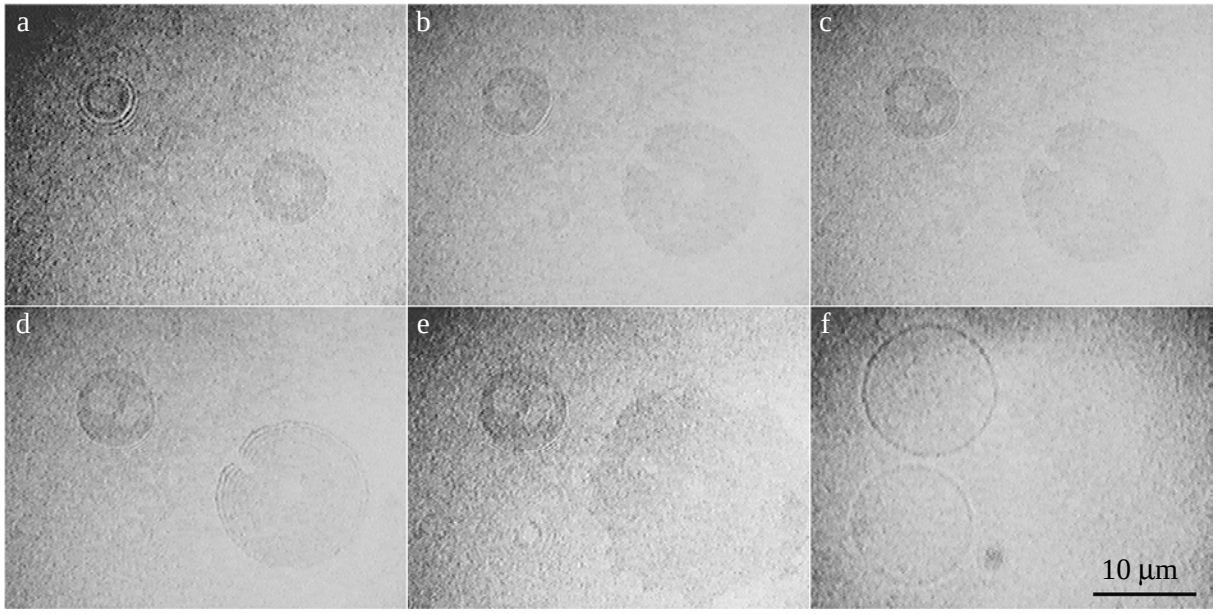


Figure 9 : (a-e) Visualisation par RICM, au cours du temps, des zones de contact entre deux vésicules d'EPC et une surface adhésive verre/Cr/Au/thiolSO_3^-/poly(L-lysine) ; (f) Image en transmission. Les vésicules sont remplies de sucrose 50 mM et baignent dans du glucose 50 mM, contenant par ailleurs 0.1 mM de calcéine et 0.1 mM d'acide chlorhydrique. La séquence dure environ 10 s.

Ces expériences ont été réalisées dans les mêmes conditions exactement que celles du travail de thèse d'A.-L. Bernard[37] : vésicules de lécithine naturelle, d'osmolarité 50 mM, adhérant sur une pellicule d'or recouverte de poly(L-lysine), via une monocouche de thiol négatif. Même la sonde fluorescente soluble a été ajoutée, de même que H^+Cl^-, pour simuler l'acidification probable du millieu (pH4), quand la calcéine est excitée en EWIF, et qui semble déclencher l'adhésion. Cette séquence correspond à la troisième étape de la dynamique d'adhésion (1.2.iii) : la croissance lente des contacts, qui s'accompagne d'une fuite de solution interne. Sur les images de RICM (a-e), deux disques d'adhésion de vésicules sont visibles. L'aire de celui de gauche augmente au cours du temps, de façon irrégulière. L'angle de contact extérieur ψ augmente aussi : 13° (a), 15° (b) et 19° (c). La vésicule se maintient jusqu'à la dernière image (f), en transmission (une troisième vésicule est apparue en bas à gauche, mais elle n'adhère pas sur la surface). L'adhésion est plus forte pour la vésicule de droite, dont la zone de contact avec la surface double entre les images (a) et (d) : la réapparition des anneaux d'interférence indiquent que la vésicule est alors aplatie comme une crêpe. Elle éclate à l'image suivante. Un examen attentif des disques d'adhésion révèle qu'ils ne possèdent pas une teinte sombre uniforme, comme ce serait le cas si la distance $d_{éq}$ entre la membrane et la paroi était homogène. Au contraire, des taches de même intensité lumineuse que le fond sont observables (d'abord une, puis

deux, qui grossissent aux cours du temps). Ce sont les décollements de membrane (“blisters”) décrits au 1.2.ii comme une séparation de phases des lipides.

b) Irrégularités de la ligne de contact

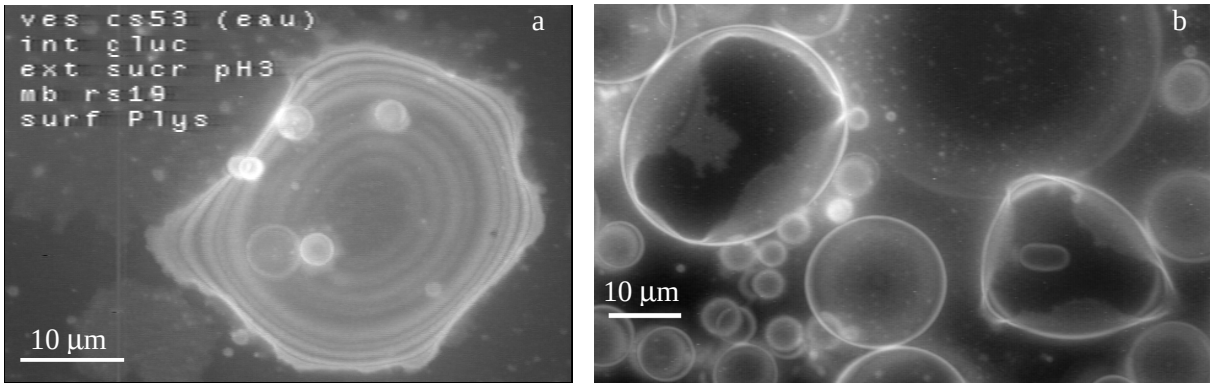


Figure 10 : Vésicules en adhésion forte sur la poly(L-lysine) : a) directement sur le verre ; b) adsorbée sur une monocouche de thiol sulfonate, greffée sur l’or (5 nm). Les solutions contiennent : a) du glucose 100 mM à pH3 ; b) du glucose 50 mM à pH4. Ces deux images sont les projections de coupes obtenues par microscopie de fluorescence conventionnelle, avec le marqueur Di-6-ASPBS.

Les vésicules en adhésion forte possèdent des formes irrégulières, éloignées de celles de sphères tronquées parfaites. Avant qu’elle n’éclate et s’étale sur la surface (IV.2.1b), la membrane reste dans un état très tendu, pendant une période de l’ordre de la minute. Imagé à différentes hauteurs de mise au point, le contour reste arrondi, sauf près de la surface où il présente des courbures locales élevées. La ligne de contact semble ainsi épouser les hétérogénéités chimiques de la paroi, sans doute des agrégats de polyélectrolyte, ou bien des fragments de vésicules déjà éclatées. La membrane s’ouvre irréversiblement lorsque la taille de ces défauts dépasse le rayon de nucléation d’un pore (IV.1c).

En présence d’une couche mince métallique sous la poly(L-lysine), la microscopie de fluorescence permet par ailleurs d’imager les cloques sous la vésicule (“blisters”). A très courte distance, l’or éteint complètement la fluorescence de la membrane, et les zones de contact étroit apparaissent noires, tandis que les régions où la membrane s’éloigne de la paroi restent fluorescentes.

2.2 Surface décorée par des lignes

Alors que des inhomogénéités de surface anarchiques font éclater les vésicules, des motifs chimiques périodiques peuvent induire un dégonflement lent et contrôlé[36]. Comparées à d’autres motifs (grilles, triangles, carreaux, chevrons) ou d’autres pas de réseau, les lignes de largeur a=2.5 µm produisent de larges déformations des vésicules, sans causer leur rupture brutale. Le protocole pour déposer ces lignes chargées positivement, recouvrant la moitié de la surface, a été décrit au II.2.3c.

Comme sur les surfaces homogènes, l’adhésion sur ces substrats commence par consommer l’excès de surface de la membrane, à volume de la vésicule constant (Figure 11).

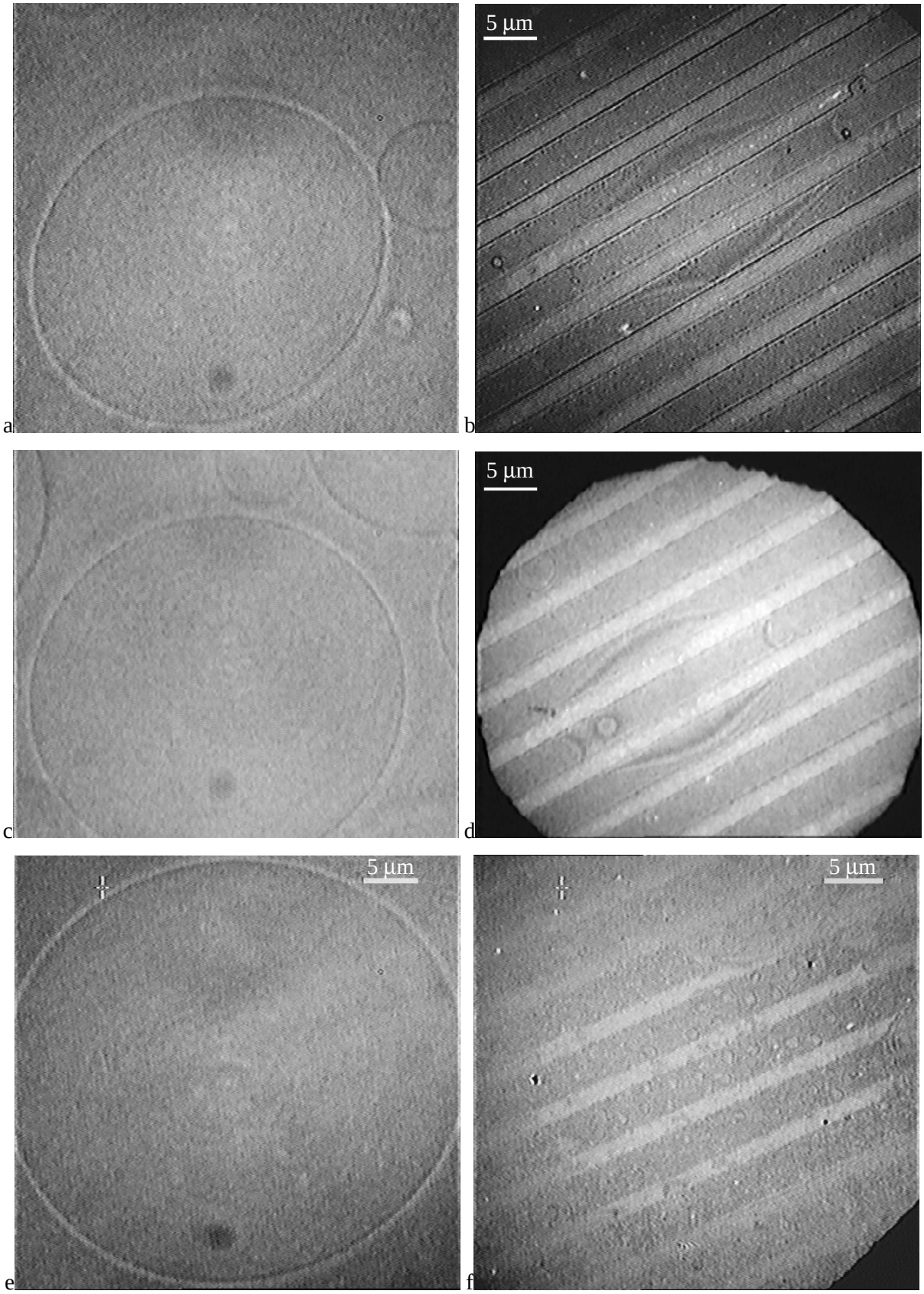


Figure 11 : Adhésion à volume constant, sur un réseau de lignes chargées (bandes claires). Trois vésicules différentes sont observées en transmission (a, c, e), et leurs zones de contact respectives sur la surface (b, d, f) en RICM. Les solutions aqueuses sont identiques à celle de la Figure 9.

Cependant, au lieu de 50 ms (cf.1.2iii), la croissance initiale du contact dure environ une dizaine de secondes. La vésicule doit en effet toucher une première ligne adhésive, puis éventuellement le contact s'étend sur quelques lignes adjacentes. La zone d'adhésion possède alors une forme sensiblement rectangulaire, parallèle aux lignes (b, d, f), et dont la largeur est commensurable avec le pas du réseau. Les vésicules (a) et (c), de diamètre environ 30 µm, n'adhèrent que sur deux lignes. La vésicule (e), plus grosse ($2R \approx 40$ µm), doit aussi posséder plus d'excès de surface initial, car elle adhère sur une largeur de 25 µm (6 lignes). Parfois, une ligne est située à une distance trop juste, et la membrane s'en décroche périodiquement. Les bandes sombres, greffées par les chaînes carbonées hydrophobes, peuvent présenter de petits anneaux d'interférence fluctuants (d, f). Sur ces portions, la membrane est donc détachée de la surface, et parcourue par des ondulations. La RICM nous apprend ainsi que les lignes hydrophobes sont répulsives envers la bicouche (et pas seulement faiblement attractives, comparées aux lignes chargées). Au bord de la zone d'adhésion, les franges d'interférence indiquent des valeurs d'angle de contact ψ comprises entre 15 et 20°. En transmission, les vésicules n'apparaissent que légèrement allongées dans la direction des lignes (Figure 11a, c, e).

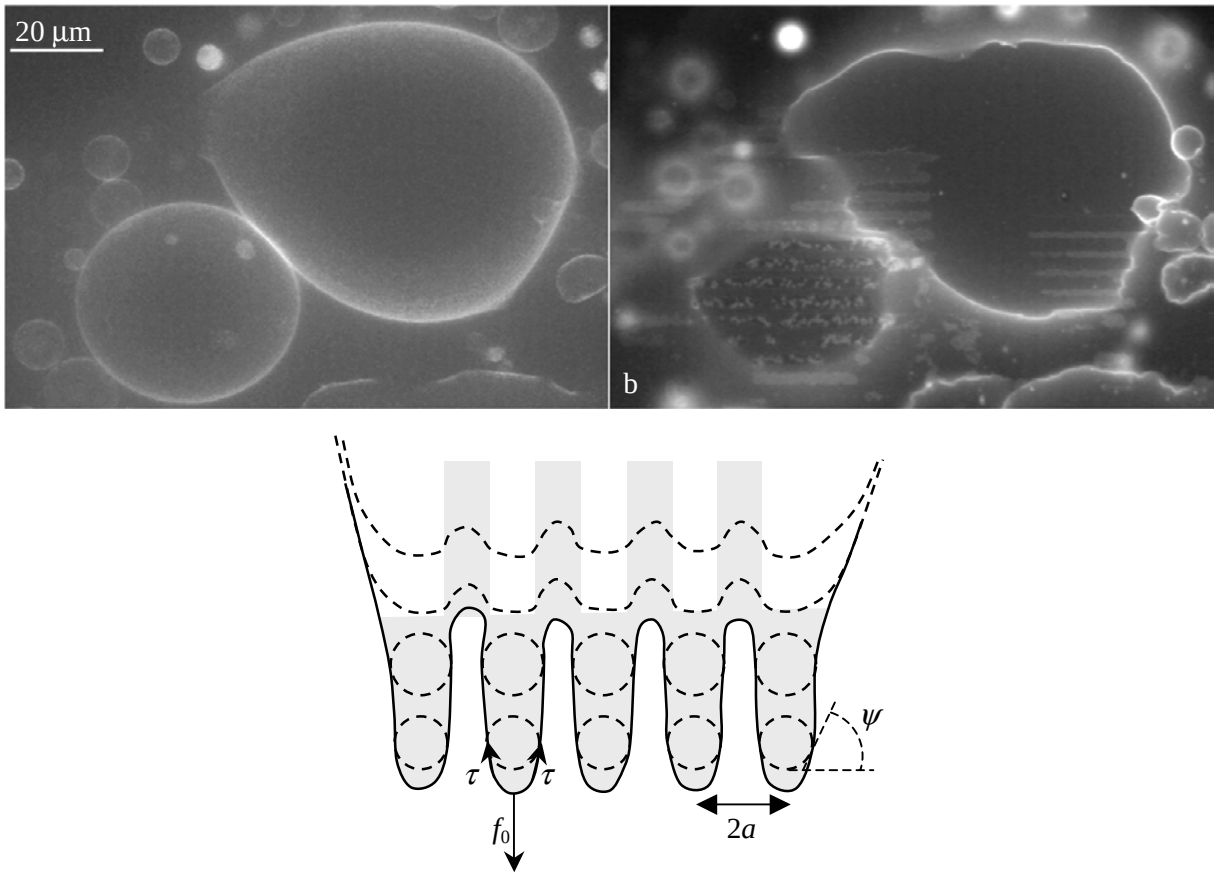


Figure 12 : Apport de la microscopie de fluorescence avec une sonde lipophile ; a) Forme globale de vésicules sur un réseau de lignes (projection de toutes les sections de fluorescence) ; b) Image dans le plan de la lamelle ; c) Schéma explicatif des zones fluorescentes (grisé) et des zones éteintes. Les conditions sont les mêmes que celles de la Figure 9, sauf la concentration des sucres, ici 300 mM. Les forces f_0 et τ sont définies plus loin dans le texte. L'angle de contact est toujours noté ψ.

La microscopie de fluorescence conforte les observations en RICM, et apporte des informations supplémentaires. Le décollement de la membrane au niveau des bandes hydrophobes est confirmé par les figures « en damier » (Figure 12b et schéma c). Sous la vésicule, les lignes chargées apparaissent noires, car la bicouche est située à une distance très courte de l'or[1]. A l'inverse, les lignes adhésives sont fluorescentes de part et d'autre de la vésicule. Elles sont en effet recouvertes par des extensions tubulaires, tirées à partir de la vésicule : leur surface supérieure est éloignée de l'or, mais reste comprise dans la profondeur de champ (Δz=2 µm, cf. Figure III–14).

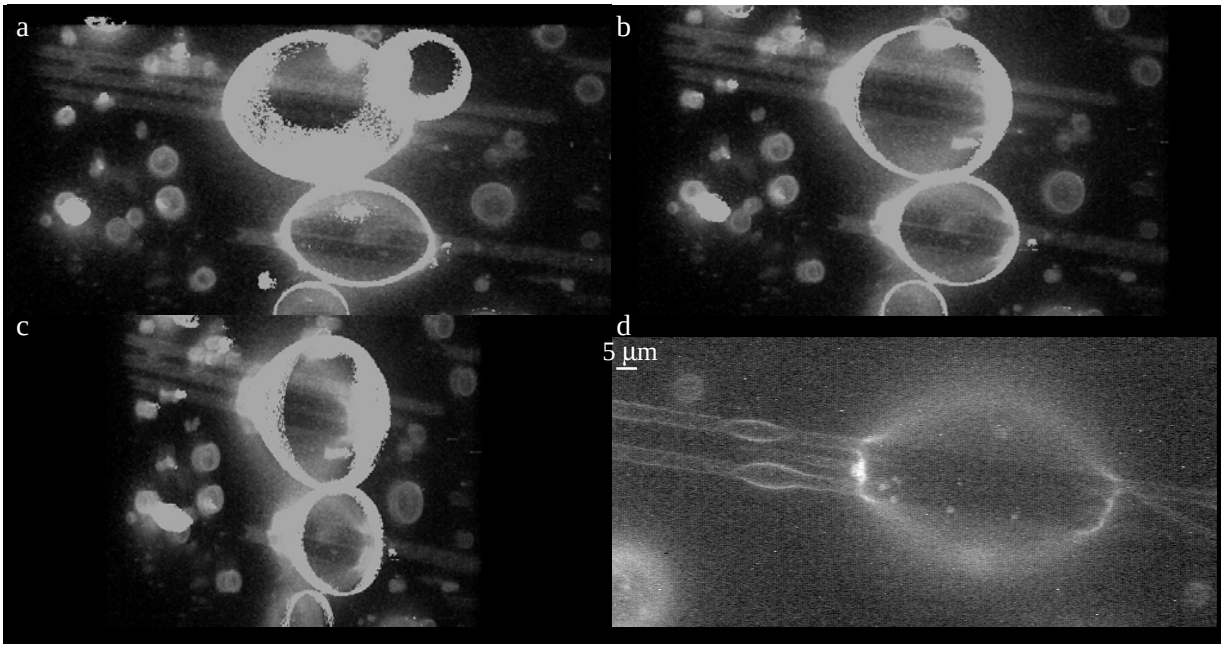


Figure 13 : a, b, c) Vues sous trois angles différents de vésicules collées à un réseau de lignes (projections d'images de microscopie de fluorescence classique) ; d) Deux perles se sont développées le long des tubes reliés à la vésicule.

La phase d'adhésion avec fuite du liquide interne, décrite sur les surfaces homogènes (cf. 1.2iii), prend sur les surfaces « rayées » une tournure beaucoup plus spectaculaire. Initialement, une simple ondulation de la ligne de contact selon les lignes est perceptible. Plus tard, cette modulation s'est transformée en de véritables « pseudopodes », partant de la vésicule et avançant le long des lignes adhésives. La fluorescence de ces structures indique qu'il s'agit de manchons cylindriques de membrane, et non simplement d'une bicouche unique adsorbée (autrement, la fluorescence serait éteinte par l'or). Une autre preuve est apportée par la Figure 13e montrant des perles, caractéristiques des vésicules tubulaires mises sous tension[(38)], par analogie avec l'instabilité de Rayleigh d'un cylindre liquide.

[1] La fluorescence des marqueurs est « quenchée », sans doute par la résonance des plasmons de surface, dans la couche métallique.

Ces tubes de membrane avancent à vitesse constante le long des lignes adhésives (Figure 14). En comparaison, le mouillage d'une bicouche lipidique sur un substrat vérifie une loi diffusive[39].

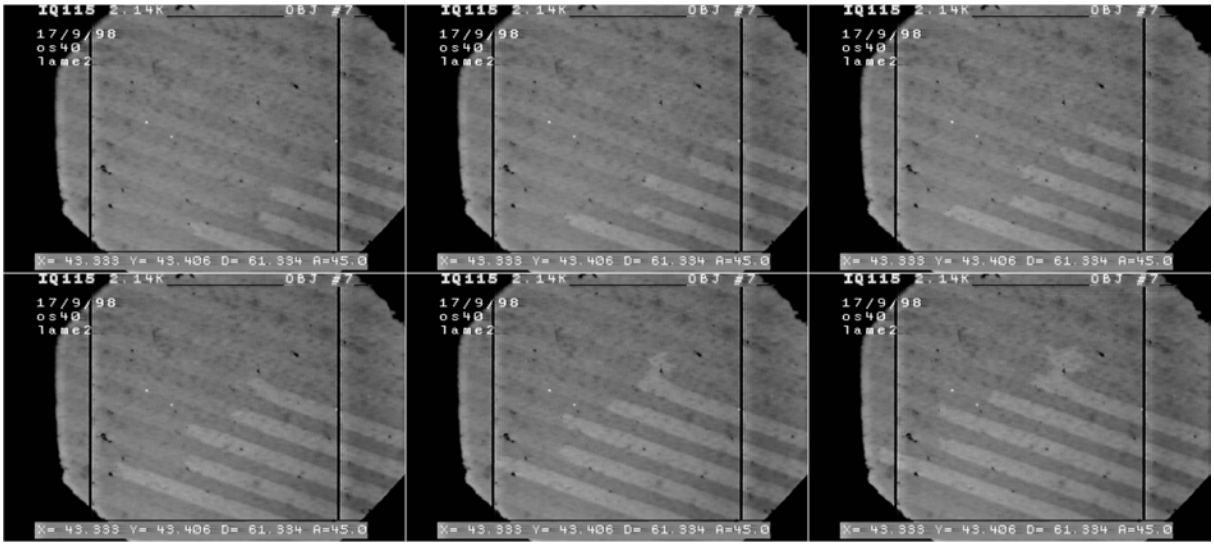


Figure 14 : Croissance des pseudopodes le long des bandes adhésives, à vitesse constante (0.40 à 0.46 µm/s suivant la ligne). Ces images de RICM se succèdent à intervalle de temps constant Δt=11 s.

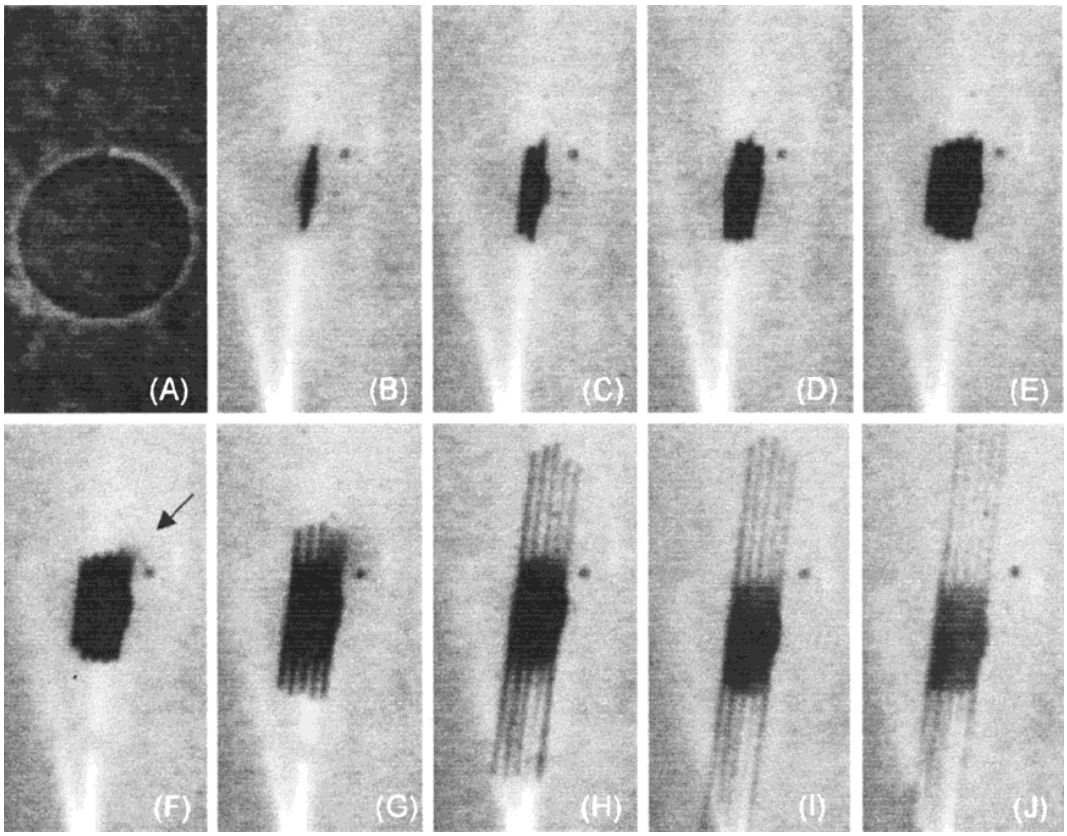


Figure 15 : Etalement sur les lignes visualisé en microscopie EWIF[36], à des instants successifs t=1 (B), 3 (C), 4 (D), 15 (E), 67 (F), 68 (G), 73 (H), 84 (I) et 92 s (J). La flèche indique l'emplacement d'un pore, détecté par une fuite de solution interne, non fluorescente.

Dernier fait important pour interpréter l'adhésion sur les lignes, le signal déclencheur de cette instabilité des tubes est l'apparition d'un **pore transitoire macroscopique**. En microscopie EWIF, les vésicules apparaissent au départ noires sur fond fluorescent. La phase finale d'étalement, qui s'accompagne d'une diminution de volume, commence toujours par une bouffée de liquide non fluorescent, s'échappant dans la solution externe de calcéine (Figure 15). Au vu du débit, la taille du pore responsable de cette fuite est macroscopique. Nous n'avons cependant pas d'image directe d'un tel pore, par un marquage fluorescent de la membrane (sans doute par manque de chance, car le temps de vie de ces pores induit par l'adhésion sur une surface décorée est inférieur à la seconde).

Pour quelles raisons les substrats recouverts par des motifs chargés induisent-ils une adhésion plus forte qu'une surface homogène, alors que seule une fraction de la surface est attractive ? Pourquoi les lignes de pas a=2.5 μm produisent-elles un lent dégonflement des vésicules, alors que d'autres motifs ou d'autres tailles sont inefficaces, ou au contraire trop destructifs ? Nous répondons en partie à ces questions, en expliquant de façon semi-quantitative l'instabilité de croissance des tubes.

Chaque bande chargée, de largeur a, exerce sur la ligne de contact de la vésicule une force $f_0=Wa$, tangentiellement à la surface. Pour $W\approx10^{-7}$ N/m, valeur typique de l'énergie d'adhésion dans le cas d'une interaction électrostatique, cette force f_0 localisée est supérieure à 10^{-13} N. La déformation d'une vésicule, par un point d'ancrage fort sur une surface, a été examinée théoriquement et expérimentalement[40]. Même si l'hypothèse d'une force ponctuelle est grossière dans notre cas, nous utilisons le calcul de la résistance τ qu'une vésicule peut fournir, en réaction à une force de traction localisée. Elle s'exprime en fonction du rayon de courbure R_c de la ligne de contact, ou de façon équivalente en fonction de l'angle de contact ψ, lorsque celui est faible :

Eq. (5)
$$\tau = \tfrac{1}{2}\frac{K_b}{R_c^2}\xi_\sigma \approx \sigma\psi^2\xi_\sigma$$

où ξ_σ désigne la longueur de raccord de la bicouche sur la surface solide, introduite au I.3.3. Les directions des forces sont représentées schématiquement sur la Figure 12c. Tant que $2\tau>f_0$, la ligne de contact peut s'accommoder d'une déformation statique, approximativement triangulaire (comme celle d'un lance-pierres tendu…). A la fin de la première étape d'étalement (Figure 15E), la zone d'adhésion reste dans un état stationnaire pendant plus de 50 s. La membrane ayant lissé ses fluctuations pour adhérer, sa tension de surface doit posséder une valeur élevée, estimée au maximum à $\sigma^+ \approx 10^{-5}$ N/m. On calcule alors $\xi_{\sigma^+} = \sqrt{K_b/\sigma^+} \approx 5\times10^{-8}$ m ($K_b = 2\times10^{-20}$ J pour la lécithine d'œuf EPC), puis compte tenu de ψ=15°, $2\tau(\sigma^+)=1.4\times10^{-13}$ N $\geq f_0$. Comme la membrane est tendue et rigide, l'équilibre statique des forces peut être réalisé. Froncée par les contacts tous les 2.5 μm, la membrane présente sous la vésicule des courbures de l'ordre du μm^{-1}. Ces zones sont propices à la nucléation hétérogène d'un pore. En effet, sous une tension de surface σ^+ aussi élevée, le rayon

minimum d'ouverture d'un pore n'est que d'un micron environ (cf. IV.5.2). C'est pourquoi tôt au tard un pore apparaît (F), relaxant une partie de la tension de surface par une diminution du volume encapsulé. Plus détendue, la vésicule offre alors moins de résistance aux forces exercées par les lignes, qui tirent sur la membrane. C'est pourquoi l'instabilité des tubes se développe (G à J), tant que $f_0 > 2\tau(\sigma)$. Leur croissance ne s'arrête que lorsque la vésicule a épuisé son excès de surface, et s'est remise sous forte tension. L'ouverture d'un autre pore transitoire peut alors relancer un nouveau cycle.

En conclusion, le réseau de lignes est un cas favorable où la perméabilité de vésicules peut être contrôlée par la géométrie du substrat. Au contraire d'autres motifs, la vésicule n'éclate pas brusquement, mais libère sa solution interne de façon intermittente. Comme dans les expériences du chapitre IV, les pores membranaires s'ouvrent et se referment régulièrement, tandis que la tension de surface effectue des cycles entre des valeurs σ^- et σ^+ estimées respectivement à 10^{-6} et 10^{-5} N/m.

V.3 Adhésion entre membranes libres

Dans cette dernière partie, nous examinons des interactions entre deux vésicules. Elles sont dites « libres », au sens où les deux bicouches sont très fluides, et peuvent éventuellement échanger des lipides entre elles, mais pas avec un réservoir. Ces conditions ne sont pas forcément réalisées dans des expériences où l'une au moins des deux bicouches étudiées est en contact direct avec une paroi solide (BLM, SFA, RICM, …).

3.1 Adhésion induite par la tension

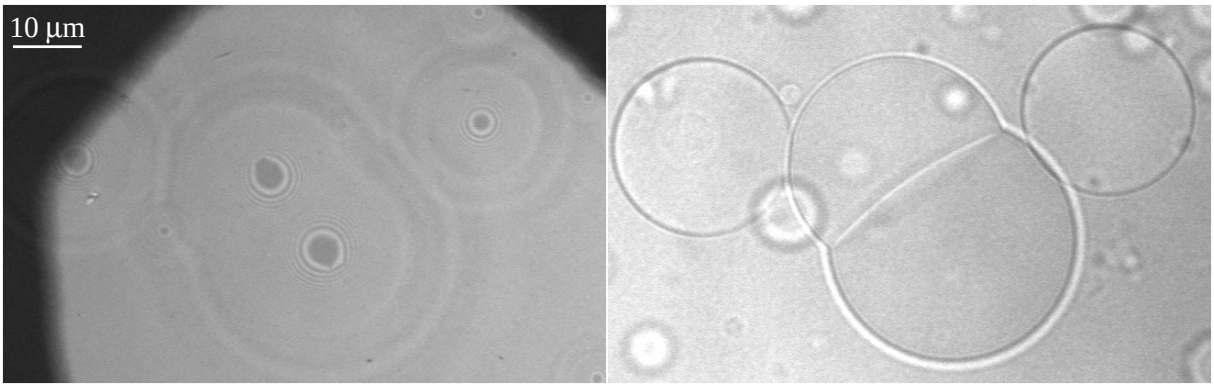


Figure 16 : Vésicules adhérant à la surface du verre (à gauche, en RICM) et entre elles (à droite en transmission). Les vésicules sont remplies de sucrose 300 mM. La solution externe contient 270 mM de glucose, 10 mM de tampon acido-basique HEPES et 1 mM de calcium. La lame de verre a été traitée par une solution de BSA 3 mg/mL, puis rincée.

Tendues par l'adhésion sur une surface, les vésicules adhèrent aussi entre elles sous l'effet des forces de Van der Waals (cf. 1.4a). Néanmoins, les membranes doivent être au préalable approchées l'une de l'autre à moins de 100 nm. Seules quelques vésicules se retrouvent suffisamment proches sur la surface après sédimentation, et forment des mousses spontanément. Pour mettre d'autres vésicules

en contact, un moyen simple consiste à les pousser les unes contre les autres, à l'aide d'une micropipette (les vésicules glissent sur la surface, grâce à une couche de lubrification intercalée entre la membrane et le verre). Cette méthode permet d'assembler les vésicules une à une en une mousse. Néanmoins, l'inconvénient majeur d'une tension induite par l'adhésion sur un substrat solide est l'éclatement des vésicules sur des défauts. Pour être utilisable, l'adhésion du substrat doit être modérée : calcium en concentration inférieure à 1 mM, poly(L-lysine) adsorbées à pH neutre, ou bien ancres cholestérol espacées sur la surface par d'autres molécules greffées.

3.2 Evolution des mousses de vésicules

Une fois collées entre elles, de quels degrés de liberté disposent des vésicules pour se réorganiser ? Le volume de l'agrégat doit être globalement conservé, de même que le nombre total de lipides. Néanmoins, par des expériences simples de microscopie optique, nous allons montrer que les mousses de vésicules ne sont pas des structures figées.

a) Croissance des contacts

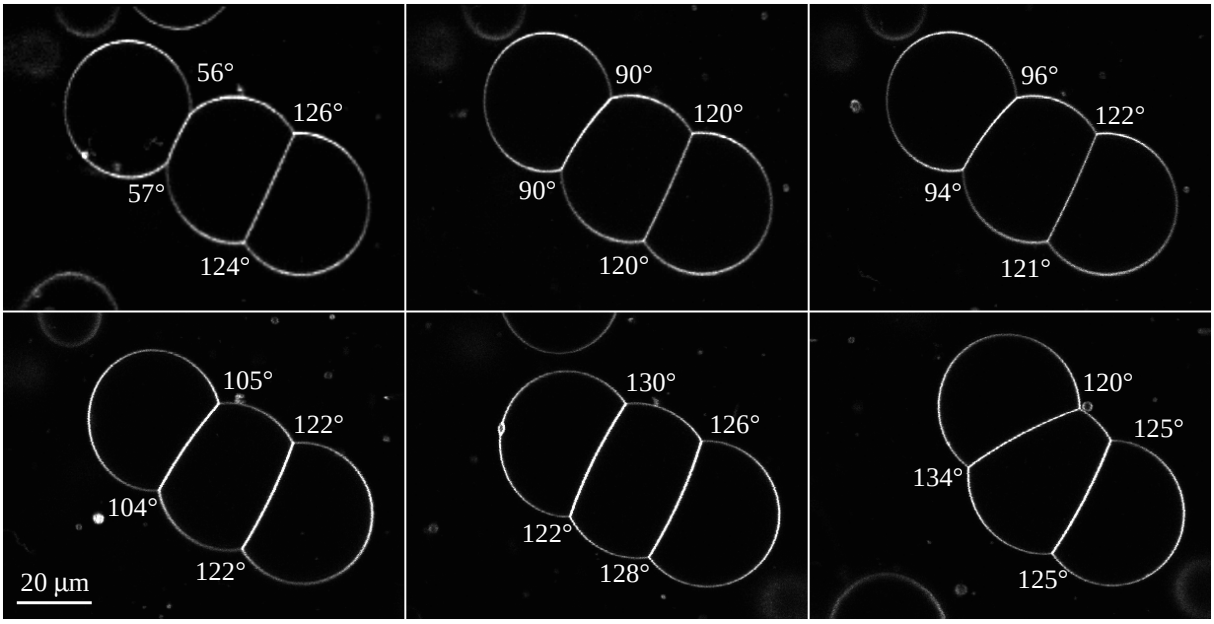


Figure 17 : Evolution au cours du temps d'une « chenille », composée de trois vésicules, en milieu calcium (Ca^{2+},$2Cl^-$ 0.5mM). La lame de verre est couverte de poly(L-lysine), afin d'éviter l'éclatement des vésicules, chargées positivement par le calcium.

Lorsqu'une vésicule est ajoutée à une mousse, elle commence par développer une aire de contact avec sa voisine. Sur la Figure 17, les deux vésicules de droite se sont assemblées dans une phase antérieure, et leurs angles de contact vérifient déjà approximativement la règle de Plateau (120°). Une troisième vésicule est incorporée par la gauche. On suit alors sur les images la progression de sa zone d'adhésion, ainsi que l'augmentation de l'angle de contact extérieur, depuis une valeur inférieur à 60°,

jusqu'à 120°. Comme sur les parois solides, la vésicule utilise l'excès de surface ΔA contenu dans ses ondulations thermiques, pour développer son aire de contact sur une membrane adjacente. A la fin de cette étape d'adhésion, la bicouche s'est donc progressivement mise sous tension.

b) Instabilité des parois

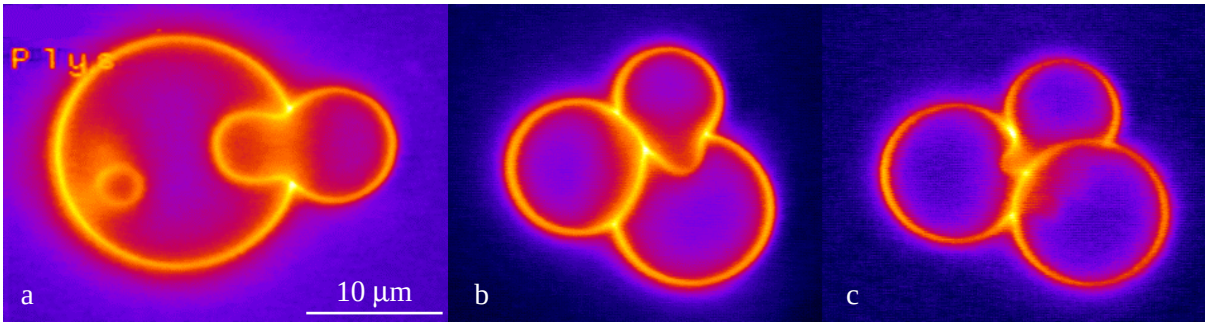


Figure 18 : Instabilité des mousses de vésicules, collées entre elles par les forces de Van der Waals. Les membranes sont au départ tendues par l'adhésion sur la lamelle de verre couverte de poly(L-lysine). Le solvant est un mélange 1:1 d'eau et de glycérol (viscosité 8 cPoise), les solutés du glucose 50 mM à l'intérieur, du sucrose 35 mM et du glucose 15 mM à l'extérieur.

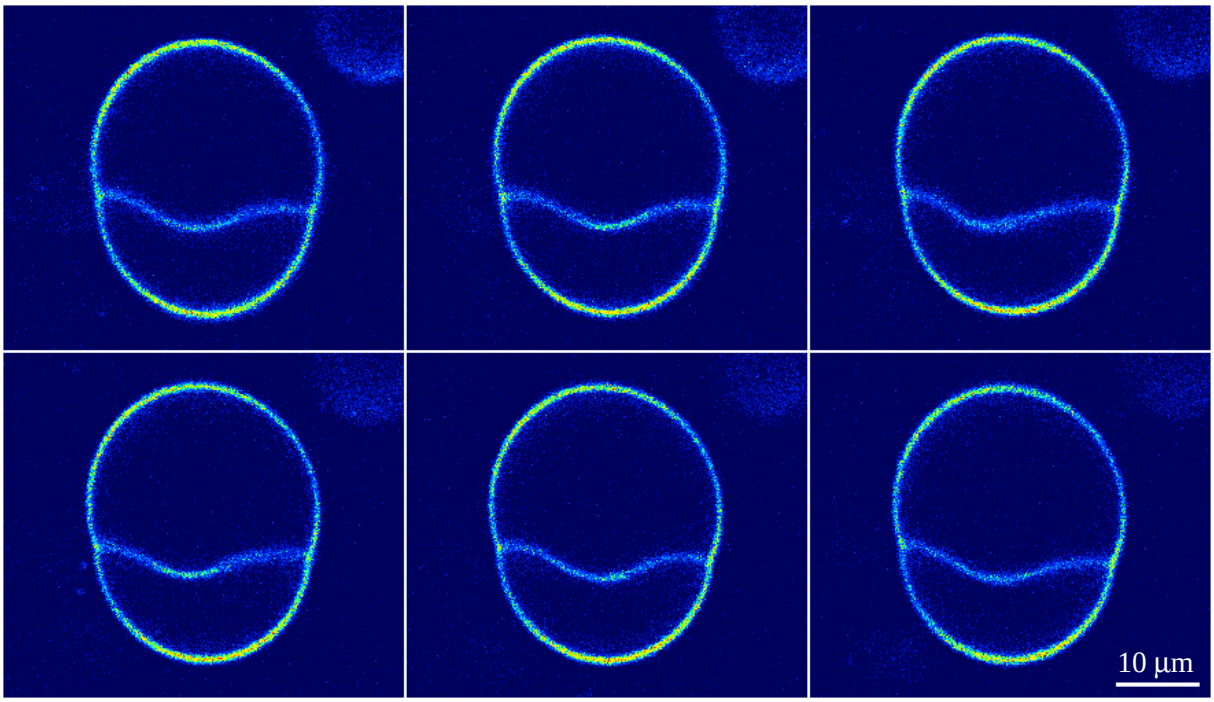


Figure 19 : Instabilité de la paroi, fluctuante, entre deux vésicules collées l'une à l'autre. Les vésicules adhèrent à la lamelle supérieure d'une cellule d'observation fermée, traitée à la poly(L-lysine). Les solutions internes contiennent du glucose 50 mM, la solution externe du sucrose 35 mM et du glucose 15 mM. La membrane de DOPC est marquée (en interne) avec 5 mol% du fluorophore Di-6-ASPBS. Ces images, prises sur le microscope à deux photons en mode TPEF, sont séparées en hauteur d'un incrément Δz=0.5 µm et en temps d'un intervalle $\Delta t \approx 1$ s.

Nous verrons plus loin comment la modification de la composition lipidique permet de s'arrêter à l'étape d'adhésion, en ajoutant une contribution de répulsion stérique à l'interaction entre bicouches. Néanmoins, dans le cas général où seule la répulsion d'hydratation s'oppose à l'attraction des membranes, l'assemblage des vésicules géantes ne se maintient pas indéfiniment sous la forme d'une mousse classique. Partant de calottes sphériques, les membranes développent une instabilité très particulière (Figure 18 et Figure 19). Aux premiers stades, cette déformation de la paroi entre deux vésicules se présente comme une simple ondulation. A cet endroit, la membrane devient détendue et fluctuante, au contraire des portions des vésicules restées sphériques. Parfois, la courbure peut changer de signe (Figure 18b et c), ou bien même devenir nulle en moyenne, l'invagination prenant une forme perlée (Figure I–6). Loin d'être anecdotique, cette instabilité de la paroi entre des vésicules est un phénomène général, indépendant de la présence ou non du glycérol, de même que du marqueur fluorescent. L'adhésion sur une paroi solide (électrostatique ou *via* des ancres cholestérol) peut servir à mettre les vésicules en contact initialement. Mais elle n'est pas indispensable, comme l'indique l'observation d'invaginations sur des doublets libres en suspension.

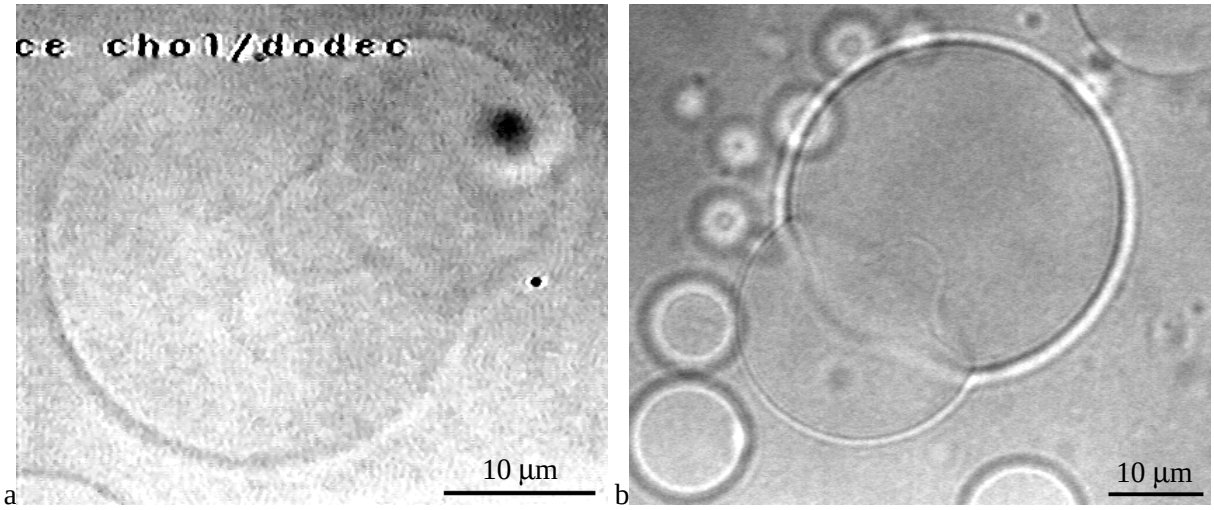


Figure 20 : Invaginations observées en transmission, sans marqueur fluorescent dans la membrane, entre des vésicules collées par des interactions différentes ; a) Adhésion induite par la tension ; la vésicule la plus grande adhère sur une surface greffée par des ancres cholestérol (cf. II.2.3b) ; b) Adhésion vraisemblablement par effet de déplétion ; la lame de verre a été traitée à la BSA (3 mg/mL).

Quel est l'origine physique d'un tel réarrangement spectaculaire des membranes dans une mousse de vésicules ? Afin de répondre à cette question, nous essayons de mesurer des changements éventuels de surface et de volume, au cours de la transformation. Les méthodes de traitement d'images, développées au III.2.4, fournissent en effet des estimations quantitatives de l'aire projetée et du volume, pour les formes présentant un axe de symétrie cylindrique. Les mesures effectuées sont expliquées à la Figure 21, sur deux images d'un doublet, avant et après l'apparition de l'invagination.

La courbure initiale de la paroi reflète une différence de tension de surface : la vésicule convexe est plus tendue que l'autre, concave (leurs tensions respectives sont notées $\sigma^+ > \sigma^-$).

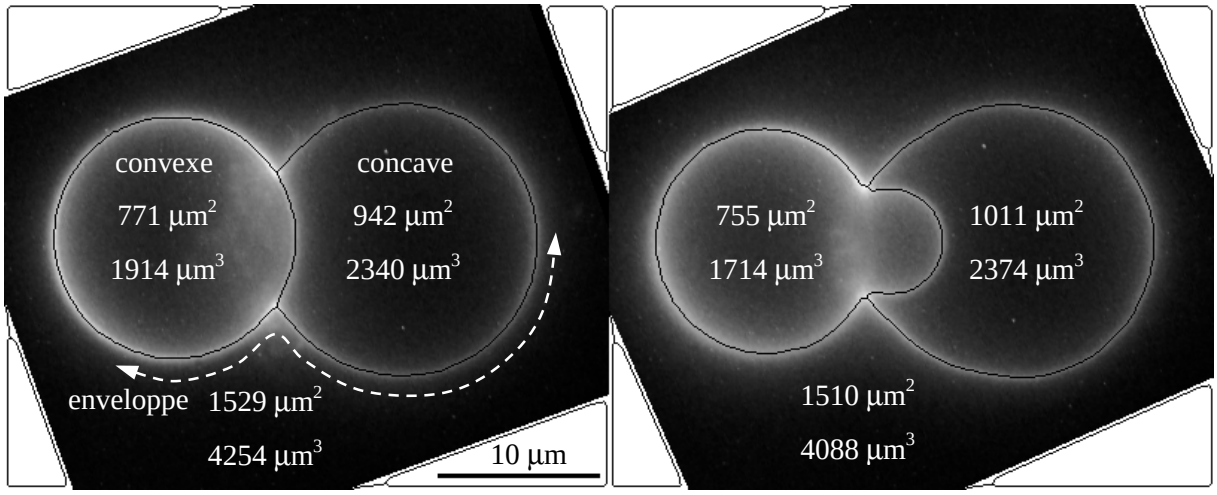


Figure 21 : Doublet de vésicules, en milieu calcium (1 mM), avant et après l'instabilité. Le trait noir représente le contour des membranes, détecté par traitement d'images. Les aires et volumes indiqués ont été intégrés numériquement, en utilisant la symétrie de révolution (cf. III.2.4b).

Le traitement informatique des images de fluorescence permet de mesurer indépendamment la surface de chaque vésicule, ainsi que celle de l'enveloppe extérieure, c'est-à-dire excluant la paroi interne. Sur cet exemple, l'aire totale $A_{\text{totale}} = A_{\text{convexe}} + A_{\text{concave}}$ passe de 1713 à 1766 μm² (elle est donc quasi-constante, à l'incertitude près). La surface de la paroi est déduite quant à elle par différence : $A_{\text{paroi}} = \left(A_{\text{totale}} - A_{\text{enveloppe}}\right)/2$. Son augmentation est ici significative, de 92 à 128 μm².

Au départ la plus tendue, la vésicule convexe a perdu, après transformation, une partie notable de son volume, alors que sa surface a peu varié. La vésicule concave possède au contraire un volume constant, tandis que son aire a légèrement augmenté. Si le nombre de molécules était constant dans chaque vésicule, ces deux variations indiqueraient globalement une diminution de la tension σ^+, initialement la plus élevée, et une augmentation de la tension σ^-, au départ la plus basse.

Bien entendu, l'examen de deux images uniquement ne suffit pas à expliquer le mécanisme d'échange de surface entre les deux vésicules. La même méthode est appliquée pour des doublets dont la transformation complète a pu être filmée. Les deux pages suivantes présentent quelques images intermédiaires, ainsi que les calculs correspondants aux films.

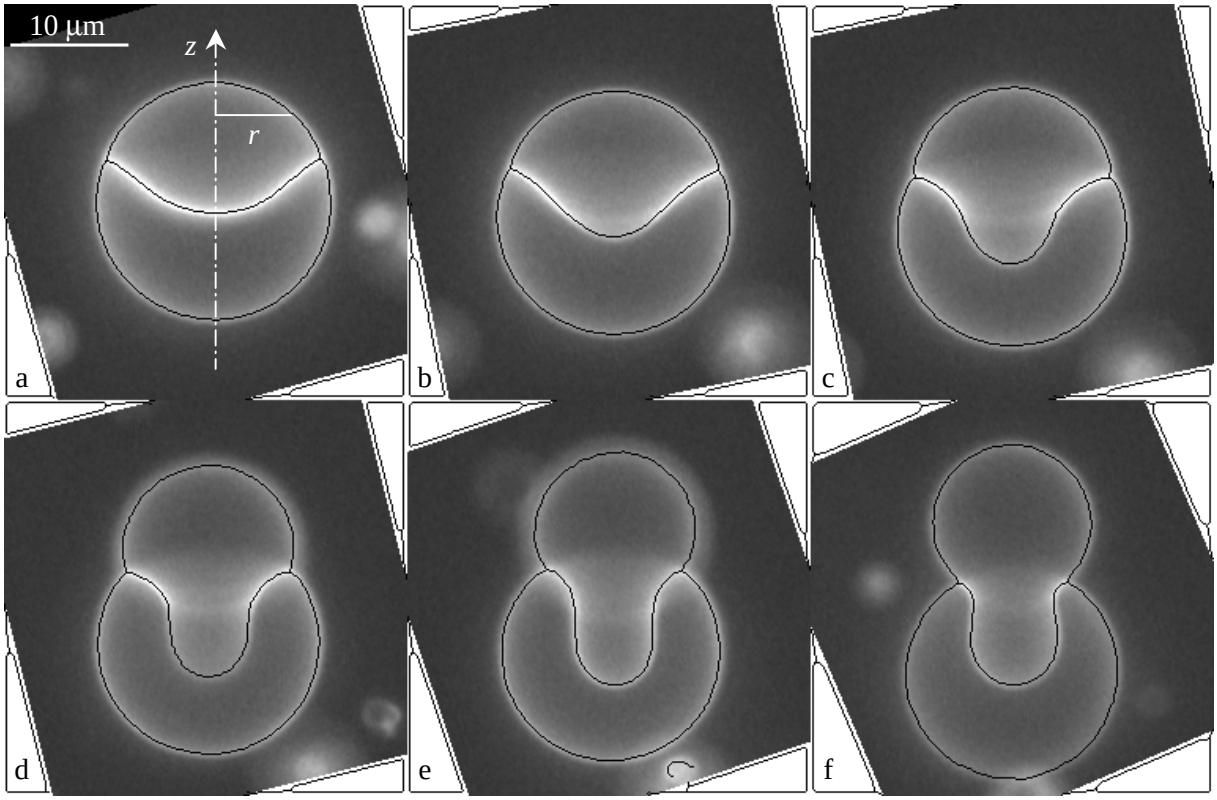


Figure 22 : Evolution d'un doublet aux instants *t*=0 (a), 38 (b), 54 (c), 84 (d), 116 (e) et 180 s (f). Remplies de sucrose 300 mM, les vésicules sont suspendues dans du glucose 250 mM, contenant par ailleurs 22.5 mM de tampon Tris borate, 0.5 mM d'EDTA et 1.2 mM de Ca^{++},$2Cl^{-}$.

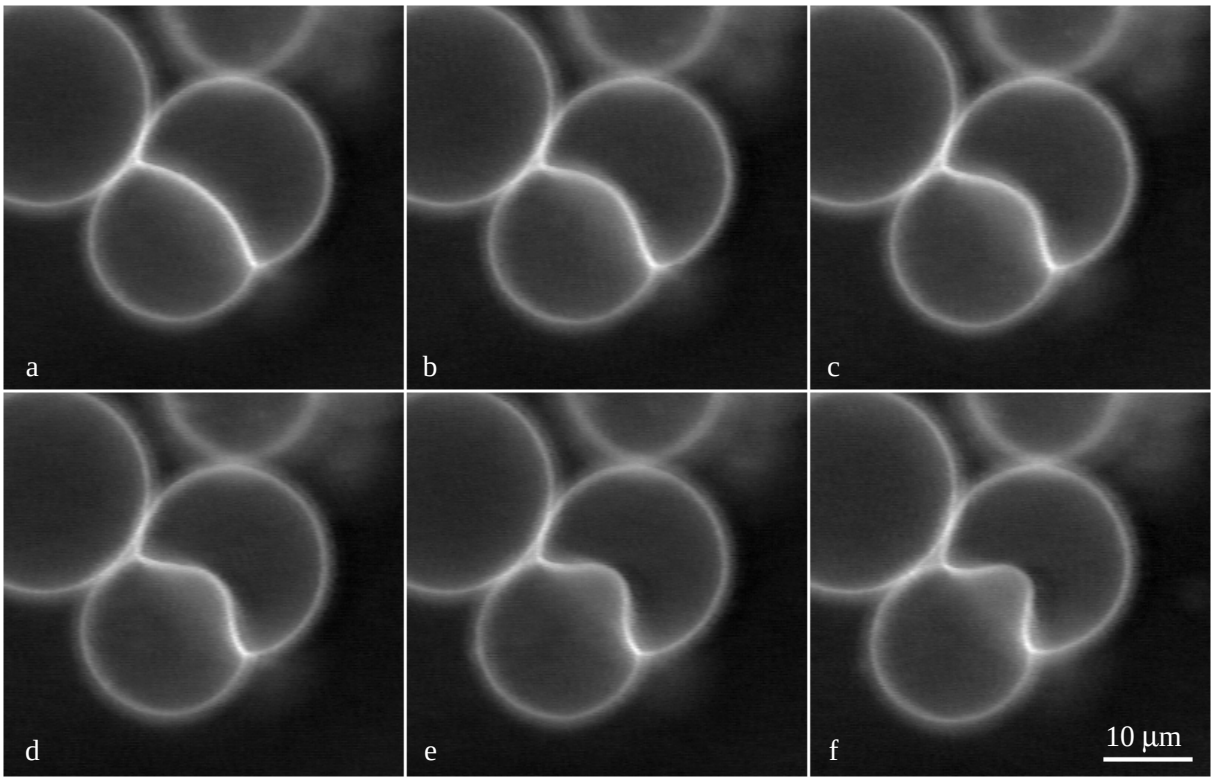


Figure 23 : Autre doublet, dans la même préparation ; *t*=19 (a), 22 (b), 23 (c), 25 (d), 29 (e) et 36 s (f).

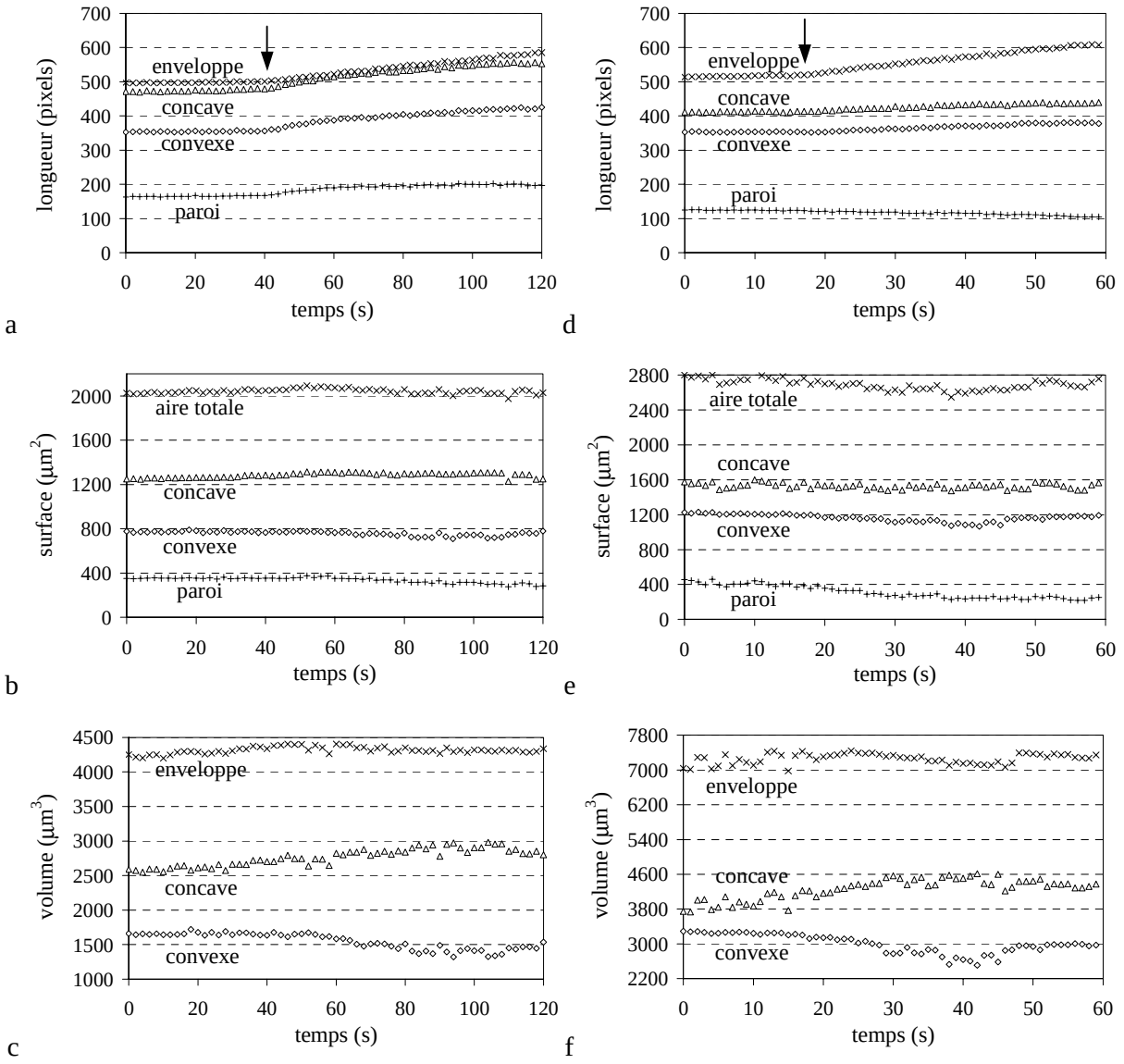


Figure 24 : Evolution temporelle de la longueur des contours, de la surface projetée et du volume interne, pour le doublet de vésicules de la Figure 22 (a, b, c) et celui de la Figure 23 (d, e, f). Les portions de membranes « convexe, concave, enveloppe et paroi » sont celles définies à la Figure 21.

Les deux doublets de vésicules présentent des évolutions analogues, excepté le fait que l'une est deux fois plus rapide que l'autre. L'instabilité débute lorsque les contours des vésicules commencent à augmenter (voir la flèche). Néanmoins, cette évolution est trompeuse, car les surfaces des membranes restent en fait sensiblement constantes, comme le révèlent les intégrations numériques[1]. L'aire projetée de la paroi présente même une légère diminution. Elle s'explique qualitativement par la forme allongée de l'invagination, qui rapproche la membrane de l'axe de symétrie (les périmètres intégrés sont plus faibles). Le volume total étant conservé sur ces deux exemples, les membranes restent

[1] $A_p = \int 2\pi r \sqrt{dr^2 + dz^2}$ et $V = \int \pi r^2 \, dz$, r et z désignant les coordonnées cylindriques définies à la Figure 22.

étanches vis à vis de l'extérieur durant toute la transformation. Cependant, un échange de solution interne est observé, depuis la vésicule convexe vers la vésicule concave. Ce flux de solvant est dirigé dans le sens du gradient de pression hydrostatique, dû à la courbure initiale de la paroi. Il implique néanmoins l'existence de pores transitoires entre les vésicules. Mais quels types particuliers de défauts nucléateurs peuvent bien exister entre deux bicouches fluides, favorisant l'ouverture de tels pores ? La reprise des fluctuations thermiques au niveau de la paroi est une observation encore plus déroutante. D'où provient la diminution globale de sa tension de surface, quand bien même à la fois la surface projetée totale A_p et le volume du doublet apparaissent sur les courbes strictement conservés ?

Une seule explication permet de répondre à ces questions : la surface lipidique totale A n'est pas constante, mais augmente tandis que l'instabilité se développe. Ces molécules de phospholipides ne viennent pas de l'extérieur du système, mais bien de la paroi elle-même. Les deux membranes lipidiques accolées peuvent en effet réunir leurs monocouches externes, pour ne former plus qu'une seule bicouche. Connu sous le nom d'**hémifusion**, ce processus libère de l'excès de surface et détend la paroi. Il se pourrait aussi qu'il favorise des défauts topologiques, expliquant du même coup l'augmentation de perméabilité uniquement entre les deux vésicules, mais pas envers l'extérieur.

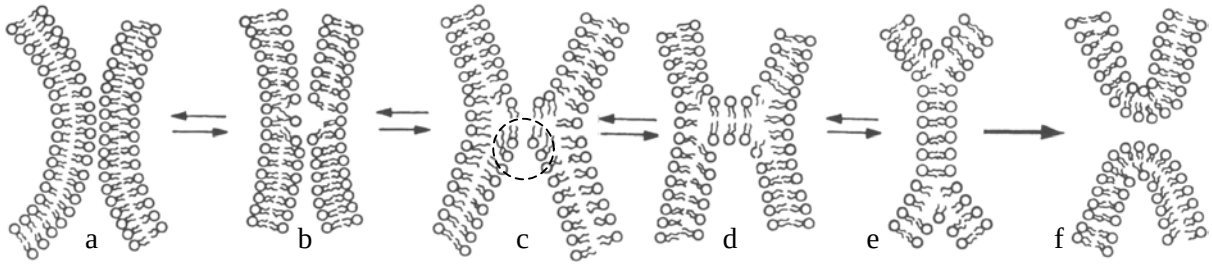


Figure 25 : Représentation schématique courante du réarrangement des lipides, au cours de l'hémifusion[41]. a) les membranes adhèrent, à une distance d'équilibre $d_{\text{équ}}$, de l'ordre d'une épaisseur de bicouche e ; b) par fluctuation thermique, des lipides s'approchent plus près, et s'attirent par effet hydrophobe ; c) à d) un passage en forme de tige ("stalk") se développe ; e) la structure s'inverse, à énergie de courbure constante : la paroi n'est maintenant plus constituée que d'une seule bicouche ; f) rupture de la membrane, laissant place à un pore de fusion. Ces croquis sont dessinés dans un plan, mais représentent en réalité des surfaces dans l'espace. La zone entourée présente une structure locale de type micelle inverse, favorisée par les lipides à $c_0<0$ (Encadré IV–6).

Dans la littérature, le critère expérimental pour détecter l'hémifusion est la mise en évidence du mélange des lipides entre les deux bicouches[1], sans qu'il y ait échange entre les solutions aqueuses de part et d'autre de la membrane. Les expériences sont toujours réalisées avec des membranes très tendues : entre deux bicouches déposées sur le mica[24,28], ou bien entre une vésicule (LUV ou GUV) et

[1] par une méthode fluorimétrique (grâce à un fluorophore membranaire) ou bien conductimétrique (avec un ionophore, c'est à dire une inclusion dans la membrane laissant passer un type d'ions).

un film noir lipidique (BLM) tendu entre deux réservoirs[42]. Il a été montré que l'apport de lipides exogènes peut promouvoir ou au contraire bloquer l'hémifusion, selon leur courbure spontanée : le cholestérol (c_0<0) est un promoteur, tandis que les lysolécithines (c_0>0) produisent l'effet inverse[43]. Cette observation a conduit à développer le modèle du "stalk" : des lipides appartenant aux deux monocouches externes, attirés entre eux par effet hydrophobe, construisent un passage reliant les deux bicouches. Cette structure transitoire, de courbure locale très prononcée, évolue rapidement vers une bicouche unique joignant les deux membranes (Figure 25). Or les auteurs ne tiennent jamais compte de l'excès de surface, issu de la réunion partielle des bicouches. En effet, en présence d'un réservoir de lipides (le ménisque dans le cas de la BLM, ou bien les bords des bicouches adsorbées sur le mica en SFA), les molécules en surnombre sont évacuées au loin. Par contre, dans le cas de membranes isolées, cet excès de lipide s'accumule forcément dans la paroi, avant d'être éventuellement redistribué entre les deux vésicules. La formation des invaginations s'explique alors par une instabilité de flambage, due à l'apport de lipides issu de l'hémifusion des membranes. Si le modèle du "stalk" décrit bien les premiers stades de nucléation (Figure 25a–e), par contre il ne donne pas les étapes intermédiaires entre l'hémifusion et le pore de fusion (f). Au vu des résultats avec les vésicules géantes, nous pouvons proposer le réarrangement suivant des bicouches lipidiques :

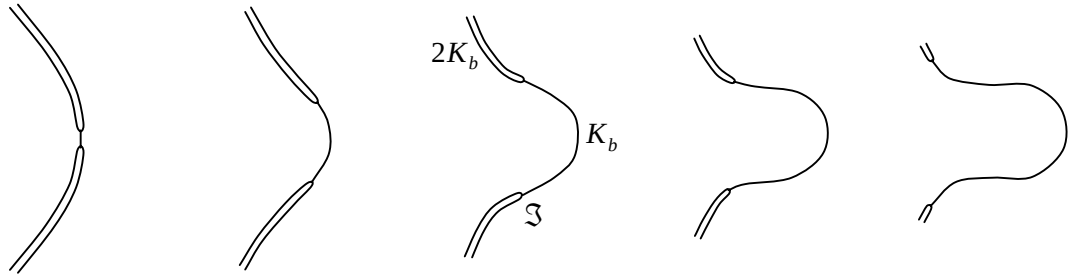


Figure 26 : Flambage de la paroi, accompagnant la croissance de la zone d'hémifusion entre deux membranes libres. Un trait noir représente une bicouche de phospholipides. Les membranes sont dessinées uniquement dans la zone de contact (mais elles sont bien refermées sur elles-mêmes).

Pourquoi cette simple instabilité de flambage n'a-t-elle jamais été décrite auparavant dans la littérature ? Pourtant, plusieurs auteurs ont étudié l'injection locale de calcium près de liposomes géants neutres, afin de déclencher leur adhésion[23,44]. Mais dans ces expériences, l'une au moins des vésicules est tenue par une micropipette. Sa tension de surface est alors imposée par la pression d'aspiration. Or l'invagination est une instabilité dont la force motrice est la relaxation des tensions de surface σ^+ et σ^- des deux membranes. C'est pourquoi elle ne se développe pas si l'une des deux tensions est maintenue constante par une action extérieure.

A notre connaissance, le seul article théorique considérant la possibilité, pour deux membranes fermées, de relaxer une partie de leur tension de surface en échangeant des lipides, est celui-là même

qui envisageait par ailleurs l'existence des pores macroscopiques stationnaires[45]. Comme ce modèle suppose une conservation de la surface totale de lipides (A constante, A_p variable), il prévoit que la relaxation de σ^+ s'accompagne en contrepartie d'une augmentation de la tension σ^-, initialement la plus basse. La prise en compte de l'hémifusion conduirait sans doute à la diminution des deux tensions simultanément. De même que la forme des doublets de bulles intéresse les mathématiciens encore de nos jours[46], celle des doublets de vésicules pourrait être étudiée par une approche plus théorique que la nôtre. Il existe en effet des méthodes numériques pour simuler les contours de vésicules, dans l'hypothèse de formes de révolution[47]. Elles peuvent aussi modéliser la coexistence de deux phases différentes dans une membrane[48] : dans le cas de l'hémifusion, ce serait les domaines où les deux bicouches accolées subsistent, raccordés par une ligne de défaut à une bicouche unique.

c) Fusion complète des vésicules

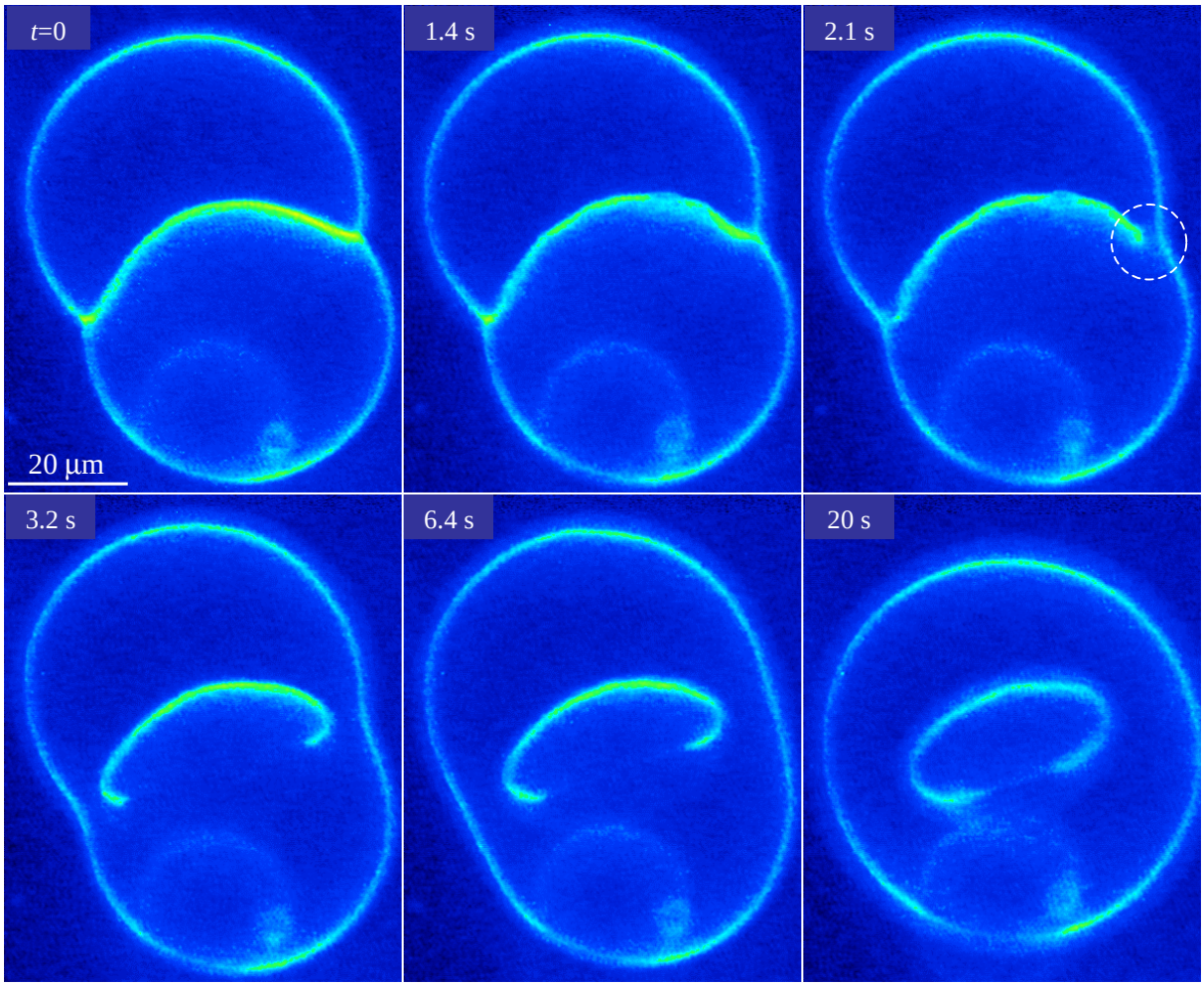


Figure 27 : Rupture de la paroi et réunion des deux compartiments aqueux. Les membranes se composent de DOPC et de cholestérol 50–50 mol%, et environ 4 mol% du marqueur fluorescent Di-6-ASPBS. L'intérieur des vésicules contient du glucose 100 mM, l'extérieur du sucrose 67 mM et du glucose 33 mM. Le solvant est un mélange 1:2 d'eau et de glycérol (viscosité 32 cPoise). La mise sous tension par illumination favorise d'abord l'adhésion, puis l'hémifusion, et ici la fusion des vésicules.

Dans les expériences avec les BLM, les pores de fusion sont décelés par le passage d'un soluté entre les deux réservoirs de solution[(42)]. Avec les vésicules géantes, nous visualisons directement la rupture de la membrane. L'évolution d'un doublet de vésicules, après l'hémifusion, est observée à la Figure 27. La ligne de défaut raccordant les trois bicouches est entourée. Dans cette zone, les lipides sont organisés localement comme une micelle (directe) de tensioactifs (cf. Figure 25e). Cette structure est instable pour des phospholipides, dont la courbure spontanée c_0 est nulle. C'est pourquoi la paroi entre les deux vésicules se détache des deux autres bicouches. Dès lors, celles-ci ne constituent plus qu'une seule membrane, enveloppant la réunion des deux compartiments aqueux. La bicouche issue de la paroi se referme sur elle-même, afin de diminuer l'énergie de son bord libre. Le ralentissement des écoulements de solution interne par la viscosité est ici encore un atout : la transformation lente du doublet en une seule vésicule a duré en tout une vingtaine de secondes.

3.3 Adhésion spécifique stabilisée par une répulsion stérique

a) Préparation de « cellules artificielles »

Comme annoncé au paragraphe 1.5, une étude préliminaire a été réalisée sur un modèle ultra-simplifié de cellules adhérentes : des vésicules géantes décorées sur leur membrane externe par une protéine d'adhésion, de la famille des cadhérines[1]. Ce sont des fragments purifiés EC1–EC2 de la cadhérine-11. Afin que la surface des vésicules soit recouverte d'ions Ni^{++}, qui fixent les protéines par leur terminaison 6xHis, le lipide NTA complexé au nickel (Figure 8) est mélangé au lipide diluant DOPC. Nous allons voir qu'il est aussi nécessaire d'incorporer des molécules qui jouent le rôle d'une matrice extracellulaire pour nos « cellules artificielles » : des phospholipides DSPE-PEG_{2000} (Fluka 43705, $M_w \approx 2800$ g/mol), possédant des chaînes carbonées C18:0, et une tête polaire greffée à un pelote de PEG. Plusieurs compositions lipidiques ont été testées (en fractions molaires) :

- (1) DOPC/NTA (92:8) soit 10 % en poids de lipide ligand ;
- (2) DOPC/NTA (87:13) soit 20 % " " " " "
- (3) DOPC/NTA/PEG_{2000} (87:8:5).

Dans les trois cas, le protocole classique d'électroformation (cf. II.1.3), dans du sucrose 300 mM, conduit à des vésicules géantes fluctuantes et de tailles normales. Autre constat positif, les ions Ni^{++} complexés ne posent aucun problème d'éclatement des vésicules sur le verre.

Sauf indication contraire, les vésicules sont d'abord marquées par perfusion du colorant Di-6-ASPBS 5.6 µM (cf. III–2.2b). Les aliquots de vésicules (20 µL) sont ensuite sédimentés dans 400 µL de glucose 250 mM, contenant par ailleurs un tampon à pH8, TBE 0.25x (22.5 mM Tris borate et 0.5 mM EDTA, complexant les cations divalents) pour ne pas dénaturer les protéines. On ajoute alors 5 à

[1] Les expériences ont été réalisées avec Hélène Feracci et Emilie Perret (UMR 144 CNRS / Institut Curie).

20 µL d'une solution de protéine environ 5 µg/mL, dans 20 mM de Tris pH8 et 250 mM d'imidazole[1]. Les vésicules sont incubées avec la protéine pendant approximativement une heure. On prélève ensuite le surnageant (370 µL), qui contient essentiellement des protéines non greffées. La plupart des vésicules restent dans les 30 µL au fond du tube. L'adhésion homophile des cadhérines peut ensuite être déclenchée par le calcium, selon deux protocoles légèrement différents :

- soit dans le même tube, en complétant à 400 µL avec du tampon, contenant en plus 1 à 2 mM de Ca^{++},$2Cl^{-}$; les vésicules sont alors observées plus tard ;
- soit par transfert des vésicules dans une chambre d'observation ouverte (cf. II.2.1a), afin de suivre en temps réel les transformations opérées sur elles par le calcium.

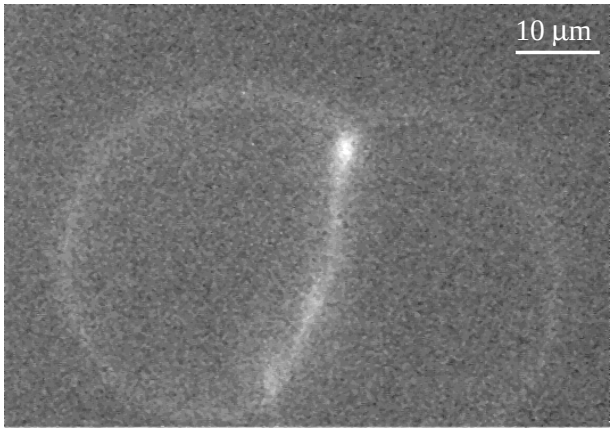


Figure 28 : Visualisation de la zone d'adhésion grâce à une cadhérine fluorescente. Les vésicules ont été préparées à partir du mélange lipidique (1), incubées avec la cadhérine-11 (EC1–EC2–6xHis), 0.125 µg/mL, mélangée avec 5% de protéine fluorescente (Alexa 546), dans du glucose 250 mM / tampon TBE 0.25x à pH8. Après 50 min, la moitié de la solution a été échangée par un milieu comportant 2 mM de calcium. Les premiers contacts ont été observés au bout de 35 min.

Afin de tester si les protéines s'accrochent bien aux membranes *via* l'hexamère d'histidine, des observations ont été réalisées par marquage fluorescent, non plus des lipides, mais des protéines :

- la cadhérine-11 marquée avec Alexa 546, sur des vésicules de composition lipidique (1) ;
- une protéine GFP ("green fluorescent protein"), pour chacune des formulations (2) et (3)[2].

Dans le cas de la cadhérine-11 (Figure 28), une localisation de la protéine sur la membrane des vésicules est observée, malgré un niveau de fluorescence faible. De plus, la protéine semble bien s'accumuler dans la zone d'adhésion entre les deux vésicules. L'expérience mériterait cependant d'être reproduite, avec un taux de marquage fluorescent plus fort. Quant aux images avec la GFP (non montrées), l'étude de leur anisotropie de fluorescence (cf. III–75à77) montre que les protéines sont

[1] entrant en compétition avec 6xHis pour complexer Ni^{++}, sa concentration finale ne doit pas dépasser 20 mM.

[2] expérience réalisée par L. Moreaux (ESPCI / Neurophysiologie) et F. Amblard (Institut Curie / PCC).

bien orientées perpendiculairement aux bicouches. Elles sont donc greffées spécifiquement aux lipides NTA, et non simplement adsorbées à la surface des vésicules. Par ailleurs, les membranes de compositions (2) et (3) présentent des niveaux de fluorescence équivalents en présence de GFP. Les pelotes de PEG ne constituent donc pas une barrière répulsive pour les protéines.

b) Adhésion électrostatique due au calcium

Les ions calcium sont nécessaires dans le milieu pour déclencher l'interaction *trans* des cadhérines (cf. 1.5). Comment étudier dès lors l'adhésion des protéines, alors que Ca^{++} provoque lui même une agrégation très forte des membranes ? Les vésicules préparées avec le mélange (1), sans lipide lié au PEG, forment des mousses en milieu contenant 1 à 2 mM de Ca^{++},$2Cl^{-}$. Les vésicules présentent de larges aires de contact entre elles, et développent rapidement des invaginations.

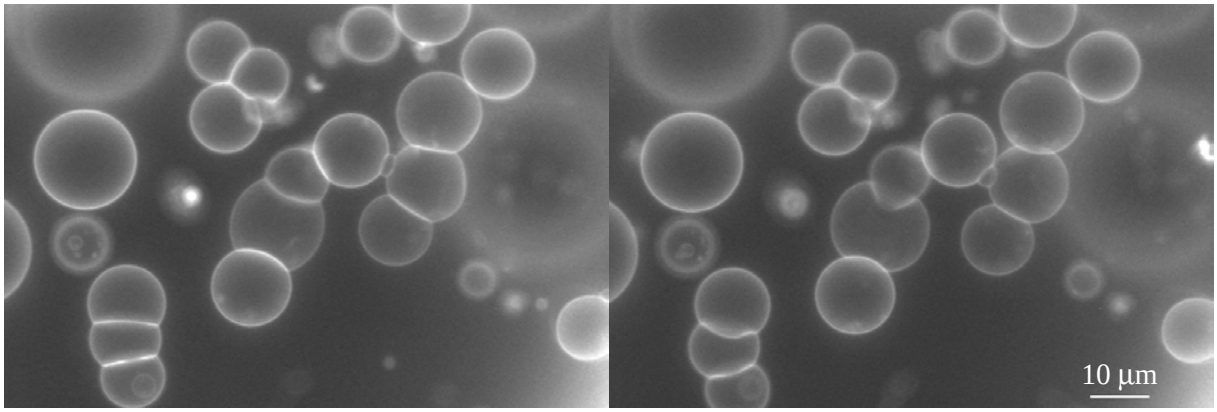


Figure 29 : Echantillon témoin, sans cadhérine, mais avec 2 mM de calcium, pour des vésicules préparées avec la composition (1). Les invaginations apparaissent au bout de 2 min environ.

c) Adhésion spécifique des cadhérines entre vésicules « chevelues »

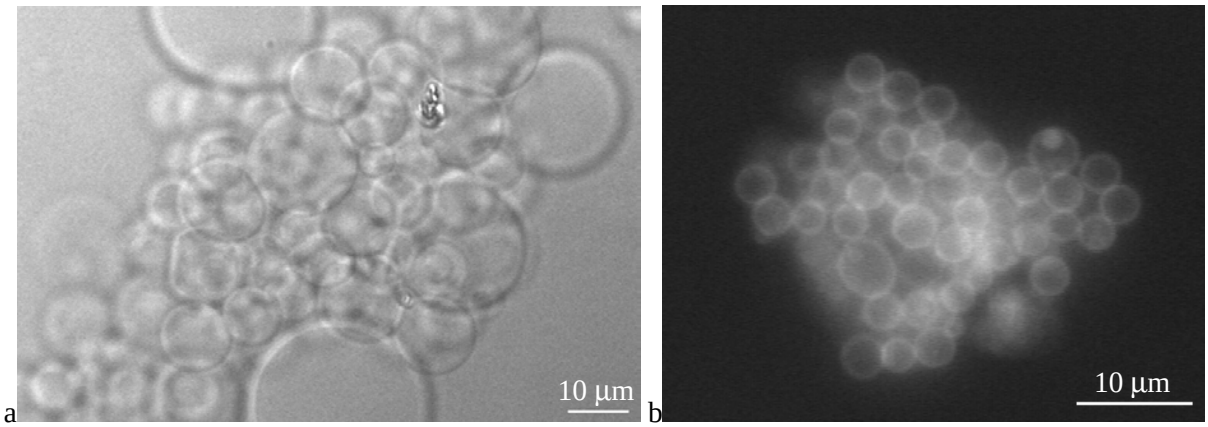


Figure 30 : Agrégation des vésicules préparées avec la formulation (2), visualisées en microscopie de transmission (a) et de fluorescence (b), grâce au marqueur membranaire Di-6-ASPBS. Les vésicules ont été incubées avec la protéine « dans le tube », pendant 6 heures, dans un milieu 1 mM Ca^{++},$2Cl^{-}$.

Les vésicules sont protégées efficacement contre l'adhésion non spécifique, grâce à une couche de PEG greffé sur une partie des lipides, assurant une répulsion stérique (1.1b). En effet, des échantillons témoins (sans protéine), respectivement à 0.6 mM et 1.2 mM de calcium, présentent seulement quelques adhésions entre vésicules, mais aucune invagination. Quand l'adhésion est due au calcium uniquement, les mousses contiennent au plus une dizaine de vésicules, dont les membranes forment des angles proches de 120°. Les parois séparant les vésicules sont larges, et développent au cours du temps des invaginations(Figure 29). Cette structure de mousses créées par adhésion non spécifique est facilement reconnaissable des agrégats stabilisés par le greffage du PEG_{2000}.

L'aspect est très différent pour un échantillon de vésicules couvertes de PEG et de cadhérines, mises en présence de calcium 1 mM pendant une longue durée, à l'intérieur d'un tube. Il ne reste alors plus aucun vésicule isolée en suspension. Elles sont en effet toutes agglutinées en grappes, qui comptent chacune des centaines de vésicules (Figure 30). Leurs formes individuelles sont quasi-sphériques, les aires de contact entre vésicules restant assez faibles.

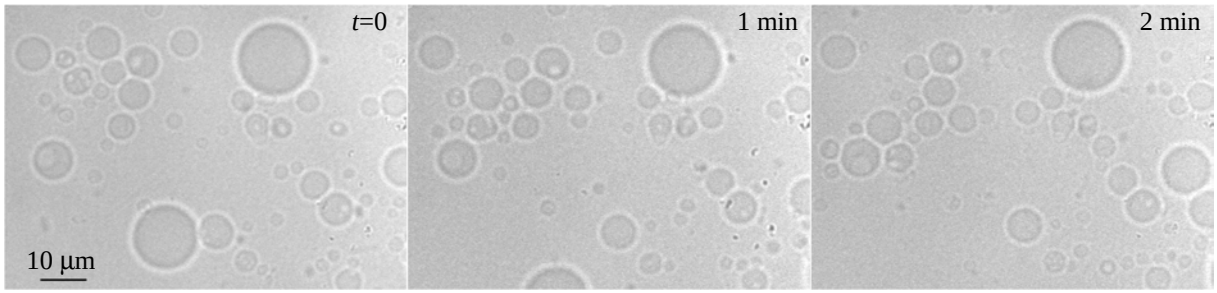


Figure 31 : Etablissement des contacts entre des vésicules recouvertes de PEG_{2000} et de cadhérine-11, au hasard des rencontres. Le calcium est ajouté directement « sous l'objectif ».

Afin de visualiser l'assemblage progressif des vésicules, le calcium est ajouté cette fois directement dans la chambre d'observation[1]. L'injection induit par ailleurs des écoulements, qui mettent en mouvement les vésicules, et favorisent les rencontres entre deux membranes. Au lieu de se repousser normalement, à cause des ondulations thermiques, celles-ci restent collées l'une à l'autre. Les vésicules forment ainsi des chaînes (Figure 31), qui doivent être les premiers stades vers les agrégats géants observés précédemment.

Un dernier trait caractéristique de l'adhésion spécifique avec les cadhérines est la réversibilité des contacts. A l'inverse, le pontage électrostatique de deux vésicules par le calcium n'est pas réversible, du moins lorsque l'étape d'hémifusion a débuté. Sur la Figure 32, deux vésicules initialement collées se détachent à cause d'un cisaillement, lorsqu'elles sont emportées par un léger flux hydrodynamique. A la fin, elle ne sont plus reliées que par un étroit filament de membrane.

[1] injection de 4 µL d'une solution de Ca^{++},$2Cl^{-}$ 100 mM dans le puits d'observation (400 µL).

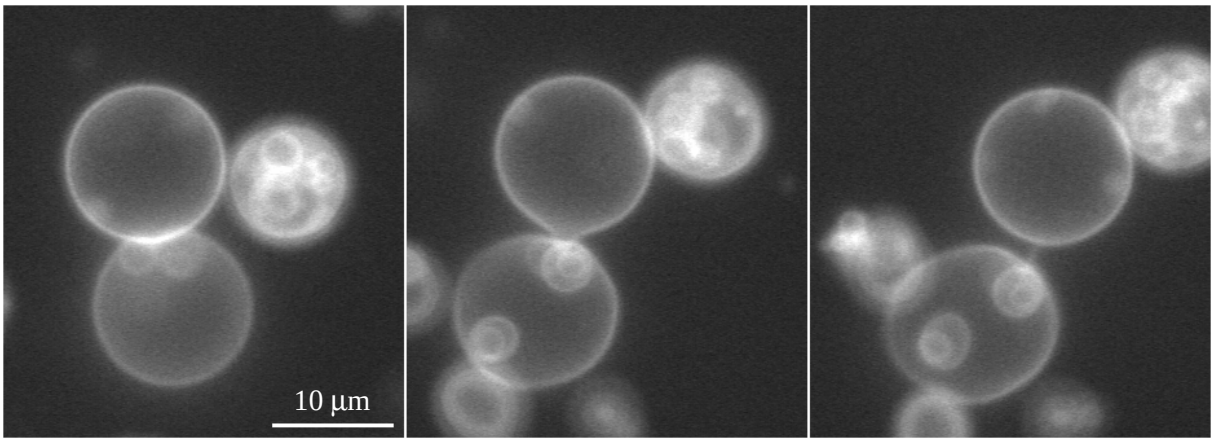


Figure 32 : Réversibilité des contacts, par adhésion avec la cadhérine-11.

3.4 Perspective : étude fine des réarrangements membranaires par microscopie SHG

Le principal atout de la microscopie par génération de second harmonique est d'être une imagerie en lumière cohérente. A notre connaissance, c'est la seule microscopie optique qui produit des interférences entre des membranes libres. L'intensité de SHG varie alors quasi-linéairement avec la distance entre les feuillets externes des bicouches, dans la gamme 30–300 nm (cf. Figure III–35c). Bien sûr la SHG ne peut rivaliser avec la microscopie électronique pour résoudre les détails microscopiques des jonctions adhésives, entre des membranes biologiques ou artificielles. Par contre, par sa vitesse d'acquisition des images, elle offre la possibilité d'étudier la dynamique de croissance des domaines d'adhésion spécifique. Sur l'exemple des cadhérines, la distance entre les membranes accolées est fixée par le nombre de segments EC imbriqués. Leur longueur individuelle étant environ 4 nm[35], la distance estimée entre les membranes est 8 nm pour des protéines tronquées EC1–2, et 20 nm pour les domaines extracellulaires complets EC1–5. L'extinction de la SHG serait quasi-totale dans les deux cas. Pour que les domaines d'adhésion forte soient visibles sur les images, deux conditions supplémentaires doivent être réalisées :

- leur extension latérale doit être plus grande que la résolution optique Δx, environ 500 nm ;
- leur contraste en SHG doit être suffisant par rapport aux portions de membranes non collées.

Ce deuxième point pourrait bénéficier d'un effet d'éloignement des membranes autour d'un point d'adhésion forte, qui a été décrit théoriquement et observé expérimentalement[49,50]. Deux bicouches pincées très localement (en pratique par un piège optique), et dont les ondulations produisent par ailleurs une forte répulsion entropique, réagissent en s'éloignant d'autant plus loin que la distance minimale h_0 au point de contact est petite (notée $d_{éq}$ dans le reste du manuscrit). La distance h_{max} autour du « bouton pression » peut alors être 10^3 fois plus grande que h_0. Comme l'effet est dû uniquement à l'état fluide des membranes, il doit exister aussi autour des domaines d'adhésion. Un écartement de 50 à 100 nm entre les bicouches serait alors suffisant pour les faire réapparaître sur l'image en SHG.

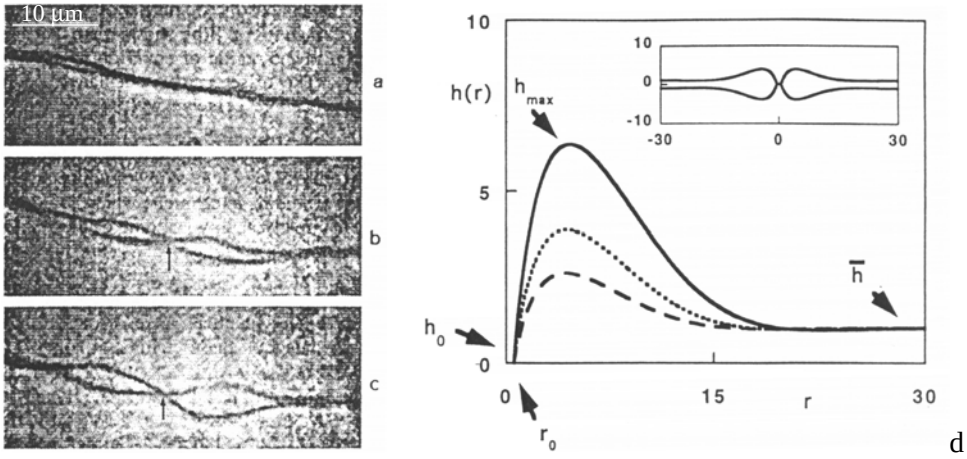


Figure 33 : Décollement de deux membranes libres pincées par un piège optique (a, b, c), et profil de distance théorique correspondant[49], en forme de « bouton pression ».

Pour finir cette partie prospective, quelques idées sont avancées sur les conditions d'une expérience pour visualiser l'établissement d'une jonction adhérente. Grâce à des micropipettes, on approcherait l'une contre l'autre deux cellules vivantes, ou bien leurs imitations artificielles. L'apparition de pointillés le long des membranes adjacentes, en SHG uniquement, serait la signature de plaques d'adhésion. Une expérience préliminaire, avec des cellules confluantes, a montré des segments où la SHG est éteinte, mais pas la fluorescence (le trou indiqué par la flèche n'est donc pas un pore !). Ces structures sont immobiles, sans doute parce que les cellules forment déjà un tapis dense sur le substrat. Il reste à démontrer que les cadhérines sont bien localisées à cet endroit…

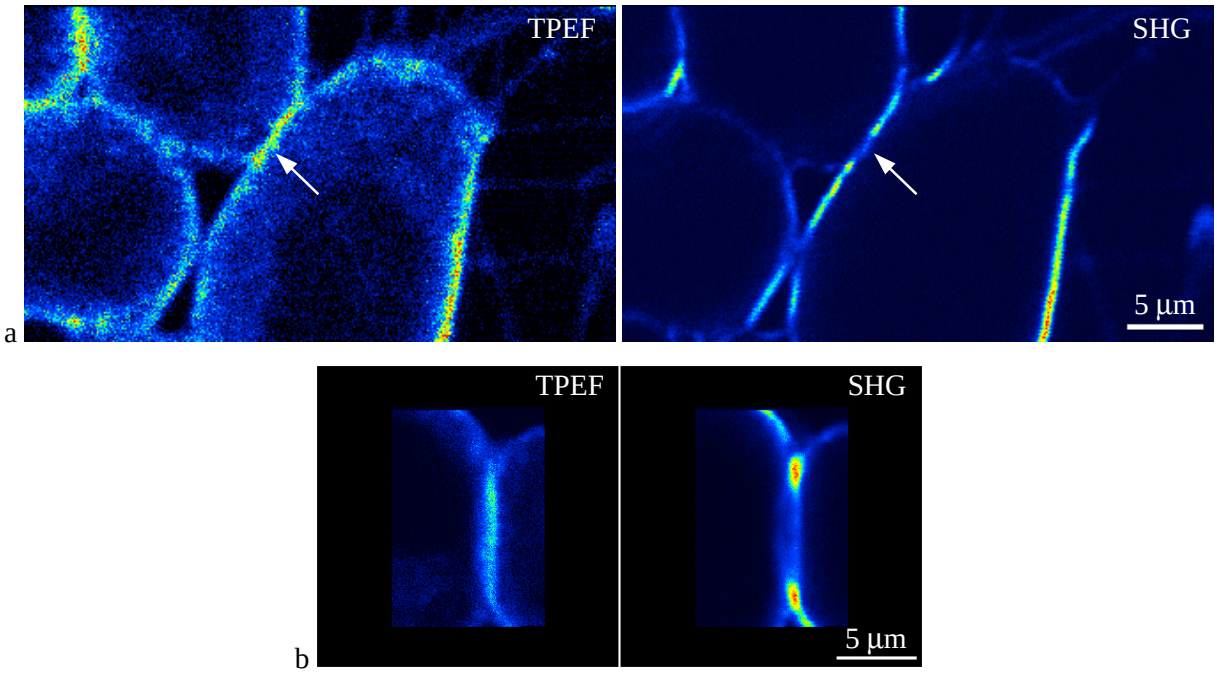


Figure 34 : a) Cellules Ncad1 confluantes, marquées avec la sonde lipophile RH237 (1 µM) ; b) Zone de contact entre deux cellules encore rondes, au début de leur étalement sur le substrat de verre.

V.4 Références du Chapitre V

1. Jones, M. N. Surface properties and interactions of vesicles. *Curr. Opin. Colloid & Interface Sci.* **1**, 91-100 (1996).
2. Hildebrandt, S. & Tromba, A. *Mathématiques et formes optimales: l'explication des structures naturelles* (Belin, Paris, 1986).
3. Helfrich, W. Steric interaction of fluid membranes in multilayer systems. *Z. Naturforsch.* **33a**, 305-315 (1978).
4. Helfrich, W. & Servuss, R.-M. Undulations, steric interaction and cohesion of fluid membranes. *Il Nuoco Cimento* **3D**, 137-151 (1984).
5. Zilker, A. in *Biophysik These: Analyse von Obserflächenfluktuationen künstlicher und biologischer Membranen mittels Mikrointerferometrie kombiniert mit digitaler Echzeitbildverarbeitung* (Technische Universität München, München, 1991).
6. Zilker, A., Ziegler, M. & Sackmann, E. Spectral analysis of erythrocyte flickering in the 0.3-4 um-1 regime by microinterferometry combined with fast image processing. *Phys. Rev. A* **46**, 7998-8001 (1992).
7. Lasic, D. D. Sterically stabilized vesicles. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **33**, 1685-1698 (1994).
8. Joannic, R., Auvray, L. & Lasic, D. D. Monodisperse vesicles stabilized by grafted polymers. *Phys. Rev. Lett.* **78**, 3402-3405 (1997).
9. Lis, L. J., McAlister, M., Fuller, N., Rand, R. P. & Parsegian, V. A. Interactions between neutral phospholipid bilayer membranes. *Biophys. J.* **37**, 657-666 (1982).
10. Israelachvili, J. *The interactions between lipid bilayers and biological membranes* in *Intermolecular & surfaces forces* 395-421 (Academic Press, San Diego, 1991).
11. Pincet, F., Cribier, S. & Perez, E. Bilayers of neutral lipids bear a small but significant charge. *Eur. Phys. J. B* **11**, 127-130 (1999).
12. Carrion, F. J., de la Maza, A. & Parra, J. L. The influence of ionic strength and lipid bilayer charge on the stability of liposomes. *J. Colloid Interface Sci.* **164**, 78-87 (1994).
13. Makino, K., Yamada, T., Kimura, M., Oka, T., Ohshima, H. & Kondo, T. Temperature- and ionic strength-induced conformational changes in the lipid head group region of liposomes as suggested by zeta potential data. *Biophys. Chem.* **41**, 175-183 (1991).
14. Letellier, D., Sandre, O., Ménager, C., Cabuil, V. & Lavergne, M. Magnetic tubules. *Mater. Sci. & Eng. C Biomaterials* **5**, 153-162 (1997).
15. Aranda-Espinoza, H. et al. Electrostatic repulsion of positively charged vesicles and negatively charged objects. *Science* **285**, 394-397 (1999).
16. Ramos, L., Lubensy, T. C., Dan, N., Nelson, P. & Weitz, D. A. Surfactant-mediated two-dimensional crystallization of colloidal crystals. *Science* **286**, 2325-2328 (1999).
17. Nardi, J., Feder, T., Bruinsma, R. & Sackmann, E. Electrostatic adhesion between fluid membranes: phase separation and blistering. *Europhys. Lett.* **37**, 371-376 (1997).
18. Nardi, J., Bruinsma, R. & Sackmann, E. Adhesion-induced reorganization of charged fluid membranes. *Phys. Rev. E* **58**, 6340-6354 (1998).

19. Bernard, A.-L., Guedeau-Boudeville, M.-A., Jullien, L. & di Meglio, J.-M. Strong adhesion of giant vesicles on surfaces: dynamics and permeability. *Langmuir* **16**, 6809-6820 (2000).

20. Fromherz, P., Kiessling, V., Kottig, K. & Zeck, G. Membrane transistor with giant vesicle touching a silicon chip. *Appl. Phys. A* **69**, 571-576 (1999).

21. Parsegian, V. A. & Gingell, D. On the electrostatic interaction across a salt solution between two bodies bearing unequal charges. *Biophys. J.* **12**, 1192-1204 (1972).

22. Akutsu, H. & Seeling, J. Interaction of metal ions with phosphatidylcholine bilayer membranes. *Biochemistry* **20**, 7366-7373 (1981).

23. Akashi, K., Miyata, H., Itoh, H. & Kinosita, K. J. Formation of giant liposomes promoted by divalent cations: critical role of electrostatic repulsion. *Biophys. J.* **74**, 2973-2982 (1998).

24. Leckband, D. E., Helm, C. A. & Israelachvili, J. Role of calcium in the adhesion and fusion of bilayers. *Biochemistry* **32**, 1127-1140 (1993).

25. Evans, E. & Needam, D. Physical properties of surfactant bilayer membranes: thermal transitions, elasticity, rigidity, cohesion and colloidal interactions. *J. Phys. Chem.* **91**, 4219-4228 (1987).

26. Servuss, R.-M. & Helfrich, W. Mutual adhesion of lecithin membranes at ultralow tensions. *J. Phys. France* **50**, 809-827 (1989).

27. Harbich, W. & Helfrich, W. Adhesion in egg lecithin multilayer systems produced by cooling. *J. Phys. France* **51**, 1027-1048 (1990).

28. Hui, S. W., Kuhl, T. L., Guo, Y. Q. & Israelachvili, J. Use of poly(ethylene glycol) to control cell aggregation and fusion. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **14**, 213-222 (1999).

29. Pincet, F., Rawicz, W., Perez, E., Lebeau, L., Mioskowski, C. & Evans, E. Electrostatic nanotitration of weak biochemical bonds. *Phys. Rev. Lett.* **79**, 1949-1952 (1997).

30. Albersdörfer, A., Feder, T. & Sackmann, E. Adhesion-induced domain formation by interplay of long-range repulsion and short-range attraction force: a model membrane study. *Biophys. J.* **73**, 245-257 (1997).

31. Noppl-Simson, D. A. & Needam, D. Avidin-biotin interactions at vesicle surfaces: adsorption and binding, cross-bridge formation, and lateral interactions. *Biophys. J.* **70**, 1391-1401 (1996).

32. Zuckerman, D. M. & Bruinsma, R. Vesicle-vesicle adhesion by mobile lock-and-key molecules: Debye-Hückel theory and Monte Carlo simulation. *Phys. Rev. E* **57**, 964-977 (1998).

33. Sivasankar, S., Brieher, W., Lavrik, N., Gumbiner, B. & Leckband, D. E. Direct molecular force measurements of multiple adhesive interactions between cadherin ectodomains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 11820-11824 (1999).

34. Shapiro, L. et al. Structural basis of cell-cell adhesion by cadherins. *Nature* **374**, 327-337 (1995).

35. Pierres, A., Feracci, H., Delmas, V., Benoliel, A.-M., Thiery, J.-P. & Bongrand, P. Experimental study of the interaction range and association rate of surface-attached cadherin 11. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 9256-9261 (1998).

36. Bernard, A.-L., Guedeau-Boudeville, M.-A., Sandre, O., Palacin, S., di Meglio, J.-M. & Jullien, L. Permeation through lipid bilayers by adhesion of giant vesicles on decorated surfaces. *Langmuir* **16**, 6801-6808 (2000).

37. Bernard, A.-L. in *Thèse de Chimie Physique: Perméabilité de bicouches lipidiques vésiculaires soumises à une déformation: perceuse moléculaire et autres exemples* (Univ. Paris 6, Pierre et Marie Curie, Paris, 1999).

38. Bar-Ziv, R. & Moses, E. Instability and "pearling" states produced in tubular membranes by competition of curvature and tension. *Phys. Rev. Lett.* **73**, 1392-1395 (1994).

39. Nissen, J., Gritsch, S., Wiegand, G. & Rädler, J. Wetting of phospholipid membranes on hydrophilic surfaces - Concepts toward self-healing membranes. *Eur. Phys. J. B* **10** (1999).

40. Albersdörfer, A., Bruinsma, R. & Sackmann, E. Force spectroscopy on adhesive vesicles. *Europhys. Lett.* **42**, 227-231 (1998).

41. Arnold, K. *Cation-induced vesicle fusion modulated by polymers and proteins* in *Structure and dynamics of membranes: Generic and specific interactions* (eds. Lipowsky, R. & Sackmann, E.) 903-957 (Elsevier, Amsterdam, 1995).

42. Chanturiya, A., Chernomordik, L. V. & Zimmerberg, J. Flickering fusion pores comparable with initial exocytotic pores occur in protein-free phospholipid bilayers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 14423-14428 (1997).

43. Chernomordik, L. V., Kozlov, M. M., Melikyan, G. B., Abidor, I. G., Markin, V. S. & Chizmadzhev, Y. A. The shape of lipid molecules and monolayer membrane fusion. *Biochim. Biophys. Acta* **812**, 643-655 (1985).

44. Menger, F. M., Keiper, J. S. & Lee, S. J. Adhesion of giant liposomes as observed by light microscopy. *Langmuir* **13**, 4614-4620 (1997).

45. Sens, P. & Safran, S. A. Pore formation and area exchange in tense membranes. *Europhys. Lett.* **43**, 95-100 (1998).

46. Hass, J., Hutchings, M. & Schlafly, R. The double bubble conjecture. *Elec. Res. Ann. Am. Math. Soc.* **1**, 98-102 (1995).

47. Jülicher, F. & Seifert, U. Shape equations for axisymmetric vesicles: a clarification. *Phys. Rev. E* **49**, 4728-4731 (1994).

48. Jülicher, F. & Lipowsky, R. Shape transformations of vesicles with intramembrane domains. *Phys. Rev. E* **53**, 2670-2683 (1996).

49. Bar-Ziv, R., Menes, R., Moses, E. & Safran, S. A. Local unbinding of pinched membranes. *Phys. Rev. Lett.* **75**, 3356-3359 (1995).

50. Menes, R., Safran, S. A. & Kessler, D. Profiles of locally adhering membranes. *Europhys. Lett.* **40**, 225-230 (1997).