



**HAL**  
open science

# Etude par microscopie à force atomique et par microscopie de fluorescence de l'interaction de nanoparticules de silice avec des films lipidiques plans

Ndeye Rokhaya Faye

► **To cite this version:**

Ndeye Rokhaya Faye. Etude par microscopie à force atomique et par microscopie de fluorescence de l'interaction de nanoparticules de silice avec des films lipidiques plans. Autre. Université de Bordeaux, 2014. Français. NNT : 2014BORD0483 . tel-01487425

**HAL Id: tel-01487425**

**<https://theses.hal.science/tel-01487425>**

Submitted on 12 Mar 2017

**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.

THÈSE PRÉSENTÉE  
POUR OBTENIR LE GRADE DE

**DOCTEUR DE**

**L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX**

ÉCOLE DOCTORALE

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES PHYSIQUES ET DE L'INGÉNIEUR

Spécialité : Lasers, matière et nanosciences

Par Ndéye Rokhaya, FAYE

**Etude par microscopie à force atomique et par  
microscopie de fluorescence de l'interaction de  
nanoparticules de silice avec des films lipidiques plans**

Sous la direction de : Pr Touria Cohen-Bouhacina  
(co-directeur : Dr Christine Grauby-Heywang)

Soutenue le 10 Décembre 2014

Membres du jury :

Mme. VIE, Véronique  
Mme PHANER-GOUTORBE, Magali  
Moskalenko, Cendrine  
Mr Dean, David

Docteur Université Rennes 1  
Professeur Ecole centrale de Lyon  
Professeur ENS Lyon  
Professeur Université Bordeaux

Rapporteur  
Rapporteur  
Examineur  
Président



## Résumé :

Cette thèse s'inscrit dans le cadre des études portant sur la toxicité des nanoparticules (NPs). Leurs propriétés physico-chimiques confèrent aux NPs la capacité de pénétrer dans les cellules en traversant la membrane plasmique. La compréhension de l'interaction NPs-membrane est donc cruciale. La structure complexe des membranes nous a imposé d'étudier l'interaction NPs-membrane à l'aide de films lipidiques plans (monocouches et bicouches) utilisés comme modèles membranaires simplifiés, déposés sur des surfaces nanostructurées par le dépôt préalable de NPs de silice (4 à 100 nm de diamètre) ou transférés à partir de monocouches étalées sur une suspension de NPs. Deux méthodes complémentaires ont été utilisées, la microscopie de force atomique (AFM) et la microscopie de fluorescence.

Après une première phase d'optimisation des protocoles expérimentaux (choix des lipides, conditions de préparation des surfaces nanostructurées et des films), l'AFM a d'abord révélé l'oxydation des films monocouches constitués de lipides insaturés, se traduisant par la formation de domaines surélevés par rapport à la phase lipidique intacte. Dans le cas des films de lipides présentant une transition de phase de type liquide expansé/liquide condensé, la présence des NPs (le plus souvent sous forme d'agrégats) semble favoriser la transition vers la phase condensée, les NPs étant situés soit au cœur soit en lisière des domaines condensés. Dans le cas des bicouches, l'étude par AFM en milieu liquide montre des comportements tribologiques différents des agrégats de NPs, suggérant deux organisations possibles de la bicouche lipidique, recouvrant les NPs ou formant des pores autour d'elles.

**Mots clés :** nanoparticules de silice, monocouches lipidiques supportées, bicouches lipidiques supportées, AFM, microscopie de fluorescence, méthode de Langmuir-Blodgett, méthode de Langmuir-Schaefer, éclatement de vésicules.

---



**Title :** Study by atomic force microscopy and fluorescence microscopy of the interaction of silica nanoparticles with supported lipid films

**Abstract:** The subject of this thesis fits into the large field of the toxicity of nanoparticles (NPs). Thanks to their physico-chemical properties, NPs are able to enter cells through the plasma membrane. Understanding the NPs-membrane interaction is thus very important. Membranes being complex structures, we chose to study this interaction using planar lipid films (monolayers and bilayers) as simplified membrane models, either deposited on nanostructured surfaces prepared by the prior deposition of silica NPs or transferred from monolayers spread on a subphase containing NPs (4-100 nm in diameter). Two complementary methods were used, atomic force microscopy (AFM) and fluorescence microscopy.

After a first part devoted to the optimization of the experimental procedure (choice of lipids, design of nanostructured surfaces and films), AFM first revealed the oxidation of transferred monolayers made of unsaturated lipids, leading to the formation of domains raised above the intact lipid phase. In the case of films made of lipids characterized by a liquid expanded/liquid condensed phase transition, the presence of NPs (usually organized in aggregates) seems to favor the transition to the condensed phase, NPs being either embedded in condensed domains or at their edges.

The final phase of this work was devoted to the study of NPs / bilayer interaction by AFM in liquid medium. The study shows different tribological behavior of NPs aggregates, suggesting two possible organizations of the lipid bilayer, covering the NPs or forming holes around them.

**Keywords:** Silica nanoparticles, Supported lipid monolayers, Supported lipid bilayers, AFM, Fluorescence microscopy, Langmuir-Blodgett method, Langmuir-Schaefer method, Vesicles spreading.

---

## Unité de recherche

[Laboratoire Ondes et Matière d'Aquitaine, 351 cours de la Libération 33405 TALENCE  
Cedex]



## Remerciements

Les deux premières personnes que je tiens à remercier sont mes deux directrices de thèse : Mme Touria Cohen-Bouhacina, et Mme Christine Grauby-Heywang de m'avoir accueillie au sein de leur équipe et de m'avoir encadrée et consacrée du temps tout au long de ce travail. En plus de leur rôle de superviseur, je les remercie profondément pour leur franchise, leur sens de l'écoute et de compréhension à mon égard dont elles ont fait preuve tout au long de cette thèse. Je tiens également à souligner que leurs remarques et corrections avisées ont GRANDEMENT contribué à la rédaction de ce mémoire et je leur en suis très reconnaissante. Mes remerciements vont naturellement à Pr Jean Pierre Delville, directeur du Laboratoire Ondes et Matière d'Aquitaine (LOMA), de m'avoir accueilli au sein de son laboratoire. Mme Magalie Phaner-Goutorbe et Mme Véronique Vié ont accepté d'être les rapporteurs de cette thèse, et je les en remercie, de même que pour leur participation au Jury. Je remercie également les autres membres du jury : ..... qui ont accepté d'évaluer cette thèse.

Je remercie le Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) et la Région Aquitaine-Limousin qui ont financé cette thèse.

Mes remerciements vont également à Mr Gérard Couturier pour sa disponibilité et ses conseils avisés pour les expériences de QCM-D, Mr Patrick Mounaix pour les images de MEB et à Mr Hamid Kelley pour m'avoir permis de réaliser les mesures de diffusion dynamique de la lumière.

Durant mes travaux de thèse j'ai côtoyé beaucoup de personnes qui chacune à sa manière a rendu cette aventure exceptionnelle. Tout d'abord les autres membres de l'équipe BIOPHYNA à commencer par Fabien qui m'a prise sous son aile dès le premier jour pour les expériences en AFM. Même si tu m'as obligée d'écouter du Chante France à longueur de journée, j'ai été très ravie de travailler en ta compagnie. Ta bonne humeur, ta simplicité et ta sensibilité m'ont bon nombres de fois permis de voir les choses du bon côté. Ibtissem et Marion, je ne sais même pas pour ou commencer mais sachez que je ne vous témoignerai jamais assez ma sincère gratitude et amitié pour tous ce qu'on a pu partager ensemble. Fabien, Ibtissem et Marion, votre soutien et votre amitié étaient un moteur pour la finalisation de cette thèse. Je remercie également tous les autres étudiants qui sont passés dans l'équipe durant ma thèse : Julien, Asma, Nadège, Yosra, Aude, Amélie, Christian...

Je remercie toute la bande de salle du 3<sup>ème</sup> étage (Fabien, Richard, Josette, Ibtissem, Marion, Benoit, Nadegda, Joyce, Jean-Paul Guillet, Léna, Jean-Baptiste, Philippe) pour tous les bons moments partagés ensemble et la complicité qu'il a eu avec certains d'entre eux.

Je remercie également tous les membres du LOMA, notamment l'équipe de direction (Suzanne, Laurette, Annie, Isabelle et Sophie), la cellule informatique (Hassan, Richard le retraité et Alain), la cellule mécanique (Sandra, Eddie, Levi), la cellule électronique (William, Sébastien, Philippe), Marc de la cellule optique et Bernadette de l'IPF.

Enfin, Cela va de soi, je remercie du fond du cœur ma famille (papa, maman, Pape Mor, Awa, Woré, Khadim, Maty), mes amis (mes ++: Wass, Titine, Vivi, Mado, Gréginou, Mino, Chérif) Ils ont toujours été présents pour écarter les doutes, soigner les blessures et partager les joies.

Un grand merci à mon PAPA (le premier homme de ma vie) et ma MAMAN sans qui je ne serai pas là aujourd'hui. Ils m'ont toujours soutenue dans tous les sens du terme donc cette thèse est un peu la leur aussi.

A mes Parents

A ma grand-mère

# TABLE DES MATIERES

<b>RESUME :</b> .....	<b>3</b>
<b>REMERCIEMENTS</b> .....	<b>7</b>
<b>LISTE DES ABREVIATIONS</b> .....	<b>15</b>
<b>INTRODUCTION GENERALE</b> .....	<b>29</b>
1. DEFINITIONS ET CONTEXTE .....	29
2. RISQUES LIES A L'EXPOSITION AUX NANOPARTICULES .....	31
3. IMPACTS ENVIRONNEMENTAUX .....	31
4. IMPACT SANITAIRE ET MALADIES ASSOCIEES CHEZ L'HOMME.....	33
5. OBJECTIFS DE CETTE THESE :.....	<b>35</b>
<b>CHAPITRE I : LA MEMBRANE CELLULAIRE ET SES MODES D'INTERACTION AVEC DES NPS</b> .....	<b>37</b>
<b>1.RAPPELS HISTORIQUES ET EVOLUTION DU MODELE DE MEMBRANE</b> .....	<b>37</b>
<b>2. COMPOSITION MOLECULAIRE</b> .....	<b>38</b>
2.1., LES PROTEINES MEMBRANAIRES .....	39
2.2. LES LIPIDES MEMBRANAIRES.....	39
2.2.1. <i>Les glycérophospholipides ou phospholipides</i> .....	40
2.2.2. <i>Les sphingolipides</i> .....	41
2.2.3. <i>Les glycolipides</i> .....	42
2.2.4. <i>Les stérols</i> .....	42
<b>3. PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES</b> .....	<b>43</b>
3.2. TEMPERATURE DE TRANSITION.....	43
3.3. POLYMORPHISME DES ASSOCIATIONS LIPIDIQUES.....	44
<b>4. FLUIDITE ET DIFFUSION MEMBRANAIRES</b> .....	<b>45</b>
<b>5. LES MODELES MEMBRANAIRES</b> .....	<b>47</b>
5.2. BUT ET AVANTAGES .....	47
5.3. MODELES TRI-DIMENSIONNELS : LES LIPOSOMES OU VESICULES LIPIDIQUES.....	48
5.4. MODELES BI-DIMENSIONNELS .....	49
5.4.1. <i>Les monocouches lipidiques à l'interface air/eau</i> .....	49
5.4.2. <i>Les films lipidiques supportés</i> .....	52
5.4.2.1. Formation de monocouches lipidiques supportées de type Langmuir-Blodgett (LB)	
52	
5.4.2.2. Formation de bicouches lipidiques supportées .....	53
<b>6. L'INTERACTION MEMBRANE-NANOPARTICULES</b> .....	<b>55</b>
6.2. CONTEXTE .....	55
6.3. LES DEUX MECANISMES DE PASSAGE DES NPS A TRAVERS LES MEMBRANES.....	56
6.4. QUELQUES RESULTATS TIRES D'ETUDES ANTERIEURES .....	58
6.4.1. <i>Monocouches et bicouches lipidiques formées à la surface de NPs</i> .....	59

6.4.2.	<i>Liposomes mis en contact avec une suspension de NPs (modèles 3D)</i> .....	61
6.4.3.	<i>Monocouches et bicouches planes déposées sur des supports préalablement nanostructurés ou mises en contact avec une suspension de NPs</i> .....	63
6.4.4.	<i>Interactions de NPs avec des monocouches lipidiques à l'interface air-eau</i> .....	66
6.4.5.	<i>Apport des études théoriques</i> .....	67
<b>7.</b>	<b>CONCLUSIONS</b> .....	<b>71</b>
<b>CHAPITRE II : CHOIX DU SUBSTRAT ET DES MOLECULES; REALISATION DES MODELES</b> .....		<b>73</b>
<b>1.</b>	<b>SUBSTRAT, MOLECULES ET SOLVANTS</b> .....	<b>73</b>
1.1.	LE SUBSTRAT SOLIDE : LE MICA MUSCOVITE .....	73
1.2.	LES LIPIDES .....	74
1.3.	LES SOLVANTS.....	75
<b>2.</b>	<b>PREPARATION DES SOLUTIONS LIPIDIQUES ET DES VESICULES</b> .....	<b>76</b>
2.1.	PREPARATION DES SOLUTIONS LIPIDIQUES .....	76
2.2.	PREPARATION DE VESICULES (SUVs) DE DMPC.....	76
<b>3.</b>	<b>FILMS DE LANGMUIR A L'INTERFACE AIR-EAU</b> .....	<b>78</b>
<b>4.</b>	<b>MONOCOUCHE LIPIDIQUE SUPPORTEE : TRANSFERT DE FILMS LB</b> .....	<b>80</b>
<b>5.</b>	<b>BICOUCHE LIPIDIQUE SUPPORTEE</b> .....	<b>81</b>
5.1.	METHODE LS PAR TRANSFERT DE MONOCOUCHE LIPIDIQUE .....	81
5.2.	METHODE PAR ECLATEMENT DE VESICULES .....	82
<b>CHAPITRE III : METHODES DE CARACTERISATION</b> .....		<b>85</b>
<b>MICROSCOPIE DE FORCE ATOMIQUE (AFM)</b> .....		<b>85</b>
1.	EVOLUTION DE LA MICROSCOPIE.....	85
2.	PRINCIPE .....	<b>87</b>
2.1.	PRINCIPE GENERAL DE L'AFM .....	87
2.2.	LES FORCES D'INTERACTION EN AFM.....	88
2.2.1.	<i>Les forces répulsives à courte portée</i> .....	89
2.2.2.	<i>Les forces de van der Waals</i> .....	89
2.2.3.	<i>Les forces électrostatiques</i> .....	90
2.2.4.	<i>Les forces capillaires</i> .....	91
2.3.	LES ELEMENTS CONSTITUTIFS DE L'AFM.....	91
2.3.1.	<i>Le système microlevier-pointe : principales caractéristiques</i> .....	92
2.3.2.	<i>Le système de détection</i> .....	94
2.3.3.	<i>Le scanner et la céramique piézoélectrique</i> .....	94
2.3.4.	<i>La boucle d'asservissement</i> .....	95
<b>3.</b>	<b>MODES D'UTILISATION DE L'AFM</b> .....	<b>95</b>
3.1.	MODE « CONTACT » .....	96
3.1.1.	<i>Régime à déflexion constante ou « isoforce »</i> .....	97
3.1.2.	<i>Régime à hauteur constante</i> .....	97
3.1.3.	<i>Frottement ou friction</i> .....	97
3.1.4.	<i>Types et origines des images en mode « contact »</i> .....	99
3.1.4.1.	<i>Image de hauteur dite « topographique »</i> .....	99

3.1.4.2.	Image de déflexion ou d'erreur .....	99
3.1.4.3.	Image de friction .....	100
3.1.5.	<i>Spectroscopie de force : la courbe de force (CF)</i> .....	100
3.1.6.	<i>Expérience de grattage d'un film</i> .....	103
3.2.	MODE « CONTACT INTERMITTENT » OU « TAPPING » .....	104
3.2.1.	<i>Modélisation par un oscillateur harmonique amorti</i> .....	105
3.2.2.	<i>Spectroscopie de force : la courbe approche-retrait (CAR)</i> .....	107
3.2.3.	<i>Régime répulsif dominant</i> .....	110
3.2.4.	<i>Régime attractif dominant</i> .....	110
3.2.5.	<i>Types et origines des images en mode « tapping »</i> .....	111
3.2.5.1.	Image de hauteur dite « image topographique ».....	111
3.2.5.2.	Image de phase .....	112
3.2.5.3.	Image d'amplitude ou « d'erreur » .....	112
<b>MICROSCOPIE DE FLUORESCENCE .....</b>		<b>112</b>
1.	PRINCIPE.....	112
2.	MARQUAGE DES LIPIDES .....	113
3.	MONTAGE EXPERIMENTAL.....	114
<b>MICROBALANCE A QUARTZ AVEC DISSIPATION (QCM-D) .....</b>		<b>115</b>
1.	PRINCIPE ET PARAMETRES EXPLOITABLES.....	115
2.	MONTAGE EXPERIMENTAL.....	117
<b>METHODES ANNEXES.....</b>		<b>118</b>
1.	DIFFUSION DYNAMIQUE DE LA LUMIERE (DLS).....	118
2.	MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A BALAYAGE (MEB).....	120
<b>CHAPITRE IV : ETUDE DES FILMS LIPIDIQUES ET LEURS INTERACTIONS AVEC DES SIO<sub>2</sub>-NPS.....</b>		<b>121</b>
INTRODUCTION .....		121
<b>1. REALISATION ET CARACTERISATION DES SURFACES NANOSTRUCTUREES ..</b>		<b>122</b>
1.1.	DISTRIBUTION DES SIO <sub>2</sub> -NPS ETUDIEE PAR DLS .....	122
1.2.	PREPARATION DES SURFACES NANOSTRUCTUREES.....	125
1.3.	CARACTERISATION PAR AFM ET PAR MEB DES SURFACES NANOSTRUCTUREES .....	126
<b>2. ETUDE DES FILMS LIPIDIQUES A L'INTERFACE AIR-EAU ET TRANSFERES SUR SUPPORT PLAN.....</b>		<b>130</b>
2.1.	CAS DES LIPIDES INSATURES : POPC ET OPPC.....	130
2.1.1.	<i>Mesures de pression de surface : exploitation des isothermes</i> .....	131
2.1.2.	<i>Caractérisation par microscopie de fluorescence et AFM de films LB de POPC et d'OPPC</i> .....	132
2.1.3.	<i>Conclusions</i> .....	140
2.2.	CAS DE LIPIDES SATURES .....	140
2.2.1.	<i>Etude de films LB de SM-Egg et SM-C16</i> .....	140
2.2.2.	<i>Etude de films LB de DMPC</i> .....	146
2.2.3.	<i>Comparaison du comportement des lipides saturés DMPC et SM-C16</i> .....	148
2.2.4.	<i>Apport spécifique de l'AFM à l'étude des films LB lipidiques</i> .....	150

2.3.	DISCUSSION SUR L'ENSEMBLE DES RESULTATS OBTENUS DANS LE CAS DES LIPIDES SATURES	156
2.3.1.	<i>Comparaison des films LB de SM-Egg et SM-C16</i> .....	156
2.3.2.	<i>Les films LB de DMPC</i> .....	160
2.3.3.	<i>Complémentarité de l'AFM et d'autres méthodes d'étude des systèmes lipidiques</i> ....	162
2.3.4.	<i>Influence de la sonde fluorescente</i> .....	163
2.4.	CONCLUSIONS.....	164
<b>3.</b>	<b>ETUDE DE FILMS LB PLANS EN INTERACTION AVEC DES NPS DE SILICE.....</b>	<b>165</b>
3.1.	ETUDE DE LIPIDES INSATURES EN PRESENCE DE SiO <sub>2</sub> -NPS : CAS DU POPC.....	165
3.2.	ETUDE DE LIPIDES SATURES EN PRESENCE DE SiO <sub>2</sub> -NPS : CAS DU DMPC ET DE LA SM-C16	170
3.2.1.	<i>Localisation des NPs et impact sur l'état de phase de films LB lipidiques</i> .....	170
3.2.1.1.	Films transférés sur des surfaces nanostructurées par des NPs -100 nm.....	170
3.2.1.2.	Films transférés sur des surfaces nanostructurées par des NPs-50 nm.....	174
3.2.1.3.	Films transférés sur des surfaces nanostructurées par des NPs-10 nm.....	176
3.2.1.4.	Films transférés sur des surfaces nanostructurées par des NPs-4 nm.....	178
3.3.	BILAN DE CES PREMIERES OBSERVATIONS .....	180
3.3.1.	<i>Estimation des dimensions apparentes et des rugosités par AFM : les NPs sont-elles recouvertes par le film lipidique ?</i> .....	181
3.3.2.	<i>Hétérogénéité de la réponse mécanique de surface</i> .....	190
3.4.	ETUDE DE L'INTERACTION DE MONOCOUCHE DE LANGMUIR AVEC DES SiO <sub>2</sub> -NPS EN SOUS-PHASE	196
3.4.1.	<i>Mesures de pression de surface : exploitation des isothermes</i> .....	196
3.4.2.	<i>Caractérisation par microscopie de fluorescence et par AFM</i> .....	198
<b>4.</b>	<b>ETUDE DE BICOUCHE LIPIDIQUE PLANES ET DE LEUR INTERACTION AVEC DES NPS.....</b>	<b>201</b>
4.1.	BICOUCHE EN ABSENCE DE SiO <sub>2</sub> -NPS.....	202
4.1.1.	<i>Préparation de bicouche supportées de DMPC par la méthode LS</i> .....	202
4.1.2.	<i>Mesures de pression de surface et transfert : isothermes et courbes de transfert</i> .....	202
4.1.3.	<i>Caractérisation des bicouche par AFM en milieu liquide</i> .....	203
4.1.4.	<i>Préparation de bicouche supportées de DMPC par éclatement de vésicules</i> .....	209
4.1.5.	<i>Optimisation de la méthode par éclatement de vésicules et suivi par QCM-D</i> .....	211
4.1.6.	<i>Conclusions de l'étude de bicouche supportées en absence de SiO<sub>2</sub>-NPs</i> .....	217
4.2.	ETUDE DE L'INTERACTION DE BICOUCHE SUPPORTEES DE DMPC AVEC DES SiO <sub>2</sub> -NPS....	217
4.2.1.	<i>Impact de la présence des NPs sur la morphologie de bicouche supportées de DMPC</i>	218
4.2.2.	<i>Hétérogénéité de la réponse nanomécanique</i> .....	227
<b>5.</b>	<b>DISCUSSION DE L'ENSEMBLE DES RESULTATS.....</b>	<b>230</b>
<b>6.</b>	<b>CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES.....</b>	<b>237</b>
6.1.	INTERACTIONS DE NPS AVEC DES MODELES MEMBRANAIRES SIMPLIFIES .....	239
6.2.	INTERACTIONS DE NPS AVEC DES BACTERIES : AU-DELA DU MODELE SIMPLIFIE .....	240
6.3.	COMPORTEMENT DES LIPIDES OXYDES .....	242
	<b>ANNEXES AFM.....</b>	<b>245</b>
	<b>MONTAGES ET CONDITIONS EXPERIMENTALES.....</b>	<b>245</b>

1. MONTAGES EXPERIMENTAUX .....	245
2. REGLAGE DES PHOTODIODES .....	246
<i>Non-alignement des photodiodes</i> .....	246
3. FORCES EN MILIEU LIQUIDE .....	247
4. MICROLEVIERS AFM UTILISES .....	248
4.1. <i>Calibration des leviers</i> .....	250
4.2. <i>L'usure de la pointe</i> .....	250
4.3. <i>Artéfacts</i> .....	251
5. COMMANDES DU CONTROLEUR PID.....	252
6. TRAITEMENT DES IMAGES AFM .....	253
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>	<b>254</b>



## Liste des abréviations

<i>AFM : Atomic Force Microscopy (microscopie de force atomique)</i>
<i>A<sub>H</sub> : constante d'Hamaker</i>
<i>BAM : Brewster Angle Microscopy</i>
<i>CAR: courbe d'approche-retrait</i>
<i>CCD : Charge-Coupled Device (dispositif à transfert de charge)</i>
<i>CF : Courbe de force</i>
<i>C<sub>L</sub>: constante de LONDON</i>
<i>DLS : Dynamic Light Scattering (diffusion dynamique de la lumière)</i>
<i>DLPC : dilauroylphosphatidylcholine</i>
<i>DLVO:Derjaguin, Landau, Verwey, Overbeek</i>
<i>DMPC: dimyristoyl-phosphatidylcholine</i>
<i>DO: densité optique</i>
<i>DOPC : dipoléoylphosphatidylcholine</i>
<i>DPPC : dipalmitoylphosphatidylcholine</i>
<i>DPPG: dipalmitoylphosphatidylglycérol</i>
<i>DSC : Differential Scanning Calorimetry (calorimétrie différentielle à balayage)</i>
<i>DSPC : distéaroylphosphatidylcholine</i>
<i>FCS: Fluorescence Correlation Spectroscopy (spectroscopie de corrélation de fluorescence)</i>
<i>FITC : Fluorescein Isothiocyanate (isothiocyanate de fluorescéine)</i>
<i>FRAP:Fluorescence Recovery After Photobleaching (retour de fluorescence après photoblanchiment)</i>
<i>FRET: Förster Resonance Energy Transfer (transfert d'énergie par resonance de type Förster)</i>
<i>G<sub>P</sub>: gain proportionnel</i>
<i>G<sub>I</sub>: gain intégral</i>

<i>G<sub>D</sub></i> : gain dérivé
<i>GUV</i> : Giant Unilamellar Vesicles (vésicules unilamellaires géantes)
<i>HPLC</i> : High-Performance Liquid Chromatography (chromatographie en phase liquid à haute performance)
<i>LB</i> : Langmuir-Blodgett
<i>LC</i> : phase liquide-condensé
<i>LE</i> : phase liquide-expansé
<i>LS</i> : Langmuir-Schaeffer
<i>LUV</i> : Large Unilamellar Vesicles (grandes vésicules unilamellaires)
<i>MEB</i> : Microscopie Electronique à Balayage
<i>MLV</i> : Multilamellar Vesicles (vésicules multilamellaires)
<i>MET</i> : Microscopie Electronique à Transmission
<i>MF</i> : Microscopie de Fluorescence
<i>MFM</i> : Magnetic Force Microscopy (microscopie de force magnétique)
<i>NADPH</i> : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate
<i>NP</i> : nanoparticule
<i>NBD-HPC</i> : (2-(12-(7-nitro-benz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)-amino)dodecanoyl-1-hexadecanoyl-sn-glycéro-3-phosphocholine)
<i>NCL</i> : non-contact long cantilever
<i>OPPC</i> : 2-Oléoyl-1-Palmitoyl-Phosphatidylcholine
<i>PA</i> : Palmitic Acide (acide palmitique)
<i>PC</i> : phosphatidylcholine
<i>PI</i> : phosphatidylinositol
<i>PID</i> : Proportionnel, Integrated, Derivated
<i>PE</i> : phosphatidyléthanolamine
<i>PI</i> : phosphatidylinositol

<i>PS</i> : phosphatidylsérine
<i>PUF</i> : Particules Ultrafines
<i>QCM-D</i> : quartz crystal microbalance with dissipation (microbalance à quartz avec dissipation)
<i>RMN</i> : Résonance Magnétique Nucléaire
<i>SiO<sub>2</sub>-NPs</i> : nanoparticules de silice
<i>SM</i> : sphingomyéline
<i>SM-C16</i> : N-Palmitoyl- Sphingosyl-Phosphatidylcholine
<i>SMegg</i> : Sphingomyéline d'œuf
<i>SNOM</i> : Scanning Near-field Optical Microscopy (microscopie optique en champ proche)
<i>STM</i> : Scanning Tunneling Microscopy (microscopie à effet tunnel)
<i>SUV</i> : Small Unilamellar Vesicles (petites vésicules unilamellaires)
<i>TEM</i> : Transmission Electron Microscopy (microscopie électronique en transmission)
<i>T<sub>m</sub></i> : melting temperature (température de transition)



## Liste des figures

Figure 1. Estimation de la répartition des applications des nanotechnologies en 2012 [4].	30
Figure 2. Inventaire des produits de consommation contenant des nanoparticules (A). Matériaux utilisés couramment dans les produits de consommation (B).	31
Figure 3. Voies d'exposition aux NPs basées sur les connaissances actuelles et les applications futures envisagées [8].	32
Figure 4. Principales voies de pénétration des NPs chez l'homme et maladies associées [1].	34
Figure 5. Modèle membranaire de type « mosaïque fluide » décrit par Singer et Nicolson en 1972 [16].	37
Figure 6. Classification et structure moléculaire des lipides membranaires [27].	40
Figure 7. Comparaison des structures chimiques de deux phospholipides « modèles » : un glycérophospholipide (POPC) et un sphingolipide (sphingomyéline).	42
Figure 8. Illustration de la transition de la phase gel à la phase fluide d'un système lipidique comme une bicouche.	44
Figure 9. Différentes formes moléculaires caractérisant les lipides membranaires.	44
Figure 10. Polymorphisme des associations lipidiques en milieu aqueux : a) micelles et micelles inverses, b) bicouche, c) liposome, d) phase lamellaire, e) phase hexagonale inverse, f) phase éponge, g) phase cubique inverse bi-continue, d'après [23,24,30].	45
Figure 11. Phénomènes de diffusion latérale et transversale (ou « flip-flop »).	47
Figure 12. Classification des liposomes suivant le nombre de bicouches et leur diamètre.	48
Figure 13. Formation d'une monocouche lipidique de Langmuir.	50
Figure 14. Isotherme de compression théorique $\Pi$ -A d'un lipide et les différentes phases potentiellement observables.	51
Figure 15. Transfert d'une monocouche lipidique de Langmuir sur un support solide : film LB.	53
Figure 16. Transfert d'une bicouche lipidique de type LS sur un support solide.	54
Figure 17. Formation d'une bicouche lipidique supportée par éclatement de vésicules.	55
Figure 18. Illustration des voies de pénétration de NPs d'argent dans la cellule et de leurs effets cytotoxiques [55].	57
Figure 19. Différentes voies d'endocytose des NPs dans la cellule [58].	58
Figure 20. Comportement d'une bicouche de DMPC en présence de NPs de diamètre variable d'après [76].	64
Figure 21: Structure chimique de la molécule de NBD-HPC (a). Spectre d'absorption et d'émission du groupement NBD dans du méthanol (b) (d'après le site de Molecular Probes).	74
Figure 22. Protocole de préparation de MLV par la méthode de réhydratation de film. Ce schéma est adapté de [111].	76
Figure 23. Processus d'extrusion pour la calibration des vésicules lipidiques.	77
Figure 24. Exemples de courbes d'autocorrélation (courbe de gauche) et de distribution (courbe de droite) obtenues par DLS pour une solution de vésicules lipidiques d'une concentration lipidique de 0.01mg/mL dans du tampon TRIS (10mM de TRIS-HCl, 150 mM de NaCl, pH de 7,4). Les mesures de DLS sont réalisées à 25°C et à un angle $\theta=90^\circ$ (le montage est décrit dans le chapitre suivant).	78
Figure 25: Principe de mesure de $\Pi$ à l'aide d'une lame de papier rectangulaire.	80
Figure 26. Exemple d'une courbe de transfert d'un film de SM sur du mica à $20 \pm 1^\circ\text{C}$ à une pression de surface constante de $30 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ .	81
Figure 27. Vue en coupe de la cellule mise au point et réalisée au laboratoire utilisée pour la préparation de bicouches planes par éclatement de vésicules [112].	82
Figure 28 : Ordres de grandeur des résolutions obtenues avec différents types de microscopie (Nicolas Battaglini, Microscopie en champ proche, Le microscope à force atomique, Université Paris-Diderot-7, 2010).	86

Figure 29. Système microlevier-sonde AFM en interaction avec une surface (a) et représentation du potentiel d'interaction interatomique selon le modèle de Lennard Jones (b). Le graphe du potentiel Lennard Jones présenté ici est adapté de [116]. ..... 88

Figure 30. Nature des forces rencontrées par la pointe AFM lors de l'engagement à l'air ambiant, d'après [117]. ..... 89

Figure 31. Principe de fonctionnement de l'AFM. .... 91

Figure 32: Description schématique d'un microlevier (a). Image d'un microlevier triangulaire obtenue par microscopie électronique à balayage (b). Modélisation de la pointe et du levier AFM par un ressort (c). L'image b est tirée du site <https://www.brukerafmprobes.com/>. .... 92

Figure 33 : Représentation schématique de la pointe AFM en cône,  $R$  étant le rayon de l'apex et  $\alpha$  le demi-angle d'ouverture. .... 93

Figure 34. Représentation schématique du photodétecteur à quatre quadrants (A, B, C, D). .... 94

Figure 35. Boucle d'asservissement de la déflexion du levier [117].  $C(t)$  représente la déflexion de consigne,  $F(h)$  la force entre la pointe et la surface,  $F_{exc}$  est la force extérieure exercée sur la pointe pour imposer un mouvement d'oscillation à la pointe (en mode « tapping »),  $S(t)$  est la mesure. .... 95

Figure 36. Représentation schématique du mode « contact ». .... 96

Figure 37. Représentation schématique d'une expérience de frottement : (a) et (b) principes de la mesure de la force de friction  $F_f$ . (c) Résultat de la mesure : boucle de frottement [123, 124]. .... 99

Figure 38. Comportement de la pointe au contact d'une surface dure de mica et courbe de force (aller-retour) expérimentale correspondante. .... 100

Figure 39. Modélisation de l'indentation d'une surface molle par la pointe AFM (a). Schéma équivalent du système de ressorts en série formé par la pointe et l'échantillon (b). .... 101

Figure 40. Exemples de courbes de force « approche » effectuées en milieu liquide sur une surface dure et une surface molle (cellule de type ostéoblaste)[124]. .... 102

Figure 41. Principe de détermination de l'épaisseur d'un film mou par une expérience de grattage avec la sonde AFM : charges appliquées  $P_1$  et  $P_2$  (a et b), variation de la force de grattage (c). .... 103

Figure 42. Courbes de force montrant le principe de grattage d'un film lipidique en faisant varier la force de grattage (a). Image AFM de hauteur ( $5\mu\text{m} \times 5\mu\text{m}$ ) d'un film de SM-C16 montrant les trois zones grattées avec des charges de grattage croissantes  $P_1 < P_2 < P_3$  (b). Sections réalisées sur les zones grattées (c). Schéma du principe de détermination de l'épaisseur d'un film LB lipidique par grattage (d). Le grattage a été réalisé à l'air avec une pointe triangulaire (SNL) de  $k = 0,58 \text{ N/m}$ . 104

Figure 43. Schéma d'excitation d'un système pointe-levier oscillant (a) et schéma équivalent d'un oscillateur amorti en régime forcé (b). .... 105

Figure 44. Courbe de résonance (en amplitude et en phase) expérimentale loin de la surface d'un microlevier « tapping » de type TAP de fréquence de résonance  $\nu_0 = 164 \text{ kHz}$ . L'amplitude et la fréquence sont normées respectivement à l'amplitude et à la fréquence de résonance de l'oscillateur libre. .... 106

Figure 45. Schéma d'excitation du système pointe-levier oscillant (a). Courbes d'approche-retrait en amplitude (b) et en phase (c). Les chiffres 1, 2 et 3 correspondent à différentes distances entre la pointe et la surface, décrites en (a). .... 108

Figure 46. Variation du temps de résidence  $\tau$  sur une période  $T$  pour deux amplitudes d'oscillation différentes du système microlevier-pointe. Plus l'amplitude de l'oscillation est faible, plus le temps  $\tau$  augmente. .... 109

Figure 47. Représentation schématique des régimes répulsif et attractif dominant (a) et (b) respectivement. .... 109

Figure 48. Schéma du mode « tapping » (a), Courbes approche et retrait (CAR) pour les 2 régimes attractif et répulsif dominant : amplitude régime répulsif dominant (b), phase répulsif dominant (c), amplitude régime attractif (d), phase régime attractif (e) [129]. .... 111

Figure 49. Diagramme de Jablonski représentant les niveaux d'énergie  $S_0$  et  $S_1$  ainsi que les niveaux vibrationnels.  $\sigma$  est la section efficace d'absorption du fluorophore et  $I$  la densité surfacique de photons par unité de temps.  $k_f$ ,  $k_{isc}$ ,  $k_T$  et  $k_i$  sont les probabilités de désexcitation de la molécule par différentes voies : la fluorescence, la conversion inter-système (menant à l'état triplet et l'émission d'un photon de phosphorescence), la phosphorescence et la désexcitation non radiative, respectivement. .... 113

Figure 50. Image par microscopie de fluorescence d'un film LB de SM contenant 0,5 mol% de sonde NBD-PC transféré sur une lame de mica à une pression de 30mN/m et à  $20 \pm 1^\circ\text{C}$ . .... 114

Figure 51. Principe d'un montage d'épifluorescence : la lumière polychromatique est émise par une lampe (1). Une longueur d'onde excitatrice est sélectionnée au moyen d'un filtre d'excitation (2) puis réfléchiée par une lame séparatrice (3) en direction de l'échantillon (5) via l'objectif (4). La lumière émise est collectée par l'objectif, traverse la lame séparatrice, une longueur d'onde d'émission étant sélectionnée par un filtre d'émission (6) avant d'atteindre la caméra CCD (7). Le choix des filtres d'excitation et d'émission dépend de la nature du fluorophore. (<http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/Microscopie/fluo/tricolore.htm>)..... 114

Figure 52. Représentation schématique du principe de fonctionnement du QCM-D. (a) Structure du capteur : le quartz est pris en « sandwich » entre deux électrodes d'or. (b) et (c) Le mouvement de cisaillement du quartz résulte de l'application d'un courant alternatif à ses extrémités. (d) et (e) L'oscillation est amortie de manière différente selon que le matériel déposé à la surface du capteur est solide ou pas. (<http://www.bu.edu/becf/downloads/BioInterface%20Technologies/QCMD/QCM-D%20Theory.pdf>). .... 116

Figure 53. Montage expérimental de la microbalance à quartz utilisée dans le cadre de cette thèse. Les images (a) et (b) montrent la face de mesure et les électrodes accolées à la lame de quartz (14mm en diamètre et 3mm en épaisseur). .... 117

Figure 54 : Principe du montage de DLS (angle de mesure à  $90^\circ$  par rapport à la direction incidente). La courbe du haut correspond au signal optique mesuré au cours du temps, tandis que celle du bas correspond à la courbe d'auto-corrélation obtenue après traitement du signal optique (courbes extraites de [www.horiba.com](http://www.horiba.com)). .... 119

Figure 55. Courbes de corrélation et de distribution du diamètre hydrodynamique pour les suspensions de  $\text{SiO}_2$ -NPs. Les solutions utilisées ont une concentration entre 0.03 et 0,12  $\text{mg.mL}^{-1}$  et les mesures sont réalisées dans de l'eau ultrapure, à  $25^\circ\text{C}$  pour un angle  $\theta = 90^\circ$ . .... 124

Figure 56. Méthodes de préparation des surfaces nanostructurées : la méthode par dépôt direct (à gauche) et la méthode par dépôt assisté à la tournette (à droite). .... 126

Figure 57. Images d'AFM ( $5\mu\text{m} \times 5\mu\text{m}$ ) d'une surface nanostructurées par dépôt de  $\text{SiO}_2$ -NPs de 100 nm de diamètre sur une lame de mica. .... 127

Figure 58. Images topographiques en AFM (a et c) et image MEB d'une surface nanostructurée par dépôt de  $\text{SiO}_2$ -NPs de 100 nm (b); le graphe (d) représente le profil de hauteur réalisé sur l'image « c » le long de la section indiquée en pointillé. .... 128

Figure 59. Images MEB d'une surface nanostructurée par dépôt de  $\text{SiO}_2$ -NPs de 100 nm de diamètre sur une lame de mica. .... 129

Figure 60. Images de MEB et d'AFM (topographie) d'une surface nanostructurée par dépôt de NPs de 100 nm de diamètre puis immergée dans de l'eau millipore pendant 90 min. .... 130

Figure 61 . Structures chimiques du POPC et de l'OPPC. .... 132

Figure 62 . Isothermes (II-A) de compression du POPC et de l'OPPC à l'interface air/eau pure ( $20 \pm 1^\circ\text{C}$ , vitesse de compression de  $5 \text{ cm}^2.\text{min}^{-1}$ ). .... 132

Figure 63. Images de microscopie de fluorescence de films LB de POPC (a) et d'OPPC (b) contenant 0,5 mol% de NBD-PC transférés à  $30\text{mN.m}^{-1}$  et à  $T = 20 \pm 1^\circ\text{C}$ . .... 133

Figure 64 . Images AFM de phase en mode tapping répulsif de films LB d'OPPC (a, b) et de POPC (c, d), fraîchement préparés (J1) et après cinq jours au contact de l'air (J5)..... 134

Figure 65 : (a) rugosité moyenne de surface et (b) surface moyenne occupée par les domaines dans les films LB de POPC et d'OPPC fraîchement préparés, et après deux ou cinq jours au contact de l'air: ..... 135

Figure 66 : Principe de la détermination de l'épaisseur  $\Delta H$  d'un film de POPC par grattage : un microlevier contact ( $k=0.35 \text{ N/m}$ ) est utilisé pour gratter localement la surface de l'échantillon sur  $1 \times 1 \mu\text{m}^2$ . Après le grattage, des sections sur une même zone sont réalisées sur les images topographiques aller (a) et retour (non montrée) et de friction aller (b) et retour (c) de  $5 \times 5 \mu\text{m}^2$ . Le profil de hauteur est obtenu en divisant par 2 la somme des sections sur les images topographiques (aller et retour). Les profils de frottement sont tracés sur une même zone des images de friction aller et retour et la somme de ces deux profils permet également d'obtenir le profil de hauteur..... 136

Figure 67. Images de phase (en mode répulsif) de films LB mixtes de DMPC et POPC (1/1 en mole) transférés sur le mica à  $30 \text{ mN.m}^{-1}$ : le film LB fraîchement préparé (a), et deux jours plus tard (b). ..... 137

Figure 68. Renversement de la chaîne oxydée des lipides dans un film LB expliquant le soulèvement des domaines oxydés au dessus de la phase lipidique intacte..... 139

Figure 69. Isothermes  $\Pi$ -A de compression de monocouches de Langmuir de SM-Egg et de SM-C16 contenant toutes les deux  $0,5 \text{ mol}\%$  de NBD-PC à l'interface air-eau et à  $T = 20 \pm 1^\circ\text{C}$ ..... 141

Figure 70. Comparaison de différents films LB de SM-Egg +  $0,5 \text{ mol}\%$  de NBD-PC transférés à  $30 \text{ mN/m}$  et à  $20 \pm 1^\circ\text{C}$ . Les images présentées ici font  $320 \mu\text{m} \times 260 \mu\text{m}$  (colonne de gauche) ou  $130 \mu\text{m} \times 105 \mu\text{m}$  (colonne de droite), et sont prises juste après le transfert. Ces images sont représentatives de la structuration générale des films. .... 143

Figure 71. Comparaison de différents films LB de SM-C16 +  $0,5 \text{ mol}\%$  de NBD-PC transférés à  $30 \text{ mN/m}$  et à  $20 \pm 1^\circ\text{C}$ . Les images présentées ici font  $320 \mu\text{m} \times 260 \mu\text{m}$  (colonne de gauche) ou  $130 \mu\text{m} \times 105 \mu\text{m}$  (colonne de droite), et sont prises juste après le transfert. Ces images sont représentatives de la structuration générale des films. .... 144

Figure 72. Images de fluorescence (ligne du dessus) et d'AFM de hauteur (ligne du dessous) de films LB de SM-Egg et de SM-C16 contenant  $0,5 \text{ mol}\%$  de NBD-PC transférés sur une lame de mica à  $30 \text{ mN/m}$  et à  $T = 20 \pm 1^\circ\text{C}$ . L'expérience d'AFM est réalisée en mode tapping répulsif à une vitesse de scan comprise entre  $0,3$  et  $1 \text{ Hz}$ , à l'air et à température ambiante..... 145

Figure 73. Comparaison des isothermes de compression de monocouches de DMPC, sans et avec la sonde NBD-PC ( $0,5 \text{ mol}\%$ ) à l'interface air-eau à  $30 \text{ mN/m}$  et à  $T = 20 \pm 1^\circ\text{C}$ . .... 146

Figure 74. Comparaison de différents films LB de DMPC +  $0,5 \text{ mol}\%$  de NBD-PC transférés à  $30 \text{ mN/m}$  et à  $20 \pm 1^\circ\text{C}$ . Les images présentées ici font  $320 \mu\text{m} \times 260 \mu\text{m}$  (colonne de gauche) ou  $130 \mu\text{m} \times 105 \mu\text{m}$  (colonne de droite), et sont prises juste après le transfert. Ces images sont représentatives de la structuration générale de certaines zones du film, d'autres étant plus homogènes. .... 147

Figure 75. Images AFM de hauteur d'un film LB de DMPC à température ambiante (a) et après incubation à  $26^\circ\text{C}$  (b). ..... 148

Figure 76. Distribution des rayons des domaines en phase  $L_C$  dans le cas de films LB de DMPC+ $0,5 \text{ mol}\%$  de NBD-PC et de SM-C16 + $0,5 \text{ mol}\%$  de NBD-PC transférés sur une lame de mica à  $30 \text{ mN.m}^{-1}$ . Ces mesures statistiques sont réalisées sur un minimum de 3 échantillons pour chaque lipide et sur une centaine de domaines en phase  $L_C$ ..... 149

Figure 77. Comparaison des images de fluorescence ( $130 \mu\text{m} \times 105 \mu\text{m}$ ) et des images de hauteur en AFM ( $70 \mu\text{m} \times 70 \mu\text{m}$ ) de films LB de DMPC + $0,5 \text{ mol}\%$  de NBD-PC et de SM-C16+  $0,5 \text{ mol}\%$  de NBD-PC transférés sur du mica à  $30 \text{ mN.m}^{-1}$ . La caractérisation par les deux techniques est réalisée à  $T = 20 \pm 1^\circ\text{C}$ ..... 150

Figure 78. (a) et (b) Images 2D et 3D topographiques d'AFM d'un film LB de DMPC+ NBD-PC (contenant 0,5 mol%) à 30 mN/m. (c) Représentation schématique de la différence de hauteur $\Delta h$ entre les phases $L_C$ et $L_E$ ; (d) exemple de section réalisée sur une image de hauteur prise en mode tapping répulsif dominant.....	151
Figure 79. Images topographiques de grattage de films LB de DMPC+ 0,5 mol % de NBD-PC et de SM-C16 + 0,5 mol % de NBD-PC avec les sections correspondantes. Une sonde contact de raideur $\approx 0,35$ N/m et de fréquence 62 KHz est utilisée et les images sont prises à des vitesses comprises entre 0,3 Hz et 1 Hz suivant leurs dimensions.....	152
Figure 80. Schéma représentatif des différents points de fonctionnement de la sonde AFM en mode tapping.....	154
Figure 81. Image AFM de hauteur (a) et images de phase sur le zoom de (a) en modes répulsif dominant (b) et attractif dominant (c) d'un film LB de DMPC + 0,5 mol % de NBD-PC transféré à 30 mN.m <sup>-1</sup> et à $T = 20 \pm 1^\circ\text{C}$ . Une sonde tapping de raideur $\approx 36$ N/m et de fréquence $f_0 = 160$ kHz est utilisée et les images sont prises à des vitesses de scan comprises entre 0,3 Hz et 1 Hz suivant la taille de l'image.....	154
Figure 82. Images AFM de friction (« aller » et « retour ») de 30x30 $\mu\text{m}^2$ d'un film LB de SM-C16 + 0,5 mol % de NBD-PC transféré à 30 mN.m <sup>-1</sup> et à $T = 20 \pm 1^\circ\text{C}$ . Une sonde contact de raideur $\approx 0,12$ N/m et de fréquence 24 KHz est utilisée et les images sont prises à des vitesses comprises entre ...	155
Figure 83. Images de fluorescence de films LB de POPC transférés sur une surface de mica nue et des surfaces nanostructurées par dépôt de NPs de 10 nm et de 100 nm de diamètre. Sur l'image centrale, les lignes sont dues aux marches produites lors du clivage du mica avant transfert.....	166
Figure 84. Images AFM de hauteur (a, b) d'un film LB de POPC transféré sur une surface nanostructurée par dépôt de NPs de 100 nm de diamètre. Les profils de hauteur (c et d) sont obtenus à partir de sections tracées respectivement sur les images e et f. Les images sont obtenues en modes « tapping » répulsif dominant.....	167
Figure 85. Images AFM de hauteur (mode tapping répulsif dominant) d'une surface nanostructurée par dépôt de NPs de 10 nm de diamètre après transfert d'un film LB de POPC.....	169
Figure 86. Les graphes ci-dessus représentent respectivement les densités spectrales d'une surface nanostructurée par dépôt de NPs de 10 nm de diamètre avant et après transfert du film lipidique. Ces hauteurs sont obtenues après l'application sur l'image d'un « masque » caractérisé par une intensité seuil permettant la sélection des NPs (mesures de « densités spectrales »).....	169
Figure 87. Comparaison d'images obtenues par microscopie de fluorescence de films LB de SM-C16 (1a, 2a, 3a) et de DMPC (1b, 2b et 3b) en absence et en présence de NPs de 100 nm de diamètre...	171
Figure 88. Images AFM de hauteur de différents films LB de SM-C16 transférés sur des surfaces nanostructurées par dépôt de NPs de 100 nm de diamètre. Les images sont obtenues en mode « tapping » répulsif dominant à l'air. L'échelle en z des images est de 100nm.....	172
Figure 89. Images AFM de hauteur de films LB de SM-C16 (a) et de DMPC (b) transférés sur des surfaces nanostructurées par dépôt de NPs de 100 nm de diamètre. Les images sont obtenues en mode « tapping » répulsif dominant à l'air. L'échelle en z des images est de 100nm.....	173
Figure 90. Images AFM de hauteur d'un film LB de SM-C16 transféré sur une surface nanostructurée par dépôt de NPs de 100 nm de diamètre. Les images sont obtenues en mode « tapping » (en régime répulsif dominant) à l'air. L'échelle en z des images est de 100nm.....	173
Figure 91. Images AFM de hauteur (a, c) et d'amplitude (b, d) de différents films LB lipidiques transférés sur des surfaces nanostructurées par dépôt de NPs de 100 nm de diamètre.....	174
Figure 92. Images de microscopie de fluorescence de films LB de DMPC en présence.....	175
Figure 93. Images d'AFM de hauteur (a, b) et d'amplitude (c, d) de films LB lipidiques transférés sur des surfaces de mica nanostructurées par dépôt de NPs de 50 nm de diamètre. Les images AFM présentées ici sont enregistrées en mode tapping (régime répulsif dominant).....	175

Figure 94. Images de microscopie de fluorescence de films LB de DMPC en présence de NPs de 10 nm de diamètre. ....	176
Figure 95. Images d'AFM de hauteur (a, c), de phase (b) et de déflexion (d) de deux films LB lipidiques différents transférés sur des surfaces de mica nanostructurées par dépôt de NPs de 10 nm de diamètre. Les images AFM présentées ici sont obtenues en mode contact (c, d) et en mode « tapping » répulsif dominant (a, b).....	178
Figure 96. Images de microscopie de fluorescence de films LB de DMPC en présence de.....	179
Figure 97. Images AFM de phase d'un film LB de SM-C16 transféré sur une surface nanostructurée par le dépôt de NPs de 100 nm.....	181
Figure 98. Schéma représentant les différentes situations supposées exister dans nos échantillons..	182
Figure 99. Images AFM de hauteur 3D (a) et 2D (b) d'un film LB de SM-C16 transféré sur une surface de mica nanostructurée par dépôt de NPs de 100 nm de diamètre. L'image AFM est obtenue en mode Tapping répulsif dominant. Le profil de hauteur (c) présenté ici est obtenu à partir de la moyenne de sections réalisées sur l'image brute non traitée. ....	183
Figure 100. Profil de hauteur effectué sur le film lipidique révélant la différence de hauteur entre les phases $L_E$ et $L_C$ . Le profil présenté ici est obtenue à partir de sections réalisées sur la zone 1 de l'image 99a.....	184
Figure 101. Profils de hauteur en zoomant sur la zone 2 au sommet des trois NPs (NP1, NP2, NP3) juxtaposées de la figure 99. ....	184
Figure 102. Image AFM de hauteur d'une surface nanostructurée par dépôt de NPs de 100 nm de diamètre (a). Profil de hauteur sont obtenus zoomant sur les sommets des NPs. ....	185
Figure 103. Images AFM de phase (a) hauteur (b) et d'amplitude (c) de films LB lipidiques transférés sur des surfaces de mica nanostructurées par le dépôt de NPs de 10 nm.les profil de sauteur sont obtenues à partir des sections réalisées comme indiqué sur l'image en inset. Les images sont obtenues en mode Tapping répulsif dominant. ....	186
Figure 104. Images AFM de phase (a) hauteur (b) (c) et d'amplitude (c) de films LB lipidiques transférés sur des surfaces de mica nanostructurées par le dépôt de NPs de 4 nm. Les images sont obtenues en mode Tapping répulsif dominant. ....	188
Figure 105. Images AFM de phase d'un film LB de SM-C16 en présence de NPs de 100 nm de diamètre. Les images sont obtenues en mode « tapping » répulsif dominant. ....	190
Figure 106. Images AFM de phase d'un film LB de SM-C16 transféré sur une surface nanostructurée par dépôt de NPs de 100 nm de diamètre.....	191
Figure 107. Image AFM de hauteur en 3D (a) et de phase (b) d'un film LB de SM-C16 transféré sur une surface nanostructurée par le dépôt de NPs de 100 nm de diamètre. Profils de hauteur et de phase obtenus sur l'agrégat (c). Les sections sont réalisées sur les images brutes non traitées. Ces images sont obtenues en mode Tapping répulsif dominant. ....	191
Figure 108. Images AFM de hauteur (a), d'amplitude (b) et de phase (c) d'un film LB de SM-C16 en présence de NPs de 10 nm de diamètre montrant différents comportement de phase des agrégats de NPs (zoom de l'image (a) de la Figure 103). Ces images sont obtenues en mode Tapping répulsif dominant.....	192
Figure 109. Profils de hauteur et de phase réalisés sur un agrégat de NPs de 100 nm de diamètre en présence d'un film LB de SM-C16. Les sections sont réalisées sur les images brutes non traitées de la Figure 108. Ces images sont obtenues en mode Tapping répulsif dominant.....	192
Figure 110. Images de hauteur (a) et de friction dans les sens « aller et retour » (b et c respectivement) d'un film LB lipidique transféré sur une surface nanostructurée par dépôt de NPs de 100 nm de diamètre. Les images de friction montrent des agrégats de NPs de contrastes différents. Ces images sont obtenues en mode Tapping répulsif dominant. ....	193

Figure 111. (a) profils de l'agrégat de NPs obtenus à partir des sections réalisées sur les images aller et retour de friction et de hauteur.( b) zoom sur deux NPs du profil en a. (c) profil de obtenu à partir de sections réalisées sur le film lipidique. Les sections sont réalisées comme indiqué sur les images(b) et (c) de la Figure 110. ....	194
Figure 112. Comparaison des contrastes de phase en régime répulsif dominant (a) et en régime attractif dominant (b) de film LB de SM-C16 transféré sur une surface nanostructurée par dépôt de NPs de 100 nm de diamètre. ....	195
Figure 113. Comparaison des profils de phase obtenus en régimes attractif et répulsif. ....	195
Figure 114. Principe de la mise en contact des NPs avec le film lipidique. (a) le film est transféré sur une surface préalablement nanostructurée par le dépôt de NPs ; (b) l'interaction NPs-lipides se déroule à l'interface air-eau et le film est transféré ensuite.....	196
Figure 115. Comparaison d'isothermes de compression (a) de monocouches de SM-C16 à l'interface air-eau (courbe SM-C16) et à l'interface air-suspension de NPs de 100 nm de diamètre (SM-C16 + NPs) à température ambiante ( $20\pm 1^\circ\text{C}$ ). Courbes de transfert des films LB (pression et aire moléculaire en fonction du temps) en présence de NPs dans la sous-phase (b). ....	197
Figure 116. Comparaison de trois films LB de SM-C16 transférés de l'interface air-eau sur une surface de mica nue (1a, 1b), de l'interface air-eau sur une surface nanostructurée par dépôt de NPs de 100 nm de diamètre (2a, 2b) et de l'interface air-suspension de NPs (100 nm de diamètre) sur une surface de mica (3a, 3b). ....	199
Figure 117. Images de fluorescence (a) et images AFM de phase (b) et d'amplitude (c) d'un film LB de SM-16 transféré de l'interface air-suspension de NPs (100 nm de diamètre) sur une surface de mica. Ces images sont obtenues en mode Tapping répulsif dominant. ....	200
Figure 118. Images AFM de phase d'une monocouche de DMPC transférée de l'interface air-suspension de NPs (diamètre de 100 nm) sur une surface de mica.....	201
Figure 119. Transfert d'une bicouche lipidique de type LB/LS sur un support plan.....	202
Figure 120. Isotherme de compression (a) et courbes de transfert (b) d'une bicouche de DMPC sur une surface de mica par la méthode LB/LS. Les films sont transférés à 30mN/m et à température ambiante ( $20\pm 1^\circ\text{C}$ ). ....	203
Figure 121. Courbes de force expérimentales enregistrées sur une surface de mica nue à l'air (a), en présence d'eau déionisée (b), et en présence de tampon Tris-HCl (c et d).Les déflexions en z sont de 38 nm (à l'air), 42,5 nm (eau déionisée) et 2,5 nm et 1,4 nm en présence de tampon TRIS-HCl ce qui correspond à des forces de balayage (k.z) utilisées de 4.6 nN nN, 3,8 nN, 300 pN et 170 pN, respectivement. ....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
Figure 122. Images AFM de hauteur obtenues pour différentes forces de balayage d'une bicouche de DMPC en milieu tamponné et à température ambiante ( $20\pm 1^\circ\text{C}$ ). Les images (a) et (b) sont obtenues respectivement avec des forces de balayage de 5,8 nN ( $z = 48,5$ nm) et 13,8 nN ( $z = 115$ nm). L'image (c) montre une zone de grattage en utilisant une force de balayage de 23,0 nN ( $z = 192$ nm). Les flèches indiquent la présence probable de trous, la pointe AFM sondant en fait le support de mica au niveau de ces zones.....	205
Figure 123. Images AFM de hauteur de différentes zones d'une bicouche de DMPC déposée sur une surface de mica par la méthode LB/LS. Les images sont réalisées en milieu liquide et à température ambiante ( $T=20\pm 1^\circ\text{C}$ ).L'échelle des images est de 10nm.....	206
Figure 124. Images AFM de hauteur montrant différentes zones d'une bicouche de DMPC déposée sur une surface de mica par la méthode LS, suggérant la présence d'organisations lipidiques de hauteurs différentes. Les images sont réalisées en milieu liquide et à température ambiante ( $T=20\pm 1^\circ\text{C}$ ). ....	207
Figure 125. Profil de hauteur (a) obtenu à partir des sections réalisées sur les images de hauteur aller et retour brutes. Schéma représentant les différents types d'organisation possibles des lipides sur le support de mica dans le cas d'une bicouche déposée par la méthode LS. ....	208

Figure 126. Formation de bicouche lipidique supportée par éclatement de vésicules. .... 209

Figure 127. Images AFM de hauteur de vésicules lipidiques adsorbées sur une surface de silicium. Ces images sont obtenues sur deux zones différentes. Le dépôt est réalisé avec une solution de vésicules de concentration lipidique de 0,1mg/mL, à pH= 7,4 et à une température égale à 22°C (< à  $T_m$ ). .... 210

Figure 128. Image AFM de hauteur d'un dépôt de SUV de DMPC sur une surface de silicium. Le dépôt est réalisé avec une solution de vésicules de concentration lipidique de 0,1mg/mL, de pH= 7,4 et de température égale à 22°C (< à  $T_m$ ). .... 210

Figure 129. Suivi de la formation d'une bicouche de DMPC par QCM-D : variations de la fréquence  $\Delta f$  et de la dissipation  $\Delta D$ , obtenues à 32°C dans du tampon Tris-NaCl (10mM Tris, 150 mM de NaCl, à pH = 7,4). Une solution de SUV de concentration lipidique de 0,1mg.mL<sup>-1</sup> est utilisée pour la formation de la bicouche. .... **Erreur ! Signet non défini.**

Figure 130. Images AFM de hauteur d'une bicouche de DMPC déposée sur une surface de silicium, obtenues en milieu liquide (tampon Tris). Une solution de SUV de concentration lipidique de 1,2mg.mL<sup>-1</sup> est utilisée pour la formation de la bicouche à T = 32°C. .... 213

Figure 131. Images AFM de topographie et d'amplitude de bicouches de DMPC réalisées à partir de SUV obtenues par sonication ou réhydratation d'un film. La caractérisation par AFM est réalisée en milieu liquide avec un levier triangulaire de raideur k = 0.06 N/m. .... 214

Figure 132. Courbes de forces obtenues sur une surface nue de mica (a), sur une bicouche de DMPC (b) et sur une vésicule lipidique absorbée à la surface du mica (c). .... **Erreur ! Signet non défini.**

Figure 133. Image AFM 3D d'une bicouche de DMPC préparé par la méthode par éclatement de vésicules. Profil de hauteur tracé à partir de sections réalisées sur l'image AFM de hauteur présentée en (a). Schéma montrant les différentes phases possibles pour les deux feuillet de la bicouche (b). 216

Figure 134. Images AFM de hauteur d'une bicouche de DMPC en présence de SiO<sub>2</sub>-NPs de 10 nm de diamètre. Ces images (obtenues en milieu liquide et à température ambiante en utilisant une force d'environ 2 nN) montrent les effets d'une mauvaise optimisation des conditions de balayage. .... 218

Figure 135. Images AFM de hauteur (a) et de déflexion (b) d'une bicouche de DMPC en présence de SiO<sub>2</sub>-NPs de 100 nm de diamètre. Ces images sont obtenues avec un balayage à la limite de décollement de la sonde AFM. .... **Erreur ! Signet non défini.**

Figure 136. Images AFM de hauteur (a, c) et de déflexion (b, d) de bicouches de DMPC déposées sur du mica nu ou en présence de NPs de 50 nm de diamètre. Les flèches indiquent la présence de trous, répartis sur l'ensemble de la surface. .... 220

Figure 137. Images AFM de hauteur obtenues sur des zones de l'échantillon caractérisées par la présence de trous. Les flèches indiquent la présence d'agrégats de NPs (diamètre 50 nm). .... 221

Figure 138. Image AFM de hauteur (a) d'une bicouche de DMPC en interaction avec des NPs de 50 nm de diamètre. Les figures (b) et (c) présentent les profils de hauteur obtenus au niveau de la bicouche et d'un agrégat de NPs respectivement. .... 222

Figure 139. Images AFM de hauteur (a, c) et de déflexion (b, d) de différents dépôts de bicouche de DMPC en interaction avec des NPs de 10 nm de diamètre. .... 223

Figure 140. Images AFM de hauteur (a, c) et de déflexion (b, d) d'une bicouche de DMPC en interaction avec des NPs de 10 nm de diamètre. Les étoiles et les flèches indiquent respectivement les zones recouvertes de fragments de bicouche et d'agrégats de NPs. .... 224

Figure 141. Images AFM de hauteur d'une bicouche de DMPC en interaction avec des NPs de 10 nm de diamètre (a). Profil de hauteur tracé à partir de la section sur l'image (b). .... 225

Figure 142. Images AFM de hauteur et d'amplitude d'une bicouche de DMPC en interaction avec des NPs de 4 nm de diamètre. Les images sont obtenues en milieu liquide (tampon Tris) et à température ambiante. Les étoiles et les flèches indiquent respectivement les zones recouvertes de fragments de bicouche et d'agrégats de NPs. .... 226

Figure 143. Image AFM de hauteur d'une bicouche de DMPC en interaction avec des NPs de 4 nm de diamètre (a). Profils de hauteur (b) et (c) obtenus selon les sections indiquées sur l'image (b) de la Figure 24. .... 226

Figure 144. Schéma montrant les différentes configurations possibles de l'interaction des NPs avec une bicouche homogène (phase unique  $L_E$  ou  $L_C$ ). .... 227

Figure 145. Images AFM de friction aller (a) et retour (b) d'une bicouche de DMPC en interaction avec des NPs de 50 nm de diamètre. Les profils tracés à partir des images brutes (a) et (b) sont présentés en (c). Les images sont obtenues en milieu liquide (tampon Tris) et à température ambiante. .... 228

Figure 146. Images AFM de hauteur (a) et de friction aller (b) et retour (c) d'une bicouche de DMPC en interaction avec des NPs de 10 nm de diamètre. Les images sont obtenues en milieu liquide (tampon Tris) et à température ambiante. .... 229

Figure 147. Schéma d'une vésicule lipidique en interaction avec une NP anionique. Son adsorption entraîne une réorientation de la tête polaire des lipides et une transition de la phase fluide  $L_E$  vers la phase  $L_C$  [68] .....224

Figure 148. Immobilisation des bactéries *E. coli* sur un substrat de quartz fonctionnalisé par dépôt de polyélectrolytes .....233

Figure 149. Images AFM de hauteur et d'élasticité d'une bactérie *E. coli* en interaction avec des  $SiO_2$ -NPs de 100 nm de diamètre .....234

Figure 150. Images AFM de hauteur, d'amplitude et de phase de bactéries *E. coli* en interaction avec des  $SiO_2$ -NPs de diamètre 10 nm .....234

Figure 151. Structure chimique des lipides oxydés dérivés du POPC, PoxnoPC et PazePC .....2.35

Figure-annexes 1. Photographies des montages du multimode (a) et du bioscope (b) utilisés dans le cadre de cette étude ..... 237

Figure-annexes 2. Schéma du système de détection à quatre quadrants.  $Q_1$ ,  $Q_2$ ,  $Q_3$  et  $Q_4$  sont les tensions délivrées par chaque photodiode en réponse à la position du spot laser après réflexion sur le levier .....238

Figure-annexes 3. Schéma du montage de l'AFM en milieu liquide .....239

Figure-annexes 4. Représentation schématique d'un levier SNL (a). Image MEB d'un levier SNL et zoom sur la pointe (b). Tableau présentant les caractéristiques de chaque pointe (c). Toutes les informations présentées sur cette figure proviennent du site <http://www.brukerafmprobes.com/> .....240

Figure-annexes 5. Images en microscopie à balayage d'une pointe PPP-NCL (a). Tableau présentant les caractéristiques des leviers NCL (b). Toutes les informations présentées sur cette figure proviennent du site <http://www.brukerafmprobes.com/> .....241

Fig-annexes 6. Représentation schématique d'un levier TAP (a). Image MEB d'un levier SNL(b).Tableau regroupant les caractéristiques de ce levier (c).Toutes les informations présentées sur cette figure proviennent du site <http://www.brukerafmprobes.com/> .....241

Figure-annexes 7. Image AFM de NPs de silice de 100 nm de diamètre déposées sur une surface de mica (a). Image obtenue en MEB de la pointe AFM ayant servi à réaliser l'image précédente (b).243

Figure-annexes 8. Schéma des déformations de matériaux mous causées par la pointe AFM. (a) déformation induisant une sous-estimation de la hauteur apparente par indentation ; (b) déformation liée à l'étirement du matériau [209] .....244

## Liste des Tableaux

<i>Tableau 1. Tableau récapitulatif des différents lipides utilisés et de leurs structures chimiques. ....</i>	<i>75</i>
<i>Tableau 2. Expression des potentiels d'interaction et des forces de van de Waals pour les principales géométries des surfaces en interaction, avec <math>R</math> le rayon des sphères, <math>A_H</math> la constante de Hamaker et <math>d</math> la distance entre les surfaces en interaction d'après [118,119]. ....</i>	<i>90</i>
<i>Tableau 3. Tableau récapitulant les résultats de DLS et les données des différents fournisseurs sur les dimensions des NPs. ....</i>	<i>125</i>
<i>Tableau 4. Tableau récapitulant les différentes dilutions et les concentrations correspondantes pour chaque taille de NPs utilisées lors des dépôts. ....</i>	<i>126</i>
<i>Tableau 5. Nature et proportion des chaînes constituant la SM-Egg d'après [123]. ....</i>	<i>141</i>
<i>Tableau 6. Estimation de l'occupation des deux phases pour des films LB de DMPC et de SM-C16 contenant 0,5 mol % de sonde NBD-PC. L'estimation est réalisée sur des images de <math>320\mu\text{m} \times 260\mu\text{m}</math> en utilisant le logiciel Gwiddion. ....</i>	<i>149</i>
<i>Tableau 7. Ordre de grandeur typique des agrégats observés dans les deux phases lipidiques en fonction de la dimension des NPs. ....</i>	<i>180</i>

## Introduction générale

### 1. Définitions et contexte

Une nanoparticule (NP) est définie comme une particule ayant au moins une dimension inférieure à 100 nm [1, 2]. On appelle nanomatériau un matériau constitué d'un assemblage de NPs.

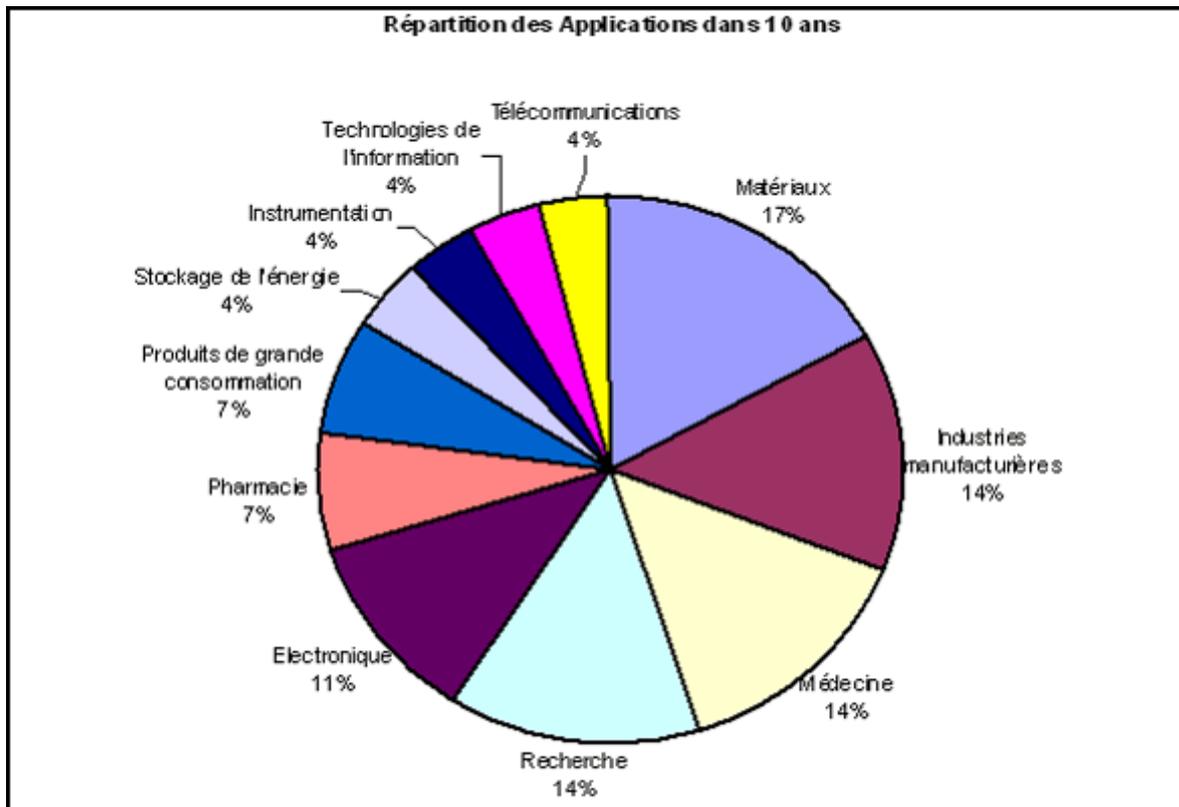
Ces dernières peuvent être classées suivant différents critères comme :

- leur origine (naturelle, produite de façon non intentionnelle ou manufacturée) ;
- leurs dimensions et formes (sphériques, oblongues...)
- leur composition chimique (organiques, métalliques, polymériques...)
- leur conditionnement (poudre, gel, aérosol, suspension liquide...).

Par exemple, les NPs naturelles sont libérées dans l'atmosphère lors d'activités volcaniques, de la combustion de divers matériaux ou de phénomènes d'érosion. D'autres NPs comme les particules ultrafines de la pollution atmosphérique, les émissions diesel ... sont produites par l'homme de façon non intentionnelle. Enfin les NPs dites manufacturées (*man made* en anglais), issues d'une production intentionnelle par l'homme, ont des propriétés physico-chimiques bien spécifiques suivant les applications auxquelles elles sont destinées (quantum dots, fullerènes, nanotubes de carbone ...) [3]. Les nanosciences sont d'ailleurs en plein essor depuis ces 30 dernières années grâce à la mise au point de procédés de fabrication, mais aussi d'étude et de manipulation de ces structures de dimensions nanométriques.

L'avantage de ces particules réside dans le fait qu'à cette échelle, la matière acquiert de nouvelles propriétés physico-chimiques, leurs propriétés chimiques, optiques, électriques, mécaniques, magnétiques ... étant très différentes de celles du même matériau en volume (*bulk* en anglais). Aujourd'hui l'engouement pour cette technologie de « l'infiniment petit » dans la recherche fondamentale et/ou appliquée est largement basé sur ces propriétés particulières mises en évidence à petite échelle et constituant un atout majeur pour le développement de nouvelles applications novatrices de pointe. Par exemple dans le domaine biomédical, la vectorisation de molécules est devenue un défi pour le traitement de maladies infectieuses et génétiques ou les cancers. Les NPs peuvent dans ce cadre être utilisées comme transporteurs de molécules thérapeutiques, ou servir de marqueur spécifique pour un diagnostic. De même dans l'industrie, on retrouve les NPs dans des champs d'application divers et variés, allant des produits de parapharmacie (crèmes solaires et cosmétiques) aux

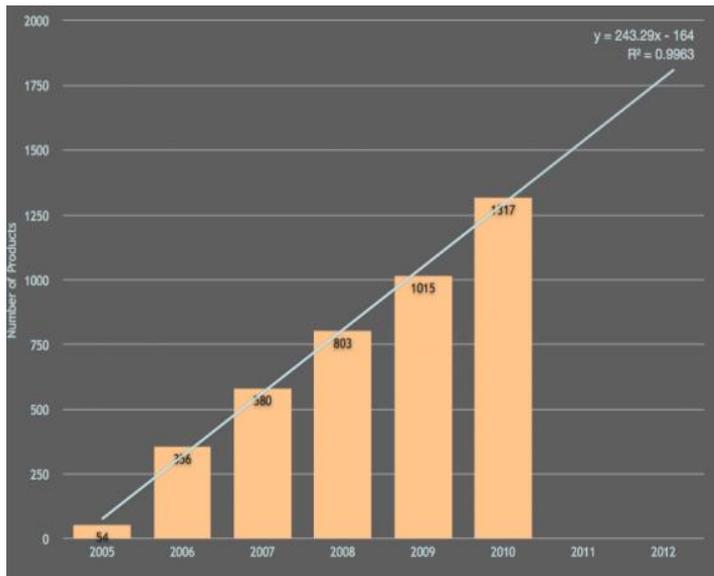
secteurs agro-alimentaire et textile en passant par l'informatique et la micro-électronique plus récemment (Figure 1).



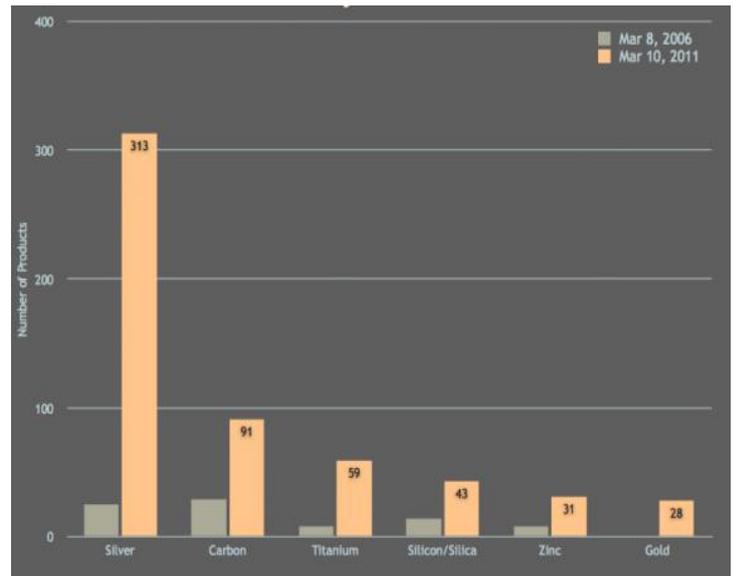
*Figure 1. Estimation de la répartition des applications des nanotechnologies en 2012 [4].*

Aujourd'hui ces nanomatériaux sont de plus en plus présents dans la vie quotidienne (Figure 2A) ce qui accroît considérablement l'exposition de l'environnement et des populations. Cette déferlante des nanotechnologies que l'on dit porteuse d'espoir et de progrès suscite donc aussi de nombreuses questions sur leurs éventuels impacts sanitaires et environnementaux. Des études sont maintenant publiées depuis quelques années, mais les résultats restent parcellaires, du fait entre autres de la très grande variété des NPs présentes dans notre environnement (Figure 2B). Le manque de données concernant le suivi et le cycle de vie des NPs inquiète de plus en plus l'opinion publique qui peut se sentir piégée et démunie devant la complexité de la situation.

### A/ Inventaire des produits de consommation contenant des NPs



### B/ Matériaux utilisés couramment dans les produits de consommation



**Figure 2.** Inventaire des produits de consommation contenant des nanoparticules (A). Matériaux utilisés couramment dans les produits de consommation (B).

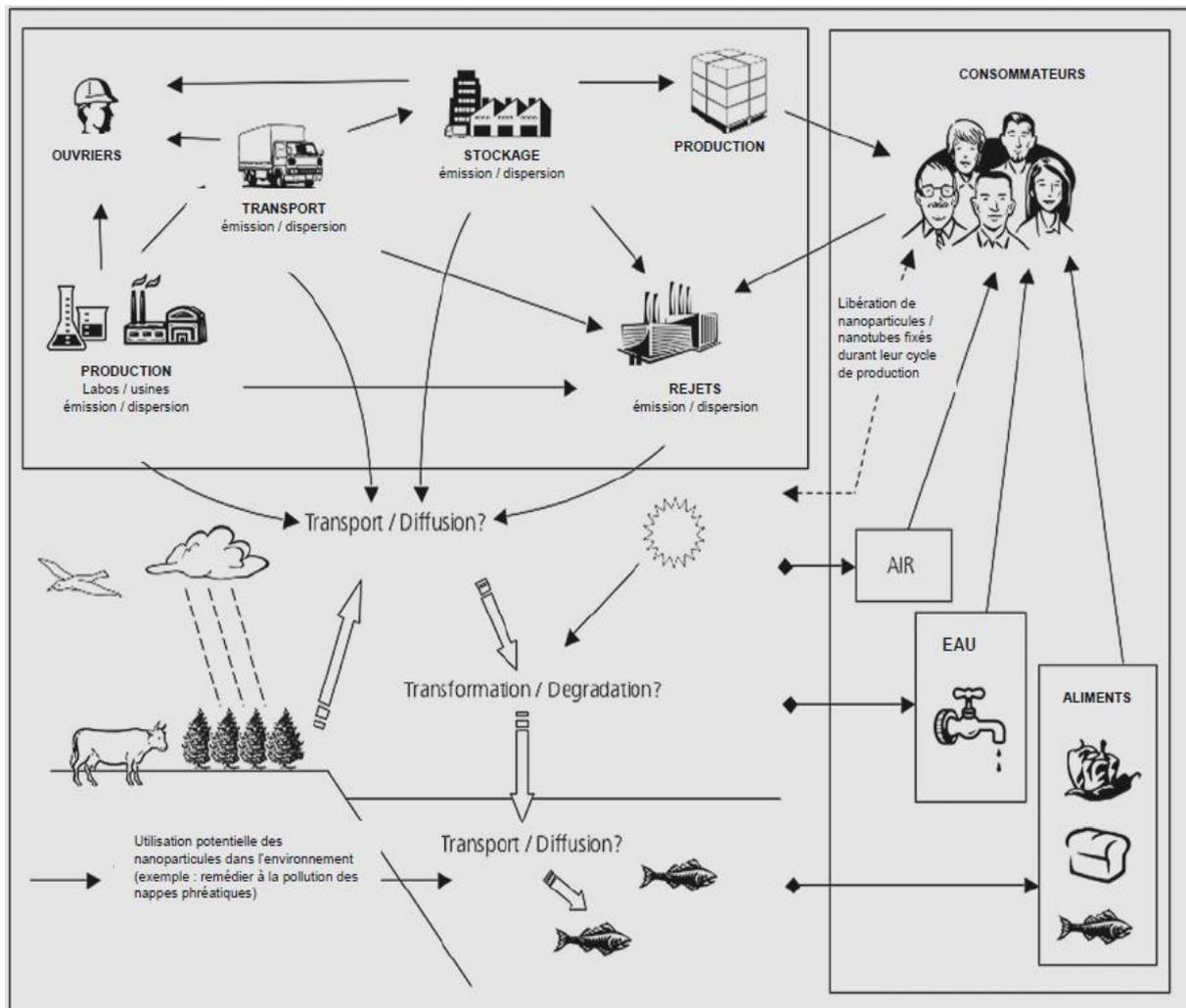
## 2. Risques liés à l'exposition aux nanoparticules

En dépit du fait que l'exposition aussi bien professionnelle que publique aux NPs augmente de manière spectaculaire avec le temps, les données sur leurs impacts environnementaux et sanitaires sont gravement insuffisantes. Aujourd'hui il y a un décalage paradoxal entre le développement effréné d'applications à base de NPs et le manque de données toxicologiques liées à ces NPs. Il est donc essentiel d'étudier et d'évaluer les risques sanitaires et écotoxiques liés aux NPs. Dans la suite de cette partie nous allons faire un état des lieux de ces impacts environnementaux et sanitaires [5-8].

## 3. Impacts environnementaux

A ce jour il existe très peu de données qui relatent avec certitude l'impact à court ou à long terme des NPs sur l'environnement. Même si la véracité d'une réelle menace n'est pas encore prouvée, les scientifiques s'interrogent sur cet impact environnemental en particulier dans le cas des NPs produites à grande échelle (NPs manufacturées ou libérées dans les émissions diesel par exemple). Des démarches méthodiques d'évaluation des risques doivent impérativement être mises en œuvre à toutes les étapes du cycle de vie des produits issus des

nanotechnologies : fabrication, transport, usage, élimination des déchets, récupération, valorisation et ce dans les différents compartiments écologiques (air, eaux et sols) [1].



**Figure 3.** Voies d'exposition aux NPs basées sur les connaissances actuelles et les applications futures envisagées [8].

En effet, une fois que ces NPs ont pénétré dans l'écosystème, elles peuvent diffuser entre les différents milieux en passant par exemple de l'eau aux sédiments ou de l'atmosphère dans

l'eau (Figure 3). De plus, il a été montré que certaines NPs juste après leur libération dans l'atmosphère sont peu dangereuses et que leur caractère nocif serait dû aux multiples transformations qu'elles subissent ultérieurement [1]. Ces modifications potentielles compliquent le travail qui doit être fait en amont tenant compte des caractéristiques pertinentes des NPs (biodégradabilité, absorption, capacité de complexation, stabilité chimique...) pour anticiper leur devenir une fois qu'elles sont libérées dans l'environnement.

## 4. Impact sanitaire et maladies associées chez l'homme

L'impact sanitaire des NPs chez l'homme suscite des interrogations et des craintes en termes de santé public. Aujourd'hui il existe très peu de réglementation concernant la manipulation, la production et la distribution des NPs, alors que les NPs par leurs propriétés si particulières représentent aujourd'hui un réel danger pour la santé des populations. De plus ces dernières années, différentes études ont révélé que les méthodologies d'évaluation toxicologique classiques ne s'appliqueraient pas aux NPs du fait de leur petite taille [8]. Des paramètres autres que la taille tels que la chimie de surface, la dose, la durée et les voies d'exposition sont également à prendre en compte pour mieux comprendre les risques potentiels.

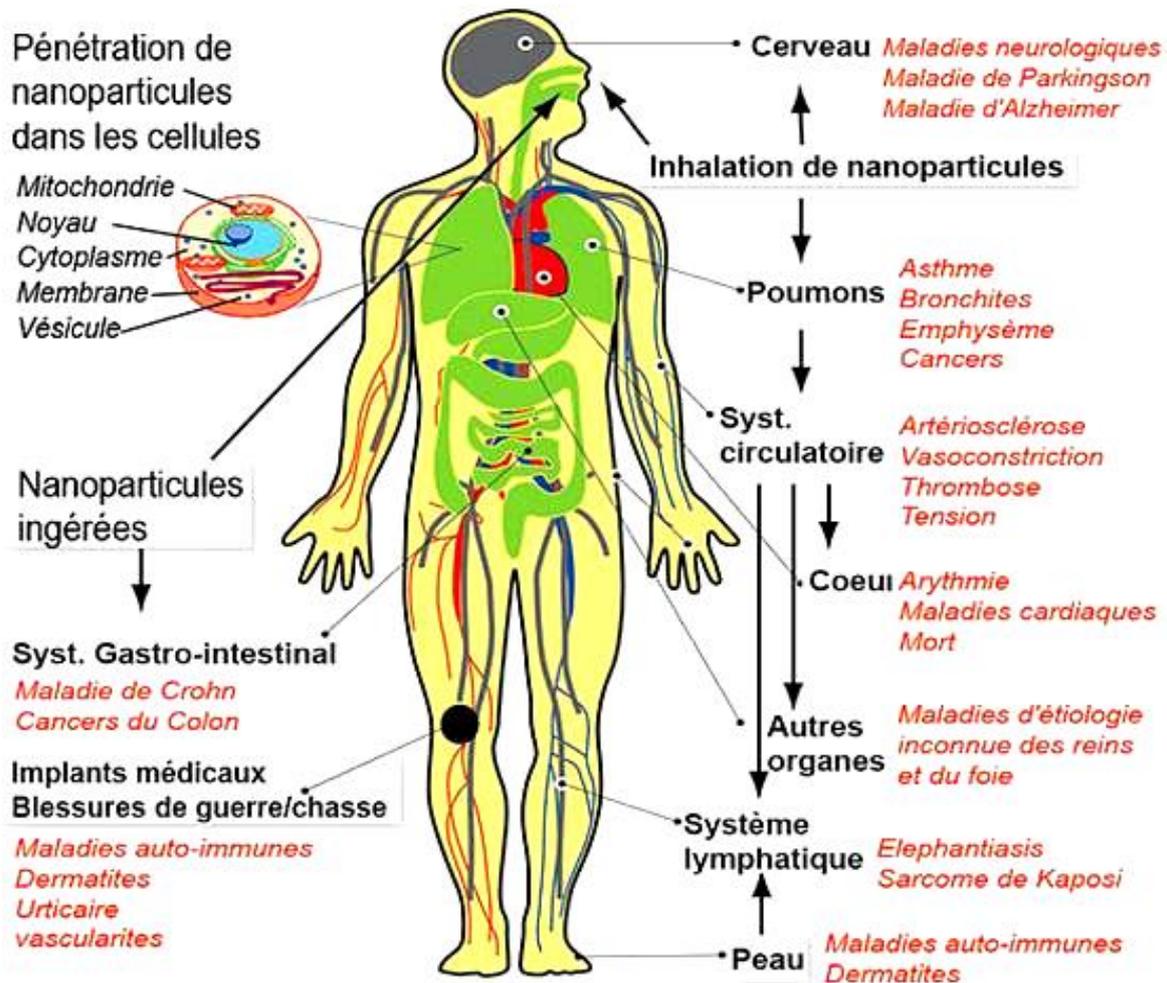
Les NPs peuvent entrer en contact avec l'organisme par trois voies principales : la voie respiratoire par inhalation, la voie digestive par ingestion, la voie cutanée par contact dermique [1, 9]. La Figure 4 montre ces voies d'entrée et les maladies associées à l'exposition à des NPs chez l'homme [1]. En particulier, des études ont montré que les particules ultrafines (PUF) issues de la pollution sont en partie responsables de l'aggravation des maladies cardiaques et respiratoires constatée chez les malades exposés à des pics de pollution particulaire [10].

De même, Ghio et coll. ont montré chez une femme saine l'apparition d'une fibrillation auriculaire vingt minutes après son exposition contrôlée aux particules ambiantes concentrées. En arrêtant l'exposition la personne est revenue à un rythme sinusal normal environ 2 heures plus tard, ce qui sous-entend un lien de causalité entre les deux [11]. Dans le même ordre d'idée d'autres études suggèrent que les particules fines (de taille inférieure à  $2,5\mu\text{m}$ ) seraient associées aux maladies respiratoires et cardiovasculaires mais aussi au cancer du poumon [12-14].

Ces propriétés toxiques des particules atmosphériques pourraient également être attribuées aux NPs manufacturées sachant que ces dernières présentent des caractéristiques physico-chimiques spécifiques (taille, forme, composition chimique...) potentiellement plus dangereuses pour les systèmes vivants. Les données toxicologiques actuelles sur les NPs manufacturées demeurent cependant insuffisantes, même si plusieurs études révèlent des risques liés à l'exposition à ces types de NPs.

## Maladies associées à l'exposition à des nanoparticules

*C. Buzea, I. Pacheco, & K. Robbie, Nanomaterials and nanoparticles: Sources and toxicity, Biointerphases 2 (2007) MR17-MR71*



**Figure 4.** Principales voies de pénétration des NPs chez l'homme et maladies associées [1].

Ces propriétés toxiques des particules atmosphériques pourraient également être attribuées aux NPs manufacturées sachant que ces dernières présentent des caractéristiques physico-chimiques spécifiques (taille, forme, composition chimique...) potentiellement plus dangereuses pour les systèmes vivants. Les données toxicologiques actuelles sur les NPs manufacturées demeurent cependant insuffisantes, même si plusieurs études révèlent des risques liés à l'exposition à ces types de NPs. On peut noter que l'exposition humaine aux NPs existe depuis très longtemps (du fait d'éruptions volcaniques ou de phénomènes de combustion), mais le développement exponentiel de leurs applications change considérablement la situation.

## 5. Objectifs de cette thèse :

Finalement quel que soit le mode d'internalisation des NPs dans un organisme, elles interagissent avec les cellules le constituant de manière plus ou moins spécifique, y engendrant des réactions biologiques graves en perturbant des fonctions cellulaires importantes.

La première cible des NPs au niveau cellulaire est la membrane plasmique. Différentes études ont permis de dégager deux grands mécanismes d'interaction des NPs avec les membranes : un premier mécanisme basé sur l'endocytose et un second basé sur la diffusion passive des NPs à travers la membrane avec formation potentielle de défauts structuraux dans cette membrane.

La membrane est une structure complexe, constituée d'une bicouche lipidique dans laquelle de nombreuses protéines aux fonctions extrêmement variées sont intégrées. Le catalogue des lipides étant lui-même très vaste, il s'avère intéressant d'étudier les interactions des NPs avec des modèles membranaires simplifiés.

L'objectif de cette thèse, qui s'inscrit dans le cadre de l'étude de la cytotoxicité des NPs et plus précisément de leurs mécanismes d'internalisation dans la cellule, est donc d'étudier l'interaction NPs-membrane, par le biais de modèles membranaires simplifiés. Dans ce cadre, seul le second mécanisme de diffusion passive est bien sûr accessible. Les modèles retenus sont des modèles plans, films monomoléculaires de Langmuir-Blodgett (LB) et bicouches planes, parfaitement adaptés à nos principales méthodes de caractérisation que sont la microscopie de force atomique (AFM) et la microscopie de fluorescence. Des mesures de tension superficielle et de microbalance à quartz (QCM-D) ont complété notre étude.

Les films lipidiques ont été étudiés sur des supports nus ou nanostructurés par le dépôt préalable de NPs afin de mimer l'interaction NPs-membrane. Des films lipidiques ont également été transférés à partir de monocouches étalées sur des suspensions de NPs. Notre choix s'est porté sur des NPs de silice ( $\text{SiO}_2$ -NPs), celles-ci étant largement répandues dans des produits de consommation courante. En dehors des méthodes de préparation des échantillons, nous avons également fait varier deux autres paramètres : la taille des NPs et la nature du lipide constituant le film pour tenir compte des différentes phases lipidiques présentes dans le feuillet externe des membranes, premier feuillet en contact avec les NPs.

Ce manuscrit est finalement organisé de la manière suivante :

-Le chapitre 1 présente l'organisation de la membrane plasmique et sa composition, les modèles membranaires simplifiés, et un résumé des connaissances actuelles sur l'interaction des NPs avec les membranes.

-Le chapitre 2 est dédié à la réalisation de nos modèles membranaires d'un point de vue pratique: choix des lipides, conditions expérimentales retenues, mesures de tension superficielle, réalisation des films monomoléculaires type LB et des bicouches planes par deux méthodes (méthode de Langmuir-Blodgett-Schaefer LS et éclatement de vésicules).

-Le chapitre 3 présente les méthodes de caractérisation : AFM, microscopie de fluorescence, QCM-D...

-Le chapitre 4 concerne les différents résultats obtenus (caractérisation des surfaces nanostructurées et des systèmes lipidiques déposés sur un substrat nu ou nanostructuré), ainsi qu'une discussion de ces résultats dans le contexte des connaissances actuelles sur les interactions NPs-membrane.

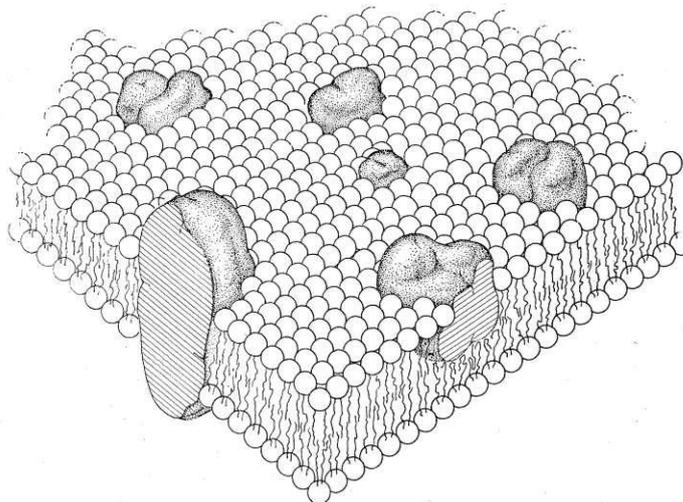
-Une conclusion générale rappelle les principaux résultats obtenus et présente également les nombreuses perspectives possibles de ce travail de thèse.

# CHAPITRE I : La membrane cellulaire et ses modes d'interaction avec des NPs

## 1. Rappels historiques et évolution du modèle de membrane

Robert Hook et Théodor Schwann ont avancé dès le XVII<sup>ème</sup> siècle l'idée selon laquelle la cellule représente l'unité fondamentale de la vie. Ainsi la cellule (de *cellula* en latin qui signifie « petite chambre ») est l'unité structurale, fonctionnelle et reproductrice constituant tout être vivant. La cellule est entourée d'une barrière physique appelée membrane plasmique, l'isolant de son environnement [15]. De par sa composition et sa structure, la membrane permet par exemple de maintenir les gradients de concentration entre le cytoplasme et le milieu extérieur. Elle est également impliquée dans d'importants processus cellulaires indispensables au bon fonctionnement de la cellule tels que : les échanges avec le milieu environnant, l'adhésion et la reconnaissance cellulaires, la transduction des signaux, le transport membranaire etc...

La notion de « mosaïque fluide » est introduite en 1972 par S. J. Singer et G. L. Nicolson pour décrire la structure des membranes [16]. Le modèle qu'ils proposent suggère que les membranes composées de protéines et de lipides sont des structures dynamiques (Figure 5).



*Figure 5. Modèle membranaire de type « mosaïque fluide » décrit par Singer et Nicolson en 1972 [16].*

Les lipides, organisés en bicouche formant une matrice bidimensionnelle fondamentalement

fluide, se comportent comme un solvant des protéines membranaires. Singer et Nicolson proposent également que les lipides et les protéines sont asymétriquement répartis entre les deux feuillettes de la membrane et animés de mouvements transversaux et latéraux (phénomène de « flip-flop » entre les deux feuillettes pour les lipides et mouvement latéral pour les protéines comme pour les lipides), d'où le nom de « mosaïque fluide ». D'autre part, Singer et Nicolson définissent deux classes de protéines : les protéines périphériques ou extrinsèques et les protéines intramembranaires ou intrinsèques. Suivant leur localisation et leur degré d'enfouissement dans la membrane, ces protéines assurent différentes fonctions, la plus fondamentale étant la communication entre le milieu extracellulaire et le cytoplasme.

Dans les années 1990, le modèle de structure de la membrane cellulaire s'affine tout en restant basé sur celui de la mosaïque fluide. Des biologistes et biophysiciens suggèrent l'existence d'hétérogénéités latérales et de microdomaines, en particulier dans le feuillet externe de la membrane, appelés « rafts » [15]. Selon cette théorie, la grande variété des espèces lipidiques membranaires présentant des propriétés physico-chimiques différentes serait à l'origine, d'une part, d'une ségrégation de phase des lipides suivant les conditions physiologiques (température, pH, pression osmotique...), et d'autre part du recrutement local de protéines membranaires spécifiques par les domaines lipidiques ainsi formés. C'est dans ce contexte et suite à des études basées sur différentes approches biophysiques que l'idée des radeaux lipidiques ou *rafts* est finalement proposée dans les années 1990 [17-20]. Ce modèle stipule donc l'existence de microdomaines enrichis en certains lipides, sphingolipides, glycolipides et cholestérol mais aussi en certaines protéines. Il est maintenant admis que cette ségrégation de phase est impliquée dans différents processus : signalisation, apoptose, fusion membranaire, adhésion et migration cellulaires ... [21, 22].

## 2. Composition moléculaire

La membrane est essentiellement constituée de lipides, de protéines et dans une moindre mesure de glucides. Ces derniers sont exposés sur la face externe de la membrane et toujours liés de manière covalente à des lipides ou protéines pour former respectivement des glycolipides ou des glycoprotéines. Les lipides, les protéines et les glucides représentent en moyenne respectivement 40%, 52% et 8% des constituants membranaires (% en poids sec de la membrane). En prenant en compte la différence de poids moléculaire entre ces classes de molécules, on compte environ 50 molécules de lipide par molécule de protéine [23, 24].

### ***2.1., Les protéines membranaires***

De part leur structure et leur localisation, les protéines membranaires peuvent être classées en deux types : les protéines périphériques et les protéines transmembranaires [15]. Les protéines périphériques, ne pénétrant pas dans la bicouche lipidique de façon significative, sont associées à la membrane à sa surface par des interactions ioniques et/ou des liaisons hydrogène. Si elles sont situées sur la face interne de la membrane, elles participent par exemple à la fonction de soutien cellulaire (en interaction avec le cytosquelette). De part leur localisation, ces protéines participent également à des réactions s'effectuant à l'interface entre la membrane et les compartiments aqueux externe ou interne, pouvant s'inscrire dans un processus séquencé plus large. Les protéines intrinsèques, au contraire, sont insérées complètement ou traversent de part en part la bicouche permettant ainsi d'assurer la communication de la cellule avec son milieu extérieur, en jouant par exemple les rôles de canal ou de transporteur actif ou passif de molécules à travers la membrane (aquaporines, pompe ionique  $K^+$ ...), de récepteur et de transducteur de signaux (hormones, neurotransmetteurs,...), de catalyseur enzymatique (NADPH oxydase, cytochrome oxydase...). Ces protéines peuvent également participer aux mécanismes de reconnaissance intercellulaire mais aussi à l'adhésion entre les membranes de deux cellules.

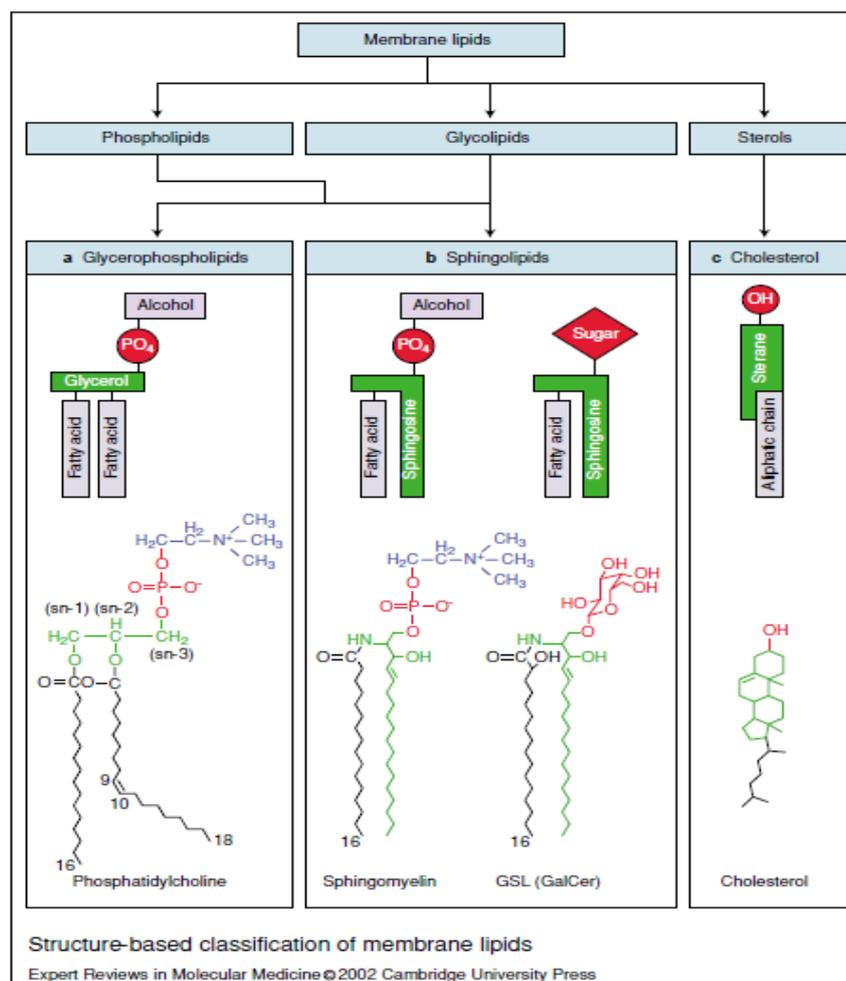
### ***2.2. Les lipides membranaires***

Les lipides sont des molécules amphiphiles (ou amphipathiques) constituées d'une tête polaire (hydrophile) et généralement de deux chaînes hydrocarbonées (hydrophobes). Dans la membrane, ces lipides sont organisés en bicouche plus ou moins fluide, d'une épaisseur variable comprise entre 6 et 7 nm, les chaînes ou parties hydrophobes dirigées vers l'intérieur de la bicouche et les têtes hydrophiles en contact avec le cytoplasme et le milieu extracellulaire, riches en eau. Si on tient compte des protéines et des glucides, l'épaisseur moyenne de la membrane est, elle, de 8 à 10 nm.

Parmi les grandes familles des lipides membranaires on distingue : les glycérophospholipides (plus communément appelés phospholipides), les sphingolipides, les glycolipides et les stérols.

### 2.2.1. Les glycérophospholipides ou phospholipides

Un phospholipide résulte de la condensation de deux acides gras avec deux fonctions alcool d'une molécule de glycérol. Un groupement phosphate, lui-même lié à un composé hydrophile et fixé sur la 3<sup>ème</sup> fonction alcool du glycérol, forme la tête polaire (Figure 6). Selon la nature de ce composé, il s'agit classiquement de la phosphatidylcholine (PC), de la phosphatidyléthanolamine (PE), de la phosphatidylsérine (PS) ou du phosphatidylinositol (PI) [23,24]. De même, selon la nature des groupements présents sur le composé hydrophile, la tête peut être chargée négativement (PS, PE) ou zwitterionique portant deux charges opposées (PC).



**Figure 6.** Classification et structure moléculaire des lipides membranaires [27].

Les phospholipides sont également classés selon la structure de leur squelette carboné (position des chaînes sur le glycérol, nombre de carbones, présence d'insaturations ...). Engénéral chez les eucaryotes, la chaîne des phospholipides en position *sn-1* est saturée, alors

que celle en position *sn*-2 est insaturée (une ou plusieurs doubles liaisons pouvant être en configuration *cis*). C'est le cas du 1-Palmitoyl-2-Oléoyl-*sn*-Glycéro-3-PhosphatidylCholine (C16:0,18:1 PC ou POPC) qui est le phospholipide monoinsaturé majoritaire de la membrane plasmique dans la plupart des types cellulaires. La présence d'une double liaison *cis* engendre un encombrement stérique par rapport à la double liaison *trans*, dû à la formation d'un coude dans la chaîne [25,26].

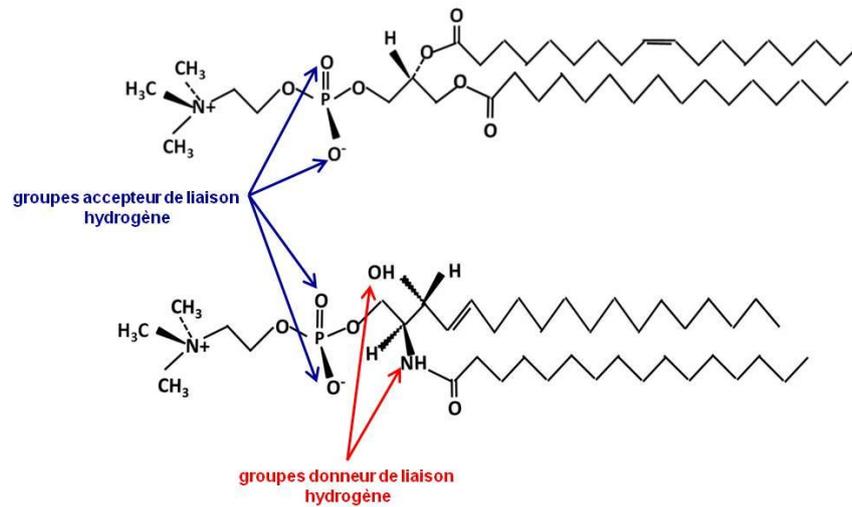
### 2.2.2. Les sphingolipides

Les sphingolipides sont présents dans toutes les cellules eucaryotes. Ils découlent de l'association d'une molécule de sphingosine, d'un acide gras, et d'un groupe phosphate lui-même lié à un alcool ou un acide aminé (Figure 6). Bien que leur constitution soit différente de celle des glycérophospholipides, leur organisation générale (une tête polaire et deux chaînes) est donc similaire. Cependant, il existe deux différences majeures entre ces deux familles de lipides :

-la partie polaire des sphingolipides comporte des fonctions donneur et accepteur de liaisons hydrogène, alors que les glycérophospholipides ne comportent que des groupes accepteurs (Figure 7). Deux sphingolipides voisins peuvent donc interagir par des liaisons hydrogène, contrairement aux glycérophospholipides [28] ;

-les chaînes hydrophobes des sphingolipides sont généralement plus longues et plus saturées que celles des glycérophospholipides.

Ces différences expliquent que la température de transition ( $T_m$ ) des sphingolipides soit généralement plus élevée que celle des glycérophospholipides (voir le paragraphe 1.3.1.). Elles expliquent également la concentration des sphingolipides dans les *rafts*, de phase plus condensée que la phase fluide environnante.



**Figure 7.** Comparaison des structures chimiques de deux phospholipides « modèles » : un glycérophospholipide (POPC) et un sphingolipide (sphingomyéline).

### 2.2.3. Les glycolipides

Ce sont des lipo-polysaccharides localisés exclusivement sur le feuillet externe et impliqués dans la reconnaissance et l'adhésion cellulaires. Les glycolipides sont composés d'un sucre (saccharide) ou de plusieurs sucres (oligosaccharides) formant la partie polaire, et de deux chaînes carbonées qui facilitent leur insertion dans la bicouche lipidique (Figure 6). La partie polaire est riche en fonctions  $-OH$  impliquées dans des liaisons hydrogène avec l'eau (ce qui explique leur forte hydratation) ou d'autres glycolipides.

### 2.2.4. Les stérols

Le cholestérol est le stérol présent majoritairement dans les membranes des cellules eucaryotes. Sa structure diffère nettement de celles décrites précédemment (Figure 6). Cette molécule est constituée :

- d'une partie polycyclique plane et rigide ;
- d'une courte chaîne carbonée greffée sur la partie cyclique, cette chaîne étant la seule partie réellement flexible de la molécule ;
- d'une tête polaire se limitant à une fonction  $-OH$ .

Au niveau de la membrane, le cholestérol s'insère entre les molécules de phospholipides, la partie polycyclique et la chaîne étant au contact des chaînes carbonées des phospholipides.

### 3. Propriétés physico-chimiques

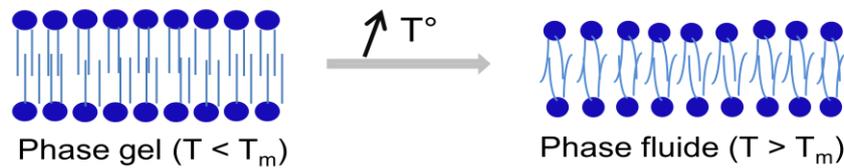
#### 3.2. *Température de transition*

Les chaînes d'acides gras des phospholipides ont généralement des longueurs comprises entre 12 et 24 atomes de carbone et peuvent interagir entre elles par des interactions de type van der Waals. L'état physique et l'organisation des lipides dépendent principalement de leur nature (nature de la tête polaire, longueur et degré d'insaturation des chaînes hydrocarbonées) mais également de la température expérimentale. En effet chaque lipide est caractérisé par une température de transition de phase  $T_m$  (pour *Melting Temperature* en anglais) essentiellement liée aux caractéristiques intrinsèques du lipide. Schématiquement la  $T_m$  est la température pour laquelle un lipide passe d'une phase gel ordonnée à une phase fluide désordonnée (Figure 8). Ce changement de phase n'est rien d'autre qu'un changement dans l'organisation et la mobilité des chaînes. Ainsi à une température inférieure à la  $T_m$ , les lipides sont en phase « condensée » ou gel, adoptant une conformation dans laquelle les chaînes d'acides gras sont étirées (configuration *all trans*), régulièrement organisées et parallèles les unes aux autres, maximisant ainsi les interactions de van der Waals. A une température supérieure à la  $T_m$ , les molécules sont en phase « liquide expansé » ou fluide (Figure 8). Dans ce cas, les chaînes ont une organisation désordonnée avec une proportion importante de défauts « gauche » qui réduisent fortement les interactions de van der Waals. La Figure 8 illustre schématiquement cette transition de phase gel  $\rightarrow$  fluide. Il faut cependant noter que le comportement d'un lipide vis-à-vis de la température peut s'avérer complexe, si on s'intéresse à la structure fine de l'organisation, et plus particulièrement aux caractéristiques du réseau formé par ces molécules dans une bicouche (phase *ripple* par exemple)<sup>1</sup>. La température de transition permet donc de déterminer l'organisation thermodynamique des lipides suivant les conditions expérimentales. Dans le cas des lipides ayant la même tête polaire (PC, PE,...), la  $T_m$  varie non seulement en fonction de la longueur de chaîne mais aussi du nombre d'insaturation. Par exemple le dimyristoyl-phosphatidylcholine (diC14 :0 PC ou DMPC) et le dipalmitoyl-phosphatidylcholine (diC16 :0 PC ou DPPC) ont respectivement leur  $T_m$  autour de 24°C et

---

<sup>1</sup> Phase *ripple* : cette phase résulterait de la courbure spontanée, locale et périodique de la bicouche. On l'associe généralement à la tête polaire du lipide, certaines familles lipidiques (dont les PC) pouvant former cette phase.

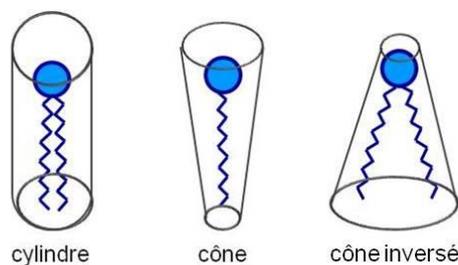
41°C. Cette différence reflète la différence d'interaction de van der Waals entre les chaînes d'acide gras qui composent ces lipides : plus les chaînes sont longues, plus les interactions sont fortes. Il faut donc « chauffer » davantage pour induire du désordre.



**Figure 8.** Illustration de la transition de la phase gel à la phase fluide d'un système lipidique comme une bicouche.

### 3.3. Polymorphisme des associations lipidiques

Les propriétés physico-chimiques de la membrane sont dépendantes de celles de ses constituants à savoir les lipides et les protéines membranaires. Nous allons nous limiter ci-dessous au cas des lipides. Les molécules amphiphiles (comme les phospholipides dans notre cas) s'auto-assemblent spontanément en milieu aqueux afin de minimiser les interactions entre leurs parties hydrophobes et les molécules d'eau : c'est l'effet hydrophobe. Le type d'organisation adoptée par les lipides en milieu aqueux dépend aussi bien des conditions expérimentales (température, force ionique, concentration des lipides) que de leur composition et de leur forme, en particulier du rapport entre le volume occupé par la tête polaire et celui occupé par les chaînes hydrophobes. En effet, suivant l'encombrement relatif de la tête polaire par rapport aux chaînes, un lipide est caractérisé par une forme géométrique, les plus courantes étant les formes en cylindre, en cône, ou en cône inversé (Figure 9) [29,30].

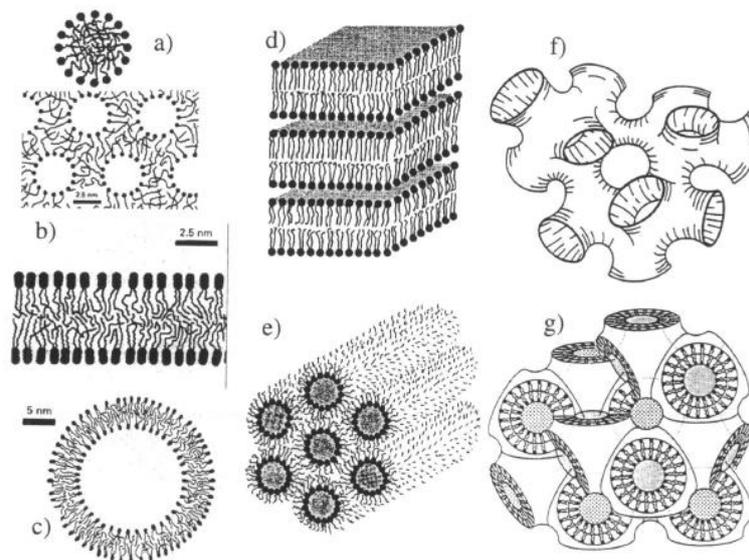


**Figure 9.** Différentes formes moléculaires caractérisant les lipides membranaires.

Par exemple, les lysophospholipides (n'ayant qu'une seule chaîne) appartiennent à la catégorie des cônes, la partie la plus large du cône étant située au niveau de la tête polaire. Les

phospholipides possédant une chaîne insaturée avec une insaturation en *cis* appartiennent eux à l'autre catégorie de cône (les chaînes prenant plus de place que la tête). Le glycolipide GM<sub>3</sub> appartient lui plutôt à la catégorie des cylindres.

En milieu aqueux suivant leur forme intrinsèque, les molécules de lipides s'auto-assemblent formant ainsi différentes structures supramoléculaires plus ou moins complexes (Figure 10). Les lipides cylindriques s'organisent par exemple facilement en bicouche. Ceux en forme de cône forment aisément des micelles. De plus, la phase des lipides dans ces structures et plus particulièrement dans les bicouches (modèles de membrane privilégiés) change sous l'effet de variations de température.



**Figure 10.** Polymorphisme des associations lipidiques en milieu aqueux : a) micelles et micelles inverses, b) bicouche, c) liposome, d) phase lamellaire, e) phase hexagonale inverse, f) phase éponge, g) phase cubique inverse bi-continue, d'après [23,24,30].

#### 4. Fluidité et diffusion membranaires

La membrane cellulaire fonctionnelle est fluide, les molécules (lipides et protéines) étant capables de diffuser plus ou moins librement dans le plan de la membrane [15]. Cette fluidité membranaire intervient dans différentes fonctions cellulaires en permettant le regroupement local de molécules spécifiques. L'étude de la dynamique des membranes par différentes méthodes de caractérisation a fait l'objet de nombreuses publications. Parmi ces méthodes on peut évoquer la méthode de retour de fluorescence après photoblanchiment (*Fluorescence*

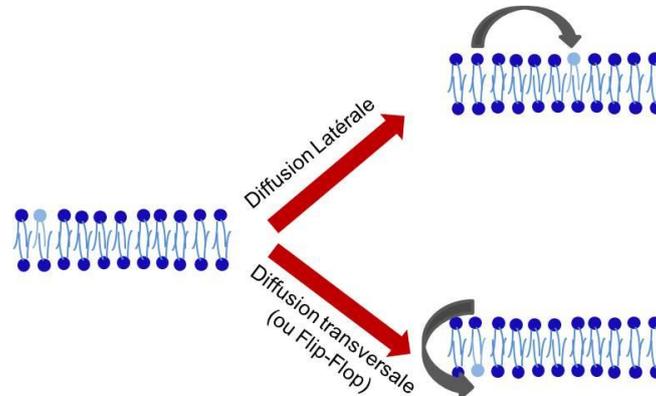
*Recovery After Photobleaching* ou FRAP) [31-33]. Dans cette méthode, le système lipidique est marqué à l'aide d'une sonde fluorescente. Le FRAP consiste à inhiber de manière irréversible la fluorescence dans une zone restreinte de l'échantillon, en exposant très brièvement cette zone à un faisceau laser intense (photoblanchiment). L'échantillon comporte alors une zone éteinte entourée d'une zone fluorescente. Les molécules fluorescentes intactes repeuplent petit à petit la zone éteinte en diffusant dans le plan de l'échantillon. L'analyse de la cinétique de redistribution de la sonde fluorescente permet de déterminer le coefficient de diffusion latérale  $D$  lié à la vitesse de déplacement des molécules dans le milieu et donc à la fluidité des lipides.

La résonance magnétique nucléaire (RMN) à gradient de champs pulsé est également une autre méthode intéressante d'étude de la diffusion latérale [34,35]. En appliquant un gradient de champ, la diffusion de translation des molécules réduit l'intensité du signal RMN. La mesure de cette atténuation du signal fournit des informations sur le processus de diffusion dans le système.

L'utilisation de la spectroscopie de corrélation de fluorescence (FCS) permet aussi de mesurer la fluidité des membranes [36-38]. Cette méthode est basée sur l'analyse des fluctuations d'intensité de fluorescence dans un petit volume d'observation au cours du temps, ces fluctuations étant liées aux mouvements d'entrée et de sortie de la sonde fluorescente.

Comme il a été mentionné précédemment, la fluidité du système lipidique est en grande partie liée à la structure des lipides, favorisant ou pas leur organisation régulière. Dans le cas d'une membrane la situation est nettement plus complexe du fait de la présence de nombreux lipides différents et de leur répartition asymétrique. Ainsi le cholestérol intervient dans la membrane comme un régulateur de sa fluidité en évitant sa «solidification» à basse température ou une augmentation trop importante de sa fluidité à des températures plus élevées. Il participe également à la formation des *rafts*, de part ses interactions privilégiées avec les sphingolipides. La phase des *rafts* est d'ailleurs intermédiaire entre une phase fluide et une phase condensée. Cette phase dite «*liquid-ordered*» est caractérisée par un arrangement régulier et serré des molécules comme dans la phase gel, mais ces molécules conservent une forte mobilité permettant entre autre l'insertion du cholestérol entre les chaînes de phospholipides. De plus, des études ont montré que les deux feuillets de la membrane n'ont pas la même composition lipidique et protéique [39,40], suggérant que la fluidité y est intrinsèquement différente. Enfin, le feuillet interne interagit fortement avec le cytosquelette ce qui limite la diffusion de certaines protéines.

Le mouvement des lipides ne se limite pas à leur diffusion latérale dans le plan de la membrane. Ils peuvent également se mouvoir par simple rotation sur eux-mêmes ou par diffusion transversale. Dans le premier cas les lipides restent dans le même feuillet alors que dans le second les lipides changent de feuillet par le phénomène de « flip-flop » (Figure 11) [41].



*Figure 11. Phénomènes de diffusion latérale et transversale (ou « flip-flop »).*

Le mécanisme de « flip-flop » spontané est généralement défavorable du point de vue énergétique et peut prendre des heures voire parfois des jours. Cependant il peut être favorisé par des enzymes appelées flippases [42] ou dans le cas de lipides insaturés.

En conclusion on voit donc que l'hétérogénéité de distribution et de phases des constituants membranaires fait de la membrane une structure inhomogène et assez complexe à étudier. C'est pour cela que de nombreux modèles membranaires simplifiés ont été développés, afin de faciliter les études concernant la structure et le fonctionnement de la membrane.

## 5. Les modèles membranaires *But et avantages*

Un des enjeux majeurs de la recherche biomédicale actuelle est de comprendre le fonctionnement de la cellule, une structure très complexe siège d'une multitude de mécanismes biochimiques. Concernant les membranes, de nombreuses études font appel aux modèles membranaires simplifiés. Cette approche conceptuelle pertinente permet d'étudier plus facilement les propriétés biophysiques et biochimiques de ses constituants [43]. L'atout de ces systèmes modèles réside dans leur facilité de réalisation et de manipulation mais aussi

dans la maîtrise de leur composition généralement limitée à trois ou quatre types de lipides au maximum.

On distingue deux types de modèles de membranes : les modèles bi-dimensionnels et les modèles tri-dimensionnels. Chacun de ces modèles a ses avantages et ses inconvénients, le choix du modèle étant intimement lié aux méthodes de caractérisation mises en place pour l'étudier. Dès lors le choix du modèle et de sa composition est une étape cruciale.

### 5.3. Modèles tri-dimensionnels : les liposomes ou vésicules lipidiques

Les liposomes (ou vésicules lipidiques) ont été découverts il y a plus de 40 ans [28]. Il s'agit de bicouches lipidiques refermées sur elles-mêmes emprisonnant de l'eau, qui se forment lorsque les phospholipides sont hydratés ou exposés à un environnement aqueux [44]. Le diamètre des liposomes varie de 20 nm à quelques dizaines de  $\mu\text{m}$ . On en distingue différents types selon leur taille et le nombre de bicouches (Figure 12):

- les vésicules unilamellaires de petite taille (SUV pour *Small Unilamellar Vesicles* en anglais) dont le diamètre est inférieur à 200 nm ;
- les vésicules unilamellaires de grande taille (LUV pour *Large Unilamellar Vesicles*) de diamètre compris entre 200 nm et 1000 nm ;
- les vésicules unilamellaires géantes (GUV pour *Giant Unilamellar Vesicles*) de diamètre supérieur à 1000 nm ;
- les vésicules multilamellaires (MLV pour *Multilamellar Vesicles*).

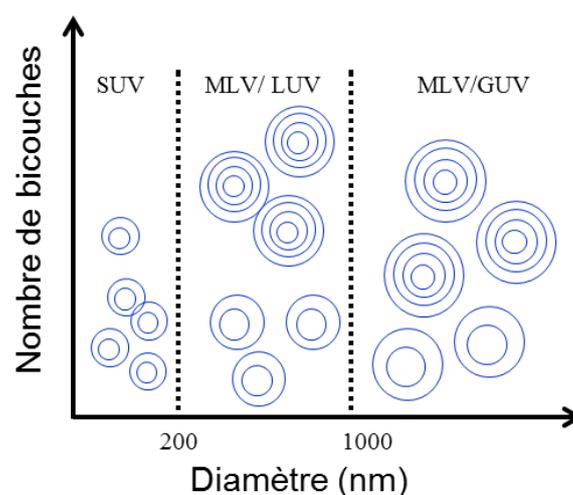


Figure 12. Classification des liposomes suivant le nombre de bicouches et leur diamètre.

Les vésicules unilamellaires (SUV, LUV et GUV) sont donc les modèles simplifiés les plus proches de la membrane et de nombreuses applications thérapeutiques (encapsulation de médicaments, vaccins.....), cosmétologiques et biophysiques (en tant que modèles membranaires) témoignent de l'intérêt qu'ils suscitent [45].

Différentes méthodes de préparation de ces vésicules lipidiques ont été décrites dans la littérature [45,46]. L'une de ces méthodes, celle que nous avons utilisée lors de cette étude, est basée sur la réhydratation d'un film lipidique après évaporation du solvant organique dans lequel les lipides ont été préalablement solubilisés. Sous l'effet de la réhydratation par le solvant aqueux, les lipides s'associent pour former des bicouches qui se referment sur elles-mêmes formant ainsi des MLV de tailles très hétérogènes. Pour homogénéiser la taille des vésicules et former des vésicules unilamellaires, différents traitements peuvent être appliqués aux MLV : la sonication, l'extrusion ou la méthode du *freeze/thaw* (cycles de congélation-décongélation successifs). Dans notre cas nous avons utilisé la méthode par extrusion [46] pour former les SUV qui nous ont servi par la suite pour préparer les bicouches supportées. Le protocole de préparation des SUV est détaillé dans le chapitre 2.

Lors de l'auto-assemblage de ces systèmes, il est nécessaire de respecter certaines conditions, en particulier de température. Celle-ci doit être supérieure à la température de transition  $T_m$  du lipide ou du mélange de lipides pour faciliter le processus de réorganisation.

#### **5.4. Modèles bi-dimensionnels**

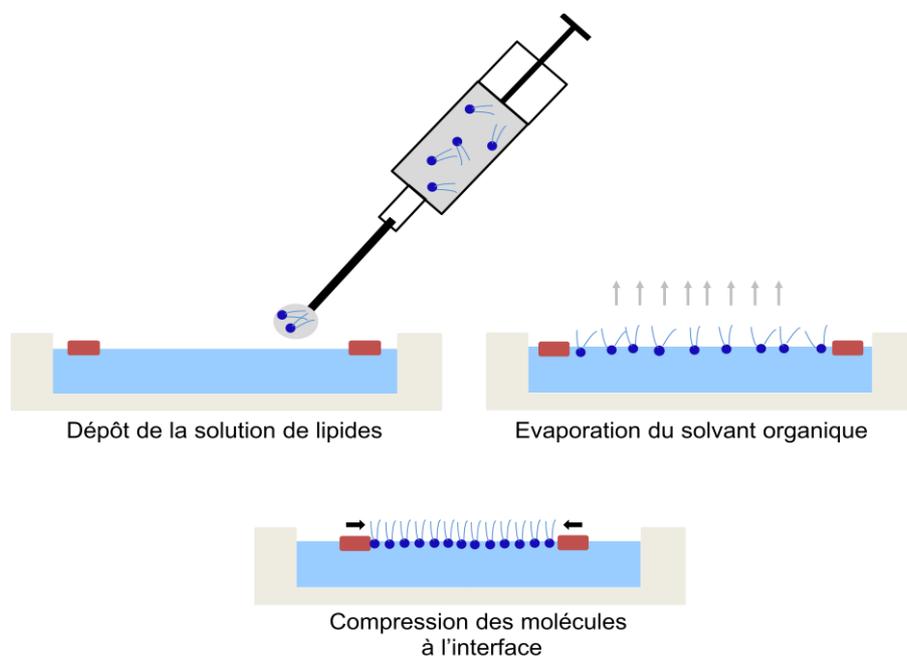
Comme leur nom l'indique ces modèles bi-dimensionnels (2D) sont des films plans. Suivant les techniques de caractérisation et la spécificité de l'étude à laquelle ils sont destinés, ils se présentent sous la forme de films lipidiques stabilisés soit à l'interface air/eau (monocouches de Langmuir ou de Gibbs), soit sur un substrat solide (films de Langmuir-Blodgett ou de Langmuir-Schaefer, ...). De nombreuses molécules, présentant un caractère amphiphile, sont capables de former de tels systèmes. Dans le cas des molécules biologiques, on peut citer les lipides et certaines protéines. Dans notre cas nous nous limiterons aux lipides.

##### **5.4.1. Les monocouches lipidiques à l'interface air/eau**

Dans le cadre de ses études sur la structure des films d'huile à la surface de l'eau, I. Langmuir (1881-1957) formule en 1917 l'hypothèse qu'une monocouche d'acide gras se forme à l'interface air-eau, les molécules s'orientant perpendiculairement à cette interface, le groupe carboxylique orienté vers l'eau et la chaîne carbonée orientée vers l'air [47]. Ses recherches

en chimie des tensioactifs lui valent le prix Nobel de chimie en 1932. En collaboration avec K.B. Blodgett (1898-1979) puis V. Schaefer (1906-1993), ils développent les notions de films de Langmuir-Blodgett (LB) et Langmuir-Blodgett-Schaefer (LS).

D'un point de vue expérimental, les monocouches à l'interface air-eau sont réalisées à l'aide d'une cuve, dite de « Langmuir ». Cette cuve de Langmuir, généralement en téflon, est remplie d'une phase aqueuse (sousphase) et équipée de deux barrières mobiles permettant la compression et le contrôle du film moléculaire à l'interface air-eau. La première étape consiste à déposer délicatement goutte par goutte les lipides préalablement solubilisés dans un solvant organique ou un mélange de solvants organiques à la surface de la sousphase. Après évaporation du solvant et de part leur nature amphiphile, les lipides s'organisent pour former une monocouche à la surface de l'eau, les têtes polaires, hydrophiles, étant en contact avec la phase aqueuse et les parties hydrocarbonées, hydrophobes, au contact de l'air (Figure 13). L'état de la monocouche est alors quantifié à l'aide de deux paramètres décrits ci-dessous.



**Figure 13.** Formation d'une monocouche lipidique de Langmuir.

A la surface de la phase aqueuse, les molécules d'eau ne sont pas rigoureusement dans le même état que celles dans la solution, et leur énergie est légèrement supérieure. On associe alors à l'interface la notion de tension superficielle  $\gamma$ , due à la cohésion des molécules entre elles et définie comme une énergie par unité de surface ou de manière équivalente comme une force par unité de longueur. La formation d'une monocouche à cette interface modifie naturellement cette tension superficielle.

Ainsi, après évaporation du solvant organique, les lipides occupent toute la surface de l'eau disponible. Si le nombre de lipides déposés est faible par rapport à la surface, leur présence ne modifie pas les propriétés de l'interface : la tension superficielle mesurée est identique à celle de l'eau ( $\gamma_0 = 72.5 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$  à  $T=20^\circ\text{C}$ ).

Les lipides sont ensuite comprimés par rapprochement des barrières, formant une monocouche de plus en plus dense, ce qui diminue alors la tension superficielle ( $\gamma < \gamma_0$ ). On définit alors la pression de surface  $\Pi$  comme étant la variation de  $\gamma$  à chaque instant  $t$  de la compression :

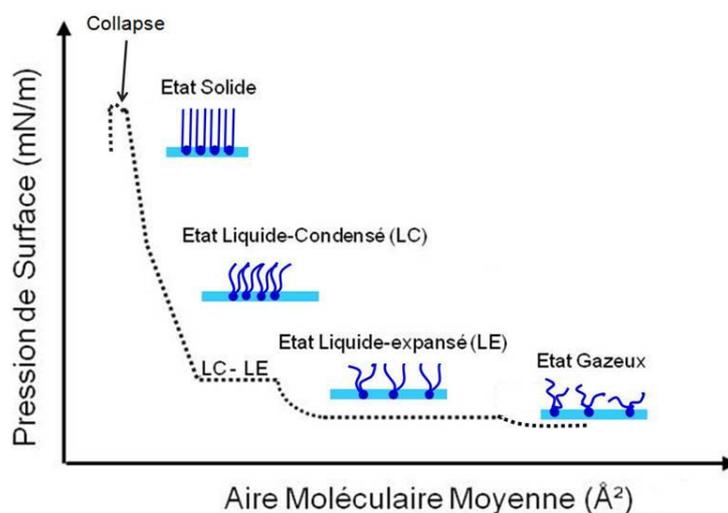
$$\Pi = \gamma_0 - \gamma \quad (1.1)$$

En parallèle, on suit la diminution de l'aire moléculaire moyenne  $A$  définie telle que :

$$A = S / N \quad (1.2)$$

où  $S$  est la surface entre les barrières et  $N$  le nombre de molécules étalées, déterminé à partir de la concentration et du volume déposé de la solution lipidique initiale. On obtient ainsi l'isotherme de compression  $\Pi = f(A)$ , indiquant les différentes phases par lesquelles passe la monocouche lipidique au cours de la compression.

Ainsi au début de la compression les molécules sont très éloignées les unes des autres et les interactions entre elles sont quasi-inexistantes : le film est en phase gazeuse et la pression de surface est proche de zéro (Figure 14).



**Figure 14.** Isotherme de compression théorique  $\Pi$ - $A$  d'un lipide et les différentes phases potentiellement observables.

La compression se poursuivant, les molécules se rapprochent tout en conservant leurs chaînes hydrocarbonées désordonnées : le film est en phase « liquide expansé » ( $L_E$ ). A ce stade, les interactions entre les chaînes restent encore assez faibles. Si la compression se poursuit, les molécules se regroupent et des interactions beaucoup plus importantes s'établissent entre les chaînes hydrocarbonées, qui s'étirent pour adopter une configuration *trans* : le film est en phase « liquide condensé » ( $L_C$ ). Dans certains cas, un plateau sur l'isotherme témoigne de cette transition de phase  $L_E/L_C$ . Si on continue à comprimer la monocouche, elle subit une nouvelle transition de phase et passe en phase solide dans laquelle les interactions entre les chaînes hydrocarbonées sont maximales. L'aire moléculaire moyenne correspond alors à la section droite du lipide. Enfin si on comprime la monocouche au-delà de cette phase solide, la surface entre les deux barrières devient trop faible pour accueillir toutes les molécules : la monocouche se casse et des empilements se forment localement de manière irréversible. C'est le *collapse*.

L'isotherme de compression d'une monocouche lipidique permet donc d'obtenir des informations sur l'organisation du lipide. Cependant cette information n'est que partielle et ces mesures sont couplées généralement à d'autres études complémentaires. L'avantage de ces monocouches de Langmuir réside par contre dans le fait qu'on peut aisément contrôler la densité et donc la cohésion des molécules. De plus, il est possible d'injecter aisément dans la sousphase une molécule qu'on souhaite faire interagir avec les lipides.

## 5.4.2. Les films lipidiques supportés

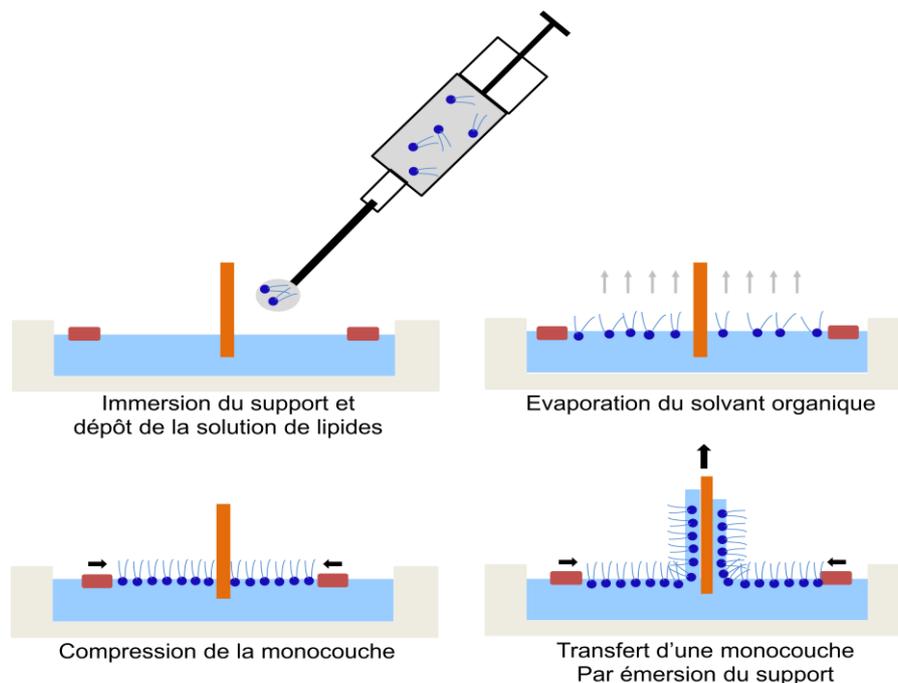
L'intérêt pour les films lipidiques supportés s'est nettement développé ces dernières années, du fait de leurs applications biotechnologiques et du développement de nombreuses méthodes adaptées à l'étude de ces systèmes, telles que les microscopies optiques et à sonde locale ou l'ellipsométrie. Différentes techniques de préparation sont décrites dans la littérature : le transfert d'une ou de deux monocouches sur un substrat plan et l'éclatement de vésicules, ou une combinaison de ces techniques.

### 5.4.2.1. Formation de monocouches lipidiques supportées de type Langmuir-Blodgett (LB)

Les films LB lipidiques sont réalisés par transfert d'une monocouche à l'interface air/eau sur un support plan. Si le support est hydrophile (verre, mica, quartz...), il est orienté perpendiculairement à l'interface et immergé dans la sousphase avant étalement des

molécules (Figure 15). Après étalement et évaporation du solvant organique, les molécules sont comprimées jusqu'à une pression  $\Pi$  donnée (relativement élevée pour que la cohésion des molécules soit suffisante).

Cette pression est ensuite maintenue constante grâce à un système d'asservissement (les barrières se déplaçant pour contrôler la pression) puis le support est retiré lentement, emportant avec lui une partie de la monocouche (les têtes polaires étant au contact du support) ainsi qu'une fine couche d'eau de l'ordre de quelques angströms d'épaisseur (couche d'hydratation des têtes polaires), sur chacune de ses faces. Au cours du transfert, la surface entre les deux barrières diminue donc pour compenser la perte de molécules à l'interface, assurant ainsi une cohésion constante des molécules du début à la fin du transfert. La qualité de ce dernier peut être contrôlée en déterminant le taux de transfert, rapport entre la variation de surface entre les barrières et la surface géométrique du support sur laquelle la monocouche a été prélevée. Un taux proche de 1 est révélateur d'un transfert de bonne qualité.



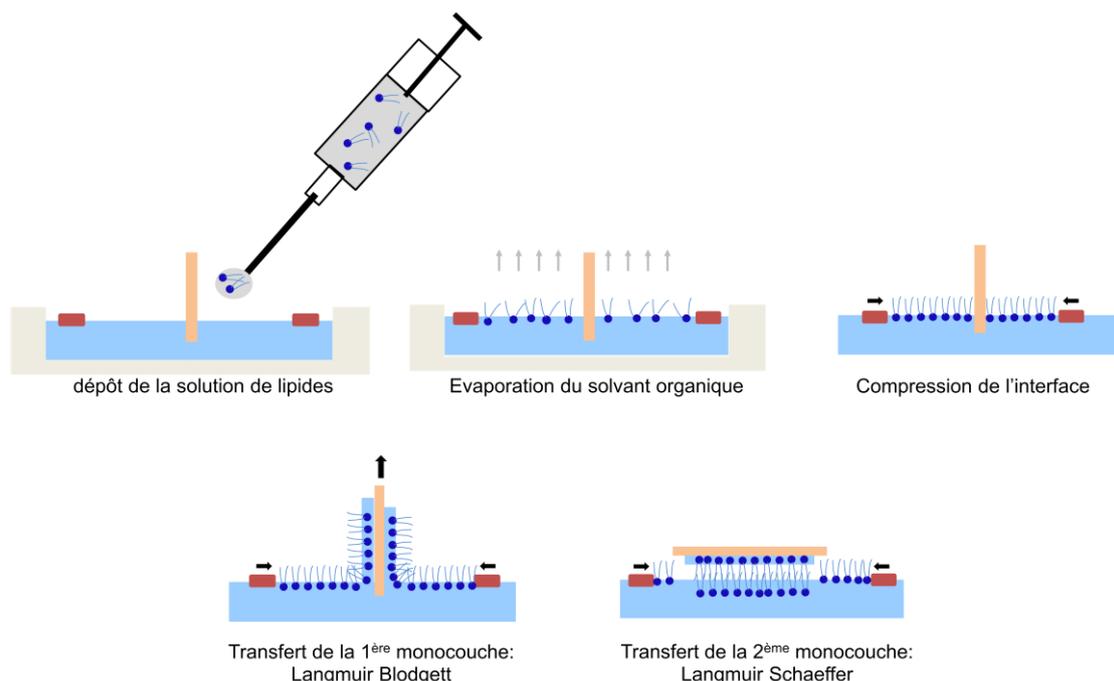
*Figure 15. Transfert d'une monocouche lipidique de Langmuir sur un support solide : film LB.*

#### 5.4.2.2. Formation de bicouches lipidiques supportées

Les bicouches supportées restent l'un des modèles membranaires 2D les plus utilisés avec les liposomes (3D) car elles permettent une reconstruction entière de la bicouche lipidique. Les bicouches lipidiques supportées sont couramment préparées suivant deux méthodes : la

méthode Langmuir-Blodgett/Schaeffer (LS) et l'éclatement de vésicules. Ces deux méthodes de préparation sont largement documentées dans la littérature [48, 49].

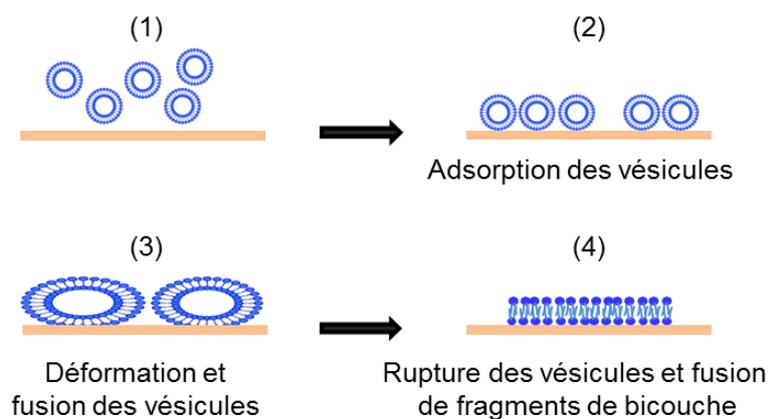
Logiquement, d'après ce qui précède, à chaque émergence et/ou immersion du support une monocouche se dépose. Malheureusement, dans le cas des lipides, l'immersion verticale du support recouvert de la monocouche ne conduit pas au transfert d'une seconde monocouche mais au ré-étalement de la monocouche déjà transférée. Ce ré-étalement est dû au fait que les lipides ont une affinité plus forte pour la sousphase que pour le support. Il est cependant possible de transférer une seconde monocouche sur la première. La méthode consiste à orienter le support parallèlement à l'interface et à l'appliquer délicatement dessus, la pression de surface étant toujours maintenue constante. On force ainsi la seconde monocouche à se déposer sur la première (bicouche de type LS). La bicouche ainsi formée est stable si elle reste au contact de l'eau (Figure 16). Cette méthode de transfert LS présente plusieurs avantages : elle permet de moduler la pression de surface à laquelle les monocouches sont prélevées, mais aussi de réaliser des bicouches asymétriques, la composition des deux monocouches pouvant être différente.



**Figure 16.** Transfert d'une bicouche lipidique de type LS sur un support solide.

La méthode la plus simple et la plus rapide pour former des bicouches lipidiques supportées est cependant l'éclatement de vésicules sur un support hydrophile. Expérimentalement elle implique différentes étapes [50]. L'incubation du support solide (dans notre cas une lame de

mica fraîchement clivé) avec la solution de vésicules permet à celles-ci de venir s'adsorber sur la surface. Une fois adsorbées sur la surface, les vésicules subissent des déformations qui sont liées aux interactions vésicules-vésicules mais aussi aux interactions vésicules-support. Ces interactions sont liées à la nature des vésicules lipidiques (composition, charge, taille et état physique) et à la nature du support (charge, structure, rugosité) aussi bien qu'aux caractéristiques de l'environnement aqueux (pH, force ionique...) [49,51-53]. L'adsorption des vésicules est également directement liée à leur concentration : dès que la concentration critique de vésicules sur la surface est atteinte (et si on se place dans les conditions de température adéquate telles que  $T > T_m$ ), les vésicules finissent par se rompre sur la surface formant ainsi une bicouche (Figure 17).



**Figure 17.** Formation d'une bicouche lipidique supportée par éclatement de vésicules.

Il est possible, en utilisant des techniques de caractérisation de surface telle que la microbalance à quartz avec dissipation (QCM-D), de suivre en temps réel la formation de la bicouche supportée mais également d'accéder à des informations aussi bien qualitatives (propriétés viscoélastiques) que quantitatives (masse déposée). Cette méthode est détaillée dans le chapitre 3.

## 6. L'interaction membrane-nanoparticules

### 6.2. Contexte

L'étude des mécanismes par lesquels les NPs interagissent avec les membranes cellulaires intéresse de plus en plus les scientifiques. En effet l'un des grands défis du XXI<sup>ème</sup> siècle est

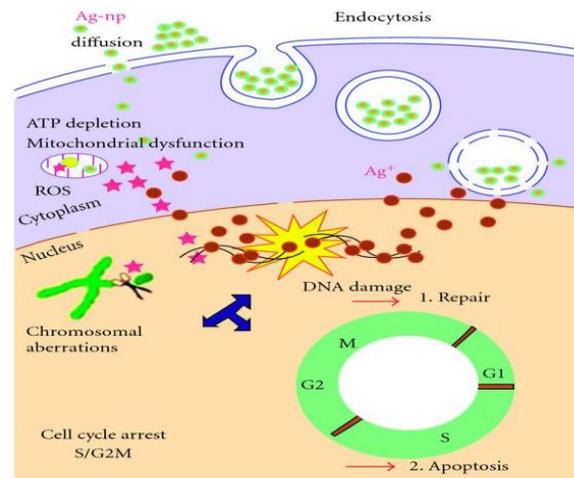
l'application des nanotechnologies dans divers secteurs d'activité allant de la nanomédecine à l'industrie automobile ou l'industrie alimentaire. Dans le domaine médical par exemple, l'engouement pour les nanomatériaux est de plus en plus important, notamment pour la vectorisation de molécules thérapeutiques et le ciblage de tumeurs pour le diagnostic et/ou le traitement de la maladie. Depuis quelques années, la cytotoxicité liée aux NPs fait aussi l'objet de nombreuses études qui montrent que les schémas habituels de toxicité observés à l'échelle macroscopique ne sont pas applicables.

En effet, certaines NPs du fait de leur petite taille mais aussi de leurs propriétés de surface (définissant leur potentiel réactif) font que les systèmes de défense de la cellule, entre autres la membrane, ne sont pas toujours suffisants pour éviter leur absorption au niveau cellulaire. De plus, une fois dans l'organisme (après ingestion ou inhalation par exemple), les NPs peuvent subir des modifications en interagissant avec les biomolécules extracellulaires solubilisées dans les liquides corporels, favorisant éventuellement leurs interactions avec les cellules. De nombreuses études ont donc été menées ces dernières années afin d'élucider les mécanismes d'interaction des NPs avec la membrane cellulaire et les paramètres importants qui interviennent dans leur internalisation.

**6.3. Les deux mécanismes de passage des NPs à travers les membranes** Pour le moment les scientifiques ont formulé deux hypothèses d'interaction-internalisation, décrits dans la Figure 14.

Dans la première, les NPs adhèrent à la membrane puis diffusent passivement à travers elle. Ce mécanisme d'adhésion-diffusion entraîne souvent la formation de trous ou de défauts locaux et éventuellement temporaires dans la membrane plasmique, mais ceci n'est pas systématique [54].

Dans la seconde, les NPs utilisent le processus d'endocytose. Ce mécanisme actif de transport à travers la membrane est emprunté par différentes catégories de molécules mais aussi certains virus. Dans le mécanisme d'endocytose, la membrane s'invagine pour envelopper les NPs facilitant ainsi leur pénétration dans la cellule (Figure 18).



**Figure 18.** Illustration des voies de pénétration de NPs d'argent dans la cellule et de leurs effets cytotoxiques [55].

Suivant la nature des NPs (taille, forme...) et suite aux modifications éventuellement subies en amont de l'interaction avec la membrane plasmique, l'un ou l'autre processus de pénétration peut être privilégié. En effet il peut arriver que les NPs soient recouvertes de protéines capables de se fixer sur des récepteurs membranaires spécifiques. Ces derniers activent alors toute une machinerie intracellulaire favorisant l'endocytose des NPs associées aux protéines. De plus, plusieurs voies d'endocytose ont été décrites, mettant en jeu différentes protéines et compliquant encore les études (Figure 19) : endocytose médiée ou pas par la clathrine<sup>2</sup>, macropinocytose<sup>3</sup> ou phagocytose<sup>4</sup>. Ces différentes voies d'endocytose ont cependant en commun de consommer de l'énergie (mécanismes « actifs ») [56-58]. Elles ne peuvent donc pas être explorées à l'aide des systèmes membranaires simplifiés étudiés dans cette thèse, ces derniers étant dépourvus de la machinerie cellulaire nécessaire (protéines impliquées, source d'énergie...).

Après pénétration des NPs dans les cellules, les effets sont multiples : interactions avec les molécules biologiques, solubilisation des NPs en ions interagissant alors avec le métabolisme...

<sup>2</sup> Protéine capable d'adopter une structure polyédrale permettant l'invagination de la membrane.

<sup>3</sup> Processus par lequel les fluides extracellulaires et leurs composants sont internalisés via des vésicules issues de la membrane.

<sup>4</sup> Capture et internalisation de particules solides au contraire de la pinocytose.

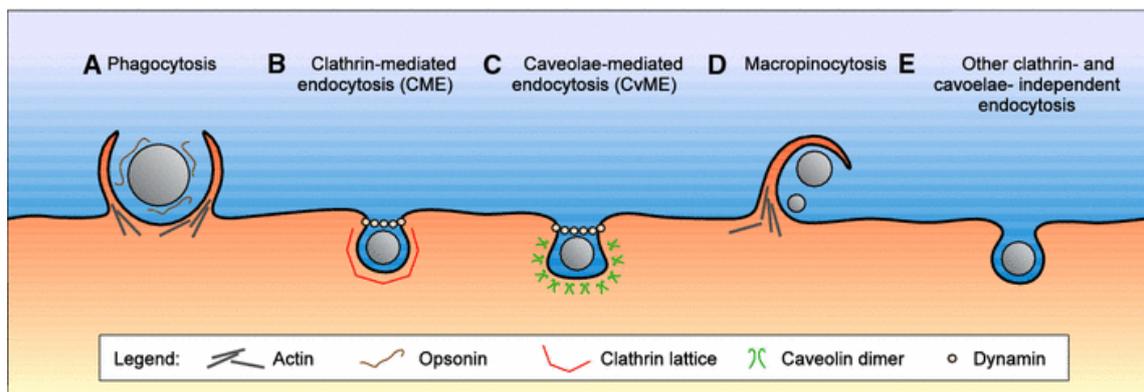


Figure 19. Différentes voies d'endocytose des NPs dans la cellule [58].

#### 6.4. Quelques résultats tirés d'études antérieures

L'analyse de la bibliographie montre que l'interaction NPs-membrane dépend d'un ensemble complexe de paramètres, parmi lesquels :

- les caractéristiques des NPs : composition (NPs métalliques, organiques, polymériques...), forme, dimension, charge, état de surface... ;

- leur concentration ;

- les types cellulaires dans le cas d'études *in vivo* : cellules saines ou tumorales, bactéries *gram+* ou *gram-* ...<sup>5</sup> ;

- les propriétés physico-chimiques des lipides et le type de modèle membranaire dans le cas d'étude utilisant des modèles.

Dans ces conditions, il est donc difficile d'avoir une vue d'ensemble cohérente de ces études, en particulier dans le cas des études *in vivo* : suivant le type cellulaire, la composition lipidique et protéique de la membrane varie sur l'ensemble de la membrane mais aussi localement (formation de *rafts* potentiellement impliqués dans les phénomènes d'endocytose).

Par exemple, concernant la charge des NPs, une étude récente a montré que le mécanisme d'endocytose est plus rapide et plus important dans le cas de NPs cationiques que dans celui des NPs anioniques et neutres [59]. Une autre étude a montré que l'internalisation de particules de silice mésoporeuses chargées positivement était plus efficace que celle des

<sup>5</sup> Toutes les bactéries comportent une membrane plasmique. Mais dans le cas des bactéries dites *gram-*, cette membrane est doublée par une paroi, constituée d'une bicouche lipidique (membrane externe) tapissée sur sa face exposée de lipopolysaccharides (LPS) de composition connue, et d'une couche de peptidoglycanes. Les bactéries *gram+* sont, elles, dépourvues de membrane externe.

particules négatives à cause des interactions favorables entre les particules positives et la membrane plasmique chargée négativement [60]. Concernant les dimensions des NPs, il a été montré que des NPs d'or ou d'argent recouvertes d'anticorps de diamètre compris entre 40 nm et 50 nm pénètrent plus rapidement que celles de tailles plus petites ou plus grandes dans des cellules cancéreuses [61]. D'autres études ont également concerné des NPs d'or en interaction avec des macrophages [49], des nanotubes de carbone en interaction avec des fibroblastes [62] ou des NPs d'or avec des lignées saines épithéliales et malignes de cancer ovarien [63].

Dans le cas des études expérimentales *ex vivo*, les systèmes expérimentaux développés pour étudier l'interaction de NPs avec des modèles membranaires peuvent globalement être classés selon les catégories décrites ci-dessous :

- Les monocouches et bicouches lipidiques formées à la surface de NPs ;
- Les liposomes mis en contact avec une suspension de NPs (modèles 3D) ;
- Les monocouches et bicouches planes déposées sur des supports préalablement nanostructurés par différentes techniques (dépôt de NPs, photolithographie...) ou mises en contact avec une suspension de NPs ;
- Les monocouches de Langmuir étalées sur une suspension de NPs.

Le but de ces études est de répondre à différentes questions concernant par exemple les conditions requises pour que les NPs soient adsorbées à la surface de la membrane ou la traversent, ou l'impact des NPs sur l'organisation lipidique (arrangement des têtes polaires et des chaînes, mobilité, ségrégation de phase...). Nous allons ci-dessous présenter quelques exemples.

#### **6.4.1. Monocouches et bicouches lipidiques formées à la surface de NPs**

La réalisation de tels systèmes présente un intérêt certain pour l'étude des interactions NPs-membrane, mais également pratique (réalisation de systèmes adaptés à un type d'expérience, amélioration de la biocompatibilité d'une NP, reproduction de la courbure locale d'une membrane...). Ainsi, Linseisen et coll. ont développé une méthode expérimentale permettant d'étudier des monocouches de DPPC par  $^2\text{H}$ -RMN, en déposant ces monocouches sur des NPs de silice rendues hydrophobes par le dépôt d'une couche de silane (SSM pour *Solid Supported Monolayer*), et comparé leur comportement à celui de bicouches déposées sur les mêmes NPs (SSV pour *Solid Supported Vesicles*) et de MLV [64]. L'étude par DSC

(Differential Scanning Calorimetry) montre que la transition de phase du DPPC est conservée dans les SSM, mais à une température supérieure à celles des systèmes en bicouches. Dans le cas des SSV, la transition de phase se déroule au contraire à une température plus faible. De plus, les spectres RMN montrent que toutes les molécules de DPPC subissent un arrangement orientationnel identique dans les SSM, contrairement au cas des SSV. Ces différences ont été attribuées au fait que les SSV doivent s'adapter à la surface de la NP qu'elles recouvrent (la bicouche subissant donc des contraintes), alors que la transition de phase LE-LC s'accompagne dans le cas des liposomes d'une variation d'aire moléculaire moyenne de l'ordre de 10-15%. Ces contraintes conduisent à l'exposition d'une partie de la surface de la NP au solvant aqueux avec la formation de pores, ces derniers étant par contre très défavorables d'un point de vue énergétique dans le cas des NPs préalablement silanisés.

Dans le même ordre d'idée, Ahmed et coll. ont étudié des bicouches supportées sur des NPs de silice en faisant varier la longueur des chaînes lipidiques (DMPC, DPPC, DSPC) ainsi que le diamètre des NPs de 5 à 100 nm [65]. L'étude de ces systèmes par des méthodes complémentaires (DSC, spectroscopies Raman et IR) suggère que le dépôt des bicouches sur les petites NPs favorise l'espacement entre les têtes polaires du feuillet externe et augmente le volume disponible entre les molécules, induisant l'interdigitation des chaînes entre les deux feuillets. Les bicouches déposées sur des surfaces au fort rayon de courbure se comportent donc différemment de bicouches déposées sur des substrats plans afin de maximiser les interactions hydrophobes.

Comme nous l'avons vu, l'« enrobage » d'une NP par une bicouche lipidique (par incubation de NPs en présence de vésicules) présente également l'avantage de rendre sa surface biocompatible. La microscopie électronique en cryotransmission permet ainsi de mettre en évidence la formation de bicouches lipidiques autour de NPs de silice s'adaptant à la rugosité locale des NPs et la présence d'une couche d'eau séparant la surface des NPs du feuillet interne des bicouches de l'ordre de 1 nm d'épaisseur [66]. Des images réalisées à différents temps d'incubation montrent que la cinétique de rupture des vésicules sur les NPs est rapide, de l'ordre de quelques minutes, donc dans la même gamme de temps que ceux observés dans le cas de substrats plans de silice. Par ailleurs le processus semble se dérouler selon les mêmes étapes : l'adsorption d'une première vésicule sur la NP de silice, la surface de contact augmentant du fait des forces d'adhésion, puis sa rupture et le recouvrement incomplet de la NP. Le recouvrement complet procède par l'adsorption, la rupture et la déformation d'autres vésicules. Ce processus est également dépendant des interactions électrostatiques, favorisé

dans le cas de mélanges lipidiques cationiques ou faiblement anioniques, mais très incomplet dans le cas de mélanges riches en lipides anioniques.

Enfin, le rayon de la NP joue un rôle essentiellement comme le montrent les travaux de Savarala et coll., où l'association de NPs de silice de 4-6 nm est suspectée à l'extérieur des liposomes, interdisant donc « l'enrobage » [67].

#### 6.4.2. Liposomes mis en contact avec une suspension de NPs (modèles 3D)

Les liposomes se prêtent particulièrement bien aux études sur les interactions NPs-membrane, car ce sont des systèmes faciles à réaliser et à mettre en contact avec une suspension de NPs, et exploitables dans le cadre de nombreuses techniques. Les méthodes de fluorescence ont par exemple fait leur preuve, comme le montrent les travaux de Wang et coll. [68]. Ces derniers ont étudié le comportement de vésicules de DOPC, DPPC et DLPC<sup>6</sup> en présence de NPs de polystyrène de 20 nm de diamètre, fonctionnalisées à leur surface par des groupes carboxyl (NPs négatives) ou amidine (NPs positives). L'adsorption des NPs négatives sur les vésicules lipidiques provoque des fuites, tandis que le déplacement du spectre d'émission du Laurdan (marqueur fluorescent de l'état de phase dans un système lipidique) montre une transition progressive du système lipidique de la phase fluide vers la phase gel. Des NPs de silice ont un effet similaire mais plus faible. Des mesures de FRET utilisant le couple de fluorophore NBD (marqueur de la phase gel) / Rhodamine B (marqueur de la phase fluide) et de calorimétrie confirment cette transition. Les mêmes mesures réalisées avec les NPs cationiques montrent que ces NPs se fixent en quantité plus faible aux liposomes et n'induisent pas de fluidification des lipides.

Cependant, des études comparatives menées par FRET sur des liposomes et des bicouches supportées ont montré que la nature du modèle membranaire est importante : des NPs anioniques de polystyrène de 24 nm de diamètre induisent effectivement une transition vers la phase lipidique ordonnée dans le cas de liposomes cationiques constitués de DOTAP<sup>7</sup>. Par contre, ces NPs n'ont aucun effet significatif sur des bicouches supportées de même composition (ou constituées de POPC), suggérant que la présence du substrat d'un côté de la bicouche influence les interactions de la bicouche sur l'autre face [69]. Enfin, l'ensemble du « contexte » doit être pris en compte, comme le montrent les travaux de Zhang et Yang portant sur le rôle du pH et des cations divalents comme le Ca<sup>2+</sup> dans l'interaction de NPs

---

<sup>6</sup> Dioléoyl-phosphatidylcholine (2 chaînes insaturées en C18), Dipalmitoyl-phosphatidylcholine (2 chaînes saturées en C16), Dilauroylphosphatidylcholine (2 chaînes saturées en C12).

<sup>7</sup> Lipide cationique utilisé pour les transfections, possédant deux chaînes insaturées.

diversement chargées avec des bicouches supportées de DOPC ou DOTAP [70]. Suite à l'étude de ces interactions par QCM-D et en tenant compte du point isoélectrique des lipides et du  $pK_a$  des groupes chimiques à la surface des NPs (-COOH ou -NH<sub>2</sub>), Zhang et Yang proposent le principe de « fenêtres d'adsorption », c'est-à-dire des gammes de valeurs de pH pour lesquelles l'adsorption des NPs sur les bicouches est favorisée ou au contraire inhibée.

Dif et coll. ont, eux, étudié l'interaction de NPs de type QDs d'un diamètre de l'ordre de 10 nm, fonctionnalisés par de petits peptides et chargés négativement, avec des vésicules lipidiques de charge opposée ou neutres [71]. Des images de microscopie de fluorescence (utilisant les propriétés d'émission des QDs) et de microscopie optique en champ sombre montrent l'adsorption sélective des NPs sur les vésicules de charge opposée ainsi que l'effet rigidifiant et la diminution de l'excès de surface de la membrane, comme le montre la disparition des ondulations de Helfrich<sup>8</sup>. La titration par mesures du potentiel zéta et par fluorescence confirme l'interaction et permet d'estimer que les NPs forment un réseau dense à la surface des vésicules.

Dans les deux études citées précédemment, les NPs restent adsorbées à la surface des vésicules lipidiques. Cependant, les NPs sont également capables de migrer à travers une membrane en l'absence de machinerie cellulaire, comme le montre l'étude de Le Bihan et coll. sur des NPs de silice en interaction avec des LUV de DOPC [72]. Des techniques de microscopie cryoélectronique et de tomographie 3D ont été appliquées, permettant de déterminer la structure 3D de ces assemblages et de lever toute ambiguïté sur la localisation des NPs (simplement adsorbées à la surface de la vésicule ou réellement internalisées). Différentes étapes de l'interaction ont ainsi été mises en évidence, l'internalisation impliquant l'invagination de la membrane, avec en fin de processus la formation d'un « col » membranaire à forte courbure permettant la fission de la vésicule : la NP est alors internalisée enveloppée dans un fragment du liposome. Des structures plus « exotiques » sont observées dans le cas de liposomes formées de deux bicouches concentriques, la NP restant piégée après son internalisation entre les deux bicouches. Cependant, toutes les NPs ne subissent pas l'internalisation, leur dimension étant un critère important : les NPs « trop » petites (diamètre de l'ordre de 15-20 nm) restent adsorbées à la surface des vésicules, probablement du fait d'une adhésion trop faible, incapable de contrebalancer le coût énergétique associé à la courbure de la membrane. Dans ce domaine, les études théoriques apportent des informations précieuses, comme nous le verrons plus loin.

---

<sup>8</sup> Fluctuations thermiques d'une membrane intervenant dans son module de compressibilité.

### 6.4.3. Monocouches et bicouches planes déposées sur des supports préalablement nanostructurés ou mises en contact avec une suspension de NPs

La stratégie est ici de mimer l'interaction NP-membrane en déposant des monocouches ou bicouches lipidiques sur des surfaces ondulées [73-75], ou sur lesquelles ont été déposées préalablement des NPs [76]. Il est également possible de déposer la bicouche lipidique puis de la mettre en contact avec une suspension de NPs comme dans le cas des études sur liposomes [69,70,77,78]. Comme dans le cas des autres systèmes expérimentaux, la nature des NPs est extrêmement variable, compliquant la comparaison des résultats entre eux. Par contre, quel que soit le système employé, l'AFM fait partie des méthodes de prédilection pour étudier ces systèmes.

Ainsi, dans l'étude de Leroueil et coll., l'AFM permet de classer les NPs en trois catégories : celles qui s'agrègent en bordure d'un défaut préexistant dans la bicouche (NPs de type dendrimère<sup>9</sup> cationique faiblement chargé), celles qui amplifient la dimension d'un défaut préexistant (NPs de type dendrimère cationique fortement chargé, NPs d' Au-NH<sub>2</sub>) et celles qui induisent elles-mêmes la présence de défaut dans la bicouche (NPs de silice-NH<sub>2</sub>) [78]. Il ne semble donc pas qu'il y ait de lien direct entre la rigidité de la NP et son comportement. Par contre, dans le cas de bicouches de DMPC présentant une coexistence de phases LC et LE, seule la phase LE est rompue [77]. Les travaux de cette équipe sur diverses NPs de type polymérique montrent par ailleurs un parallèle entre le degré de rupture de la bicouche *in vitro* et les mesures de cytotoxicité, de fuite et d'internalisation *in vivo*. La notion de pore ou de trou formé dans la bicouche par une NP mérite par ailleurs d'être précisée, puisqu'il peut s'agir d'une perte locale de matériel au sens strict du terme (trous observés par exemple par AFM dans des bicouches supportées) ou d'une diminution locale et plus ou moins sélective de la densité en molécules, les deux types de structures pouvant expliquer une augmentation de perméabilité [77].

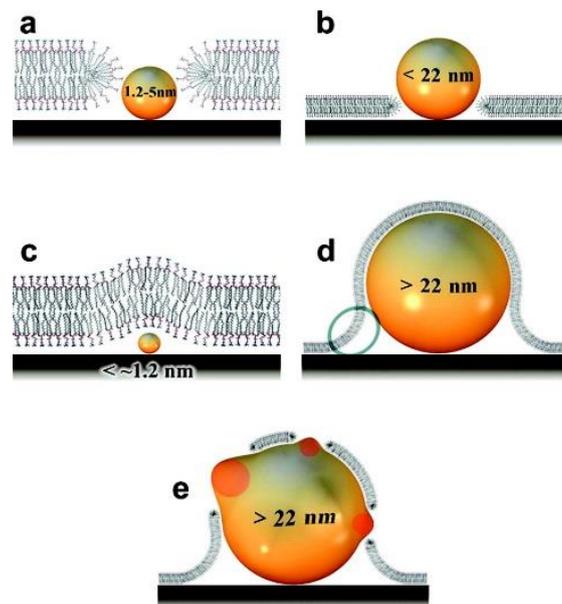
L'AFM est également un outil très performant pour étudier l'organisation d'une bicouche lipidique au contact des NPs. Roiter et coll. ont par exemple étudié l'organisation de bicouches de DMPC<sup>10</sup> en phase fluide déposées sur des substrats préalablement nanostructurés par le dépôt de NPs de silice d'un diamètre compris entre 1 et 140 nm et abouti

---

<sup>9</sup> Molécule dont la forme reprend celle des branches d'un arbre, formée par l'association de monomères. Ses propriétés dépendent de la nature des groupes chimiques présents en surface.

<sup>10</sup> Dimiristoyl-phosphatidylcholine (deux chaînes saturées en C14).

à un diagramme de phase décrivant l'état de la bicouche (formation de trous autour des NP ou recouvrement des NPs) en fonction de ce diamètre [76]. Ils ont par ailleurs confirmé ces résultats par microscopie confocale en faisant incuber les systèmes « bicouches + NPs » avec une solution d'insuline marquée par un fluorophore (FITC), l'insuline s'adsorbant exclusivement sur les surfaces de silice (donc sur des NPs « nues », c'est-à-dire non recouvertes par une bicouche). L'adsorption de l'insuline est par ailleurs facilement mise en évidence par AFM, puisqu'elle provoque une augmentation de la hauteur de l'ordre de 2 nm au dessus de la phase lipidique. Les principaux résultats obtenus montrent que le diamètre des NPs est un paramètre essentiel (Figure 20).



**Figure 20.** Comportement d'une bicouche de DMPC en présence de NPs de diamètre variable d'après [76].

Dans le cas des NPs de diamètre inférieur à 1,2 nm, la bicouche lipidique suit la topographie de la surface et aucun changement n'est observé après incubation en présence d'insuline, signes que la bicouche recouvre les NPs. Dans le cas des NPs de 1,2 à 5 nm de diamètre, la bicouche forme un pore autour de la NP sans la recouvrir (la membrane étant organisée de telle sorte qu'elle expose les têtes polaires autour de la NP pour diminuer le coût énergétique). Si les NPs ont une dimension comprise entre 5 et 22 nm, la membrane forme également des pores autour d'elles, mais contrairement au cas précédent, les NPs sont exposées au solvant car leur dimension excède l'épaisseur de la bicouche. Enfin, dans le cas de NPs de diamètre supérieur à 22 nm, la membrane suit à nouveau la topographie de la surface et recouvre les NPs. L'AFM ne permet cependant pas de vérifier si le recouvrement concerne uniquement la

partie supérieure des NPs. Un modèle théorique développé dans cette étude suggère que la membrane conserve son intégrité et que les NPs ne sont pas exposées au solvant au niveau du raccordement de la bicouche au substrat plan [76].

Les systèmes plans, bien que très utiles, présentent cependant une limite liée à la présence du substrat pouvant influencer le comportement du système lipidique déposé dessus. Les bicouches supportées et les liposomes se distinguent ainsi par leur rayon de courbure et la capacité des lipides à se réorienter, *a priori* limitée dans le cas des bicouches supportées [57]. Cependant, comme nous le verrons, notre étude par AFM des monocouches lipidiques oxydées suggère que les lipides sont capables de se réarranger dans ce genre de systèmes. De même, l'épaisseur de la couche d'eau coincée entre la bicouche et le support est, à cet égard, parfois insuffisante pour découpler la bicouche du support. Cette constatation a conduit à la mise au point de « coussins polymériques » préalablement déposés sur la surface puis recouverts par la bicouche lipidique [79, 80], mais les progrès récents en matière de modifications chimiques et topologiques de surface ont ouvert d'autres voies. Il est dorénavant possible de modifier localement l'interaction membrane-surface en faisant varier les propriétés (rugosité, charge, énergie d'adhésion, mouillabilité) du substrat à l'échelle du  $\mu\text{m}$  au  $\text{nm}$  [81]. Dans le cas des études portant sur l'interaction NP-membrane, ces paramètres sont particulièrement pertinents puisque la réponse élastique de la membrane est déterminée par la balance entre les énergies d'adhésion et de courbure et la tension de la membrane, en lien direct avec la courbure locale. Ces surfaces s'avèrent également très intéressantes pour étudier la relation entre la courbure locale de la membrane (imposée par le substrat ou par certains lipides et protéines *in vivo*) et les séparations de phase conduisant à la formation de domaines membranaires à la composition spécifique. Cette stratégie a été mise en œuvre par Parthasarathy et coll. qui ont utilisé des surfaces de quartz sur lesquelles des régions de faible et forte courbures ont été créées par des processus de photolithographie [73], la surface du substrat ressemblant à de la « tôle ondulée ». Des systèmes de doubles bicouches (chaque bicouche étant marquée à l'aide d'un fluorophore différent) ont ensuite été déposés sur ces surfaces, la première bicouche isolant la seconde du support. La microscopie de fluorescence appliquée à ces systèmes a révélé que la déformation de la membrane impose une différence de répartition des lipides en phase *liquid ordered* (LO enrichie en lipides saturés et cholestérol) ou Ld (phase fluide enrichie en lipides insaturés) : les lipides en phase LO sont préférentiellement localisés au niveau des zones de faible courbure (ou fort rayon), formant des domaines allongés suivant le sens de la « tôle ondulée » et à la même périodicité. L'analyse des résultats a montré qu'une courbure critique minimale de l'ordre de  $0,8 \mu\text{m}^{-1}$  est

nécessaire pour induire la séparation de phase, correspondant à un rayon local d'environ 1,25  $\mu\text{m}$ .

#### 6.4.4. Interactions de NPs avec des monocouches lipidiques à l'interface air-eau

Plusieurs études ont été menées ces dernières années sur l'interaction de NPs avec des monocouches lipidiques étalées à l'interface air-eau, dans le but de mieux comprendre l'effet de ces nano-objets sur des systèmes mimant le surfactant pulmonaire. Ce dernier est un mélange complexe de lipides (dont le DPPC) et de protéines, organisé en une monocouche tapissant la surface des alvéoles pulmonaires. Il facilite la respiration en empêchant le collapse des alvéoles à la fin de l'expiration, et constitue la première ligne de défense contre les particules et microbes inhalés [82]. L'équipe de Guzman a par exemple étudié le comportement de monocouches de lipides purs (DPPC, DOPC, PA) ou de mélanges (DPPC/DOPC et DPPC/PA) étalées sur une suspension de NPs de silice de diamètre 30 nm [83-85]. La présence des NPs induit, dans le cas du DPPC et du DOPC, le décalage des isothermes de compression vers les aires moléculaires plus élevées. Ce décalage est attribué à la formation de complexes lipides-NPs (donc partiellement hydrophobes) par le biais d'interactions électrostatiques, qui s'incorporent à l'interface. L'étude en microscopie à l'angle de Brewster ou BAM<sup>11</sup> des monocouches à l'interface air-eau montre également une réorganisation des monocouches de DPPC, la présence des NPs provoquant une résistance à la compression et donc un retard dans la transition de la phase LE vers la phase LC [83].

Les attractions d'origine électrostatique ne sont pas les seules à favoriser l'interaction des NPs avec les monocouches. Les liaisons hydrogène peuvent également être impliquées, comme dans le cas de monocouches de cholestérol déposées sur une suspension de NPs de silice [86]. Bien que le BAM soit utile pour définir la nature des phases lipidiques présentes, il n'a pas la résolution nécessaire pour mettre en évidence les NPs en elles-mêmes. Guzman et coll. ont ainsi procédé au transfert des monocouches de DPPC+NPs pour une étude de ces films LB par AFM [84]. Les images AFM ont montré une répartition hétérogène des NPs et la formation de domaines en phase LC plus irréguliers en présence de ces NPs. Ces dernières affaiblissent sans doute la cohésion des lipides, induisant une organisation plus lâche. L'AFM permet également de vérifier la présence de complexes NPs-cholestérol dans le cas de films LB prélevés à partir de monocouches de cholestérol étalées sur une suspension de NPs, avec

---

<sup>11</sup> Microscopie basée sur les propriétés de réflexion de la lumière polarisée et sur les variations d'indice de réfraction de l'interface.

la présence de deux hauteurs distinctes dans les profils de hauteur, attribuées soit au film lipidique, soit aux NPs [86].

Les études à l'interface air-eau ne sont pas limitées au cas des NPs hydrophiles, comme celles de silice. Guzman et coll. ont par exemple étudié l'interaction de NPs de carbone avec des monocouches de DPPC [83]. Par contre leur nature hydrophobe nécessite que les NPs soient déposées à l'interface air-eau, suite au dépôt du lipide. Dans ce cas, la présence des NPs ne modifie pas la transition de phase du DPPC, celui-ci s'organisant autour des NPs. Wang et coll. ont eux choisi d'étaler des solutions mixtes de DPPC et de NPs dans des rapports molaires variables, dans le cas de NPs de type métalofullerènes<sup>12</sup> [87]. L'étude des monocouches par pression de surface et BAM et celles des films LB par AFM révèlent un comportement complexe de ces systèmes mixtes : l'attraction forte entre les dipôles des métalofullerènes conduit à la formation à l'interface d'agrégats 3D, qualifiés de « tours » et partageant la surface disponible avec le DPPC en phase LE. Au cours de la compression, ces tours s'effondrent progressivement sur les molécules de lipides transitant en phase LC.

La même technique de co-étalement des lipides et des NPs a été utilisée dans le cas de monocouches de DPPC, DPPG<sup>13</sup> et de mélanges DPPC/DPPG en interaction avec des NPs hydrophobes de polyorganosiloxane [82]. Dans l'ensemble, la présence des NPs entraîne une expansion des monocouches, concentration-dépendante. Ces monocouches, marquées au Bodipy-PC puis imagées par microscopie de fluorescence directement à l'interface, sont caractérisées par un retard dans la transition LE-LC (comme dans le cas précédemment évoqué des NPs de silice) et une diminution de la taille des domaines en phase LC. De plus, des agrégats de NPs sont visibles en bordures de ces domaines, affectant donc les forces de tension de ligne et électrostatiques à l'origine de la transition. Les résultats suggèrent ici aussi la formation de complexes NPs-lipides, où les lipides recouvreraient au moins partiellement les NPs sous la forme d'une monocouche, les chaînes lipidiques étant au contact des NPs.

#### 6.4.5. Apport des études théoriques

Les méthodes expérimentales ne sont pas les seules à avoir été appliquées à l'étude des systèmes membrane-NPs. De nombreux travaux théoriques portent ainsi sur le comportement de NPs à proximité ou dans une membrane, et peuvent d'ailleurs être étendus à d'autres cas

---

<sup>12</sup> Cage de carbone emprisonnant un atome de type lanthanide.

<sup>13</sup> Dipalmitoylphosphatidylglycérol (2 chaînes saturées en C16 et une tête polaire anionique).

comme l'enveloppement d'un virus ou la déformation de la membrane au cours d'un processus d'exocytose ou d'endocytose. Ces calculs théoriques peuvent également permettre de définir les conditions d'enveloppement/détachement pour le *design* ultérieur de vésicules lipidiques capables de réaliser ce genre de processus sans l'appui d'une machinerie cellulaire [88].

Comme pour les résultats purement expérimentaux, une comparaison simple des différents travaux déjà réalisés s'avère cependant compliquée à réaliser, du fait de la multiplicité des systèmes choisis. La modélisation de la membrane en elle-même varie par exemple d'une étude à une autre. Ces dernières années, des solutions de type *coarse-graining* sont par exemple apparues, pour tenter de répondre aux limites imposées par les simulations de mécanique quantique sur des systèmes biologiques (petite taille des systèmes et temps trop courts), en complément des simulations de dynamique moléculaire combinées aux avancées en informatique [89]. La méthode de *coarse-graining* consiste à remplacer une description atomistique de la membrane par un modèle où plusieurs atomes ou groupes moléculaires sont regroupés et moyennés en une particule. La perte d'information (précision, degré de liberté...) permet des études sur des temps et distances plus longs, donnant ainsi accès à des phénomènes de type transport transmembranaire par exemple [89]. Très peu d'études sont dédiées par contre à l'interaction de NPs avec des monocouches. On peut citer l'étude de Choe et coll. sur l'interaction de NPs carbonées avec des monocouches de DPPC comportant un fragment de la protéine SP-B présente dans le surfactant pulmonaire [90].

De nombreux calculs théoriques sont basés sur le calcul de l'énergie du système tenant compte de différentes contributions :

- Un paramètre particulièrement importante est l'énergie d'adhésion, proportionnelle à la surface de contact entre la particule et la membrane ;
- Une surface étant entre autres caractérisée par une résistance à la courbure, un terme d'énergie de courbure est nécessaire pour décrire le comportement de la membrane ;
- De même il est nécessaire de prendre en compte le coût énergétique de l'étirement de la membrane. L'enveloppement de la particule par la membrane impose son expansion, la tension s'y opposant. Si la vésicule présente par contre un excès de surface, l'enveloppement de la particule en est facilité [91].

Le bilan énergétique permet ainsi de définir les conditions nécessaires pour obtenir une NP

partiellement ou entièrement recouverte par la membrane, ou au contraire simplement adsorbée à sa surface, voire non liée, et donc d'aboutir à un diagramme de phase structural.

Il en découle que la dimension de la NP est un paramètre primordial puisqu'il intervient dans la balance entre les forces d'adhésion et celles nécessaires pour courber une bicouche lipidique. Deserno et Bickel ont ainsi déterminé, dans le cas d'une membrane sans tension, un rayon critique de la NP de l'ordre de 10-15 nm, un enveloppement total étant possible si la NP a un rayon supérieur au rayon critique [92]. Globalement, Livadaru et coll. notent qu'une NP est complètement enveloppée par une membrane sous tension si son rayon excède une valeur limite de l'ordre de 5 nm, le rayon limite étant proportionnel au module de courbure et inversement proportionnel à l'énergie de contact par unité de surface [93].

La nature de l'interaction NP-membrane est un autre paramètre à prendre en compte. Ainsi, l'interaction entre la particule et la membrane peut être de nature électrostatique, hydrophobe, ou nécessiter l'ajout d'un *linker*... Par exemple Fleck et coll. ont étudié le rôle de l'interaction électrostatique dans la fixation d'un colloïde chargé à une membrane de charge opposée, tout en tenant compte des répulsions potentielles entre des fragments de membrane se retrouvant alors à proximité l'un de l'autre [94]. Ils ont complété leur analyse en étudiant l'effet de concentrations croissantes en sel. Ainsi, à faible concentration en sel, ou dans le cas d'un petit colloïde, les interactions électrostatiques sont à peine écrantées, et l'enveloppement est limité du fait de la répulsion forte entre les segments membranaires proches de la particule. Dans le cas d'une forte concentration en sel, l'énergie mécanique de courbure devient supérieure à celle mise en jeu dans l'attraction, limitant alors l'enveloppement. Ce dernier est finalement favorisé dans le cas de particules de taille intermédiaire, à des concentrations modérées en sel. Ginzburg et Balijepalli ont, eux, comparé l'influence de NPs neutres et hydrophobes ou chargées (rayon de l'ordre de 1-4 nm) sur la structure de la membrane. La NP hydrophobe se loge au cœur de la membrane entre les deux feuilletts provoquant un épaissement de la membrane sans formation de trou, alors que la NP chargée entraîne un réarrangement des lipides autour d'elle avec la formation de trous et de structures hybrides NP-bicouche lipidique. Si la densité de charge des particules chargées augmente, le nombre de lipides recrutés augmente lui aussi [95]. Par contre, Li et coll. notent qu'une particule semi-hydrophile reste adsorbée à la surface de la membrane [96]. Les travaux de Qiao et coll. confirment, eux, l'importance de la balance hydrophile/hydrophobe de la particule. Leur étude a porté sur des NPs de type fullerène, C<sub>60</sub> hydrophobes et C<sub>60</sub>(OH)<sub>20</sub> hydrophiles en

interaction avec des bicouches de DPPC : les premières se localisent à l'intérieur de la bicouche, tandis que les secondes sont localisées à l'interface lipide/eau [97].

Höfninger et coll. ont, eux, étudié l'interaction de fullerènes  $C_{60}$  hydrophobes avec une membrane. Logiquement et comme précédemment, ce type de particule se loge dans le cœur hydrophobe de la membrane. Ils ont également étudié le comportement de nanotubes de carbone (CNTs), également hydrophobes, de différentes longueurs comprises entre 21 et 60 Å, pour un même diamètre de 8 Å. Tous ces nanotubes s'immergent également complètement dans la partie hydrophobe de la membrane mais leur orientation dépend de leur longueur. Cette étude met donc en évidence un autre paramètre, la valeur du rapport d'aspect, dans l'interaction de nano-objets de forme allongée avec les membranes [98].

Dans le même ordre d'idée, Chang et coll. ont étudié le comportement de NPs issues de la combustion avec une bicouche de DMPC. Les NPs sont constituées de carbone et hydrogène, mais de morphologies différentes, sphérique ou plate. Ces NPs étant dépourvues de charge électrostatique ou d'un dipôle, les interactions mises en jeu sont de type van der Waals, à courte portée. Si les deux types de NPs se logent globalement dans le cœur hydrophobe de la bicouche, la NP sphérique, plus lourde, diffuse moins vite que la plate. Enfin, la portion de membrane entourant la NP forme de manière instantanée un pore permettant l'insertion de molécules d'eau (effet combiné du déficit lipidique et des fluctuations thermiques). Si la NP est plate, la formation du pore en est facilitée, car la NP réside préférentiellement dans un feuillet de la membrane. Concernant les fluctuations thermiques, Livadaru et coll. notent qu'elles s'opposent à l'adhésion et à l'enveloppement en diminuant la surface de contact NP-membrane [93].

Dans le cadre d'applications telles que la vectorisation, il peut s'avérer très intéressant de définir les conditions de formation d'un pore. Ting et coll. ont ainsi étudié l'effet de NP de type dendrimères avec une bicouche lipidique, en faisant varier la taille de la NP, sa charge et l'état de tension de la membrane (la tension rendant compte de la pression osmotique). Cette dernière s'est avérée particulièrement importante pour stabiliser le pore et augmenter sa durée de vie [99].

Des structures autres que des pores peuvent également apparaître lors de l'interaction NP-membrane, en fonction du degré d'enfouissement de la NP. Dans certains cas, la majeure partie de la NP est recouverte d'une bicouche lipidique, le reste se couvrant de lipides organisés dans une phase proche de la phase hexagonale de type II [88]. *A priori*, cette topologie n'a jamais été mise en évidence expérimentalement. De même, des complexes NP-

lipides sont mis en évidence dans le cas de NP de carbone interagissant avec des monocouches de DPPC, les chaînes hydrophobes de deux lipides se logeant à l'intérieur de la cavité de la NP [90].

Enfin, comme dans les études expérimentales, la nature des lipides présents dans le modèle est importante. Smith et coll. soulignent en particulier le lien entre la présence de *rafts* (caractérisés par des dimensions finies et une tension de ligne à leurs frontières) et la dimension de la NP potentiellement recouverte [88]. La présence d'un *raft* peut favoriser l'encapsulation et la fission, si l'énergie d'adhésion est suffisante et si sa surface permet de couvrir la NP. De même, l'insertion d'une NP hydrophobe dans une membrane provoque non seulement sa déformation, mais peut aussi engendrer des phénomènes de ségrégation de phase, les lipides s'organisant en fonction de la longueur de leurs chaînes et des dimensions de la NP. L'organisation lipidique peut également être atteinte dans sa mobilité. Ainsi l'ajout de CNTs hydrophobes dans une membrane entraîne par exemple une restriction de la liberté de conformation et de diffusion des lipides [100]. De même, l'insertion de NPs issues de la combustion dans une bicouche de DMPC diminue le coefficient de diffusion du lipide d'un facteur 2 environ [98].

Afin d'améliorer la description de l'interaction NP-membrane et d'étudier le phénomène d'endocytose, on peut également étudier le comportement de NPs recouvertes d'un ligand se fixant spécifiquement à des récepteurs présents dans la membrane. Chaudhuri et coll. ont ainsi montré que les termes énergétiques dictant le comportement du système sont l'énergie libérée lors de la reconnaissance récepteur-ligand et celle mise en jeu pour courber la membrane [101].

## 7. Conclusions

Les interactions membrane-NPs sont donc complexes à appréhender, compte tenu de la multitude de paramètres susceptibles d'influencer l'interaction. Les études antérieures menées, entre autres, dans l'équipe de Roiter montrent que l'AFM est un outil particulièrement performant pour l'étude des interactions de NPs avec des modèles membranaires plans. Cependant, dans le cas des études menées sur des modèles membranaires simplifiés, la composition de ces modèles reste sommaire, limitée à des phospholipides de type phosphatidylcholine. De plus l'AFM est généralement sous-exploitée, son application se limitant à son utilisation en imagerie.



## CHAPITRE II : Choix du substrat et des molécules; réalisation des modèles

Dans ce chapitre, nous allons présenter les caractéristiques des différents lipides utilisés en justifiant nos choix. Puis nous détaillerons les différentes méthodes de préparation de nos modèles membranaires en précisant les conditions expérimentales. Nous aborderons ainsi :

- les mesures de pression de surface ;
- le transfert des monocouches par les méthodes de Langmuir-Blodgett (LB) et Langmuir-Schaefer (LS) ;
- la réalisation de bicouches par éclatement de vésicules, cette dernière étant caractérisée par AFM et par des mesures complémentaires de QCM-D.

### 1. Substrat, molécules et solvants

#### 1.1. *Le substrat solide : le mica muscovite*

Lors de cette étude nous avons utilisé le mica muscovite acheté chez Electron comme support plan pour la préparation de nos échantillons. Le mica est un minéral d'origine naturelle constitué de silicate hydroxylé d'aluminium et de potassium de formule  $KAl_2(AlSi_3O_{10})(OH)_2$  et ayant une structure mince en forme de feuilles. Il se compose de couches chargées négativement qui sont liées entre elles par des cations interfoliaires, ( $K^+$ ). Chaque strate est constituée de deux couches hexagonales de  $SiO_4$ , qui sont réticulées par des atomes d'aluminium avec des groupes -OH incorporés.

Les substrats de mica sont des systèmes bon marché et faciles à utiliser car il suffit de les cliver à l'aide d'un scotch pour obtenir une surface propre et plane sur plusieurs centaines de  $\mu m^2$ . En effet sa rugosité est faible, de l'ordre de 0,3 nm (rugosité atomique). Chaque surface de mica nu fraîchement clivé est systématiquement caractérisée par AFM avant son utilisation pour vérifier son état de surface.

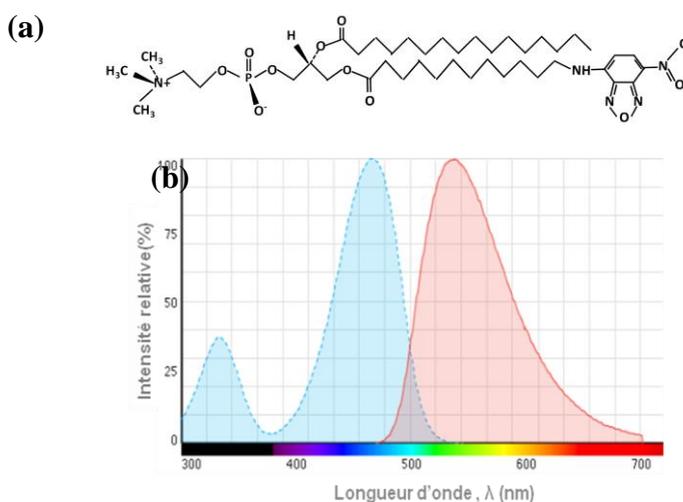
## 1.2. Les lipides

Dans le cadre de ces travaux, il nous a semblé judicieux de travailler avec des lipides qui rentrent dans la composition du feuillet externe de la membrane plasmique. Ce choix est justifié par le fait que les NPs sont en premier lieu en contact avec la partie externe de la membrane. De plus, dans le but de mimer au mieux les différentes phases lipidiques du feuillet externe des membranes biologiques, nous avons étudié des lipides présents dans la phase fluide et dans les *rafts* :

- le POPC et l'OPPC, deux phospholipides insaturés nous servant de modèles pour la phase fluide ;
- la sphingomyéline (SM), lipide présent dans les *rafts*. Deux types de SM ont été étudiés : une SM extraite du jaune d'œuf («egg-SM») caractérisée par des chaînes de longueur variable, et une SM synthétique aux chaînes calibrées ;
- le DMPC, un phospholipide saturé. Il est largement utilisé dans de nombreuses études en tant que modèle lipidique, bien que ce choix ne nous semble pas très judicieux du fait de sa température de transition proche de la température ambiante.

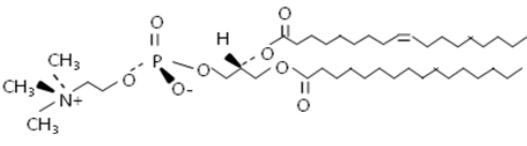
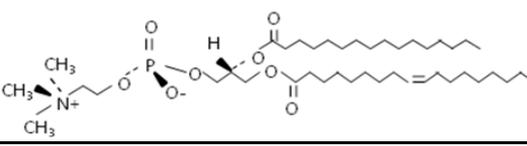
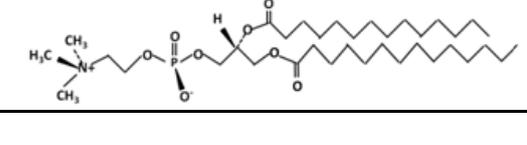
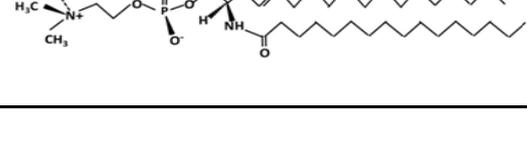
Le Tableau 1 regroupe les structures de ces lipides ainsi que différentes informations (fournisseurs, température de transition  $T_m$ ...). Tous ces lipides sont purs à plus de 99%, et ont été utilisés sans purification supplémentaire.

Les lipides n'étant pas fluorescents naturellement, nous avons été amenés à utiliser une sonde lipidique fluorescente, la NBD-HPC (Molecular Probes), dont la structure est présentée sur la Figure 21.



**Figure 21:** Structure chimique de la molécule de NBD-HPC (a). Spectre d'absorption et d'émission du groupement NBD dans du méthanol (b) (d'après le site de Molecular Probes).

La structure de cette sonde est basée sur celle d'un phospholipide : une tête PC et deux chaînes hydrophobes. La sonde NBD (7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl) est fixée à l'extrémité d'une de ces chaînes (Figure 21a). Compte tenu de la position de ce groupe NBD, la sonde (que nous abrègerons en NBD-PC) se solubilise dans les zones en phase fluide et est exclue des zones en phase condensée [102]. La Figure 21b présente les spectres d'absorption et d'émission de la sonde (NBD aminohexanoic acid) dans le méthanol. Ces spectres sont centrés sur 470 nm et 540 nm, respectivement.

Nom, abréviation et fournisseur	Structure chimique	Nature des chaînes	$T_m$
1-Palmitoyl-2-Oléoyl-Phosphatidylcholine POPC Sigma-Aldrich		16:0-18:1	-3°C [103,104]
2-Oléoyl-1-Palmitoyl-Phosphatidylcholine OPPC Sigma-Aldrich		18:1-16:0	-9°C [103,104]
Dimyristoyl-Phosphatidylcholine DMPC Sigma-Aldrich		14:0-14:0	24°C [105,106]
N-Palmitoyl-Sphingosyl-Phosphatidylcholine ou Sphingomyéline SM Avanti Polar Lipids		Sphingosine-16:0	41°C [107,108]
N-acyl-d-sphingosine-1-phosphocholine ou Shingomyéline d'œuf « egg-SM » Avanti Polar Lipids	Même structure que précédemment, mais chaînes de longueur variable (principalement palmitiques)	Sphingosine-16:0 principalement	≈37°C [109]

**Tableau 1.** Tableau récapitulatif des différents lipides utilisés et de leurs structures chimiques.

### 1.3. Les solvants

Selon les expériences réalisées, les lipides ont été solubilisés :

- soit dans un mélange éthanol/chloroforme (1/1 v/v), tous deux de qualité HPLC, et achetés chez Fluka et Sigma-Aldrich, respectivement ;
- soit dans de l'eau Millipore (résistivité supérieure à 18,2 MΩ.cm) ;

- soit dans un tampon Tris-NaCl (10 mM de Tris-HCl, 150 mM de NaCl, pH de 7,4) réalisé avec de l'eau Millipore.

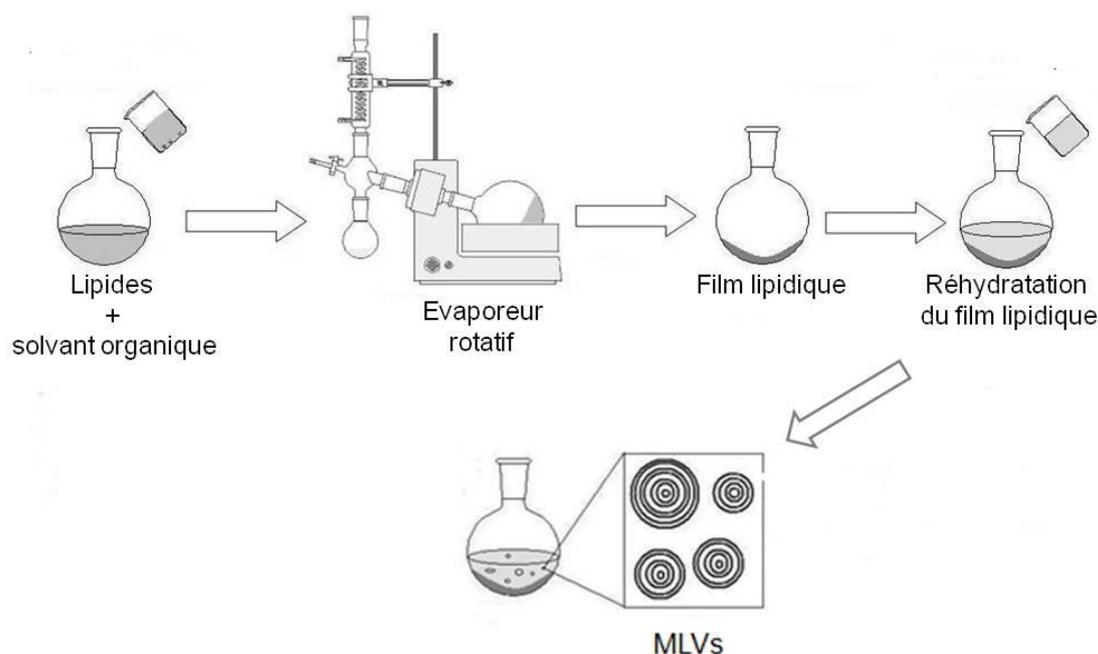
## 2. Préparation des solutions lipidiques et des vésicules

### 2.1. Préparation des solutions lipidiques

Dans le cas des mesures de pression de surface, la masse adéquate de chaque lipide est pesée puis solubilisée dans un mélange de chloroforme/éthanol (1/1 v/v) afin d'obtenir une solution avec une concentration lipidique finale de l'ordre de 1 mM. Les solutions sont par la suite stockées à  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### 2.2. Préparation de vésicules (SUVs) de DMPC

Les vésicules lipidiques sont préparées suivant la méthode de Bangham [110] qui consiste à solubiliser les lipides dans un solvant organique, évaporer le solvant sous agitation pour former un film phospholipidique dans le fond d'un ballon puis réhydrater les lipides. Les vésicules ainsi formées sont ensuite calibrées et homogénéisées. Les différentes étapes de préparation de vésicules sont présentées dans les Figures 22 et 23.



**Figure 22.** Protocole de préparation de MLV par la méthode de réhydratation de film. Ce schéma est adapté de [111].

D'un point de vue pratique pour chaque préparation, la même masse de lipides (30 mg) est pesée dans un ballon puis solubilisée dans du chloroforme (3 mL). Le ballon contenant la solution est ensuite plongé dans un bain-marie maintenu à une température supérieure à la  $T_m$  du lipide et mis en rotation (240 rpm), grâce un évaporateur rotatif (Figure 22), afin d'évaporer le chloroforme. Pour s'assurer de l'évaporation totale du chloroforme on baisse la pression interne qui règne dans le système à l'aide d'une trompe à eau en chauffant pendant au minimum 2 heures. Au cours de l'évaporation du chloroforme, un film lipidique mince multicouches se forme sur la paroi du ballon. Tout en maintenant le ballon dans le bain-marie et sous agitation, le film est réhydraté par ajout d'un volume de 5 mL de tampon TRIS-NaCl. Le film se décolle alors de la paroi du ballon et se réorganise formant ainsi des MLV.

Afin d'obtenir des petites vésicules unilamellaires (SUV) de taille contrôlée, la solution de MLV est par la suite extrudée à l'aide d'un *miniextruder* thermostaté de chez Avanti Polar Lipids en faisant passer la solution à travers une membrane de polycarbonate dont les pores ont un diamètre de 200 nm. Quinze passages de la solution à travers cette membrane à une température constante de 40°C permettent d'obtenir une solution de SUVs monodisperse.

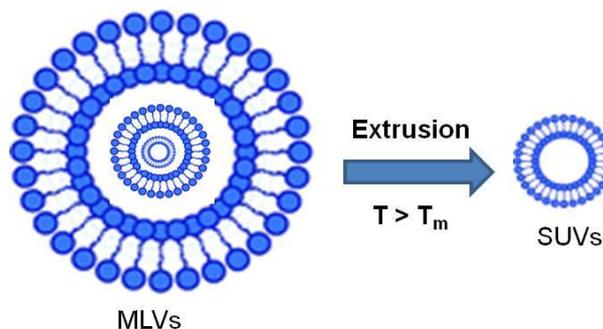
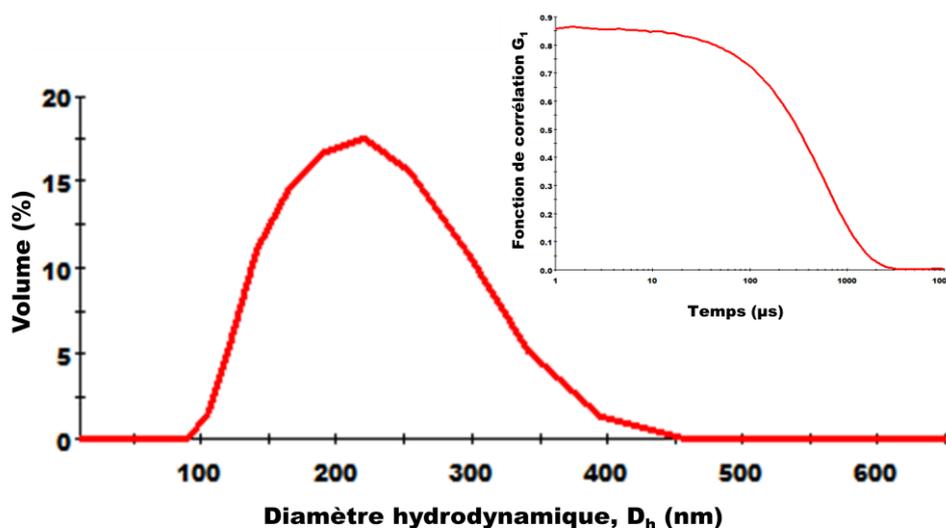


Figure 23. Processus d'extrusion pour la calibration des vésicules lipidiques.

La solution de SUV ainsi obtenue est systématiquement caractérisée par diffusion dynamique de la lumière (DLS) décrite dans le chapitre suivant. La courbe d'autocorrélation (exemple sur la Figure 24) permet de définir le diamètre hydrodynamique moyen des vésicules ainsi que la dispersité de ce diamètre. Dans le cas des SUV de DMPC, ce diamètre hydrodynamique moyen est de l'ordre de  $218 \pm 2$  nm, avec un indice de polydispersité PI de  $0.05 \pm 0.03$  indiquant que la solution est monodisperse.

Rappelons que toute solution dont l'indice PI est faible ( $< 0.2$ ) est considérée comme monodisperse.



**Figure 24.** Exemples de courbes d'autocorrélation (courbe de gauche) et de distribution (courbe de droite) obtenues par DLS pour une solution de vésicules lipidiques d'une concentration lipidique de 0.01mg/mL dans du tampon TRIS (10mM de TRIS-HCl, 150 mM de NaCl, pH de 7,4). Les mesures de DLS sont réalisées à 25°C et à un angle  $\theta=90^\circ$  (le montage est décrit dans le chapitre suivant).

### 3. Films de Langmuir à l'interface air-eau

Comme nous l'avons vu au Chapitre 1, les lipides sont capables de former des monocouches stables à l'interface air-eau affectant la tension de surface de l'eau. Nous présentons ci-dessous la méthode de mesures de cette tension superficielle.

Les mesures de pression de surface sont effectuées à l'air dans une pièce thermostatée à  $20 \pm 1^\circ C$ , en utilisant une cuve de Langmuir (environ 30 cm x 10 cm x 0,5 cm) équipée d'un capteur de pression (balance de Wilhelmy), tous deux de la société Nima.

Le principe de la mesure de pression repose sur la détermination du bilan de forces s'appliquant sur un rectangle de papier (papier de chromatographie Whatman dans notre cas), de dimensions connues, suspendu à la balance et partiellement immergé dans la sousphase (Figure 25). Le papier (ou lame de Wilhelmy) est ainsi soumis à 3 forces :

-son poids  $\vec{P}$ , vertical, vers le bas ;

-la poussée d'Archimède  $\vec{P}_A$ , verticale, vers le haut ;

-la force  $\vec{F}$  due à la tension superficielle. Cette dernière s'applique sur tout le périmètre de la lame en contact avec le liquide. Si ce dernier est mouillant, il y a formation d'un ménisque caractérisé par un angle  $\theta$  aigu (Figure 25). Localement la force de tension superficielle  $\vec{f}$  est dirigée selon le ménisque et attire la lame vers le liquide. La somme  $\vec{F}$  de toutes les forces  $\vec{f}$  est donc dirigée verticalement vers le bas pour des raisons de symétrie. Sa norme s'exprime en fonction de la tension superficielle  $\gamma$  tel que :

$$F = \gamma \times 2 (w + t) \cos\theta \quad 2.1$$

Si le liquide mouille parfaitement le papier alors  $\theta = 0$  et :

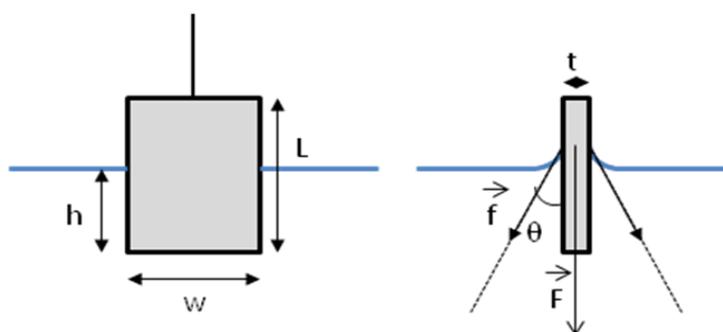
$$F = \gamma \times 2 (w+t) \quad 2.2$$

En veillant à immerger le papier au minimum et après tarage et calibration de la balance, on peut accéder à tout moment au bilan des forces s'exerçant sur le papier ( $\vec{P} + \vec{P}_A + \vec{F}$ ). Si les dimensions du papier sont connues, il est donc possible de déterminer  $\gamma$  et d'en déduire la pression de surface  $\Pi$ . La cuve est par ailleurs équipée de deux barrières en téflon permettant la compression et l'expansion de la monocouche (ainsi que le maintien de la pression lors d'un transfert). Le logiciel NIMA 512 permet de gérer le déplacement de ces barrières, la mesure de la pression de surface, et le moteur utilisé pour l'immersion et l'émersion du support lors d'un transfert.

D'un point de vue pratique, avant chaque expérience la cuve est nettoyée plusieurs fois à l'éthanol puis rincée à l'eau Millipore. Enfin, pour s'assurer de l'absence de pollution à la surface de l'eau, nous réalisons une compression avant chaque étalement de lipides. Si aucune variation de la pression de surface n'est enregistrée pendant la compression, nous validons l'état de propreté de la surface. Dans le cas contraire, nous recommençons un cycle de nettoyage.

Après étalement de la solution lipidique à l'interface air-eau et évaporation des solvants (15 minutes), les lipides sont comprimés en continu à une vitesse de  $5 \text{ cm}^2 \cdot \text{min}^{-1}$ . Au fur et à mesure de la compression, on suit en parallèle la diminution de l'aire moléculaire moyenne  $A$  et l'augmentation de la pression de surface  $\Pi$ , l'isotherme  $\Pi$ - $A$  étant construite point par point au cours de la compression. Si la monocouche doit être étudiée ultérieurement par

microscopie de fluorescence, la sonde NBD-PC est ajoutée à hauteur de 0,5 mol% dans la solution lipidique avant l'étalement.



**Figure 25:** Principe de mesure de  $\Pi$  à l'aide d'une lame de papier rectangulaire.

Les isothermes permettent d'obtenir des informations sur l'organisation des lipides à l'interface, ces isothermes variant suivant la nature et les propriétés du lipide et ne correspondant pas forcément au modèle théorique général présenté dans le chapitre 1. Nous commenterons ces isothermes dans le chapitre 4.

#### 4. Monocouches lipidiques supportées : transfert de films LB

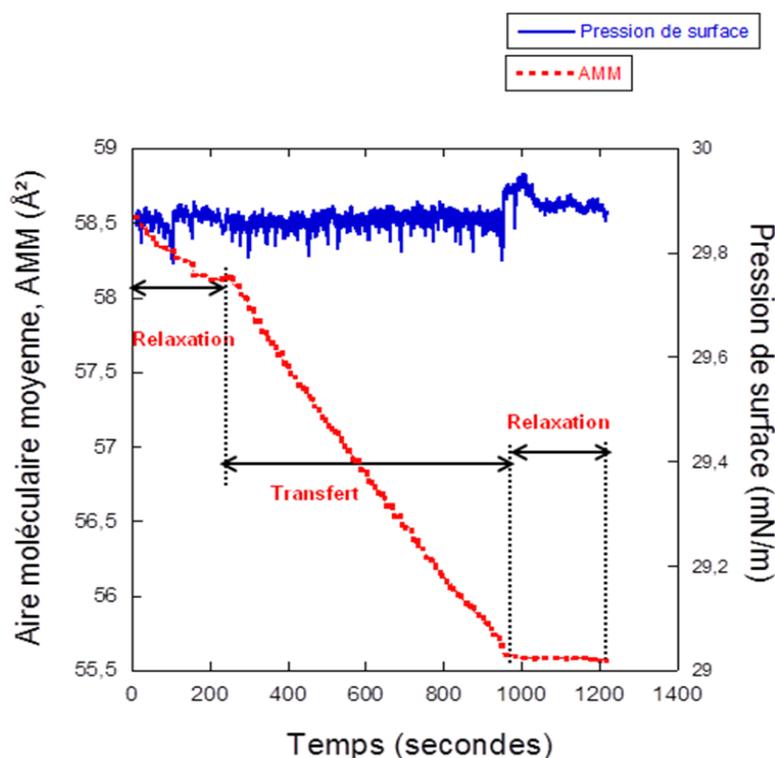
Les monocouches sont transférées de l'interface air-eau sur du mica fraîchement clivé par la méthode de LB, en utilisant un plongeur motorisé (Nima) assurant un transfert régulier à une vitesse contrôlée. Le mica est d'abord immergé dans l'eau, les faces du mica étant perpendiculaires à l'interface et la monocouche lipidique est préparée comme indiqué précédemment, puis comprimée jusqu'à une pression de surface de  $30 \text{ mN.m}^{-1}$ . Cette pression de surface est ensuite maintenue constante grâce à un système de contrôle ajustant en continu la surface occupée par la monocouche. La Figure 26 présente un exemple de courbe de transfert (courbe isobare) d'un film de SM, montrant les variations de l'aire moléculaire moyenne  $A$  (directement liée à la surface entre les deux barrières) au cours du temps. Cette courbe révèle les trois étapes du transfert :

- un déclin relativement faible de  $A$  qui se stabilise après quelques minutes, lié à la « relaxation » de la monocouche (réorganisation des lipides après l'arrêt de la compression) ;

-le transfert proprement dit, correspondant à une diminution importante de  $A$ , la pente étant liée à la vitesse de transfert ( $2 \text{ mm}\cdot\text{min}^{-1}$  dans notre cas) signe que le mica entraîne avec lui une partie de la monocouche;

-une dernière phase caractérisée par une surface stable, le transfert étant terminé.

Après son transfert, le film LB est conservé à l'abri de la poussière et de la lumière jusqu'à sa caractérisation par AFM et microscopie de fluorescence.



**Figure 26.** Exemple d'une courbe de transfert d'un film de SM sur du mica à  $20 \pm 1^\circ\text{C}$  à une pression de surface constante de  $30 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ .

## 5. Bicouches lipidiques supportées

Dans le cadre de notre étude nous avons utilisé les deux méthodes de préparation de bicouches supportées les plus courantes : la méthode Langmuir Blodgett/Schaefer (LS) et la méthode par éclatement de vésicules.

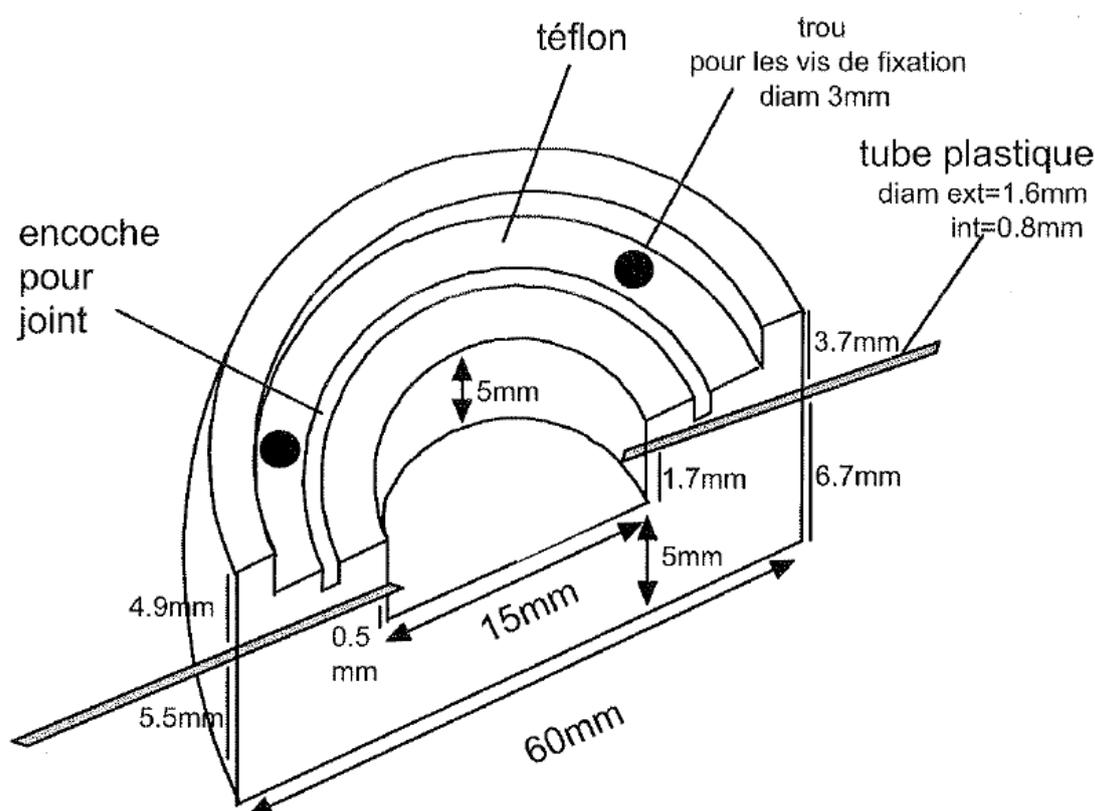
### 5.1. Méthode LS par transfert de monocouches lipidiques

Cette technique consiste à déposer en deux étapes une bicouche lipidique sur un support plan. Pour cela une première monocouche est transférée sur le support hydrophile par la méthode LB. Puis le support est orienté parallèlement à l'interface air-eau et appliqué sur l'interface, sa

vitesse de descente étant de  $2 \text{ mm.mn}^{-1}$  et la pression de la monocouche étant toujours maintenue constante à  $30 \text{ mN/m}^{-1}$ . Le transfert horizontal ne se traduit pas comme précédemment par une diminution régulière de l'aire moléculaire moyenne. Il est cependant possible de s'assurer, au moins partiellement, de la qualité du transfert en vérifiant que le contact du support avec l'interface n'engendre pas de variation brutale de la pression. Une fois la bicouche formée, l'échantillon est placé dans une boîte de Petri remplie d'eau ou d'un tampon suivant le cas, puis conservé à température ambiante ( $20 \pm 1^\circ\text{C}$ ).

## 5.2. Méthode par éclatement de vésicules

Pour la réalisation de bicouches lipidiques par éclatement de vésicules, nous avons utilisé une cellule (Figure 27) usinée à l'atelier de mécanique du LOMA.



**Figure 27.** Vue en coupe de la cellule mise au point et réalisée au laboratoire utilisée pour la préparation de bicouches planes par éclatement de vésicules [112].

Cette cellule cylindrique est usinée dans du téflon. Le téflon offre ici le double avantage d'être chimiquement inerte et d'assurer l'étanchéité de la cellule. La cellule se compose d'une chambre alimentée par deux capillaires en plastique permettant d'injecter la solution de vésicules à l'aide d'une microseringue et d'évacuer le surplus de solution. La chambre est

fermée par une lamelle de verre très propre sur laquelle la bicouche se forme. En plus du matériau utilisé, l'étanchéité de la chambre est assurée par un joint et une bride en aluminium qui viennent s'adapter au-dessus la chambre. Le tout est fermé à l'aide de trois vis.

La solution de vésicules (dont la préparation a été décrite précédemment) est diluée dans du tampon Tris-NaCl pour obtenir une solution de concentration finale 1mg/mL. Un volume d'environ 0,9 mL de cette solution est ensuite injecté dans la chambre puis le tout est placé dans une étuve chauffée à une température au-dessus de la  $T_m$  (40°C dans le cas du DMPC) pendant une heure. Nous rappelons que le maintien de la température au-dessus de la  $T_m$  du lipide est nécessaire pour favoriser l'éclatement des vésicules après leur adsorption sur la surface du mica. Après incubation, la cellule est placée à température ambiante une dizaine de minutes. Le surplus de vésicules (vésicules non adsorbées) est éliminé par rinçage en injectant un volume de tampon. Enfin l'échantillon est placé dans une boîte de Petri remplie de tampon Tris-NaCl. L'homogénéité et la qualité de chaque bicouche sont par la suite systématiquement vérifiées par AFM en milieu liquide avant leur étude.

Comme nous l'avons vu, des paramètres tels que la nature de la phase aqueuse (pH, force ionique,...) et la taille des vésicules sont des facteurs importants lors du processus de formation de la bicouche supportée par éclatement de vésicules. Lors de notre étude, nous avons étudié l'impact de deux procédés de préparation de vésicules et l'effet de la variation du pH et de la concentration des solutions de vésicules en étudiant la formation des bicouches par microbalance à quartz. Les résultats sont présentés dans la partie 4 du chapitre 4.



## CHAPITRE III : Méthodes de caractérisation

Dans ce chapitre nous allons décrire de façon détaillée les différentes méthodes utilisées au cours de cette thèse. Deux techniques de caractérisation de surface ont été utilisées plus particulièrement pour étudier les surfaces nanostructurées par dépôt de NPs de silice, et les monocouches et bicouches lipidiques planes en absence et présence de ces NPs. Il s'agit de deux méthodes d'imagerie de résolution différente mais complémentaires : la microscopie de fluorescence (MF) et la microscopie de force atomique (AFM pour *Atomic Force Microscopy* en anglais). Nous nous attarderons en particulier sur la description de cette technique qui a été exploitée sous différents angles lors de cette étude.

Enfin, la technique de diffusion dynamique de la lumière (DLS), la microbalance à quartz (QCM-D) et la microscopie électronique à balayage (MEB) ont été utilisées ponctuellement pour définir la taille des vésicules lipidiques, étudier le processus de formation des bicouches lipidiques planes et caractériser nos surfaces nanostructurées.

### Microscopie de force atomique (AFM en anglais)

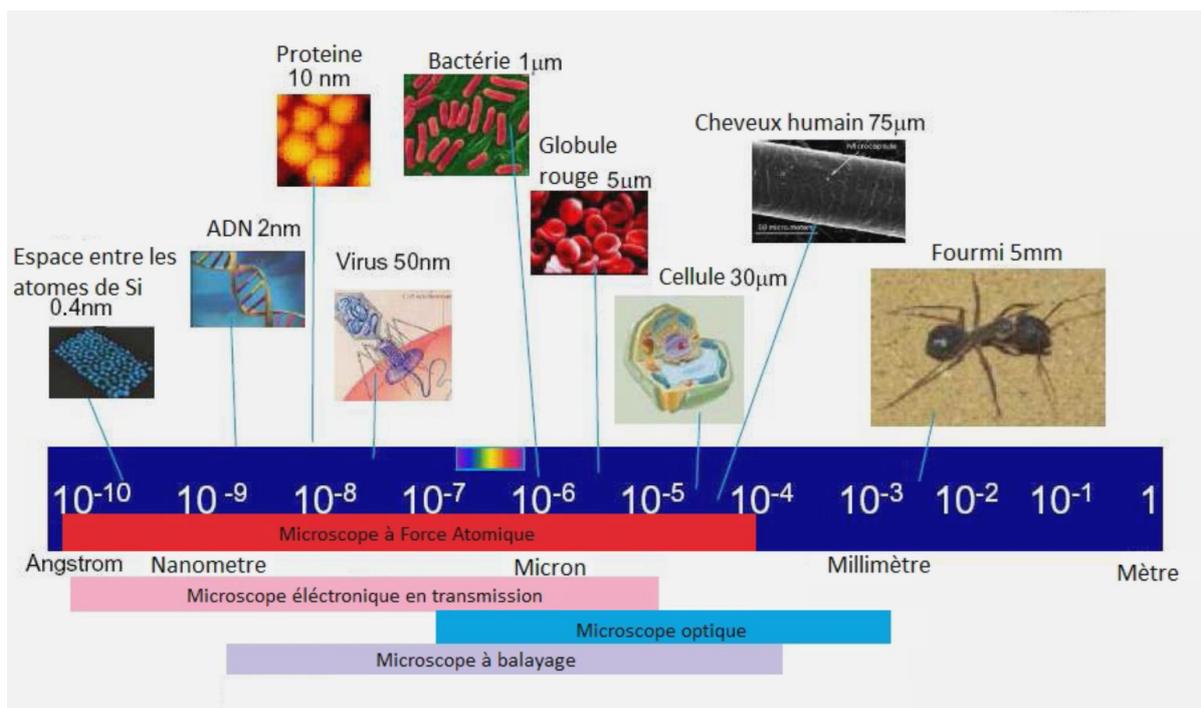
#### 1. Evolution de la microscopie

De nombreuses techniques de caractérisation de surface ont vu le jour au cours des dernières décennies. En complément de ces techniques on peut citer la grande famille des méthodes de microscopie optique qui depuis le XVII<sup>ème</sup>, avec l'invention du premier microscope par Anton van Leeuwenhoek, a connu une évolution fulgurante. La microscopie optique a longtemps été la seule méthode de microscopie disponible. Le développement de la physique quantique a fait très largement progresser ce domaine.

En 1932, Ernst Ruska (Prix Nobel de Physique en 1986) et Max Knoll conçoivent le premier microscope électronique à transmission (MET ou TEM en anglais) dont la résolution spatiale est, à cette époque, de quelques dizaines de nanomètres. Aujourd'hui les MET offrent des résolutions spatiales comprises entre 1 et 2 Å suivant l'épaisseur de l'échantillon observé. La microscopie électronique à balayage (MEB) apparaît, dans la foulée, en 1938.

Un demi-siècle plus tard (en 1981) le premier microscope à sonde locale voit le jour avec la conception du microscope à effet tunnel (STM pour *Scanning Tunneling Microscope*) par Gerd Binnig et Heinrich Rohrer (Prix Nobel de Physique 1986). Le principe de la STM repose sur le balayage d'une surface conductrice à l'aide d'une sonde métallique, elle aussi conductrice. En appliquant une tension électrique entre la surface de l'échantillon et la sonde, des électrons passent entre les deux conducteurs par effet tunnel. Ainsi, en jouant sur la distance entre les densités locales des nuages électroniques, on peut remonter à la structure atomique de la surface sondée.

Cinq années plus tard (en 1986) la microscopie à force atomique (AFM) apparaît. Complémentaire de la STM, l'AFM permet d'étudier des surfaces conductrices ou non [113,114]. En effet, en AFM, le balayage de la surface de l'échantillon par une pointe nanométrique permet de mesurer non pas un courant électrique mais les forces d'interaction locales entre la sonde (la pointe AFM) et l'échantillon et ce quel que soit le milieu dans lequel l'échantillon est plongé (liquide, air, vide). La Figure 28 permet de situer ces différentes méthodes de microscopie les unes par rapport aux autres en termes de résolution.



**Figure 28 :** Ordres de grandeur des résolutions obtenues avec différents types de microscopie (Nicolas Battaglini, *Microscopie en champ proche, Le microscope à force atomique*, Université Paris-Diderot-7, 2010).

Par la suite, les champs d'application de l'AFM n'ont cessé de s'élargir. En effet, à l'issue de nombreuses modifications, de nouvelles variantes de l'AFM ont vu le jour. Parmi ces

variantes on peut citer, entre autres, l'invention des microscopies SNOM (pour *Scanning Near-field Optical Microscopy*) et MFM (pour *Magnetic Force Microscopy*) [115].

Aujourd'hui un des champs privilégiés de l'AFM concerne l'étude des systèmes biologiques en raison de ses conditions appréciables de travail (par exemple en milieu liquide donc dans des conditions physiologiques) et surtout d'une meilleure résolution que celle des méthodes optiques.

L'autre atout, non négligeable, de l'AFM est la possibilité de réaliser des études non destructives sur des systèmes biologiques (*in vivo*, *in situ*).

Dans cette partie nous allons détailler le principe de l'AFM ainsi que les différents composants et modes de fonctionnement de celle-ci.

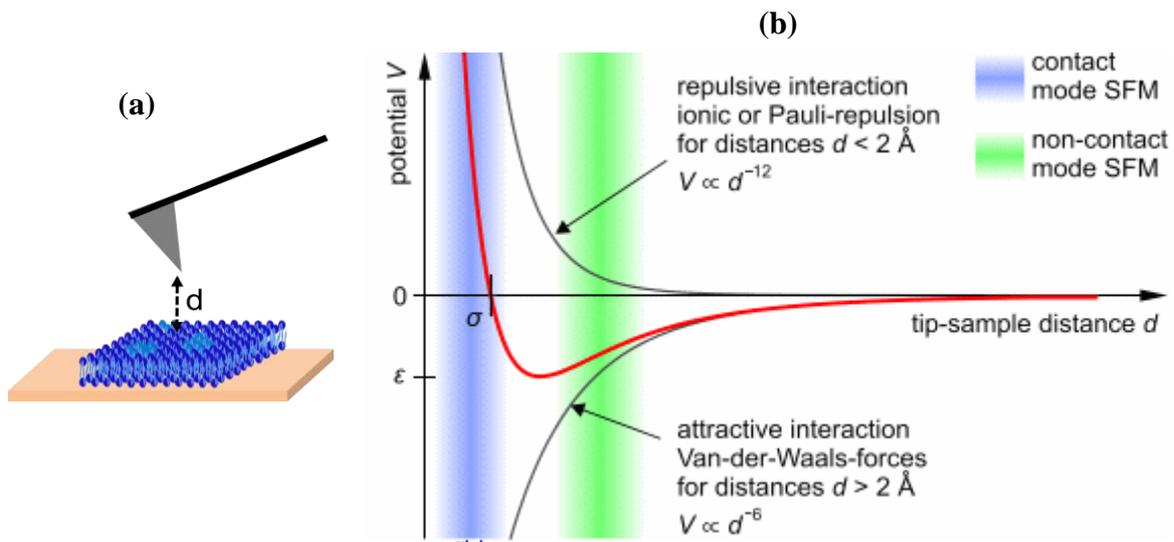
## 2. Principe

### 2.1. Principe général de l'AFM

L'AFM permet la cartographie locale d'une surface à l'échelle du nanomètre. La surface de l'échantillon est balayée par une sonde (ou pointe) de dimensions nanométriques solidaire d'un microlevier. La cartographie tridimensionnelle est réalisée à partir de la mesure de l'intensité des différentes interactions entre la surface et la pointe (Figure 29a). L'approche la plus souvent utilisée pour décrire les forces mises en jeu en AFM consiste à considérer l'énergie d'interaction qui existe entre deux atomes (ou molécules) non liés. Cette énergie est très souvent exprimée sous la forme d'un potentiel par paire de Lennard-Jones liée à la distance pointe-échantillon (Figure 29b). Ce potentiel est la combinaison d'une interaction attractive qui prédomine à "grande distance" de séparation et d'une interaction répulsive qui intervient de façon prépondérante à "faible distance" selon le principe d'exclusion de Pauli<sup>14</sup>.

---

<sup>14</sup> Le principe d'exclusion de Pauli empêche l'interpénétration mutuelle des nuages électroniques de deux atomes.



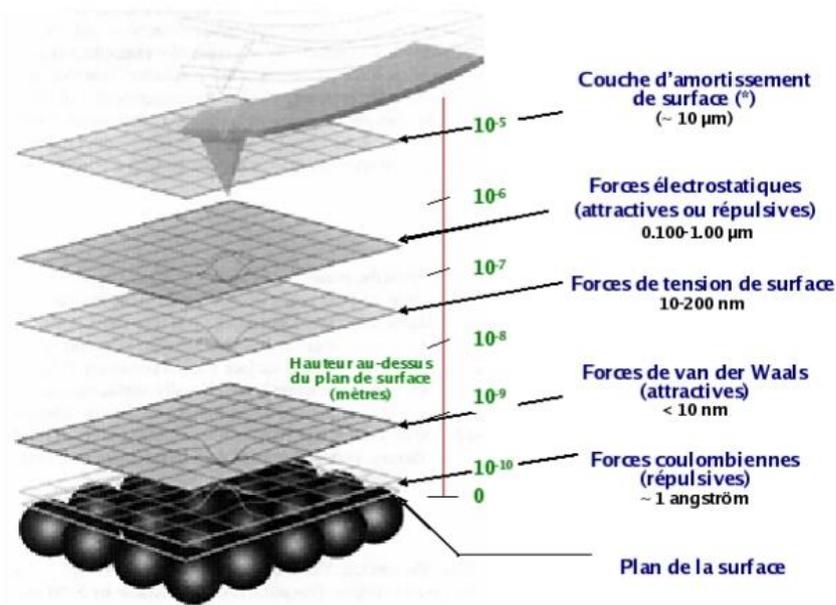
**Figure 29.** Système microlevier-sonde AFM en interaction avec une surface (a) et représentation du potentiel d'interaction interatomique selon le modèle de Lennard Jones (b). Le graphe du potentiel Lennard Jones présenté ici est adapté de [116].

Expérimentalement, un faisceau laser est focalisé sur l'extrémité du microlevier puis réfléchi sur une photodiode quatre quadrants. Le signal différentiel reçu par la photodiode donne la déflexion subie par le microlevier et donc la force d'interaction pointe-surface. En l'absence de champ externe, la pointe, étant à une distance  $d$  de l'ordre de quelques Å, est sensible aux forces de courte et de longue portées qui dépendent des propriétés physico-chimiques aussi bien du microlevier que de l'échantillon. Les forces de courte portée, comme leur nom l'indique, sont mesurées pour des distances de quelques Å et sont essentiellement des forces répulsives. Les forces de longue portée, quant à elles, sont des forces capillaires, électrostatiques, magnétiques et de van der Waals. La nature des interactions mises en jeu variant avec la distance  $d$ , cette notion de distance entre la pointe et la surface de l'échantillon prend toute son importance.

## 2.2. Les forces d'interaction en AFM

Nous allons ici décrire brièvement les principales forces agissant sur la pointe AFM. Comme nous venons de le mentionner, l'AFM est basée sur la mesure de forces ( $F$ ) ou de gradients de force ( $dF/dz$ ) entre la pointe et la surface étudiée,  $z$  étant la direction perpendiculaire à la surface de l'échantillon. Les forces entrant en jeu lors de l'approche de la pointe vers la surface sont nombreuses et dépendent du type de pointe, de la nature

de la surface sondée mais aussi du milieu dans lequel la mesure est réalisée (sous vide, à l'air, en milieu liquide). La Figure 30 résume les différentes forces subies par la pointe à l'air lors de son approche vers la surface. Elles sont détaillées ci-dessous.



**Figure 30.** Nature des forces rencontrées par la pointe AFM lors de l'engagement à l'air ambiant, d'après [117].

### 2.2.1. Les forces répulsives à courte portée

Elles s'établissent pour des distance très faibles ( $d \sim 1 \text{ \AA}$  tout au plus) et sont liées à la répulsion coulombienne et à l'impossibilité de l'interpénétration des orbitales électroniques (principe d'exclusion de Pauli).

### 2.2.2. Les forces de van der Waals

Elles sont attractives et ont pour origine trois interactions dipolaires différentes :

- l'interaction entre dipôles permanents (force d'orientation de Keesom), les dipôles permanents résultant du fait que les barycentres des charges positives et négatives d'une molécule ne coïncident pas ;

- l'interaction dipôle permanent-dipôle induit (force de Debye), le dipôle induit résultant de la déformation du nuage électronique en présence d'un champ électrique ;

- l'interaction dipôle induit-dipôle induit (force de dispersion de London) qui correspond à la polarisation instantanée créée par les fluctuations de la densité électronique autour du noyau.

En AFM, il convient de considérer l'interaction entre surfaces et non entre atomes ou molécules : il faut donc sommer l'ensemble de ces contributions. Les forces de van der Waals agissent sur des distances  $d$  comprises entre 1 et 100 Å et sont suffisamment fortes pour provoquer une déflexion du microlevier AFM. Des calculs ont été effectués pour différentes géométries des surfaces en interaction (sphère-sphère, sphère-plan ...) en introduisant la constante de Hamaker,  $A_H$ <sup>15</sup> définie par la relation [118,119]:

$$A_H = \pi^2 C_L \rho_1 \rho_2 \quad 3.1$$

où  $C_L$  est la constante d'interaction de London entre les deux surfaces,  $\rho_1$  et  $\rho_2$  sont les nombres d'atomes par unité de volume pour chacune des surfaces respectivement.

Le Tableau 2 présente les expressions des potentiels d'interaction et des forces de van der Waals pour les principales géométries des surfaces en interaction, avec  $R$  le rayon des sphères,  $A_H$  la constante de Hamaker et  $d$  la distance d'interaction.

Géométrie	Potentiel d'interaction	Force de van der Waals
Sphère-sphère	$U(r) = \frac{-A_H}{6d} \frac{R_1 R_2}{R_1 + R_2}$	$U(r) = \frac{-A_H}{6d^2} \frac{R_1 R_2}{R_1 + R_2}$
Sphère-plan	$U(r) = \frac{-A_H R}{6d}$	$U(r) = \frac{-A_H R}{6d^2}$
Plan-plan	$U(r) = \frac{-A_H}{12\pi d^2}$	$U(r) = \frac{-A_H}{6\pi d^3}$

**Tableau 2.** Expression des potentiels d'interaction et des forces de van de Waals pour les principales géométries des surfaces en interaction, avec  $R$  le rayon des sphères,  $A_H$  la constante de Hamaker et  $d$  la distance entre les surfaces en interaction d'après [118,119].

### 2.2.3. Les forces électrostatiques

Ces forces découlent des propriétés électriques de la surface et du matériau étudiés. Elles peuvent être attractives ou répulsives suivant le signe des charges. L'intensité de la force électrostatique entre deux charges électriques ponctuelles est proportionnelle au produit des

<sup>15</sup> La constante d'Hamaker caractérise les polarisabilités électroniques des deux surfaces en interaction et du milieu qui les sépare.

deux charges et est inversement proportionnelle au carré de la distance entre les deux charges. Pour une pointe sphérique, il est possible de modéliser la force électrostatique suivant l'équation ci-dessous :

$$F_{Elec}(z) = -\frac{\pi\epsilon_0 R U^2}{z} \quad 3.2$$

où  $U$  est la différence de potentiel,  $R$  le rayon de courbure de la pointe,  $z$  la distance entre la pointe et l'échantillon et  $\epsilon_0$  la permittivité du vide. Pour  $U = 1\text{ V}$ ,  $R = 50\text{ nm}$ ,  $z = 0,5\text{ nm}$ , nous obtenons une force  $F_{Elec}$  d'une intensité de l'ordre de  $2,5\text{ nN}$ , ce qui montre l'influence de cette force qui va demeurer importante même à longue portée.

#### 2.2.4. Les forces capillaires

Elles sont liées à la condensation de l'humidité de l'air du milieu expérimental. Un ménisque peut ainsi se former au voisinage de la pointe par mouillage. Ce ménisque entraîne la présence d'une force attractive entre la pointe et la surface. Outre le taux d'humidité environnant, les forces capillaires dépendent également du rayon de courbure de la pointe et de l'échantillon (hydrophile ou hydrophobe).

### 2.3. Les éléments constitutifs de l'AFM

Le montage expérimental d'AFM est schématisé sur la Figure 31.

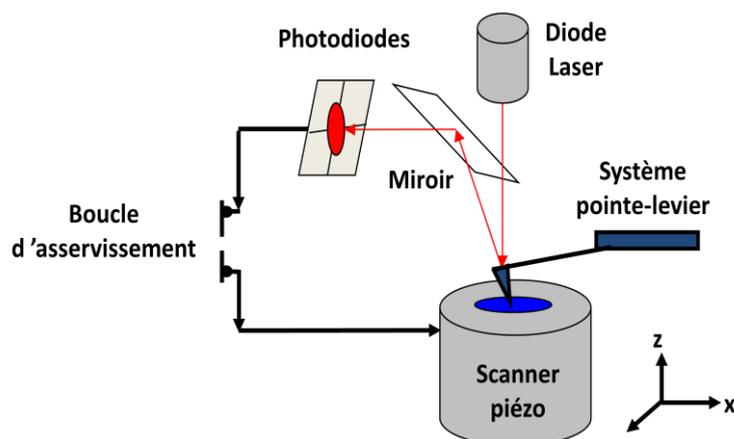


Figure 31. Principe de fonctionnement de l'AFM.

L'échantillon est déposé sur un scanner piézoélectrique<sup>16</sup> assurant son déplacement dans les

<sup>16</sup> Un matériau piézoélectrique est un matériau qui se déforme sous l'effet d'un champ électrique et qui crée réciproquement un champ électrique sous l'effet d'une déformation.

trois directions de l'espace  $x$ ,  $y$  et  $z$ . Une sonde (ou pointe), encastrée à l'extrémité d'un microlevier (type poutre) est en interaction avec la surface de l'échantillon. Un faisceau lumineux issu d'une diode laser est focalisé à l'extrémité du microlevier puis réfléchi *via* un miroir vers des photodiodes. Lors du balayage de la surface par la sonde, le point d'incidence du faisceau sur la photodiode se déplace engendrant une différence dans les courants collectés sur les quadrants de la photodiode. Ces variations nous renseignent sur la déflexion, voire la torsion du levier.

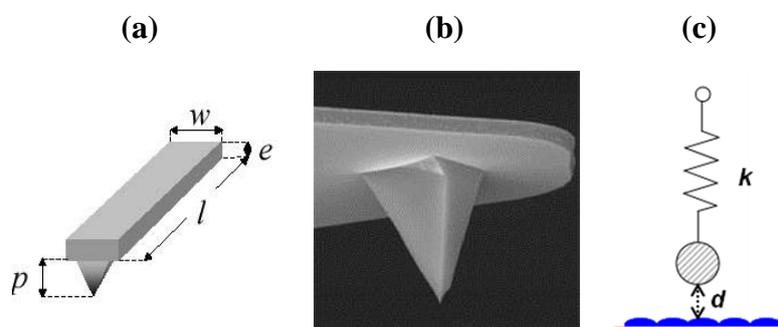
### 2.3.1. Le système microlevier-pointe : principales caractéristiques

Les microleviers utilisés en AFM sont généralement en silicium ou en nitrure de silicium suivant l'application à laquelle ils sont destinés. Un microlevier d'AFM est constitué d'un support et d'un levier sur lequel est fixée la sonde. Typiquement les microleviers ont une longueur comprise entre 100  $\mu\text{m}$  et 200  $\mu\text{m}$  (Figures 32a et 32b). Ils sont assimilables à des ressorts (Figure 32c) caractérisés par des constantes de raideur  $k$  pouvant aller de quelques centièmes à quelques dizaines de N/m suivant leurs caractéristiques géométriques. La raideur  $k$  d'un microlevier rectangulaire peut être exprimée par la relation :

$$k = \frac{wEe^3}{4l^3} \quad 3.3$$

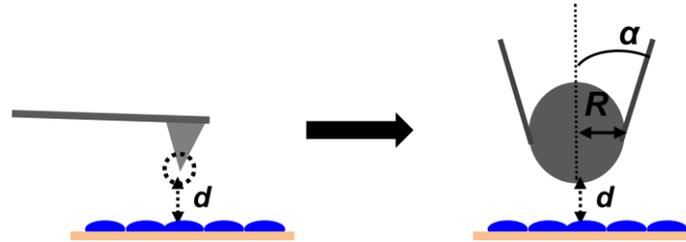
où  $E$  est le module d'élasticité du matériau le constituant (en  $\text{N.m}^{-2}$ ),  $w$  la largeur,  $l$  la longueur et  $e$  l'épaisseur du microlevier.

Les microleviers sont assimilés à des oscillateurs du second ordre et ont des fréquences propres qui peuvent aller de 6 KHz à 300 KHz.



**Figure 32:** Description schématique d'un microlevier (a). Image d'un microlevier triangulaire obtenue par microscopie électronique à balayage (b). Modélisation de la pointe et du levier AFM par un ressort (c). L'image b est tirée du site <https://www.brukerafmprobes.com/>.

La sonde AFM est l'élément central du microscope, et de ses propriétés physico-chimiques intrinsèques vont dépendre le caractère local de la mesure ainsi que la nature et la portée des interactions sondées. La pointe est modélisée par un cône de hauteur  $h$  ( $3\mu\text{m} < h < 20\mu\text{m}$ ), d'angle d'ouverture  $\alpha$  compris entre  $10^\circ$  et  $45^\circ$  (Figure 33).



**Figure 33** : Représentation schématique de la pointe AFM en cône,  $R$  étant le rayon de l'apex et  $\alpha$  le demi-angle d'ouverture.

Son apex est assimilable à une sphère de rayon  $R$  compris entre 2 et 40 nm (Figure 33). Il est possible d'estimer plus ou moins grossièrement les deux paramètres  $\alpha$  et  $R$  de la pointe soit par microscopie électronique, soit *in situ* en AFM en utilisant des échantillons de calibration (dépôts de billes, nanostructures présentant des marches, etc ...) [120,121]. La nature des propriétés de l'échantillon à mettre en évidence détermine la forme de la pointe à utiliser (conique ou pyramidale, fine ou large). Dans le cadre de notre étude, suivant le mode opératoire choisi, nous avons utilisé des pointes coniques (pointe « *tapping* » TAP,  $2\text{nm} \leq R \leq 15\text{nm}$ ) et pyramidales (pointe « contact » SNL,  $R \approx 40\text{nm}$ ). Ces deux modes opératoires seront détaillés dans la suite de ce chapitre.

Comme nous l'avons vu, le système microlevier-pointe peut être assimilé, à l'air, à un système masse-ressort (Figure 32c). La déflexion du levier liée à son interaction avec la surface de l'échantillon permet de mesurer la force d'interaction pointe-surface,  $F$ , en équilibre avec la force de rappel du ressort. Cette force  $F$  est alors proportionnelle à la constante de raideur du levier  $k$  suivant la loi de Hooke :

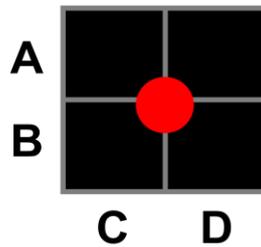
$$F = k \cdot d \quad 3.4$$

où  $d$  est la déflexion vertical du levier.

Nous reviendrons un peu plus tard sur cette notion de force dans la partie traitant des courbes de force.

### 2.3.2. Le système de détection

Le système de détection est composé d'une diode laser, d'un miroir et d'une cellule photoélectrique, appelée « photodétecteur quatre quadrants » (formé de quatre photodiodes). Le photodétecteur permet de définir avec précision la position et l'intensité du spot lumineux réfléchi au bout du microlevier. Les quatre quadrants A, B, C et D permettent de mesurer les déflexions verticales et latérales (ou torsions) qui sont déduites de l'expression des valeurs des signaux  $(A+B)-(C+D)$  et  $(A+C)-(B+D)$  respectivement (Figure 34). Nous reviendrons sur le réglage des photodiodes dans la partie annexe.



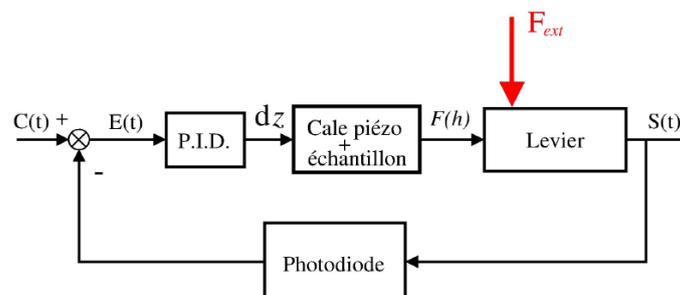
*Figure 34. Représentation schématique du photodétecteur à quatre quadrants (A, B, C, D).*

### 2.3.3. Le scanner et la céramique piézoélectrique

Le déplacement du levier dans les trois directions de l'espace ( $x$ ,  $y$ ,  $z$ ) est contrôlé par un positionneur de haute précision : le scanner composé de céramiques piézoélectriques. Suivant le montage utilisé, le système piézoélectrique peut piloter le déplacement de la pointe, de l'échantillon ou des deux suivant les directions  $x$ ,  $y$  et  $z$ . Malheureusement, dans la direction verticale  $z$ , la relation entre le déplacement théorique et le déplacement réel de la céramique piézoélectrique n'est pas linéaire. En effet, cette céramique piézoélectrique présente une réponse sous forme d'hystérèse lorsqu'elle se déplace verticalement vers le haut (extension) puis vers le bas (rétraction). En plus des phénomènes de non-linéarité et d'hystérèse, la céramique est soumise à un phénomène de dérive verticale dans le temps. Afin de limiter cet effet, il convient de réaliser un « préchauffage » du scanner avant chaque expérience et une calibration régulière de ce dernier (une à deux fois par an) en utilisant des réseaux de calibration dont les dimensions latérales (suivant  $x$  et  $y$ ) et verticale (suivant  $z$ ) sont connues. L'étape de calibration est indispensable pour éviter ces phénomènes de dérive et/ou de non-linéarité. Dans notre cas, les scanners ont été régulièrement calibrés en utilisant deux types de réseaux de calibration. Nous reviendrons sur cette étape de calibration dans l'annexe (paragraphe 4.1).

### 2.3.4. La boucle d'asservissement

Quel que soit le mode de fonctionnement de l'AFM en mode « contact » ou « *tapping* », il est possible d'effectuer des expériences avec ou sans asservissement de la force. Toutefois il est préférable d'asservir la force, notamment dans le cas d'étude de matériaux mous ou très rugueux, afin de ne pas déformer la surface sondée ou d'abîmer la pointe jusqu'à la casser. La boucle d'asservissement (Figure 35) est régulée par un contrôleur PID (pour Proportionnel, Intégral, Différentiel). Ce dernier permet, en effet, d'optimiser le temps de réponse, la bande passante de l'électronique du dispositif ainsi que la limitation de l'influence du bruit. L'écart entre la consigne (force imposée) et la mesure (force détectée) est appelé signal d'erreur. Dans le cas du mode « contact » où l'on asservit sur la déflexion du levier, autrement dit on impose une déflexion constante, le signal d'erreur est le signal de déflexion. Dans le cas du mode « *tapping* » où on asservit sur l'amplitude d'oscillation du levier, le signal d'erreur est le signal d'amplitude.



**Figure 35.** Boucle d'asservissement de la déflexion du levier [117].  $C(t)$  représente la déflexion de consigne,  $F(h)$  la force entre la pointe et la surface,  $F_{exc}$  est la force extérieure exercée sur la pointe pour imposer un mouvement d'oscillation à la pointe (en mode « *tapping* »),  $S(t)$  est la mesure.

D'un point de vue pratique, sur l'interface utilisateur, la correction de l'erreur se fait en jouant sur trois commandes : le gain proportionnel ( $G_P$ ), le gain intégral ( $G_I$ ) et le gain différentiel ( $G_D$ ). L'effet de chacun de ces gains sur la réponse du scanner piézoélectrique est détaillé dans l'annexe.

## 3. Modes d'utilisation de l'AFM

L'AFM est très souvent utilisée selon deux modes opératoires spécifiques : l'imagerie et la spectroscopie de force. La première méthode consiste à balayer la surface de l'échantillon dans le plan  $(x, y)$  et à mesurer le signal en hauteur  $(z)$  de la céramique piézoélectrique (mode

asservi), ou la déflexion du levier (mode non asservi). Le mode « spectroscopie de force », quant à lui, permet de mesurer les forces d'interaction locale entre la pointe et la surface de l'échantillon. Pour ce mode spectroscopique, dit « courbe de force » en contact, et « courbe approche-retrait » en « *tapping* », il s'agit d'étudier l'évolution de la force ou du gradient de force détecté en fonction de la distance verticale pointe-échantillon,  $d$ , en un point fixe ( $x, y$  constants) du plan. Ainsi en modulant la position  $z$  de l'échantillon on enregistre les variations de déflexion du levier.

Il existe plusieurs modes d'utilisation, qui, en plus d'accéder à la topographie de la surface, permettent de sonder ses propriétés mécaniques. Les 3 principaux modes sont : le mode « contact », le mode contact intermittent (dit « *tapping* ») ainsi que le mode « non contact ». Dans les paragraphes suivants, nous allons nous focaliser essentiellement sur les modes « contact » et « *tapping* » que nous avons utilisés pour l'étude de nos échantillons.

### 3.1. Mode « contact »

Le mode « contact » consiste à utiliser les forces répulsives, la pointe étant très proche de la surface ( $d \approx 2\text{\AA}$ ) tout au long du balayage. Cette pointe est repoussée du fait du principe de Pauli et le levier est dévié (Figure 36). La rétroaction s'effectue sur la mesure de la déviation. Avec ce mode, la pointe reste au contact de l'échantillon.

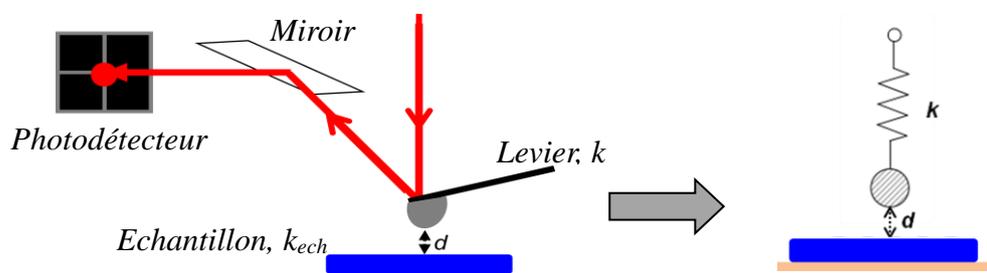


Figure 36. Représentation schématique du mode « contact ».

Ainsi, les variations de forces suivant le point considéré de coordonnées ( $x, y$ ) sur la surface de l'échantillon et/ou l'hétérogénéité (du point de vue mécanique, chimique, électrique...) permettent de reconstituer des images. Il existe différents régimes opératoires d'imagerie en mode « contact » : le mode « contact » à déflexion constante et le mode « contact » à hauteur constante.

### 3.1.1. Régime à déflexion constante ou « isoforce »

Dans ce régime, il y a répulsion entre la pointe et la surface durant le balayage dans le plan horizontal ( $x, y$ ) et la déflexion est maintenue constante. Ceci est rendu possible grâce à la boucle d'asservissement qui commande la position de l'échantillon par déplacement vertical ( $z$ ) de la céramique piézoélectrique afin de maintenir la déflexion constante. Le changement de position ( $\Delta z$ ) est ensuite relayé au système de détection pour la construction de l'image.

Le régime « isoforce » est intéressant quand les surfaces sont rugueuses (pour éviter de détériorer la pointe) ou quand elles sont fragiles (polymères, cellules, etc ...) pour éviter d'abîmer l'échantillon. Cependant il peut induire des artefacts liés à la partie électronique de l'asservissement quand les paramètres ne sont pas optimisés.

### 3.1.2. Régime à hauteur constante

La hauteur de l'échantillon est maintenue constante (pas d'asservissement, les gains sont mis à zéro) et l'image est constituée à partir de la mesure de la déflexion du levier. Cette mesure est purement physique (pas d'artefact lié à l'électronique) mais avec une limitation dans le choix des échantillons (pas trop rugueux, pas trop mou, etc...). Avec ce mode, l'échantillon peut être endommagé si les forces d'adhésion entre la pointe et la surface sont importantes.

Quel que soit le régime utilisé (force ou hauteur constante), les échantillons biologiques sont difficiles à analyser en mode « contact » parce qu'ils sont souvent mous et faiblement liés à la surface. Ils peuvent donc être facilement endommagés. Par contre ces régimes opératoires peuvent fournir, en plus des informations topographiques, des caractéristiques telles que les propriétés mécaniques locales de l'échantillon sondé (nanotribologie, nanorhéologie, etc ...).

### 3.1.3. Frottement ou friction

Lors du balayage de la surface de l'échantillon en mode « contact » il est possible de sonder les propriétés nanotribologiques de la surface en mesurant la force de frottement agissant sur la pointe. Cette force  $F_f$  est fonction de deux autres forces  $P$  et  $F_{adh}$  :

- $P$  la force normale appliquée par la pointe sur l'échantillon ;
- $F_{adh}$  la force d'adhésion de la surface, lorsque les analyses sont réalisées à l'air.

La mesure de la force de friction  $F_f$ , induite par la déflexion ou torsion du levier, permet de remonter à l'anisotropie de frottement de la surface sondée. Cette force  $F_f$  est proportionnelle à la charge normale de compression,  $P$ , suivant la relation :

$$F_f = \mu.P \quad 3.5$$

où  $\mu$  est le coefficient de friction.

Cette équation est établie à partir de l'équation phénoménologique, définie par Amontons [122]:

$$F_f = \tau.A \quad 3.6$$

où  $\tau$  et  $A$  sont la contrainte de cisaillement et l'aire de contact entre la pointe et la surface de l'échantillon respectivement.

Comprendre les mécanismes fondamentaux à l'origine des forces de friction est difficile car ils dépendent non seulement des propriétés des matériaux, en volume et en surface, et de l'environnement du système, mais aussi des échelles spatiales et temporelles qui sont sondées par le cisaillement. En AFM, le système levier-pointe peut balayer la surface suivant l'axe de symétrie du levier ou perpendiculairement à l'axe de symétrie du levier. Ces deux types de balayage sont respectivement appelés balayage en déflexion (qui fait intervenir la constante de raideur verticale du levier  $k$ ) ou en torsion (qui fait intervenir la constante de raideur transversale du levier  $k_t$ ), (Figure 37).

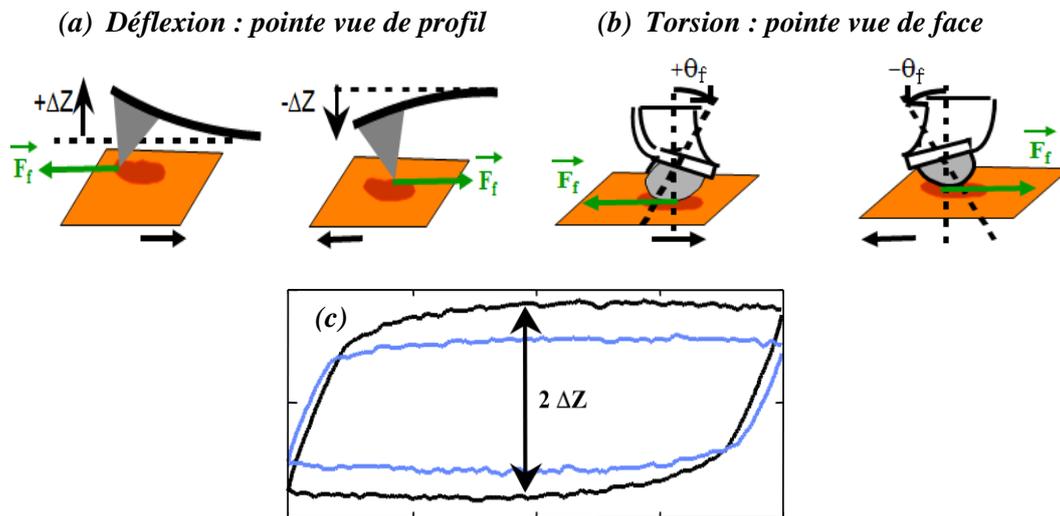
Les forces de friction  $F_f$  ainsi mesurées induisent une déflexion additionnelle  $\Delta z$  telle que :

dans le cas de la déflexion  $F_f = k.\Delta z \quad 3.7$

et

dans cas de la torsion  $F_f = k_t.\Delta z \quad 3.8$

Lors d'une expérience de frottement en AFM (ou de nanotribologie), l'enregistrement des déviations du levier (en fixant dans le plan  $x$  ou  $y$ ) durant un cycle de déplacement aller-retour constitue une boucle de frottement (Figure 37c), [123, 124].



**Figure 37.** Représentation schématique d'une expérience de frottement : (a) et (b) principes de la mesure de la force de friction  $F_f$ . (c) Résultat de la mesure : boucle de frottement [123, 124].

Par ailleurs, en plus de la charge de compression, les forces de frottement sont tributaires de deux autres paramètres expérimentaux : la vitesse de balayage  $v$  et la température de l'échantillon,  $T$  [123, 125] ce qui s'avère intéressant par exemple pour l'étude de systèmes thermosensibles.

#### 3.1.4. Types et origines des images en mode « contact »

Différents types d'images peuvent être enregistrés lors d'une expérience en AFM. En mode « contact », en plus des images de hauteur, des images de déflexion et de friction sont enregistrées pour compléter l'information.

##### 3.1.4.1. Image de hauteur dite « topographique »

Elle représente le contraste de hauteur de la surface de l'échantillon. En effet, la variation de la déflexion est utilisée comme signal d'asservissement afin de corriger le déplacement selon  $z$ , et de conserver ainsi la déflexion constante pour suivre la morphologie de la surface. Les zones claires de l'image de hauteur correspondent aux points d'altitudes les plus élevées si la variation des interactions pointe-surface n'est pas très grande.

##### 3.1.4.2. Image de déflexion ou d'erreur

La variation de la déflexion du levier est utilisée comme signal d'asservissement afin de corriger le déplacement en  $z$  et ainsi suivre la morphologie de la surface. Elle a la même utilité que l'image d'amplitude en mode « tapping » mais la variation de l'erreur se fait sur la valeur de déflexion au cours du balayage.

3.1.4.3. *Image de friction*

Une image de friction intègre la force appliquée par la pointe, l'adhésion de la surface et la forme de la pointe ainsi que la force de friction. Autrement dit, le contraste observé sur l'image est lié à l'hétérogénéité des propriétés tribologiques de la surface de l'échantillon. Un cycle de balayage aller-retour conduit soit à la topographie (équation 3.9) soit à la friction (équation 3.10) de la surface de l'échantillon, par les bilans vectoriels suivants, où  $F_N$  est la force normale à la surface correspondant à la déflexion verticale du levier :

$$\frac{(\vec{F}_N + \vec{F}_f) + (\vec{F}_N - \vec{F}_f)}{2} = \vec{F}_N \rightarrow \frac{\text{aller} + \text{retour}}{2} \tag{3.9}$$

$$\frac{(\vec{F}_N + \vec{F}_f) - (\vec{F}_N - \vec{F}_f)}{2} = \vec{F}_f \rightarrow \frac{\text{aller} - \text{retour}}{2} \tag{3.10}$$

Dans le cadre de notre étude nous avons utilisé le principe de l'équation 3.9 afin de remonter à la topographie de nos échantillons.

3.1.5. **Spectroscopie de force : la courbe de force (CF)**

Sur la Figure 38 est présentée une courbe de force caractéristique d'une surface dure (surface de mica nue). La courbe de force est obtenue en enregistrant les déflexions du levier en fonction du déplacement de la céramique piézo-électrique.

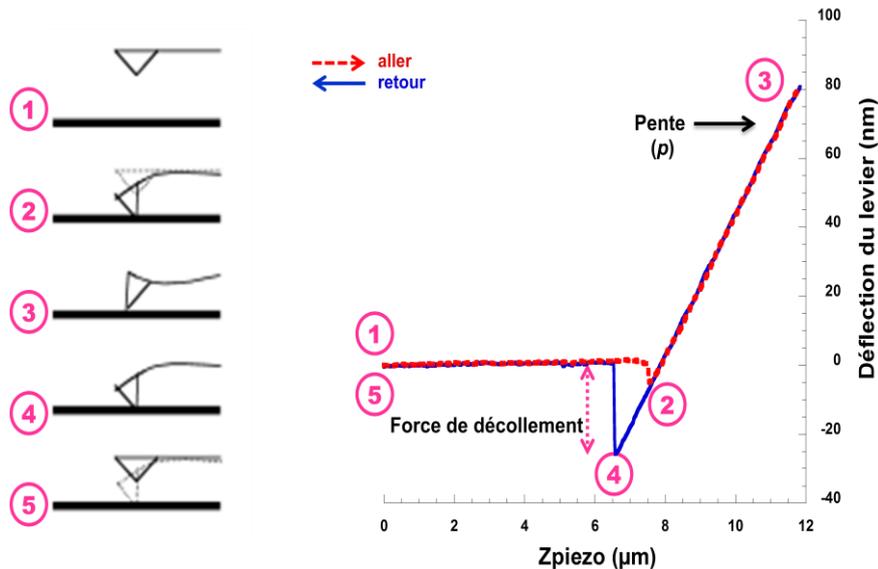


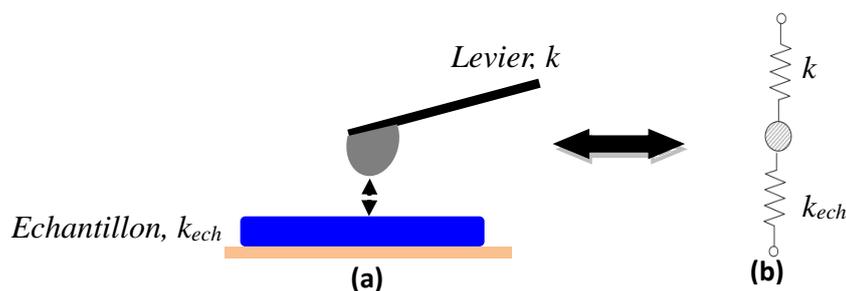
Figure 38. Comportement de la pointe au contact d'une surface dure de mica et courbe de force (aller-retour) expérimentale correspondante.

Pour cela on applique une tension triangulaire en fonction du temps à la céramique et la

pointe sonde la surface en un point ( $x, y$  fixes) grâce au déplacement en  $z$  de la céramique piézoélectrique. La courbe de force enregistrée reflète les variations de la déflexion du microlevier suivant le déplacement  $z$ . Une courbe de force s'effectue en deux temps : d'abord l'approche de la sonde vers la surface (courbe « aller » ou « approche ») puis le retrait (courbe « retour » ou « retrait »).

**Courbe « aller » ou « approche » :** loin de la surface, la sonde ne « sent » pas les forces, la déflexion du levier est nulle (point 1 sur la Figure 38). En s'approchant de la surface, il se produit une instabilité et la pointe étant sous l'effet des forces attractives, rentre brusquement en contact avec la surface de l'échantillon : la déflexion est négative (2). Parfois, dans le cas de leviers raides, cette déflexion (saut sur la courbe de force) n'est pas détectable. Lorsque la distance  $d$  pointe -surface de l'échantillon devient très petite ( $d \approx 2\text{\AA}$ ), les forces attractives deviennent maximales et induisent une inversion du sens de la déviation du microlevier : la déflexion devient positive et croît linéairement avec le déplacement vertical de l'échantillon (3). L'acquisition des images en mode « contact » se fait normalement dans cette condition, en tirant partie de la relation linéaire entre la déflexion et la force pour l'asservissement.

**Courbe « retour » ou « retrait » :** la déflexion décroît linéairement jusqu'à atteindre le point de déflexion nulle et devient négative du fait des forces d'adhésion et de la raideur finie du levier. Sous l'effet des forces répulsives, l'échantillon se retire, entraînant avec lui la pointe grâce à la force d'adhésion (4). Enfin lorsque l'adhésion est maximale, la force élastique du levier (liée à la déflexion de celui-ci) l'emporte sur la force d'adhésion, la pointe se décolle alors de la surface (« pull off point ») pour revenir à sa position d'équilibre (5), c'est-à-dire sa position sans interaction. Un cycle d'hystérèse mécanique est ainsi observé.



**Figure 39.** Modélisation de l'indentation d'une surface molle par la pointe AFM (a). Schéma équivalent du système de ressorts en série formé par la pointe et l'échantillon (b).

Quantitativement, il est alors possible d'analyser la courbe de force dans la zone de contact (parties 2-3 sur la Figure 38) afin d'en déduire un module élastique de l'échantillon.

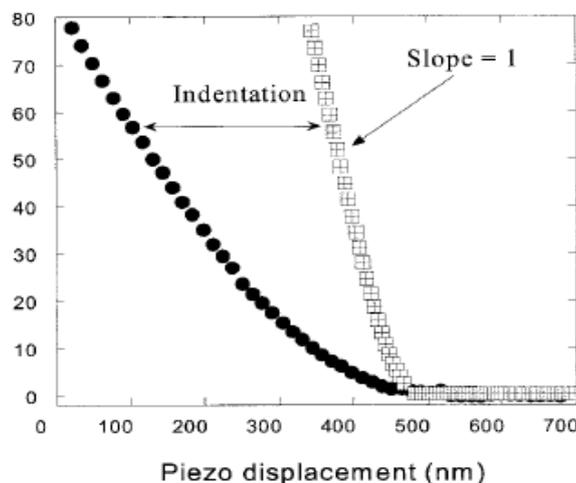
Ce dernier paramètre étant toujours supposé grand devant celui de la surface, la déformation élastique est celle de l'échantillon. Dans ce cas, on parle d'indentation de la pointe à la surface de l'échantillon.

La raideur du levier étant connue et la calibration effectuée, il est possible d'estimer à partir de la pente  $p$  de la courbe de force (partie 2-3 sur la Figure 38) la raideur de l'échantillon  $k_{ech}$  en assimilant l'ensemble pointe-surface à un système de ressorts en série (Figure 39). La pente  $p$  de la courbe de force s'écrit alors suivant la relation [123, 124]:

$$p = \frac{1}{1 + \frac{k}{k_{ech}}} \quad 3.11$$

Pour la surface dure, la déflexion du microlevier est proportionnelle au déplacement  $z$  du piézo (la pente  $p$  est égale à 1) alors que dans le cas de la surface molle, la déflexion est inférieure au déplacement  $z$  du piézo. La déflexion du levier est donc plus faible que le déplacement de l'échantillon ce qui se traduit par une pente  $p$  de la courbe déflexion-déplacement inférieure à 1.

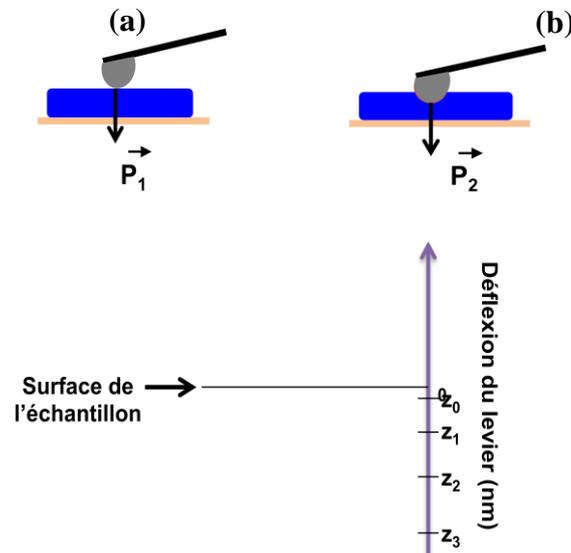
Sur la Figure 40 sont présentées des exemples de courbes de forces enregistrées en sondant une surface dure et une cellule de type ostéoblaste. On voit très clairement une variation de la pente suivant l'élasticité de la surface sondée, la courbe de force réalisée sur la cellule montrant une réponse mécanique différente de celle de la surface dure. Ceci est lié à l'indentation de la surface de la cellule par la pointe AFM.



**Figure 40.** Exemples de courbes de force « approche » effectuées en milieu liquide sur une surface dure et une surface molle (cellule de type ostéoblaste)[124].

### 3.1.6. Expérience de grattage d'un film

En AFM il est possible d'estimer l'épaisseur d'un film mou en effectuant des opérations de grattage avec la sonde AFM utilisée comme un « râteau ». Cette méthode a déjà été utilisée dans d'autres études pour estimer l'épaisseur de bicouches lipidiques supportées [126, 127]. Le principe opératoire typique d'une expérience de grattage est présenté sur la Figure 41.



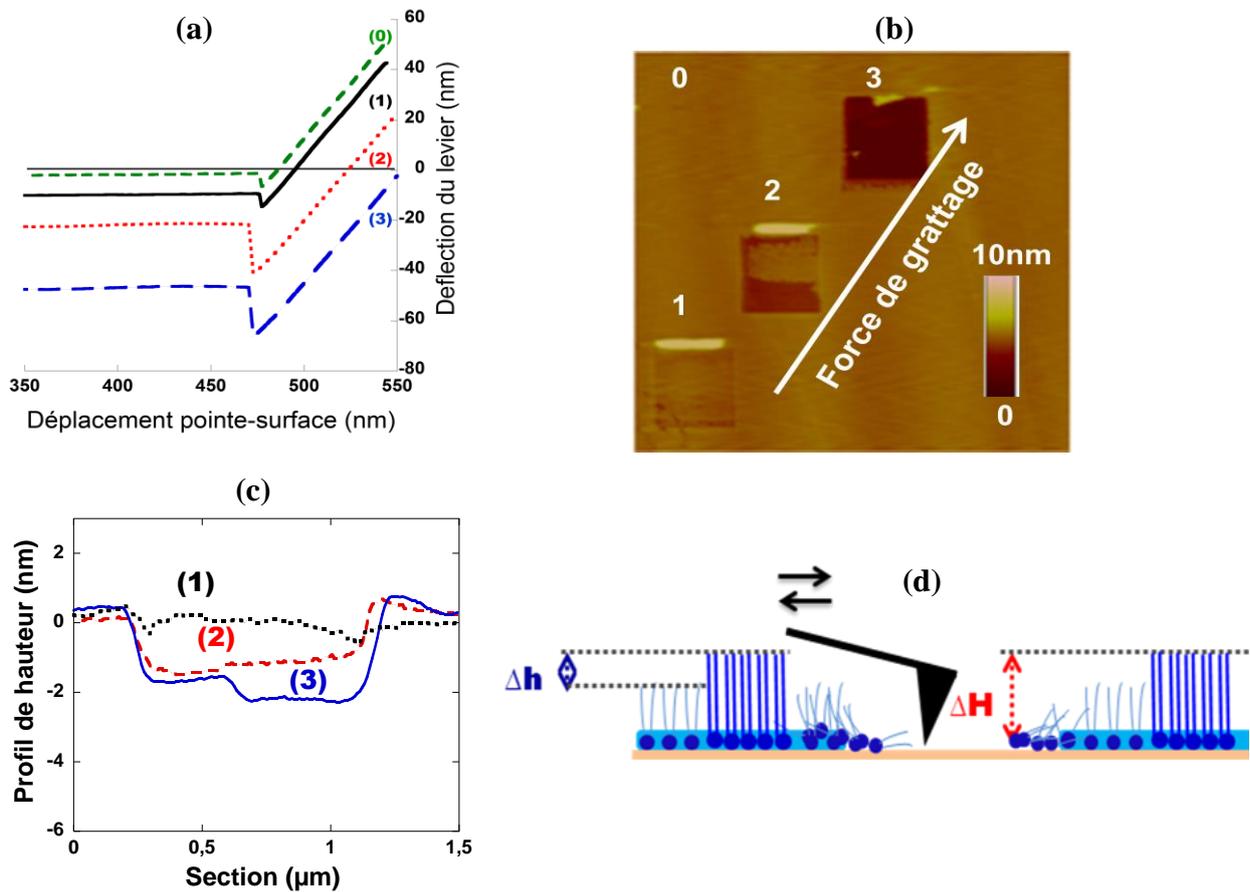
**Figure 41.** Principe de détermination de l'épaisseur d'un film mou par une expérience de grattage avec la sonde AFM : charges appliquées  $P_1$  et  $P_2$  (a et b), variation de la force de grattage (c).

Expérimentalement, on procède comme suit : après calibration du microlevier, l'échantillon est imagé à charge appliquée (force) quasiment nulle permettant de le sonder et de localiser une zone représentative sans abîmer son état de surface. Puis, une petite zone de la surface est sélectionnée et imagée en appliquant une force un peu plus importante.

L'objectif est d'exercer une force plus importante que celle utilisée pour imager en temps normal afin d'induire un comportement de râteau chez le système microlevier-pointe, qui déplace alors la matière sur les bords de la zone grattée. A la fin de l'expérience, un « zoom out » permet de revenir à la première image et la zone est une nouvelle fois imagée avec une charge quasi appliquée à la limite du décollement afin d'observer le résultat du grattage.

Afin de montrer l'influence de la force appliquée sur l'épaisseur du film, nous avons réalisé différentes expériences en faisant varier la force appliquée (Figure 42). Sur la Figure 42b est représentée une image obtenue lors d'une expérience de grattage d'un film LB de SM transféré sur une surface de mica. Les zones 1, 2 et 3 correspondent à des forces de grattage croissantes, ces zones apparaissant sous la forme de « trous » dans le film (Figures 42b et 42c). On note également l'accumulation de la matière sur les bords des zones grattées suivant

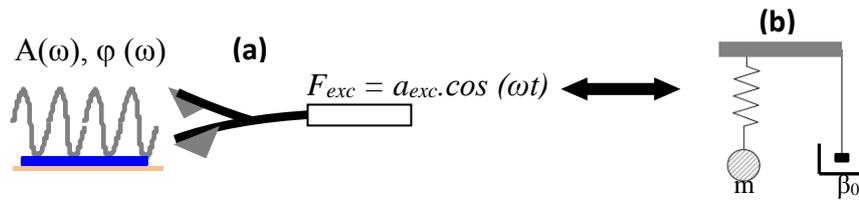
le sens de balayage (spots clairs zones (1) et (2)). Sur la deuxième zone grattée, différents contrastes sont observés dus au ré-étalement d'une partie des molécules. Les épaisseurs  $\Delta H$  des films sont estimées en faisant la moyenne des sections réalisées sur les images de hauteur aller et retour (Figure 42c). On trouve des épaisseurs croissantes avec la force de grattage, ainsi que parfois des épaisseurs intermédiaires liées au ré-étalement des lipides sur la surface du mica.



**Figure 42.** Courbes de force montrant le principe de grattage d'un film lipidique en faisant varier la force de grattage (a). Image AFM de hauteur ( $5\mu\text{m} \times 5\mu\text{m}$ ) d'un film de SM-C16 montrant les trois zones grattées avec des charges de grattage croissantes  $P_1 < P_2 < P_3$  (b). Sections réalisées sur les zones grattées (c). Schéma du principe de détermination de l'épaisseur d'un film LB lipidique par grattage (d). Le grattage a été réalisé à l'air avec une pointe triangulaire (SNL) de  $k = 0,58 \text{ N/m}$ .

### 3.2. Mode « contact intermittent » ou « tapping »

Le mode « contact intermittent » ou « tapping » est un mode dynamique, qui a été introduit en 1993 [128]. Dans ce mode, le système microlevier-pointe oscille à une fréquence  $\omega$  proche de sa fréquence de résonance  $\omega_0$  et à une amplitude  $A_I$  inférieure à l'amplitude de résonance  $A_0$ . (Figure 43).



**Figure 43.** Schéma d'excitation d'un système pointe-levier oscillant (a) et schéma équivalent d'un oscillateur amorti en régime forcé (b).

### 3.2.1. Modélisation par un oscillateur harmonique amorti

Loin de la surface, le levier oscille à une pulsation  $\omega$  légèrement inférieure à celle du mode principal de résonance  $\omega_0$ , pour optimiser la sensibilité du dispositif expérimental. Le microlevier se comporte ainsi comme un oscillateur amorti en régime forcé. L'équation du mouvement de l'oscillateur amorti soumis à une excitation périodique d'intensité  $F_{exc}$  à la fréquence  $\nu$  s'écrit :

$$\ddot{z}(t) + 2\beta_0 \dot{z}(t) + \omega_0^2 z(t) = \frac{F_{exc}}{m} \cos(2\pi\nu t) \quad 3.12$$

où  $m$  est la masse de l'oscillateur,  $k$  sa raideur reliée à la fréquence par la relation  $\omega_0 = 2\pi\nu_0 = \sqrt{\frac{k}{m}}$ . Le terme  $\gamma = 2\beta_0 m$  est le coefficient de frottement du milieu dans lequel l'énergie de l'oscillateur se dissipe.

L'oscillateur est dit linéaire quand la force de rappel présente une dépendance linéaire en fonction de l'écart à la position d'équilibre. La réponse de l'oscillateur est proportionnelle à l'amplitude ou, de façon équivalente, à la force d'excitation qui lui est appliquée.

Pour des temps longs où  $t \gg \beta_0^{-1}$ , l'oscillateur est dans un état stationnaire et la solution de l'équation 3.12 s'écrit :

$$z(t) = A(\omega) \cos(\omega t + \varphi(\omega)) \quad 3.13$$

Pour une excitation à la fréquence  $\omega$ , l'oscillateur a une amplitude d'oscillation  $A(\omega)$  avec un retard de phase  $\varphi(\omega)$ . Leurs expressions sont déduites de la résolution de l'équation différentielle:

$$A(\omega) = \frac{F_{exc}}{m\sqrt{(\omega_0^2 - \omega^2)^2 + 4\beta_0^2 \omega^2}} \quad 3.14$$

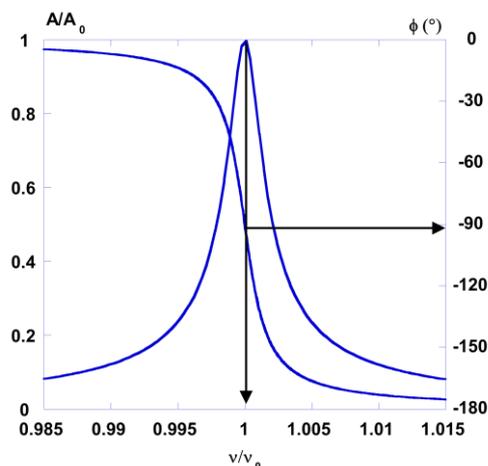
et

$$\varphi(\omega) = \arctan\left(\frac{2\beta_0\omega}{\omega^2 - \omega_0^2}\right) \quad 3.15$$

Pour  $A = \frac{A_0}{\sqrt{2}}$ , la largeur de la courbe de résonance vaut  $\Delta \nu = 2\beta_0$ .

Lors de l'approche du microlevier vers la surface de l'échantillon, la fréquence de résonance diminue sous l'effet d'un gradient de forces ressenti par la pointe. Ceci entraîne une diminution de l'amplitude d'oscillation, le levier oscillant avec une nouvelle amplitude de consigne définie auparavant par l'utilisateur  $A_{sp} < A_l$  pour avoir un comportement stable. La boucle d'asservissement ajuste la position en hauteur du scanner piézoélectrique de telle sorte que cette amplitude d'oscillation du microlevier reste constante.

Toutefois avant toute approche de la surface, un balayage en fréquence du piezo exciteur est obligatoire afin de localiser l'amplitude maximale du levier qui correspond à sa résonance. Pour cela l'utilisateur commence par enregistrer la courbe de résonance loin de la surface. La Figure 44 montre un exemple de courbe de résonance expérimentale. L'amplitude décrit une courbe de Lorentz centrée sur la fréquence de résonance de l'oscillateur. Le système oscillant microlevier-pointe peut être alors modélisé par un oscillateur harmonique de fréquence de résonance  $\omega_0$ , d'amplitude de résonance  $A_0$  et de facteur de qualité  $Q$ .



**Figure 44.** Courbe de résonance (en amplitude et en phase) expérimentale loin de la surface d'un microlevier « tapping » de type TAP de fréquence de résonance  $\nu_0=164$  kHz. L'amplitude et la fréquence sont normées respectivement à l'amplitude et à la fréquence de résonance de l'oscillateur libre.

On définit en effet l'oscillateur par son facteur de qualité. Ce dernier est défini comme 2 fois l'énergie moyenne stockée par l'oscillateur divisée par l'énergie qu'il dissipe sur une oscillation. Pour les grands facteurs de qualité et pour des fréquences proches de la résonance, son expression peut être simplifiée pour obtenir la relation généralement utilisée:

$$Q \approx 2\pi \frac{E_{stockée}}{E_{dissipée}} \approx \frac{\omega^2 + \omega_0^2}{4\beta_0\omega} \approx \frac{\omega_0}{2\beta_0} = \frac{\nu_0}{\Delta\nu} \quad 3.16$$

où  $\Delta\nu$  est la largeur en fréquence du pic de résonance à  $A_0/\sqrt{2}$ .

Pour les leviers de dynamique, les facteurs de qualité varient dans un intervalle caractéristique de 350 à 500 pour des fréquences de 150kHz à 300kHz à l'air.

En mode « *tapping* », le fait que le microlevier soit mis en oscillation par un bimorphe piézoélectrique suppose qu'il faut vérifier la linéarité de la réponse du levier oscillant à l'excitation fournie. Au cours de l'approche du microlevier vers la surface, la fréquence de résonance se décale en fonction de l'interaction pointe-surface. En situation de contact intermittent, s'ajoute à ce décalage une déformation du pic de résonance, qui devient dissymétrique. Il faut alors utiliser un modèle d'oscillateur non linéaire pour décrire le système. D'un point de vue pratique, cette non-linéarité a pour conséquence d'avoir plusieurs points de fonctionnement stables possibles, en fonction des paramètres d'interaction pointe-surface et de commande (plusieurs amplitudes d'oscillation possibles pour une même fréquence d'excitation) [129].

Lorsque la pointe s'approche de l'échantillon, celle-ci ressent une force additionnelle qui dépend de sa distance avec l'échantillon. La pointe commence à toucher de manière intermittente la surface et les forces de surface, en général attractives, induisent une diminution de la fréquence de résonance du système.

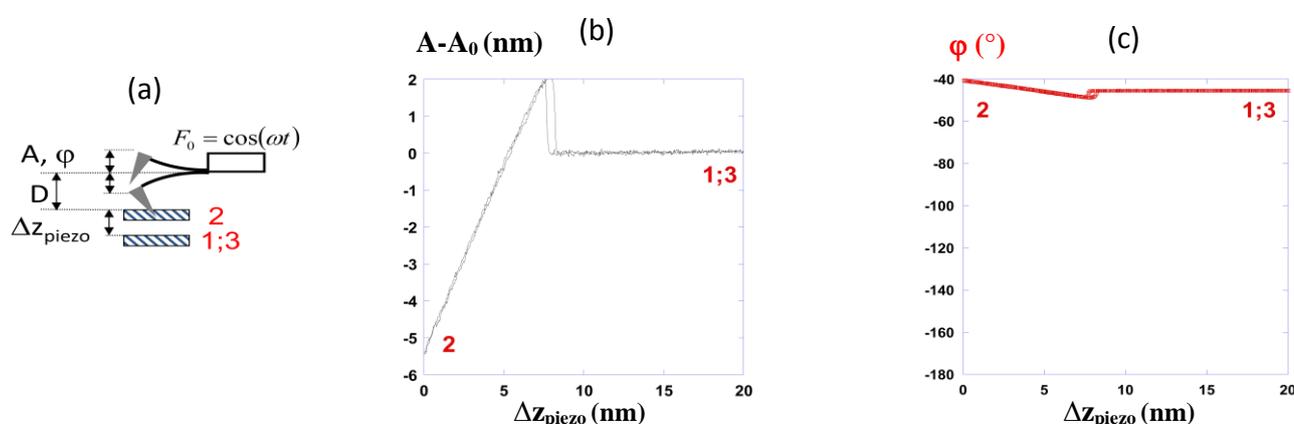
De même, on peut voir que l'interaction pointe-surface est une courbe qu'il est possible de linéariser par morceaux, comprenant alors une partie neutre à longue distance, puis une partie attractive et enfin une partie répulsive à courte distance. Ainsi l'évolution de cette interaction peut être suivie en traçant une courbe d'approche retrait qui nous renseigne sur les types de force qui s'établissent entre la pointe et la surface de l'échantillon.

### 3.2.2. Spectroscopie de force : la courbe approche-retrait (CAR)

L'amplitude d'oscillation est un premier indicateur du comportement de l'oscillateur. Elle indique où est la surface (différence d'amplitude nulle) et sert ensuite à étalonner la valeur de

l'amplitude libre d'oscillation. Pour ce faire on considère que la variation de l'amplitude est égale à la variation de distance pour une surface dure. Le deuxième indicateur est la phase d'oscillation. Nous verrons aussi que la phase est une grandeur cruciale pour distinguer l'interaction à dominante attractive de l'interaction à dominante répulsive.

En pratique, la courbe d'approche-retrait ou courbe de force en mode «*tapping*» permet de mesurer en un point  $(x, y)$  la force d'interaction pointe-surface en fonction de la distance entre la pointe et la surface de l'échantillon. Elle représente l'évolution de l'amplitude  $A$  et de la phase  $\varphi$  de l'oscillateur en fonction de la position  $z$  ( $x$  et  $y$  étant fixes). La Figure 45 décrit des courbes d'approche-retrait expérimentale en amplitude (b) et en phase (c) obtenue sur une surface de mica fraîchement clivée (surface dure).



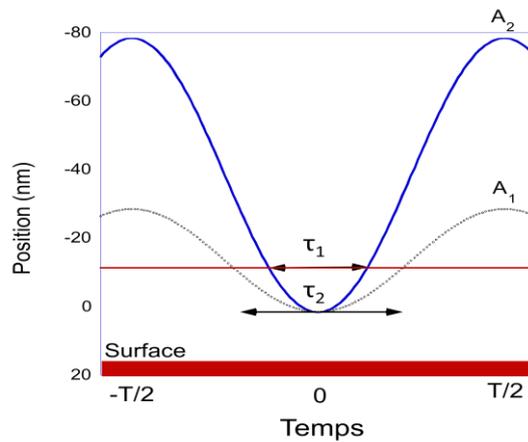
**Figure 45.** Schéma d'excitation du système pointe-levier oscillant (a). Courbes d'approche-retrait en amplitude (b) et en phase (c). Les chiffres 1, 2 et 3 correspondent à différentes distances entre la pointe et la surface, décrites en (a).

Loin de la surface (point 1 sur la Figure 45), l'interaction pointe-échantillon est trop faible pour influencer l'amplitude. L'amplitude et la phase restent à leur valeur libre. L'approche de l'échantillon entraîne un saut d'amplitude dû aux forces de van der Waals. La pointe entre alors en contact intermittent avec la surface. Le contact de l'échantillon (2) réduit l'amplitude par l'augmentation des forces répulsives et le retard de phase diminue. Lors du retrait de l'échantillon on constate une hystérèse d'amplitude (3).

En considérant l'amortissement de pente 1 de l'amplitude par rapport au déplacement vertical (surface dure), on remonte à l'amplitude en tout point de la courbe. Connaissant alors l'amplitude libre, on peut calibrer toutes les courbes.

Enfin, lors de l'oscillation, le levier entre en contact avec la surface de l'échantillon périodiquement. Suivant l'amplitude d'oscillation utilisée (grande ou petite) le temps

d'interaction ou temps de résidence  $\tau$  durant lequel la pointe reste en interaction avec la surface de l'échantillon sur une période n'est pas le même (Figure 46).

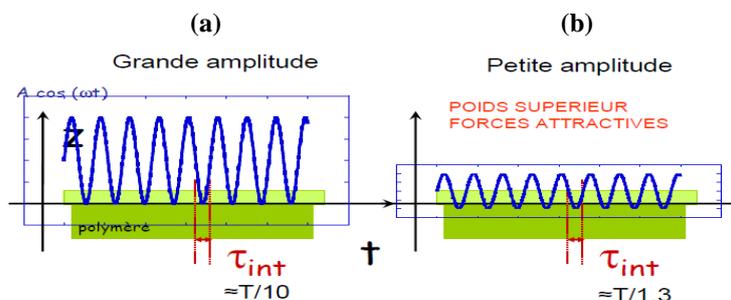


**Figure 46.** Variation du temps de résidence  $\tau$  sur une période  $T$  pour deux amplitudes d'oscillation différentes du système microlevier-pointe. Plus l'amplitude de l'oscillation est faible, plus le temps  $\tau$  augmente.

Le temps de résidence est plus long dans le cas d'une faible amplitude. Qualitativement, ceci peut se comprendre en remarquant qu'à petite amplitude, la pointe se trouve à des distances auxquelles les interactions (attractives) entre la pointe et la surface sont non négligeables pendant une fraction de la période d'oscillation plus importante qu'à grande amplitude (Figure 46). Ainsi, à faible amplitude, l'effet de ces forces est intégré sur un temps plus long lors d'une période.

Finalement en mode « tapping », il est possible de travailler avec deux régimes opératoires différents [130-132]. Dans le premier cas, la pointe entre en contact avec la surface de l'échantillon par intermittence, le temps de résidence étant relativement court: on parle de régime «répulsif dominant» ou de situation de « contact intermittent ».

Dans le deuxième cas, la pointe «frôle» seulement la surface et reste plus longtemps à son voisinage, on parle de régime « attractif dominant » ou de situation de « non-contact » (Figure 47).



**Figure 47.** Représentation schématique des régimes répulsif et attractif dominant (a) et (b) respectivement.

### 3.2.3. Régime répulsif dominant

Dans ce mode, la pointe se rapprochant de la surface, l'amplitude d'oscillation libre augmente jusqu'à atteindre une valeur maximale  $A_{répulsif}$  (Figure 48) qui est maintenue constante tout au long du balayage grâce à la boucle d'asservissement. L'amplitude étant aussi grande (par rapport à la distance pointe-surface), la pointe vient alors toucher la surface de l'échantillon périodiquement pendant un temps très court. Le reste du temps, aucune interaction entre la pointe et la surface n'est détectée. Ce mode est souvent utilisé pour obtenir des images de topographie de bonne résolution, sur tous types de surfaces, mais il est bien adapté aux matériaux mous.

### 3.2.4. Régime attractif dominant

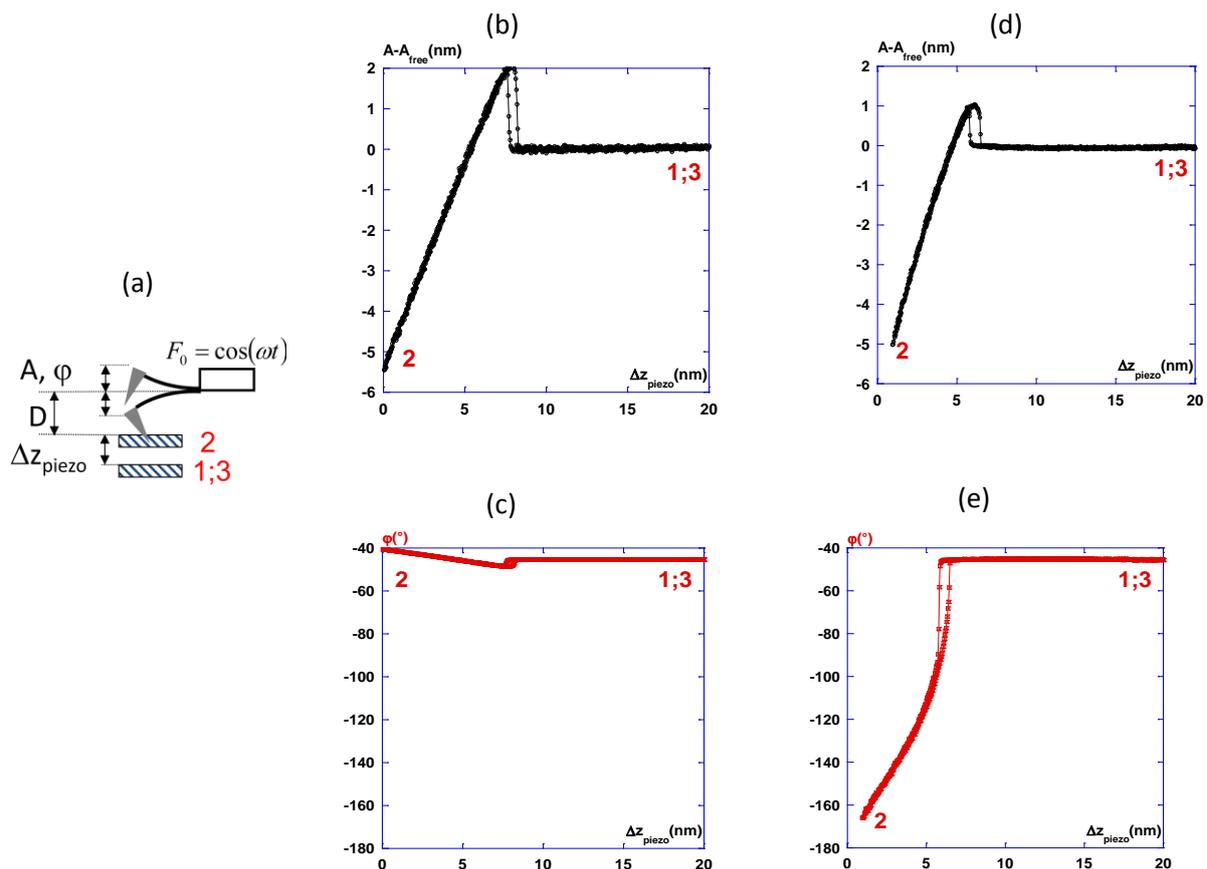
Contrairement au mode répulsif, dans le mode attractif l'amplitude d'oscillation libre diminue jusqu'à la valeur  $A_{attractif}$  (Figure 48). La pointe est donc, tout au long du balayage au voisinage de la surface, dans le domaine attractif. Le temps de contact entre la pointe et la surface dépend essentiellement des propriétés nanomécaniques de cette dernière. Ainsi il est possible de remonter au module de Young<sup>17</sup> de l'échantillon.

*Régime répulsif dominant*

*Régime attractif dominant*

---

<sup>17</sup> Le module de Young est la constante qui lie la déformation d'un matériau à la contrainte de traction ou de compression qu'il subit.



**Figure 48.** Schéma du mode « tapping » (a), Courbes approche et retrait (CAR) pour les 2 régimes attractif et répulsif dominant : amplitude régime répulsif dominant (b), phase répulsif dominant(c), amplitude régime attractif (d), phase régime attractif (e) [129].

### 3.2.5. Types et origines des images en mode « tapping »

En mode « tapping », il est ainsi possible d'obtenir trois types de données simultanément: l'image de hauteur, l'image d'amplitude et l'image de phase qui sont respectivement liées aux trois grandeurs mesurées dans la boucle :  $z$  le déplacement du piezo,  $E$  l'erreur d'amplitude (l'écart entre l'amplitude de consigne et l'amplitude au cours du balayage),  $\varphi$  le déphasage.

#### 3.2.5.1. Image de hauteur dite « image topographique »

Lors d'une expérience donnée, on fixe le point de fonctionnement, à savoir une amplitude d'oscillation donnée. Celle-ci est maintenue constante à l'aide du système d'asservissement, en faisant déplacer suivant  $z$  la céramique piézoélectrique. L'enregistrement de ces déplacements donne l'image de hauteur, qui dans la majorité des cas, est celle de la topographie de la surface. Parfois elle peut être un « mélange » de la topographie et des

propriétés mécaniques, notamment lorsque que l'on travaille avec de petites amplitudes d'oscillation (mode attractif dominant).

### 3.2.5.2. *Image de phase*

Le mouvement d'oscillation de la pointe peut être caractérisé par son déphasage par rapport au mouvement d'oscillation de la céramique piézoélectrique qui l'entraîne. Ce déphasage change quand la pointe entre en interaction avec la surface et ses variations sont à l'origine d'un contraste caractéristique des propriétés viscoélastiques (l'adhésion et/ ou l'élasticité) et de la nature de l'échantillon. De plus, même sur un échantillon homogène, le signal obtenu permet souvent d'obtenir un meilleur contraste que sur les images de hauteur et d'amplitude.

### 3.2.5.3. *Image d'amplitude ou « d'erreur »*

Le contraste d'amplitude est aussi topographique si les variations des interactions dissipatives sont faibles. Il dépend de la variation d'altitude suivant la direction de balayage. Cela donne un côté « ombragé » à l'image, permettant de révéler les variations abruptes de faible amplitude. Cette variation de l'amplitude d'oscillation est utilisée comme signal d'asservissement afin de corriger le déplacement en  $z$ , pour conserver l'amplitude constante et ainsi suivre la morphologie de la surface. L'image d'amplitude représente la variation de la racine carrée de l'amplitude avant la boucle de régulation.

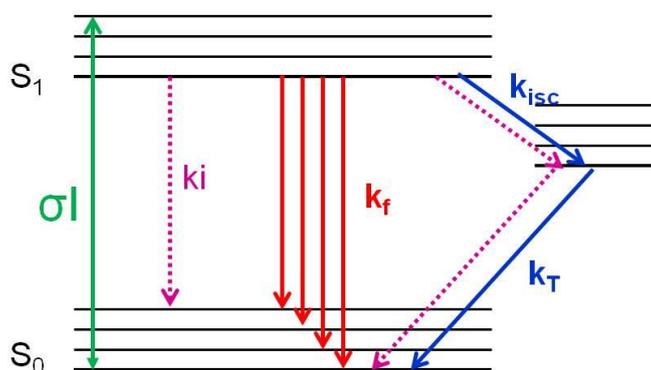
L'avantage du mode « *tapping* » réside dans le fait que le contact de la pointe avec la surface de l'échantillon est périodique et très court, limitant ainsi l'usure et/ou la pollution de la pointe et surtout la perturbation et/ou la modification de la surface de l'échantillon. Dans ces conditions (oscillation de grande amplitude, soit un contact périodique et court), le balayage de la surface par la pointe permet d'obtenir une bonne résolution latérale du fait de la faible force latérale. Ce mode est donc particulièrement bien adapté pour la visualisation d'échantillons fragiles tels que les matériaux mous et les matériaux biologiques (cellules, macromolécules...).

## Microscopie de fluorescence

### 1. Principe

Une molécule fluorescente est capable d'émettre un photon après en avoir absorbé un d'énergie supérieure. La Figure 49 présente le diagramme simplifié de Jablonski décrivant les niveaux électroniques et vibrationnels de la molécule : le fluorophore absorbe une énergie  $\sigma I$  le faisant passer de l'état fondamental  $S_0$  à l'état excité  $S_1$  de plus haute énergie et instable. La

molécule retombe sur le niveau fondamental en émettant un photon de fluorescence d'énergie plus faible : l'émission de la fluorescence est donc décalée vers les longueurs d'ondes plus élevées par rapport à l'excitation.



**Figure 49.** Diagramme de Jablonski représentant les niveaux d'énergie  $S_0$  et  $S_1$  ainsi que les niveaux vibrationnels.  $\sigma$  est la section efficace d'absorption du fluorophore et  $I$  la densité surfacique de photons par unité de temps.  $k_f$ ,  $k_{isc}$ ,  $k_T$  et  $k_i$  sont les probabilités de désexcitation de la molécule par différentes voies : la fluorescence, la conversion inter-système (menant à l'état triplet et l'émission d'un photon de phosphorescence), la phosphorescence et la désexcitation non radiative, respectivement.

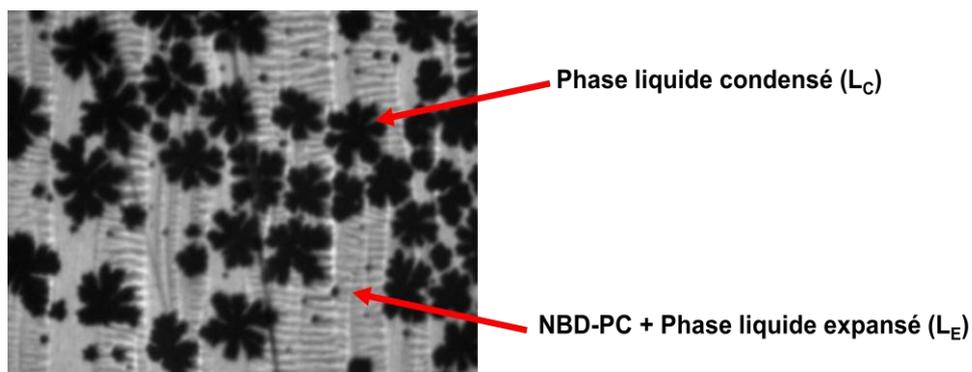
Dans le cas d'une observation par microscopie, une image de l'objet observé est reconstituée à partir de l'émission de fluorescence de cet objet.

## 2. Marquage des lipides

Dans le cadre de notre étude, les lipides n'étant pas fluorescents naturellement, nous avons utilisé une sonde lipidique fluorescente, le NBD-PC, ajoutée à faible quantité (0,5 mol%) aux lipides pour limiter les éventuelles perturbations induites par la sonde. Cette sonde est un glycérophospholipide de type PC, le groupement fluorescent NBD (7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl) étant greffé à l'extrémité d'une des chaînes (voir chapitre 2) [102]. La position de ce groupe explique le comportement de la sonde en présence d'un système lipidique : du fait de l'encombrement stérique imposé par le groupe NBD, cette sonde se solubilise préférentiellement dans les phases lipidiques fluides et est exclue des phases condensées. Les différences de concentration induites par ce phénomène sont à l'origine du contraste observé sur l'image : les zones lipidiques fluides apparaissent lumineuses alors que les zones condensées apparaissent sombres.

A titre d'exemple, la Figure 50 montre une image obtenue par microscopie de fluorescence d'un film LB de SM marqué au NBD-PC (0,5 mol%). Comme on peut le constater la présence d'une petite quantité de sonde permet de distinguer la ségrégation des lipides en deux phases:

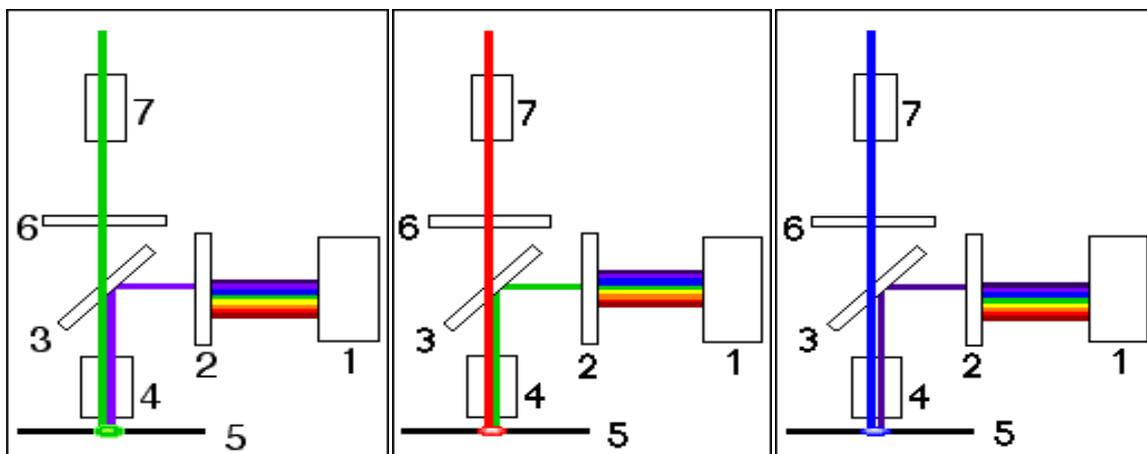
la phase liquide-expansé apparaissant lumineuse car ayant concentré la sonde, alors que la phase liquide condensé apparaît sombre.



**Figure 50.** Image par microscopie de fluorescence d'un film LB de SM contenant 0,5 mol% de sonde NBD-PC transféré sur une lame de mica à une pression de 30mN/m et à  $20 \pm 1^\circ\text{C}$ .

### 3. Montage expérimental

Le montage expérimental utilisé comporte une lampe à vapeurs de mercure de 100 W (U-LH100HG de la société Olympus) équipant un microscope à platine fixe (BX51WI). Un schéma de principe du montage est présenté sur la Figure 51.



**Figure 51.** Principe d'un montage d'épifluorescence : la lumière polychromatique est émise par une lampe (1). Une longueur d'onde excitatrice est sélectionnée au moyen d'un filtre d'excitation (2) puis réfléchi par une lame séparatrice (3) en direction de l'échantillon (5) via l'objectif (4). La lumière émise est collectée par l'objectif, traverse la lame séparatrice, une longueur d'onde d'émission étant sélectionnée par un filtre d'émission (6) avant d'atteindre la caméra CCD (7). Le choix des filtres d'excitation et d'émission dépend de la nature du fluorophore.  
(<http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/Microscopie/fluo/tricolore.htm>)

Expérimentalement, la lumière excitatrice est focalisée sur l'échantillon grâce à une série d'objectifs de grandissement et d'ouverture numérique x10/0.3 (UMPlanFI, Olympus),

x20/0.4 (LMPlanFI) et x50/0.5 (LMPlanFI), l'émission de fluorescence étant collectée suivant le même chemin (montage d'épifluorescence). Un cube placé sur le trajet de la lumière et comportant des filtres et une lame séparatrice permet de sélectionner les longueurs d'onde d'excitation et d'émission adaptées à la sonde NBD-PC (excitation centrée sur 470 nm, émission centrée sur 540 nm). Des filtres de DO variables complètent le dispositif pour moduler l'intensité lumineuse sur l'échantillon. Les images sont ensuite collectées par une caméra Orca Flash 2.8 (société Hamamatsu), elle-même pilotée par le logiciel HCLImage Live, permettant entre autres de définir le temps d'acquisition. Typiquement, ce dernier est de l'ordre de 50 à 100 ms, selon l'objectif choisi, afin de limiter les dégradations de l'échantillon par photoblanchiment. La résolution latérale du montage est de l'ordre de 0,4-0,6  $\mu\text{m}$ .

## Microbalance à quartz avec dissipation (QCM-D)

La QCM-D permet de mesurer de faibles variations de masse (de l'ordre du  $\text{ng}\cdot\text{cm}^{-2}$ ) sur un résonateur de type piézoélectrique, un cristal de quartz. Elle permet en même temps d'accéder aux propriétés viscoélastiques du matériau déposé. La QCM-D est une technique très attractive dans le cadre de la mise au point d'un biocapteur pour étudier par exemple les interactions protéine-protéine, anticorps-protéine, cellule-surface.

### 1. Principe et paramètres exploitables

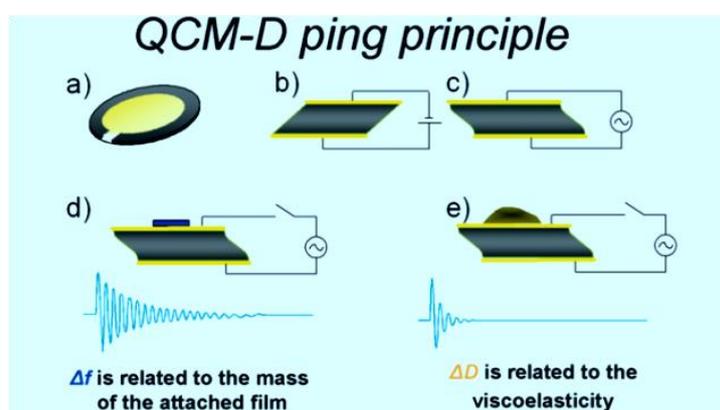
Le principe de base de la QCM-D repose sur les variations de fréquence de résonance d'une lame de quartz quand un « objet » (molécule, cellule...) s'adsorbe à sa surface (Figure 52). Le cristal de quartz, pris en « sandwich » entre deux électrodes en or, est soumis à un courant alternatif. Sous l'effet de ce courant, le quartz oscille à sa fréquence propre,  $f_0$ , si aucun matériau n'est déposé sur sa surface. Si on dépose une masse sur le cristal, la fréquence de vibration change, passant alors d'une fréquence  $f_0$  à une fréquence  $f$ . Après arrêt du courant, l'amortissement de l'oscillation est mesuré. A partir de l'évolution de la fréquence de résonance du cristal et de la courbe d'amortissement, on peut en déduire les variations de la

fréquence de résonance  $\Delta f$  et la dissipation  $\Delta D$ . Cette dernière est l'inverse du facteur  $Q$  représentant le nombre d'oscillations du cristal jusqu'à l'arrêt final.

La variation de fréquence  $\Delta f$  ainsi mesurée est proportionnelle à la masse absorbée ( $\Delta m$ ) à la surface du cristal selon la relation de Sauerbrey [133]:

$$\Delta f = -\frac{n \cdot \Delta m}{C} \quad 3.17$$

où  $n$  est l'harmonique et  $C$  la constante de sensibilité de masse, dépendant du type de quartz utilisé. Pour les cristaux de fréquence  $f_0 = 5\text{MHz}$  que nous avons utilisés lors de cette thèse,  $C$  vaut  $17,7 \text{ ng} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{Hz}^{-1}$ . Toutes nos mesures ont été faites à l'harmonique fondamental ( $n=1$ ).



**Figure 52.** Représentation schématique du principe de fonctionnement du QCM-D. (a) Structure du capteur : le quartz est pris en « sandwich » entre deux électrodes d'or. (b) et (c) Le mouvement de cisaillement du quartz résulte de l'application d'un courant alternatif à ses extrémités. (d) et (e) L'oscillation est amortie de manière différente selon que le matériel déposé à la surface du capteur est solide ou pas. (<http://www.bu.edu/becf/downloads/BioInterface%20Technologies/QCMD/QCM-D%20Theory.pdf>).

Toutefois il est à noter que la masse estimée prend en compte non seulement la masse « sèche » du matériau mais aussi celle de l'eau d'hydratation (fine couche d'eau entourant le matériau). De plus, pour que l'équation de Sauerbrey soit applicable, il faut que le dépôt soit rigide, uniforme et mince.

Quant à la dissipation  $D$ , elle permet d'accéder en temps réel aux propriétés viscoélastiques du matériau adsorbé. En effet pour les systèmes biologiques, qui sont intrinsèquement mous, l'interaction avec la surface du cristal se fait très souvent par interaction électrostatique, ce qui sous entend que le couplage matériau-surface n'est pas rigide. Ainsi lors de l'amortissement

de l'oscillation du cristal, une partie de l'énergie peut être dissipée au travers du dépôt.

L'amortissement de l'oscillation du cristal est alors défini comme suit :

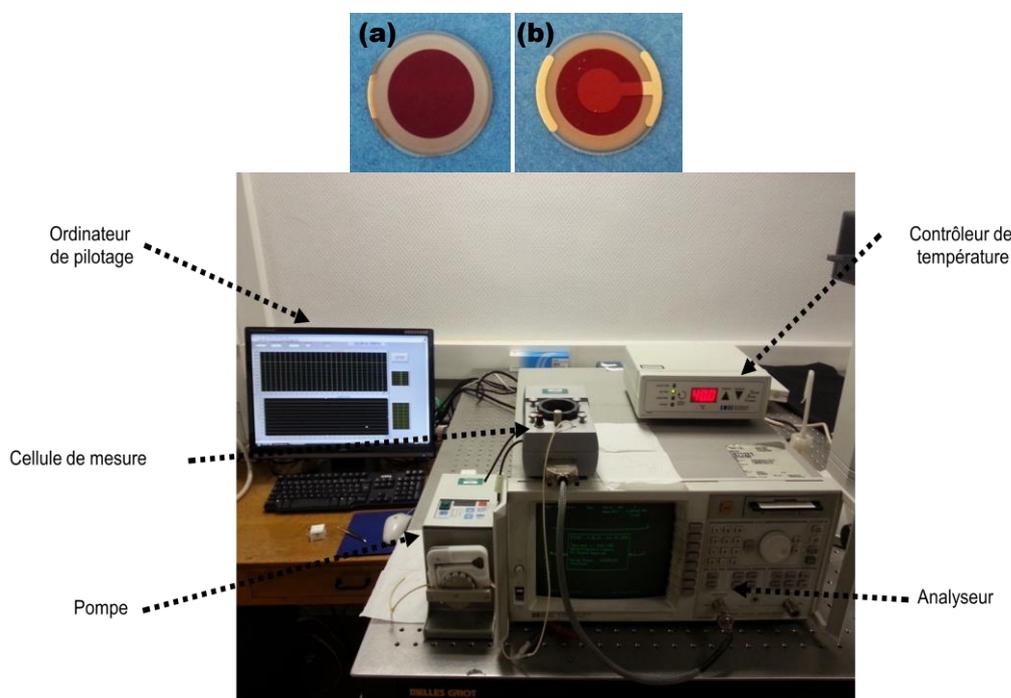
$$D = \frac{E_{perdue}}{2\pi \cdot E_{accumulée}} \quad 3.18$$

où  $E_{perdue}$  est l'énergie perdue (dissipée) pendant un cycle d'oscillation et  $E_{accumulée}$  l'énergie totale stockée dans l'oscillateur.

En mesurant la variation de la dissipation,  $\Delta D$ , il est ainsi possible de remonter aux propriétés viscoélastiques du matériau adsorbé.

## 2. Montage expérimental

Ce montage élaboré au LOMA par le Pr Gérard Couturier est composé d'une cellule liquide commerciale (QCM 500W-KVM) et d'une pompe (REGLO Digital MS-2/6, ISMATEC) (Figure 53). La pompe permet d'injecter les solutions contenant les vésicules lipidiques lors de la formation des bicouches et d'effectuer les étapes nécessaires de rinçage. Sur la plateforme utilisateur le logiciel LABVIEW est utilisé pour enregistrer les données.



**Figure 53.** Montage expérimental de la microbalance à quartz utilisée dans le cadre de cette thèse. Les images (a) et (b) montrent la face de mesure et les électrodes accolées à la lame de quartz (14mm en diamètre et 3mm en épaisseur).

## Méthodes annexes

### 1. Diffusion dynamique de la lumière (DLS)

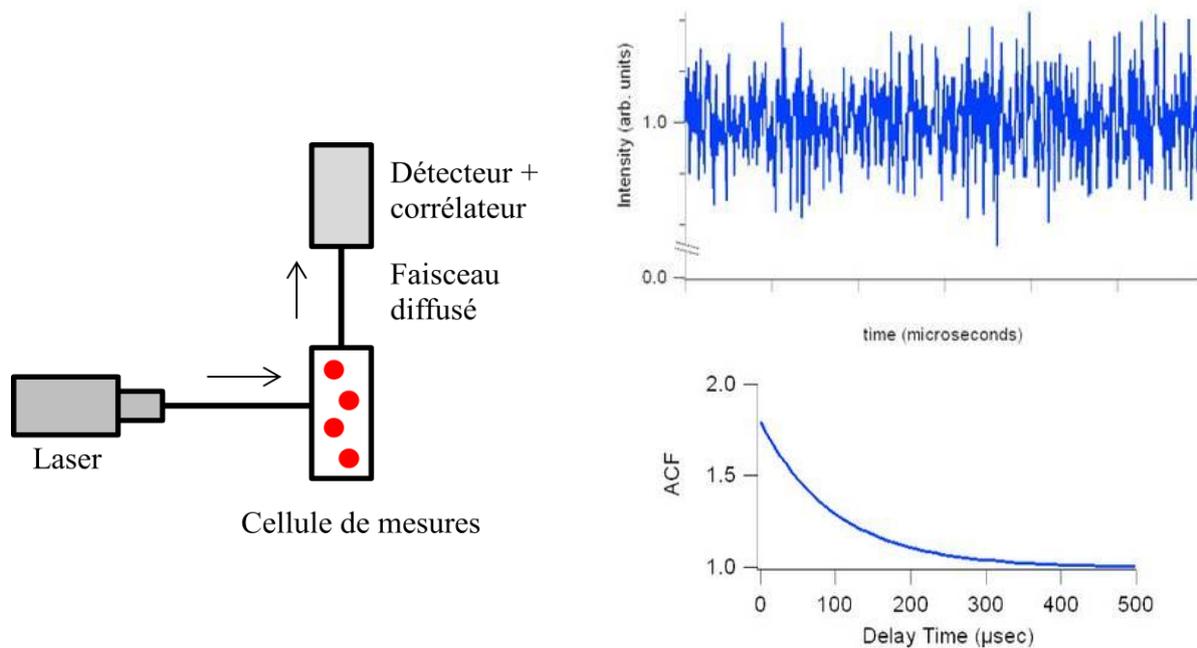
La DLS est une technique simple et rapide pour mesurer les dimensions de particules ou de macromolécules en solution. Elle fournit des informations sur la taille, la forme des particules mais aussi sur la nature des interactions entre les particules et leur environnement. Cette technique a plusieurs avantages : elle ne nécessite pas (ou peu) de préparation de l'échantillon, et les temps de mesure sont très courts, typiquement de quelques secondes à quelques minutes. Lors de ce travail, nous l'avons appliquée afin de déterminer les tailles des NPs et les diamètres des vésicules lipidiques.

Deux types de montage ont été utilisés pour les mesures de DLS : un appareil commercial, le Malvern Zetasizer Nano ZS et un montage optique réalisé au LOMA, composé d'un goniomètre compact CGS-3 équipé d'un corrélateur 7004, d'un laser He-Ne ( $\lambda = 632,80\text{nm}$ ) fonctionnant à une puissance entre 100 et 300 mW, et d'un photomultiplicateur pour recueillir la lumière diffusée.

Le principe de cette technique consiste à envoyer un faisceau laser incident d'une intensité donnée dans une cellule de mesure contenant la solution de particules à caractériser. A la sortie de la cellule l'intensité du faisceau diffusé par les particules est mesurée au cours du temps grâce à un détecteur positionné à un angle  $\Theta = 90^\circ$  par rapport à la direction du faisceau incident (Figure 54). La variation de l'intensité au cours du temps est due au mouvement aléatoire des particules (mouvement brownien), qui lui-même est lié à l'agitation thermique. Le signal obtenu à partir de la lumière diffusée est traité au moyen d'un corrélateur (Figure 54), qui génère alors une fonction d'autocorrélation  $G(t)$  :

$$G(t) = I(t).I(t + \tau) \quad \mathbf{3.19}$$

où  $I$  est l'intensité mesurée,  $t$  le temps et  $\tau$  le temps de relaxation.



**Figure 54 :** Principe du montage de DLS (angle de mesure à 90° par rapport à la direction incidente). La courbe du haut correspond au signal optique mesuré au cours du temps, tandis que celle du bas correspond à la courbe d’auto-corrélation obtenue après traitement du signal optique (courbes extraites de [www.horiba.com](http://www.horiba.com)).

Cette fonction dépend du coefficient de diffusion translationnelle  $D$  des particules (supposées sphériques et monodisperses), tel que :

$$G(t) \propto \exp(-2Dq^2\tau) \tag{3.20}$$

où  $q$  est le vecteur d’onde de transfert tel que  $q^2 = \frac{\Gamma}{D}$  ( $\Gamma$  la constante de décroissance s’obtenant facilement par un ajustement de la courbe d’autocorrélation). L’analyse de la fonction  $G(t)$  permet de déterminer  $\tau$  et  $D$ . Enfin pour une température  $T$  et une viscosité  $\eta$  données, les mouvements aléatoires sont modélisés par la relation de Stokes-Einstein (équation 3.21) qui exprime le coefficient de diffusion  $D$  en fonction du rayon hydrodynamique  $R_h$  des particules<sup>18</sup> et des propriétés physiques du milieu ( $T, \eta$ ) tel que :

$$D = \frac{k_B T}{6\pi \cdot \eta R_h} \tag{3.21}$$

<sup>18</sup> Rayon hydrodynamique : rayon de la particule mesuré à partir de son mouvement brownien, prenant en compte la forme de l’objet et son hydratation.

où  $k_B$  est la constante de Boltzmann. Cette expression permet finalement de déterminer le rayon  $R_h$  de la particule (NP ou vésicule dans notre cas).

## 2. Microscopie électronique à balayage (MEB)

Le microscope électronique à balayage ou MEB permet d'obtenir des images de la surface de pratiquement tous les matériaux solides, en bénéficiant d'un grossissement de 500000, voire plus. L'obtention d'une image par MEB impose le traitement de la surface avant son examen. Dans notre cas, une fine couche d'or a été déposée à la surface de nos échantillons (mica + NP). La réalisation de l'image se fait au moyen d'un faisceau d'électrons qui balaye la surface de l'échantillon, générant des électrons secondaires accélérés en direction d'un détecteur. L'image obtenue en MEB est ensuite reconstituée en se basant sur la cartographie de l'intensité du signal reçu par le détecteur.

Nos échantillons ont été observés à l'aide d'un appareil JEOL JSM-5910LV disponible à l'ICMCB (Institut de Chimie de la Matière Condensée de Bordeaux).

## CHAPITRE IV : Etude des films lipidiques et leurs interactions avec des SiO<sub>2</sub>-NPs

### *Introduction*

Avant d'étudier l'interaction de nos modèles membranaires avec des nanoparticules de silice (SiO<sub>2</sub>-NPs), il est nécessaire de comprendre le comportement de ces modèles et des surfaces nanostructurées utilisées.

La première partie de ce chapitre est donc dédiée à la réalisation et à la caractérisation de nos surfaces nanostructurées par MEB (topographie de surface) et AFM (topographie de surface et dimensions des NPs).

La seconde partie sera consacrée à l'étude de films monomoléculaires lipidiques plans, selon le cheminement suivant :

- étude des monocouches lipidiques à l'interface air-eau (réalisation des isothermes de compression) ;
- transfert de ces films sur du mica (méthode de LB) et caractérisation par microscopie de fluorescence (organisation latérale microscopique) et AFM (organisation latérale et perpendiculaire au support à l'échelle nanométrique, et signatures mécaniques). Bien que l'imagerie par AFM ne nécessite pas la présence d'une sonde fluorescente, les images AFM présentées dans ce chapitre correspondent à des films LB contenant 0,5 mol% de NBD-PC, ce qui nous a permis d'étudier systématiquement tous ces films par les deux méthodes d'imagerie. Nous préciserons donc également les précautions prises concernant la présence de cette sonde.

Nous présenterons tout d'abord les résultats obtenus dans le cas de films LB de lipides insaturés, POPC et OPPC, et mettrons en évidence un phénomène de vieillissement de ces films dû à leur oxydation. Puis nous commenterons les résultats obtenus dans le cas de deux lipides saturés, le DMPC et la SM. Dans le cas de ces deux lipides, nous traiterons de l'apport spécifique de l'AFM (autre que celui en termes d'imagerie) en abordant en détails la détermination de l'épaisseur d'un film LB, de la différence de hauteur entre deux phases lipidiques et de leurs propriétés nanomécaniques.

La troisième partie de ce chapitre sera dédiée à l'étude des interactions de films LB avec les SiO<sub>2</sub>-NPs, en nous attachant en particulier à l'influence des dimensions des NPs ou de leur état d'agrégation sur l'organisation lipidique.

Enfin nous finirons par l'étude de bicouches supportées de DMPC seules et en interaction avec des SiO<sub>2</sub>-NPs. Dans cette partie nous nous intéressons à l'effet de la taille des SiO<sub>2</sub>-NPs sur l'intégrité de la bicouche lipidique.

## 1. Réalisation et caractérisation des surfaces nanostructurées

### 1.1. *Distribution des SiO<sub>2</sub>-NPs étudiée par DLS*

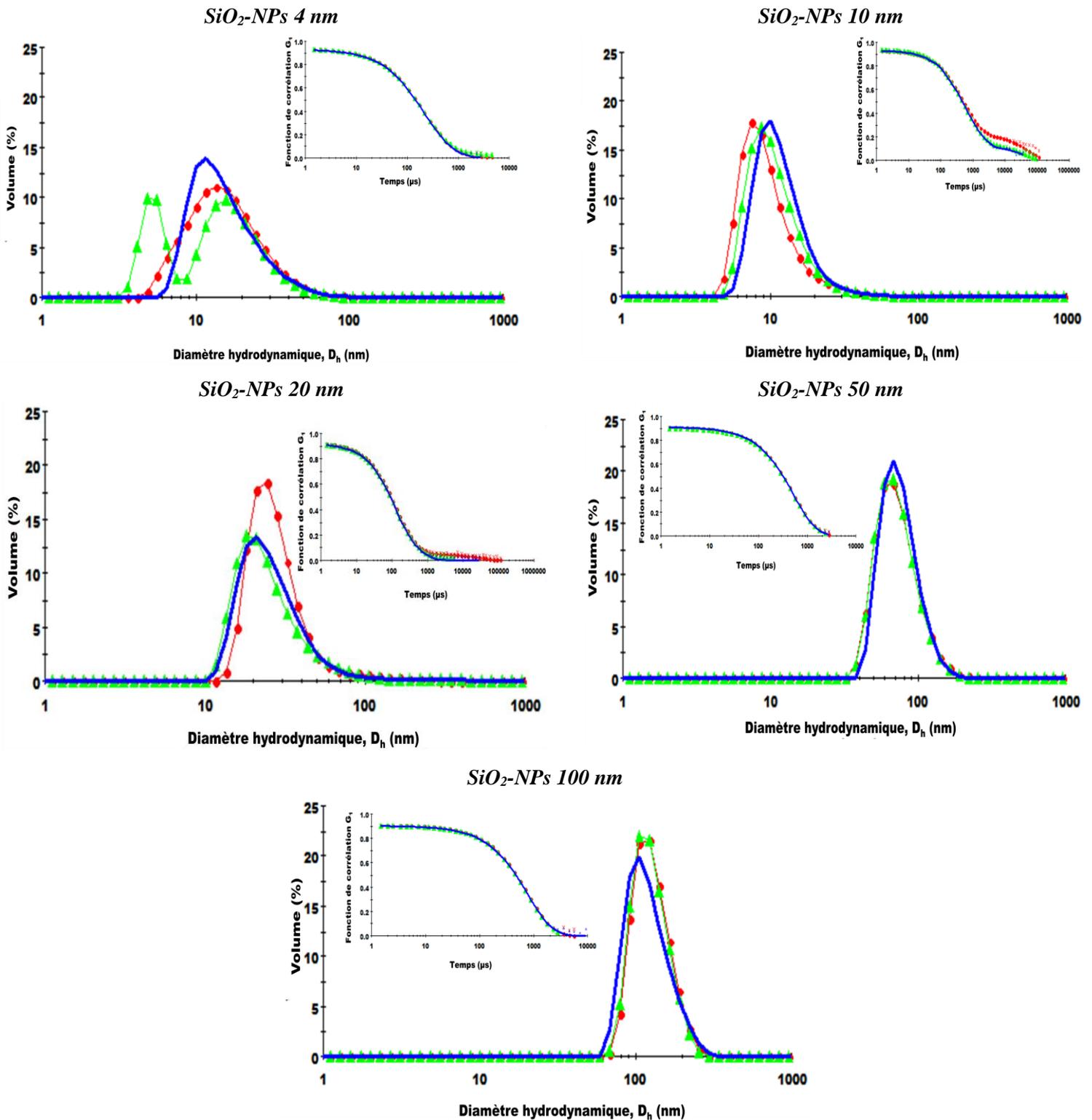
Un des objectifs premiers de ce travail a tout d'abord été de préparer les surfaces nanostructurées par dépôt de SiO<sub>2</sub>-NPs sur un support solide, ici le mica. Comme il a été mentionné dans l'introduction, l'internalisation des NPs dans la cellule dépend en grande partie de leurs propriétés physico-chimiques. Dans ce travail, nous nous sommes donc attachés à étudier l'influence du diamètre des NPs sur l'organisation de films lipidiques plans, en utilisant des NPs de diamètres différents compris entre 4 et 100 nm.

Avant leur utilisation, des mesures de DLS (principe de cette technique décrit dans le chapitre 3) ont été réalisées pour chaque suspension colloïdale afin de déterminer la distribution de diamètre des NPs. Une fois les NPs déposées sur le mica, avant le transfert des films lipidiques, les surfaces nanostructurées nues ont été observées en AFM et en MEB pour s'assurer de l'état des dépôts. De plus nous avons utilisé l'AFM pour estimer les diamètres moyens des NPs « sèches » (après leur dépôt sur le mica et séchage). Le couplage de ces différentes techniques nous a permis d'estimer avec précision les diamètres pour chaque suspension colloïdale.

En pratique, afin d'éviter de fausser les mesures en DLS, les solutions de NPs sont d'abord nettoyées par centrifugation-rinçage (trois cycles au minimum, pendant environ 1 heure et à 12000 rpm) afin d'enlever toutes les impuretés. Entre chaque cycle un volume de surnageant de 800 µL est prélevé et les NPs sont re-dispersées dans un volume équivalent d'eau ultra pure. Une fois les NPs nettoyées, les solutions obtenues sont plongées dans un bain d'ultrasons pendant 30 minutes pour éviter leur agrégation puis diluées pour les mesures de DLS. Pour chaque dimension de NPs, plusieurs tests ont été réalisés indépendamment et de manière identique à partir de différentes dilutions au 1/500 (courbe en bleu), 1/1000 (courbe

en rouge), 1/2000 (courbe en vert) d'une même suspension colloïdale. Pour les NPs de 4 nm de diamètre ces dilutions correspondent à des concentrations de 0,3 mg.mL<sup>-1</sup>, 0,15 mg.mL<sup>-1</sup> et 0,08 mg.mL<sup>-1</sup> respectivement. Pour celles de 20 nm de diamètre les concentrations correspondantes sont 0,8 mg.mL<sup>-1</sup>, 0,4 mg.mL<sup>-1</sup> et 0,2 mg.mL<sup>-1</sup>. Enfin pour les NPs de 10 nm, 50 nm et 100 nm de diamètre, les concentrations correspondantes sont de 0,12 mg.mL<sup>-1</sup>, 0,06 mg.mL<sup>-1</sup> et 0,03 mg.mL<sup>-1</sup>.

Les résultats des mesures (fonctions d'autocorrélation et courbes de distribution de taille correspondantes) pour toutes les solutions de NPs utilisées lors de cette étude sont présentés sur la Figure 55. Les résultats sont dans l'ensemble reproductibles, sauf dans le cas des NPs de 4 nm de diamètre et, dans une moindre mesure, dans le cas de celles de 10 nm de diamètre. De plus les courbes de distribution sont unimodales dans le cas des NPs de 10 à 100 nm de diamètre et donc, caractéristiques de solutions monodisperses. Elles sont plus ou moins larges indiquant une plus ou moins grande variation du diamètre autour de la valeur moyenne. Dans le cas des NPs de 4 nm, les deux valeurs de diamètre obtenues sont sans doute dues à une agrégation, malgré le traitement par ultrasons. L'analyse des corrélogrammes pour les temps courts (temps avant que la corrélation commence à décroître) permet d'obtenir des informations sur la taille des NPs. En effet, plus la décroissance (ou la variation du signal) est rapide et plus la taille des particules est faible. Comme on peut le constater ici, ces temps sont de l'ordre de quelques microsecondes concernant les petites NPs (4 nm, 10 nm, 20 nm) et supérieures à 100 µs pour les plus grandes tailles (50 nm et 100 nm). Pour finir, les lignes de base lisses des corrélogrammes pour les NPs de 50 nm et de 100 nm prouvent l'absence d'agrégats dans les suspensions correspondantes alors que pour les petites tailles les lignes de base sont assez bruitées, témoignant de la présence d'agrégats.



**Figure 55.** Courbes de corrélation et de distribution du diamètre hydrodynamique pour les suspensions de  $\text{SiO}_2$ -NPs. Les solutions utilisées ont une concentration entre  $0,03$  et  $0,12 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  et les mesures sont réalisées dans de l'eau ultrapure, à  $25^\circ\text{C}$  pour un angle  $\theta = 90^\circ$ .

Le Tableau 3 regroupe les diamètres hydrodynamiques (ou diamètres de Stokes) des NPs obtenus par DLS et ceux donnés par les fournisseurs. Ce diamètre hydrodynamique fait référence aux mouvements des particules dans un fluide et correspond au diamètre d'une

sphère de même volume que la NP recouverte de sa couche d'eau d'hydratation, qui aurait le même coefficient de diffusion translationnel.

Dans l'ensemble, même si les mesures de DLS donnent des diamètres supérieurs à ceux des fournisseurs, les domaines de valeurs définis en tenant compte des incertitudes sont cohérents.

Taille des NPs	Fournisseur	Ø fournisseur (nm)	Ø en DLS (nm)	Ø en AFM (nm)
SiO <sub>2</sub> -4nm	Alfa Aeser	4 (large distribution)	6 et 15	4-15 (agrégats)
SiO <sub>2</sub> -10nm	Biovalley	10±5	38 ± 11	6 - 20
SiO <sub>2</sub> -20nm	Alfa Aeser	20	22 ± 3	non défini
SiO <sub>2</sub> -50nm	Biovalley	50± 10	89 ± 31	61± 7
SiO <sub>2</sub> -100nm	Biovalley	100± 30	134 ± 3	117 ± 5

**Tableau 3.** Tableau récapitulant les résultats de DLS et les données des différents fournisseurs sur les dimensions des NPs.

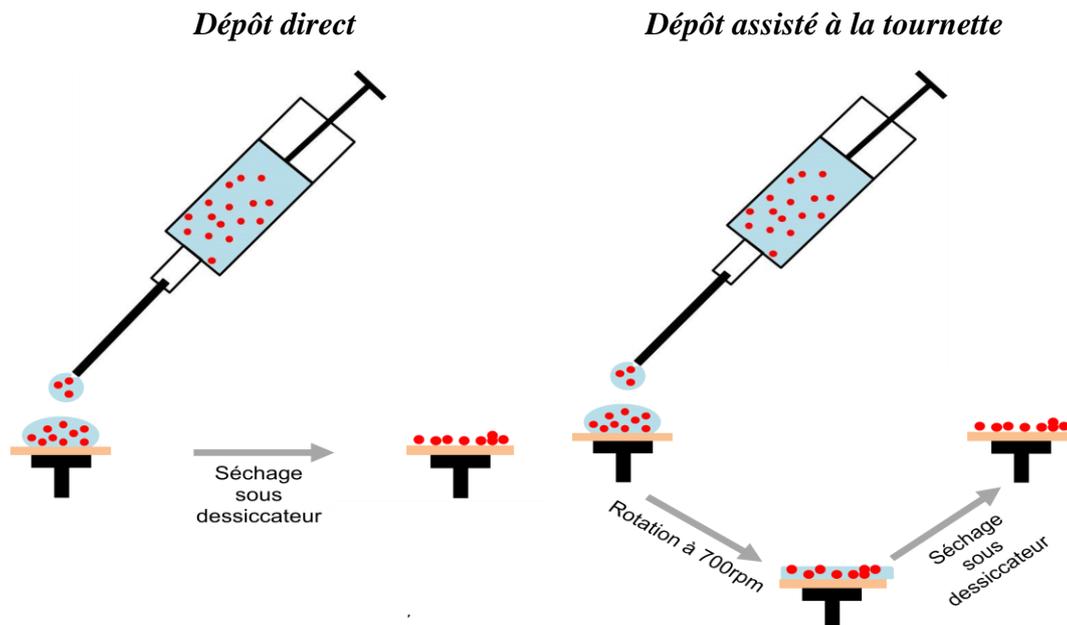
## 1.2. Préparation des surfaces nanostructurées

De nombreuses méthodes permettent actuellement de réaliser des super-réseaux de NPs bidimensionnels ou tridimensionnels. Parmi ces méthodes on peut citer la méthode d'assemblage par électrophorèse utilisant un champ électrique continu [134] ou alternatif [135] qui induit l'organisation des particules. On peut également citer la méthode d'assemblage par forces capillaires qui est essentiellement gouvernée par l'évaporation du solvant après dépôt d'une goutte de solution colloïdale sur une surface, ou le transfert des particules en flottaison sur une surface en utilisant la technique de LB [136, 137]. Dans le cadre de cette thèse nous avons utilisé la méthode par évaporation du solvant, en procédant de deux manières. Après dilution des suspensions de NPs à la concentration adéquate (Tableau 4), un volume de 5 µL de la solution diluée est déposé sur la surface (Figure 56) soit par :

-dépôt direct (ou *cast deposition*) : la solution de NPs est déposée sur le mica et ce dernier est conservé sous dessiccateur pour séchage (minimum 24 heures à température ambiante) ;

-dépôt assisté à la tournette (ou *spin assisted deposition*) : la diffusion des NPs est favorisée par la rotation du mica (700 tours/minute, 1 minute), les conditions de séchage

étant identiques aux précédentes.



**Figure 56.** Méthodes de préparation des surfaces nanostructurées : la méthode par dépôt direct (à gauche) et la méthode par dépôt assisté à la tournette (à droite).

Dans les deux cas, les dépôts sont ensuite caractérisés par AFM et MEB. Le Tableau 4 résume les conditions de concentration utilisées lors de cette étude.

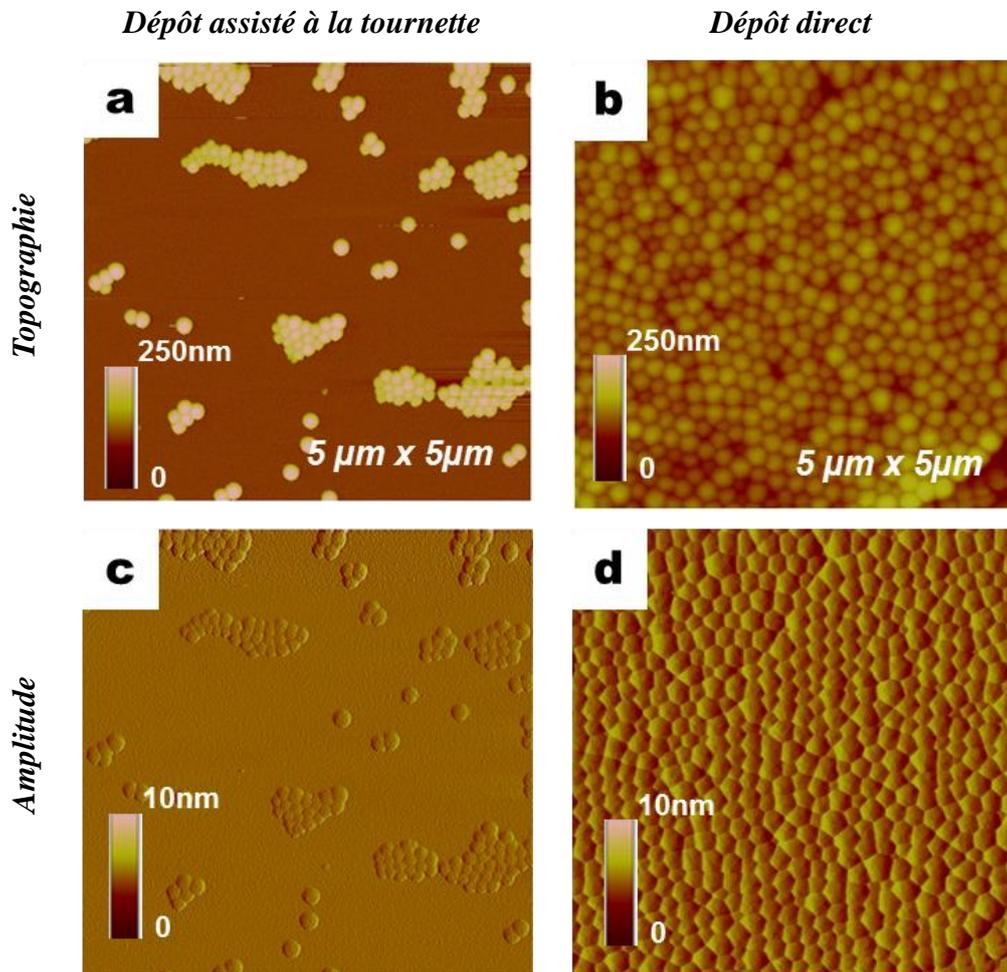
Taille des NPs	4 nm	10 nm	20 nm	50 nm	100 nm
Dilutions (d)	500 et 1000	500	500	50	20
Concentrations (mg/mL)	0,3 et 0,15	0,12	0,8	1,2	2,9

**Tableau 4.** Tableau récapitulant les différentes dilutions et les concentrations correspondantes pour chaque taille de NPs utilisées lors des dépôts.

### 1.3. Caractérisation par AFM et par MEB des surfaces nanostructurées

La Figure 57 montre des images AFM (hauteur et amplitude) de surfaces de mica nanostructurées par dépôt de SiO<sub>2</sub>-NPs de 100 nm de diamètre suivant les deux méthodes de préparation mentionnées. Les images AFM montrent des réseaux de NPs de tailles différentes suivant la méthode de dépôt utilisée. Pour les surfaces préparées à partir de la méthode de dépôt direct, les images (Figures 57b et 57d) montrent une tendance des NPs à se confiner formant ainsi des réseaux hexagonaux très denses et très étendus sur la surface du mica. La

présence de ces réseaux est due au phénomène d'agrégation, d'une part sous l'effet du mouvement du solvant (ici l'eau), et d'autre part lors de l'évaporation de ce dernier. On note également sur certaines zones de la surface la formation de multicouches de NPs (essentiellement des bicouches dans notre cas).

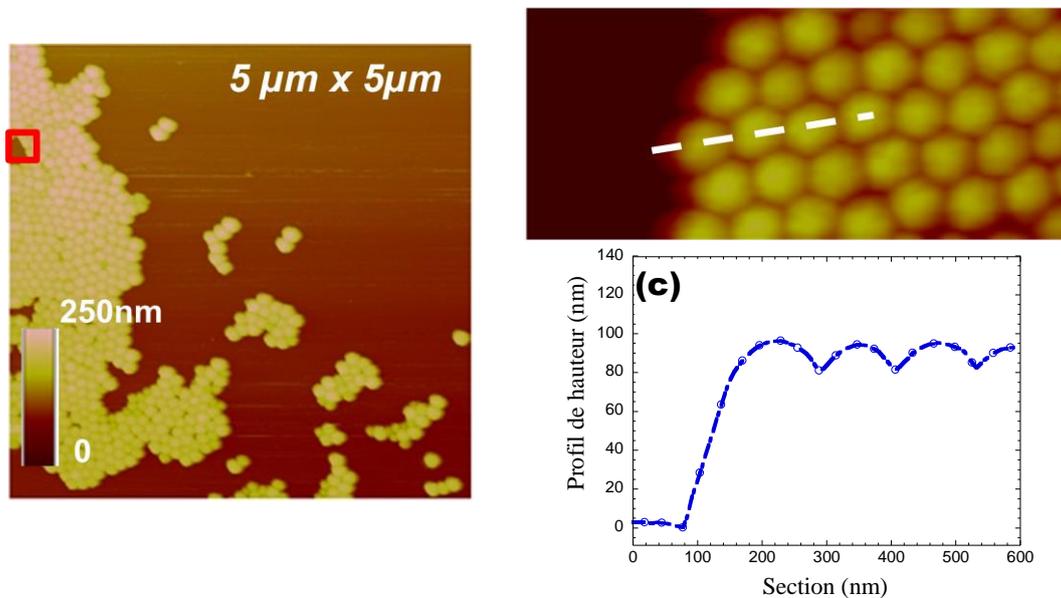


**Figure 57.** Images d'AFM ( $5\mu\text{m} \times 5\mu\text{m}$ ) d'une surface nanostructurées par dépôt de  $\text{SiO}_2$ -NPs de 100 nm de diamètre sur une lame de mica.

Contrairement à la méthode précédente, la méthode de dépôt assisté à la tournette produit des surfaces nanostructurées beaucoup moins denses avec des NPs isolées et/ou des petits agrégats de NPs (Figures 57a et 57c). En effet, sous l'effet de l'agitation mécanique (utilisation de la tournette), les NPs ont une probabilité plus faible de rentrer en contact les unes avec les autres lors de l'évaporation de l'eau, ce qui limite la formation de gros agrégats.

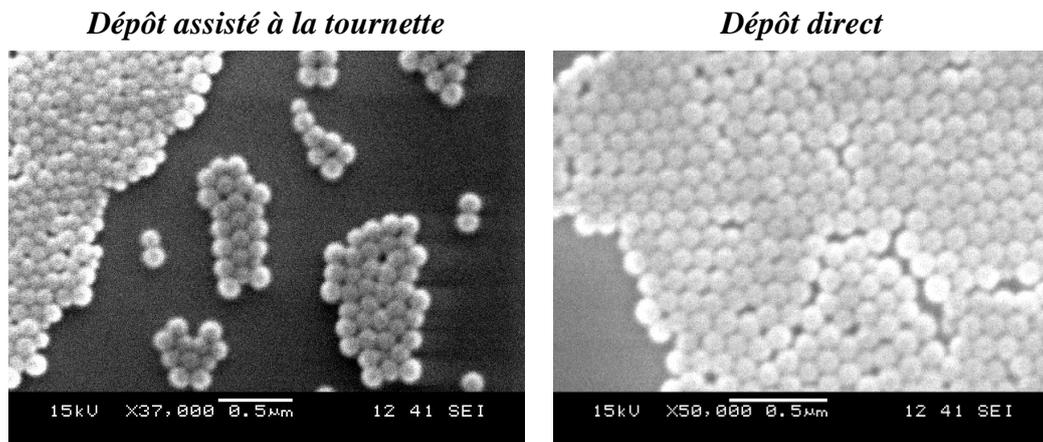
En plus de l'imagerie de surface, nous avons également exploité l'AFM afin de déterminer les dimensions des NPs en mesurant leur diamètre moyen. Pour cela nous avons réalisé des sections soit sur des NPs isolées soit sur des zones comportant des réseaux hexagonaux

comme le montre la Figure 58. Les Figures 58a et 58b montrent des images AFM et MEB d'une surface nanostructurée obtenue par la méthode de dépôt assisté à la tournette. Le profil de hauteur représenté ici est obtenu en faisant la moyenne des sections « aller » et « retour » sur l'image 58c qui est un zoom de l'image 58a. Le diamètre moyen mesuré pour les NPs de 100 nm est de  $117 \pm 5$  nm (mesures réalisées sur une centaine de NPs).



**Figure 58.** Images topographiques en AFM (a et c) et image MEB d'une surface nanostructurée par dépôt de  $\text{SiO}_2$ -NPs de 100 nm (b); le graphe (d) représente le profil de hauteur réalisé sur l'image « c » le long de la section indiquée en pointillé.

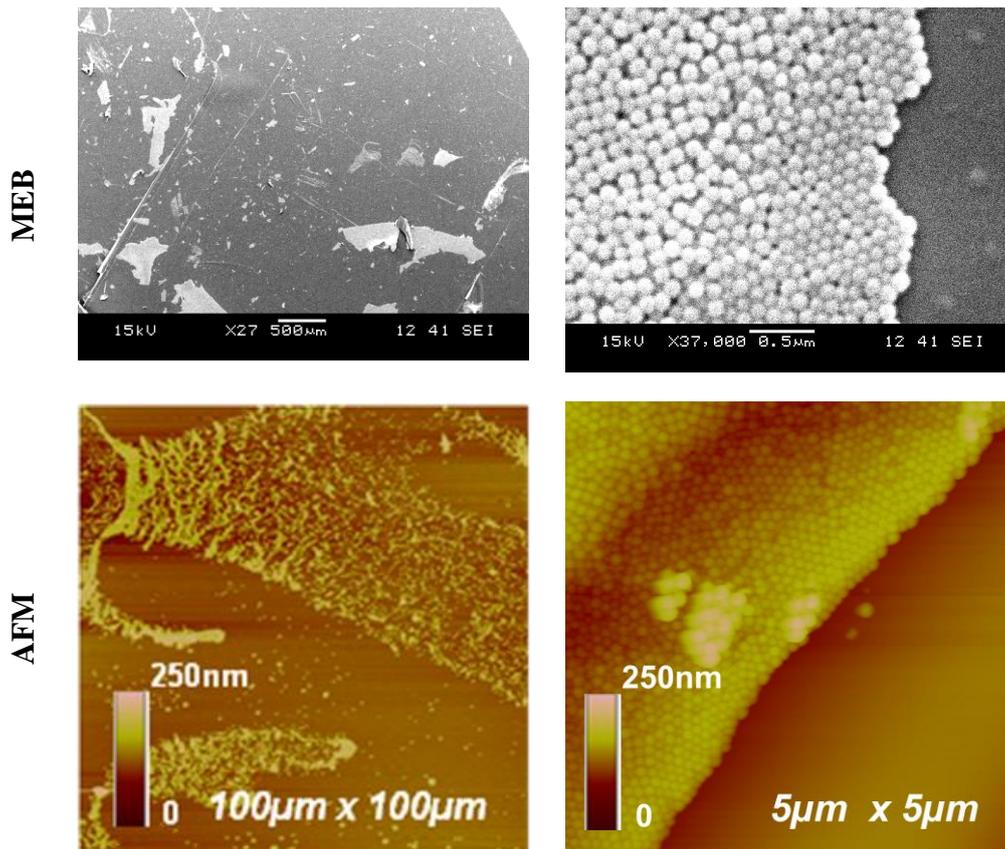
Les résultats obtenus par MEB confirment de façon très nette la présence de réseaux hexagonaux formés par les NPs relativement monodisperses. A titre d'exemple, sur la Figure 59 sont présentées des images de MEB d'une surface nanostructurée par dépôt de  $\text{SiO}_2$ -NPs de silice de 100 nm de diamètre, en utilisant les deux méthodes de dépôt citées plus haut. En effet les NPs s'assemblent sous forme de réseaux hexagonaux avec une distribution spatiale des NPs moins dense par la « méthode assisté à la tournette ». Le même constat est observé pour les autres tailles de NPs avec une caractérisation moins évidente pour les petites tailles (4 nm et 10 nm).



**Figure 59.** Images MEB d'une surface nanostructurée par dépôt de  $\text{SiO}_2$ -NPs de 100 nm de diamètre sur une lame de mica.

Ainsi ces deux méthodes de dépôt permettent de préparer des surfaces nanostructurées de densités surfaciques en NPs différentes. Cependant, dans la suite de ce travail, les supports de mica nanostructurés sont immergés dans l'eau pour la réalisation des monocouches et bicouches planes. Afin de vérifier qu'il reste suffisamment de NPs après immersion, nous avons réalisé la même étude sur des surfaces nanostructurées ayant été immergées environ 90 minutes.

La Figure 60 montre des images obtenues par MEB et par AFM d'une surface nanostructurée par dépôt de NPs de 100 nm de diamètre. Comme on peut le constater, même si une bonne partie des NPs s'est détachée de la surface, une quantité suffisante pour notre étude reste fixée.



**Figure 60.** Images de MEB et d'AFM (topographie) d'une surface nanostructurée par dépôt de NPs de 100 nm de diamètre puis immergée dans de l'eau millipore pendant 90 min.

## 2. Etude des films lipidiques à l'interface air-eau et transférés sur support plan

### 2.1. Cas des lipides insaturés : POPC et OPPC

Comme nous l'avons vu plus tôt, l'étude des modèles membranaires nécessite la prise en compte de paramètres pertinents comme le choix des lipides mais également les conditions expérimentales dans lesquelles les échantillons sont préparés et/ou conservés (température, force ionique...). Dans le cas des bicouches planes, la seconde monocouche doit être en contact avec de l'eau, afin d'avoir un système moléculaire stable. Par contre, dans le cas de monocouches déposées sur un support hydrophile, les chaînes lipidiques sont exposées à l'air. Les lipides sont généralement assez stables chimiquement, mais certains d'entre eux sont sensibles à l'oxydation.

L'oxydation lipidique a été largement étudiée, en particulier dans le cas du cholestérol et des phospholipides polyinsaturés. Les phospholipides monoinsaturés sont également sujets à l'oxydation, mais dans une moindre mesure. Il est donc nécessaire d'étudier la stabilité dans le temps des systèmes lipidiques sensibles à l'oxydation, avant de les utiliser comme modèles membranaires. En effet l'oxydation des lipides peut engendrer des changements importants dans l'organisation des phases lipidiques, en induisant par exemple des séparations de phase dans les membranes biologiques [138-140] et les modèles membranaires [142-146]. En outre, il est intéressant de mieux comprendre le comportement de ces lipides oxydés dans les membranes, puisque ces molécules pourraient être impliquées dans des processus biologiques importants, agissant par exemple comme « balise moléculaire » pour la reconnaissance de cellules par les macrophages [147].

Dans cette partie, nous avons donc étudié la stabilité de films LB constitués de deux lipides insaturés: le POPC <sup>19</sup> et l'OPPC <sup>20</sup>. Tous les deux ont une chaîne saturée (C16) et une autre insaturée (C18:1), mais leur position sur la molécule centrale de glycérol est inversée (Figure 61). Les monocouches de POPC et d'OPPC ont été transférées de l'interface air-eau sur du mica par la méthode LB à une pression de surface de 30 mN.m<sup>-1</sup>, puis observées par AFM immédiatement après leur dépôt, puis deux et cinq jours plus tard.

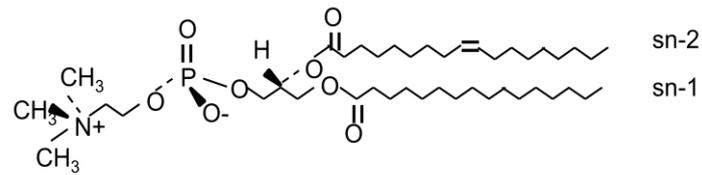
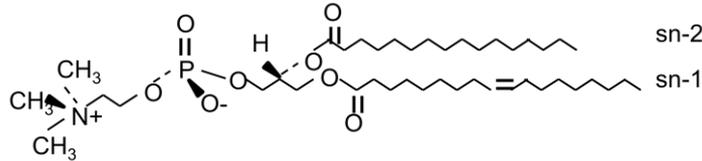
### 2.1.1. Mesures de pression de surface : exploitation des isothermes

La Figure 62 montre les isothermes ( $\Pi$ -A) à l'interface air-eau de ces deux lipides. Ces isothermes, en accord avec celles déjà publiées [148, 149], montrent une augmentation régulière de la pression de surface au cours de la compression. Cette augmentation régulière et les aires moléculaires moyennes suggèrent que ces deux lipides restent en phase liquide expansé ( $L_E$ ) pendant toute la compression dans nos conditions expérimentales, en accord avec leurs températures de transition à -3°C et -9°C pour le POPC et l'OPPC, respectivement [150-152].

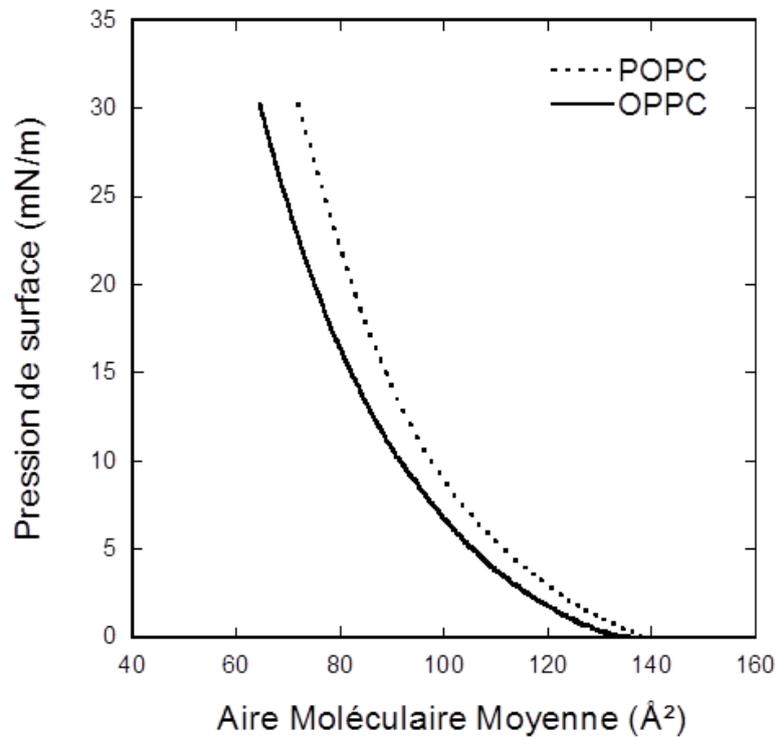
---

<sup>19</sup> POPC : 1-Palmitoyl-2-Oléoyl-Phosphatidylcholine

<sup>20</sup> OPPC : 2-Oléoyl-1-Palmitoyl-Phosphatidylcholine

**POPC****OPPC**

*Figure 61 . Structures chimiques du POPC et de l'OPPC.*

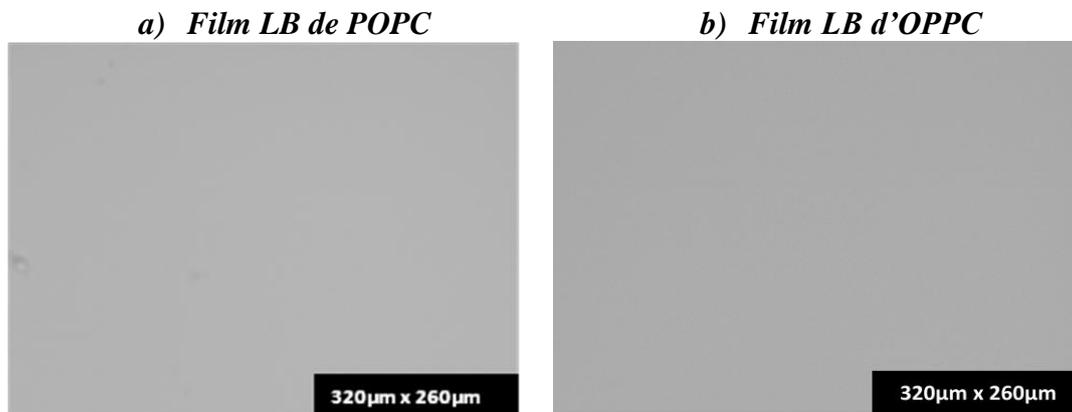


*Figure 62 . Isothermes (II-A) de compression du POPC et de l'OPPC à l'interface air/eau pure ( $20 \pm 1$  ° C, vitesse de compression de  $5 \text{ cm}^2 \cdot \text{min}^{-1}$ ).*

### 2.1.2. Caractérisation par microscopie de fluorescence et AFM de films LB de POPC et d'OPPC

Sur la Figure 63 sont présentées des images de microscopie de fluorescence de films de POPC et d'OPPC fraîchement préparés (J1). Ces images, homogènes à la résolution de la

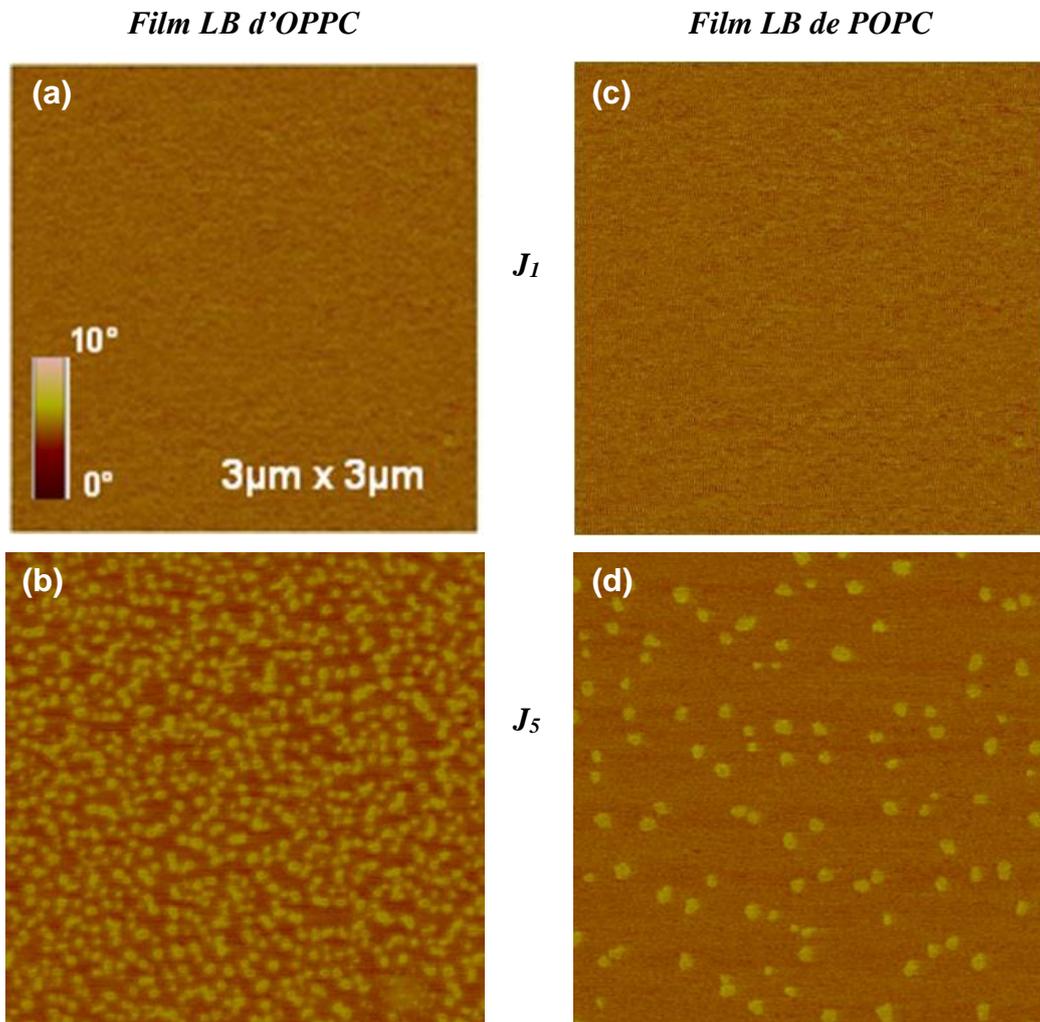
microscopie de fluorescence, confirment les mesures de pression de surface, en montrant la présence d'une phase unique dans laquelle la sonde fluorescente est uniformément répartie. Elles suggèrent également que le support solide, ici le mica, n'affecte pas l'organisation des lipides lors de leur transfert.



**Figure 63.** Images de microscopie de fluorescence de films LB de POPC (a) et d'OPPC (b) contenant 0,5 mol% de NBD-PC transférés à  $30\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$  et à  $T= 20\pm 1^\circ\text{C}$ .

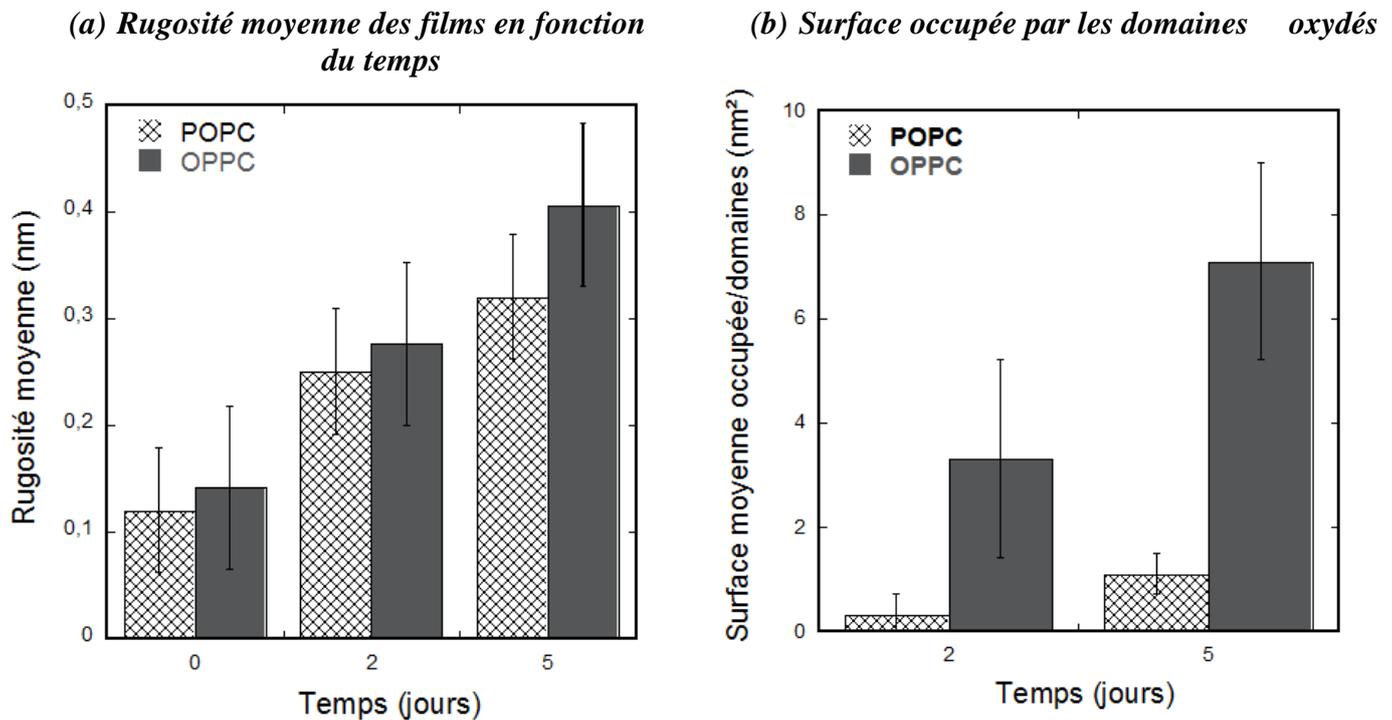
Les Figures 64a et 64b montrent des images AFM de phase des films LB de POPC et d'OPPC juste après leur transfert (J1). Ces images sont toutes réalisées en mode tapping répulsif dominant pour obtenir des informations sur la topographie des échantillons. Dans les deux cas, ces images très homogènes confirment, avec une résolution latérale meilleure que celle de la microscopie de fluorescence, que les deux lipides sont dans une seule phase, la phase liquide expansé.

Les Figures 64c et 64d montrent également des images d'AFM de phase des mêmes films de POPC ou d'OPPC cinq jours plus tard (J5). Ces images sont nettement différentes des précédentes : les deux films ne sont plus homogènes, la surface étant parsemée de petits domaines répartis régulièrement.



**Figure 64 .** Images AFM de phase en mode tapping répulsif de films LB d'OPPC (a, b) et de POPC (c, d), fraîchement préparés ( $J_1$ ) et après cinq jours au contact de l'air ( $J_5$ ).

A  $J_1$ , les rugosités de surface moyenne (en tenant compte du bruit expérimental) sont de 0,10 nm et 0,14 nm respectivement (Figure 65), tandis que l'épaisseur moyenne des films (Figure 66), obtenue après un grattage local des films [153], est d'environ 0,5 nm. Le principe de l'expérience de grattage est rappelé dans le chapitre 3.



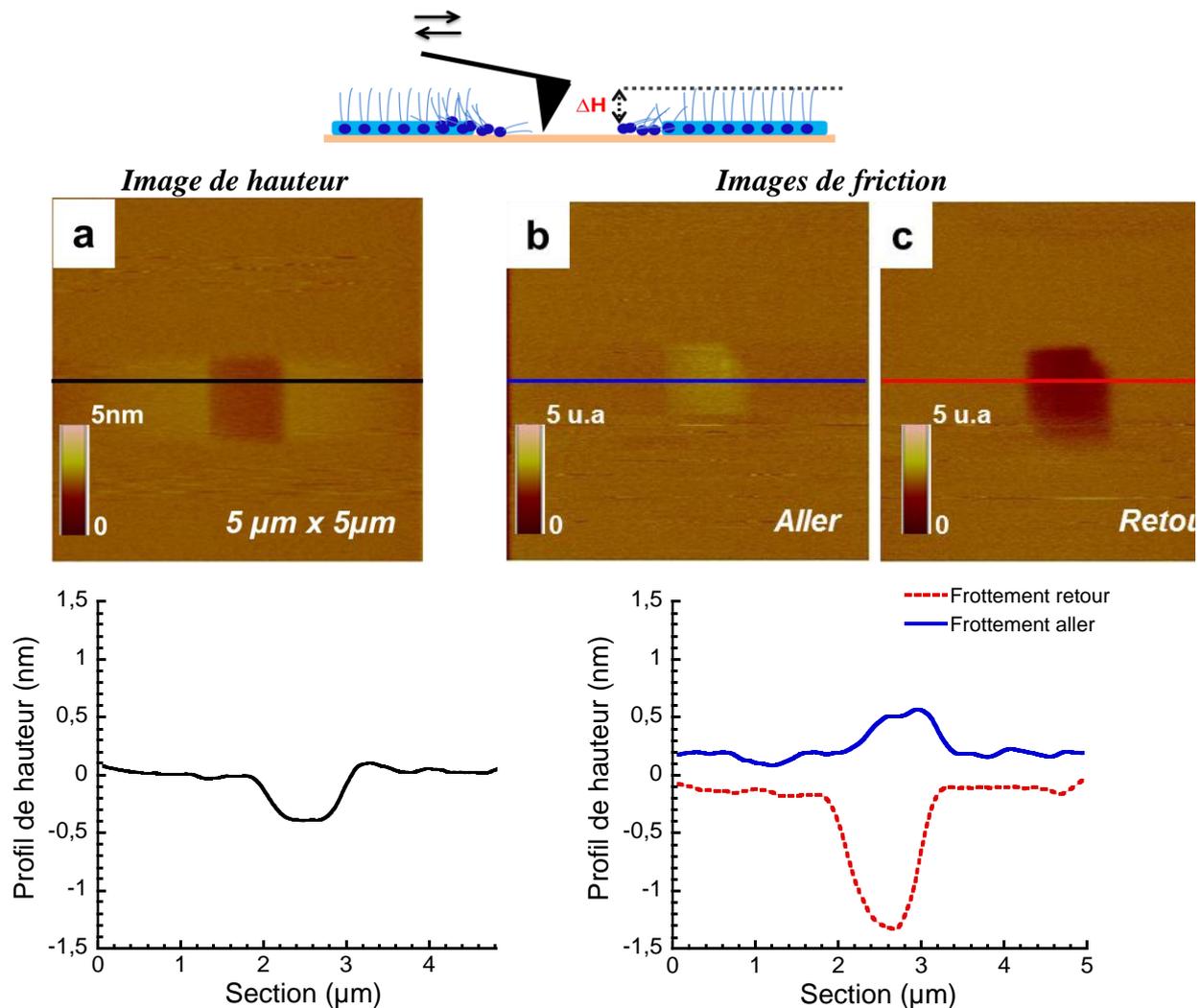
**Figure 65 :** (a) rugosité moyenne de surface et (b) surface moyenne occupée par les domaines dans les films LB de POPC et d'OPPC fraîchement préparés, et après deux ou cinq jours au contact de l'air.

Cette valeur de 0,5 nm est plus faible que la valeur attendue de l'ordre de 2 nm. Ainsi, Grossfield et coll. ont réalisé des simulations sur des bicouches de POPC et estimé leur épaisseur à 3,8 nm (soit 1,9 nm pour une monocouche) [154, 155]. Garcia-Manyes et coll. ont, eux, procédé à des expériences de spectroscopie de force en AFM sur des films LB de POPC et ainsi déterminé leur épaisseur à 2 nm [126]. La faible épaisseur déterminée dans notre cas peut s'expliquer par l'inadéquation entre la méthode utilisée (le grattage) et la fluidité des films liée à la phase liquide expansé des lipides. En effet Garcia-Manyes et coll. soulignent dans leur étude que l'estimation de l'épaisseur d'un film LB par grattage est difficile dans le cas de films de lipides fluides, ces lipides ayant tendance à rediffuser immédiatement après le grattage ou à se coucher sur la surface de mica sous l'effet du déplacement de la pointe [126]. De plus, une possible pollution de la pointe par les lipides peut également expliquer l'écart entre l'épaisseur expérimentale et celle attendue.

La différence de hauteur entre les domaines et la phase liquide expansé du reste de l'échantillon est de 0,8 nm en moyenne. L'étude des frictions en mode contact montre que les domaines sont plus denses que la phase liquide expansé dans les deux cas (données non présentées). Toutefois, certaines divergences sont observées entre les deux lipides dans l'évolution de la rugosité de surface moyenne et la surface moyenne occupée par les

domaines, l'OPPC apparaissant plus sensible au vieillissement que le POPC (Figures 64b et 64c).

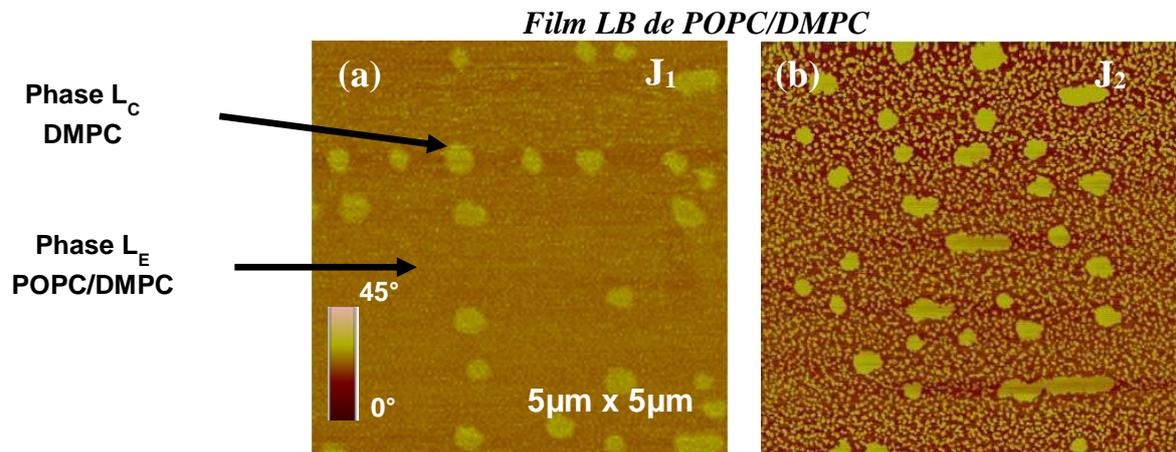
*Schéma représentatif de l'état de surface après grattage d'un film LB lipidique supporté*



**Figure 66 :** Principe de la détermination de l'épaisseur  $\Delta H$  d'un film de POPC par grattage : un microlevier contact ( $k=0.35 \text{ N/m}$ ) est utilisé pour gratter localement la surface de l'échantillon sur  $1 \times 1 \mu\text{m}^2$ . Après le grattage, des sections sur une même zone sont réalisées sur les images topographiques aller (a) et retour (non montrée) et de friction aller (b) et retour (c) de  $5 \times 5 \mu\text{m}^2$ . Le profil de hauteur est obtenu en divisant par 2 la somme des sections sur les images topographiques (aller et retour). Les profils de frottement sont tracés sur une même zone des images de friction aller et retour et la somme de ces deux profils permet également d'obtenir le profil de hauteur.

Des résultats complémentaires ont été obtenus en étudiant des films LB constitués de mélanges binaires contenant un lipide insaturé (POPC ou OPPC) et un lipide saturé, le DMPC (mélanges 1/1 en moles). Dans le cas d'un mélange de POPC-DMPC observé juste après le transfert, on observe la présence de deux phases, le DMPC formant des domaines circulaires en phase liquide condensé  $L_c$  dans une phase fluide de POPC/DMPC (Figure 67).

Cette séparation de phase est liée à la différence de température de transition entre les deux lipides, celle du DMPC étant de 23°C [105]. Deux jours plus tard, les petits domaines décrits précédemment apparaissent uniquement dans les zones contenant le POPC. Enfin, si les échantillons sont conservés sous vide pendant les jours qui suivent leur transfert, aucun domaine n'est observé (résultats non montrés).



**Figure 67.** Images de phase (en mode répulsif) de films LB mixtes de DMPC et POPC (1/1 en mole) transférés sur le mica à  $30 \text{ mN.m}^{-1}$ : le film LB fraîchement préparé (a), et deux jours plus tard (b).

L'ensemble de ces résultats suggère que l'apparition des domaines dans les monocouches de POPC et d'OPPC est due à l'oxydation des chaînes insaturées de ces lipides. À notre connaissance, c'est la première fois que l'oxydation *in situ* est observée par AFM, bien que cette méthode soit particulièrement pertinente pour étudier l'organisation des lipides dans les modèles de membranes plans.

L'oxydation peut se produire de différentes façons, par des mécanismes enzymatiques ou non.

Dans ce dernier cas, l'oxydation est induite par des espèces réactives de l'oxygène comme les radicaux hydroxyles. Elle consiste en trois étapes d'initiation (formation d'un radical lipidique), de propagation (ajout de l'oxygène moléculaire sur le radical) et de terminaison [156] conduisant à la formation de composés variés, comme des lysophospholipides (lipides auxquels il manque une chaîne) ou des lipides dont la chaîne insaturée a été coupée au niveau de la double liaison. Dans ce cas, la chaîne tronquée se termine par une fonction polaire (aldéhyde ou acide carboxylique par exemple) [156]. Les phospholipides polyinsaturés sont plus sensibles à l'oxydation que les monoinsaturés [156], l'oxydation étant de plus rapide. Il a

été montré par exemple par spectroscopie infrarouge que le mode d'étirement de la liaison HC = CH des groupes oléfiniques dans le 1-stéaroyl-2-arachidonyl-phosphatidylcholine a une durée de vie de moins de 15 minutes à l'interface air-eau, même en présence d'argon [157]. Au contraire, des études ont montré que le POPC n'est pas sensible à l'oxydation induite par l'oxygène de l'air à l'interface air-eau [148], ou en solution aqueuse [158]. Toutefois, les monocouches de POPC sont très sensibles à l'ozone [148].

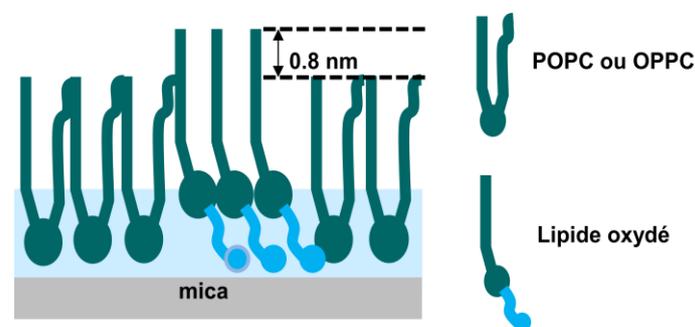
Dans nos conditions expérimentales, il semble que l'oxydation se produise dans les films LB, et non à l'interface air-eau, car les images AFM de films LB fraîchement transférés sont homogènes à la résolution de l'AFM. La distribution des domaines observés dans les films LB suggère que l'oxydation se produit en différents points en même temps, probablement dans des zones présentant une organisation plus « lâche » ou un défaut, l'oxydation se « propageant » à partir de ces zones. Le temps assez long nécessaire pour observer les domaines de lipides oxydés confirme également la résistance relative du POPC et de l'OPPC à l'oxydation par l'oxygène de l'air. Toutefois, l'organisation plutôt régulière des molécules lipidiques dans les films LB (même si les lipides sont dans une phase liquide expansé) pourrait également contribuer à une propagation efficace de l'oxydation. Ainsi, le taux d'oxydation de l'acide arachidonique dans des liposomes de DMPC augmente à une température inférieure à la température de transition de phase du DMPC [159]. De la même manière, la présence de cholestérol dans une bicouche lipidique facilite la propagation des radicaux libres à travers la bicouche, en augmentant l'organisation latérale des lipides [158].

De plus, on observe des différences entre le POPC et l'OPPC, la rugosité moyenne de la surface et la surface moyenne occupée par les domaines étant plus importantes dans le cas de l'OPPC (Figure 65). Cette comparaison suggère que la double liaison n'a pas la même sensibilité à l'oxydation selon que la chaîne insaturée est en position *sn-1* ou *sn-2* (Figure 61). Il a été rapporté que les chaînes n'ont pas la même orientation à proximité du glycérol. Par conséquent, une chaîne est décalée par rapport à l'autre d'environ 1,5 liaisons carbone-carbone, (distance estimée après projection sur la normale à la bicouche) [150]. Cela implique que la double liaison est plus profondément ancrée dans une bicouche d'environ 1.8 à 1.9 Å, quand elle est sur la chaîne *sn-1*, et donc moins enfouie dans le cas de nos monocouches planes. Cette différence, même très faible, semble influencer la sensibilité de la double liaison à l'oxydation dans les films LB, même si des mesures précédentes en RMN n'ont pas montré de différence d'organisation entre les deux lipides dans des vésicules, cette organisation étant

suffisamment étanche pour empêcher les molécules d'eau de pénétrer profondément dans la bicouche [160].

Enfin, si l'AFM montre clairement le phénomène d'oxydation des films LB, elle ne permet pas d'identifier les produits de l'oxydation. La combinaison de la chromatographie en phase liquide et de la spectrométrie de masse a révélé la nature des produits oxydés après un traitement oxydatif (Fe(II), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Des dérivés comportant des fonctions hydroperoxyde, cétone et hydroxyle ont été identifiés. Des dérivés dont la chaîne *sn*-2 est tronquée et se termine par une fonction aldéhyde ou acide carboxylique ont également été trouvés [141]. On peut supposer que des produits dérivés similaires sont également présents dans les films LB de POPC et d'OPPC après oxydation.

De nombreuses études ont montré que des dérivés lipidiques oxydés sont capables de perturber l'organisation de la bicouche, même si des résultats contradictoires ont parfois été trouvés. Par exemple, Sabatini et coll. ont étudié les effets de quantités croissantes de dérivés du POPC comportant une chaîne tronquée finalisée par un groupe aldéhyde ou acide carboxylique dans des monocouches de DPPC. Les lipides oxydés induisent une expansion des monocouches de DPPC à une pression de surface inférieure à 20 mN.m<sup>-1</sup> [141]. Ils ont attribué cette expansion au fait que la chaîne tronquée et plus polaire se renverserait, le groupe polaire carboxyle ou aldéhyde se trouvant alors au voisinage des têtes lipidiques (Figure 68).



**Figure 68.** Renversement de la chaîne oxydée des lipides dans un film LB expliquant le soulèvement des domaines oxydés au dessus de la phase lipidique intacte.

L'hypothèse du renversement de la chaîne est confirmée par RMN [147], et par des simulations de dynamique moléculaire [142, 145, 146], l'orientation de la chaîne non oxydée ne changeant pas.

De plus l'orientation de la chaîne oxydée pourrait être variable : plus ou moins parallèle à l'interface ou plongeant dans la phase aqueuse. Dans ce dernier cas, le groupe polaire serait

exposé à la surface de la membrane. Enfin, une diminution de l'épaisseur de la bicouche est également observée et attribuée à ces changements d'orientation. Dans notre cas, nous avons observé, au contraire, une augmentation de l'épaisseur de la monocouche de l'ordre de 0,8 nm au niveau des domaines oxydés. Cette différence est probablement liée à la nature différente des échantillons. En effet les simulations de dynamique moléculaire ont été effectuées sur des bicouches lipidiques en contact avec de l'eau sur leurs deux faces. De même, les monocouches à l'interface air-eau sont au contact de l'eau. Dans notre cas, les monocouches sont transférées sur un support plan. Même si une fine couche d'eau est transférée avec la monocouche, elle n'est probablement pas suffisante pour permettre à la chaîne oxydée de rester parallèle au support. On peut supposer que le renversement de la chaîne oxydée est plus important, surélevant l'ensemble de la molécule au dessus de la surface de la phase fluide environnante (Figure 68). Une telle orientation pourrait également expliquer l'organisation assez dense observée dans les expériences de frottement.

### 2.1.3. Conclusions

Les films LB de POPC et d'OPPC sont donc sensibles à l'oxydation induite par l'oxygène de l'air, même si ce processus est plutôt lent. Cette oxydation, non observée si les échantillons sont maintenus sous vide, est responsable de la formation de domaines surélevés de 0,8 nm au-dessus de la phase lipidique intacte en phase liquide expansé. Cette augmentation de l'épaisseur est probablement due à une orientation particulière des chaînes oxydées. Concernant les études suivantes sur l'interaction NPs-membrane, il convient donc de prendre des précautions dans le cas des lipides insaturés, en limitant autant que possible le temps entre le transfert du film LB et son observation.

## 2.2. Cas de lipides saturés

### 2.2.1. Etude de films LB de SM-Egg<sup>21</sup> et SM-C16

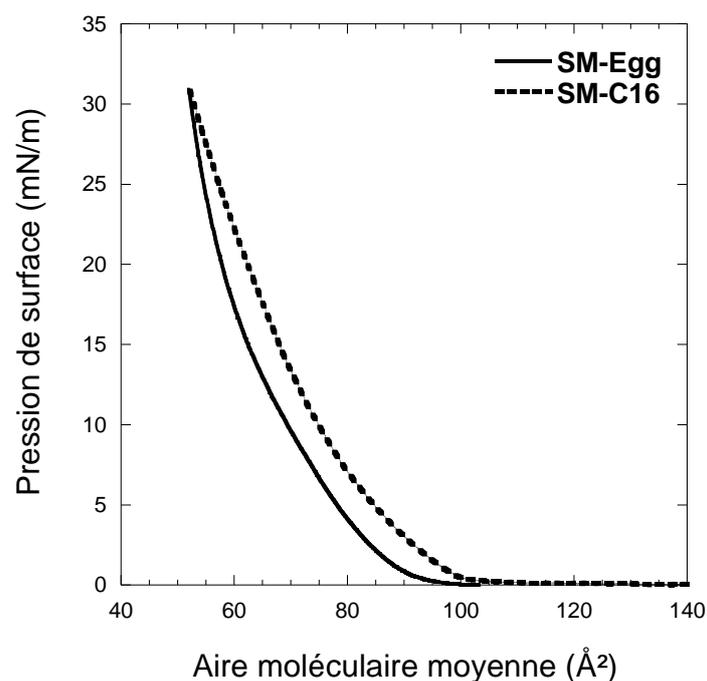
Des travaux antérieurs dans l'équipe ont porté, il y a quelques années, sur le comportement de monocouches constituées de SM-Egg [72, 121]. Nous avons donc choisi initialement ce lipide comme modèle général de sphingolipides. Cependant, nous avons dû par la suite utiliser la SM-C16, aux chaînes parfaitement définies, pour des raisons qui seront expliquées par la suite. Nous présentons ici les résultats obtenus dans les deux cas.

---

<sup>21</sup> SM-Egg : sphingomyéline purifiée à partir du jaune d'œuf

La Figure 69 présente les isothermes de compression de monocouches de SM-Egg et SM-C16, contenant toutes deux 0,5 mol% de NBD-PC. Notons que des mesures comparatives avec et sans cette sonde ont été réalisées pour tous les lipides utilisés dans cette étude : elles n’ont pas montré de changement significatif au niveau des isothermes de chaque lipide.

Ces isothermes montrent une augmentation globalement régulière de la pression de surface au cours de la compression. Cependant on note un changement de pente assez discret entre 5 et 10 mN/m dans le cas de la SM-C16 suggérant une transition de phase de la phase liquide-expansé ( $L_E$ ) à la phase liquide condensé ( $L_C$ ).



**Figure 69.** Isothermes  $\Pi$ -A de compression de monocouches de Langmuir de SM-Egg et de SM-C16 contenant toutes les deux 0,5 mol% de NBD-PC à l’interface air-eau et à  $T = 20 \pm 1^\circ\text{C}$ .

Cette transition de phase  $L_E$ - $L_C$  n’apparaît pas dans le cas de la SM-Egg, ce qui est probablement lié à l’hétérogénéité des chaînes lipidiques constituant ce lipide comme le montre le Tableau 5 [122, 123]. Nous reviendrons sur ce point dans la discussion.

Nature de chaînes	C16:0	C18:0	C20:0	C22:0	C24:0	C24 :1 <sup><math>\Delta</math>15</sup>
Proportion (%)	78	7	2	4	2	3

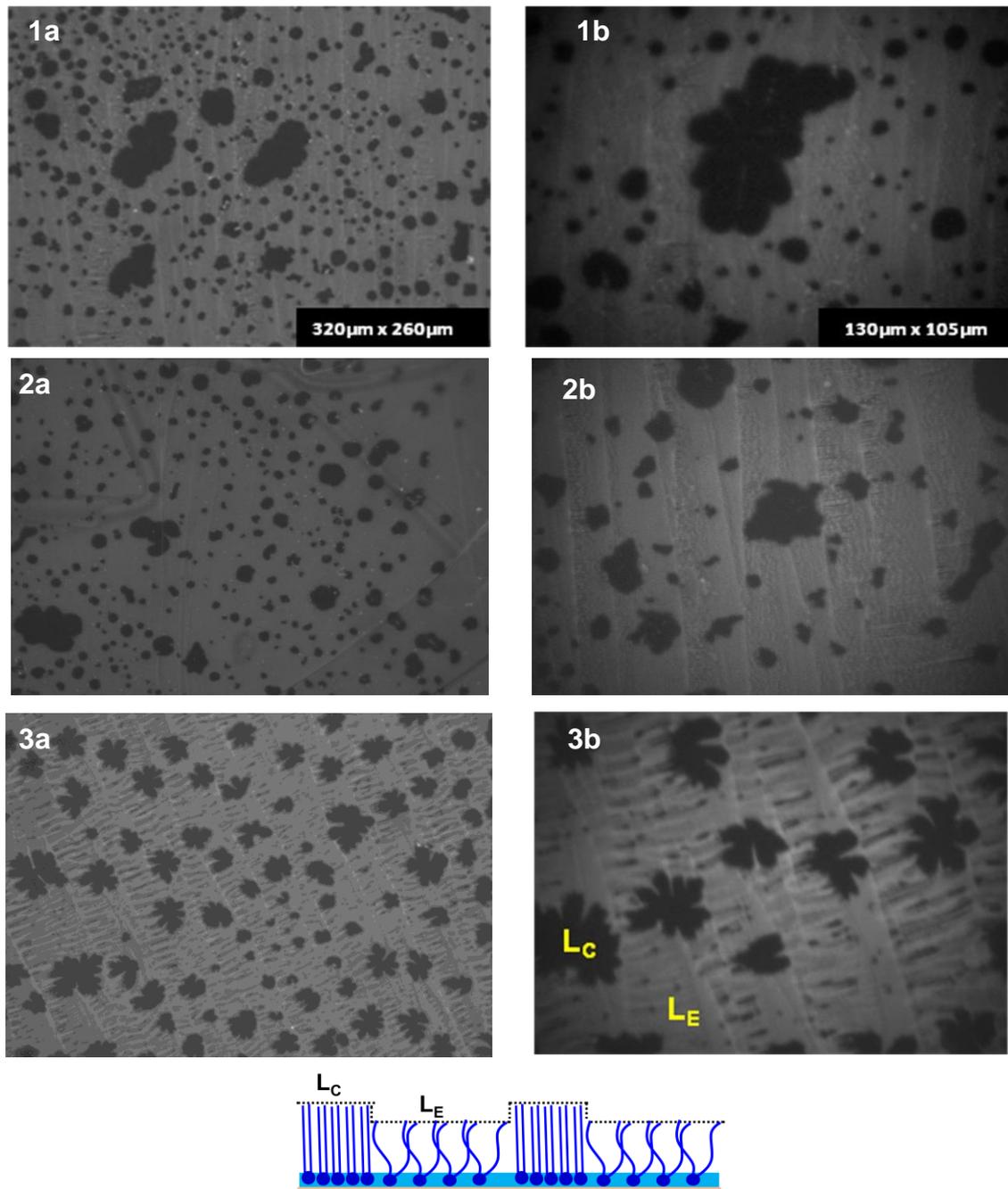
**Tableau 5.** Nature et proportion des chaînes constituant la SM-Egg d’après [123].

Les aires moléculaires moyennes dans les deux cas sont de l’ordre de  $49 \pm 2 \text{ \AA}^2$  et  $50 \pm 2 \text{ \AA}^2$  à une pression de 30 mN/m pour les monocouches de SM-Egg et de SM-C16 respectivement.

On note également que les aires moléculaires moyennes occupées par la SM-Egg et la SM-C16 sont plus faibles que celles observées dans le cas des lipides insaturés (POPC et OPPC), suggérant une organisation plus compacte en accord avec le fait que ces lipides comportent essentiellement ou complètement des chaînes saturées ne formant pas de coude. Ces mesures de pression de surface ne nous permettent toutefois de caractériser ces lipides que de manière très incomplète, d'où leur étude par microscopie de fluorescence et AFM après leur transfert sur du mica. Une fois transférés sur une lame de mica, les filmsLB de SM-Egg et SMC16 sont caractérisés par microscopie de fluorescence (Figures 70 et 71).

Contrairement au cas des lipides insaturés, ces images sont caractérisées par la présence de deux phases, l'une lumineuse et ayant donc concentré la sonde NBD-PC, l'autre sombre et l'ayant donc exclue.

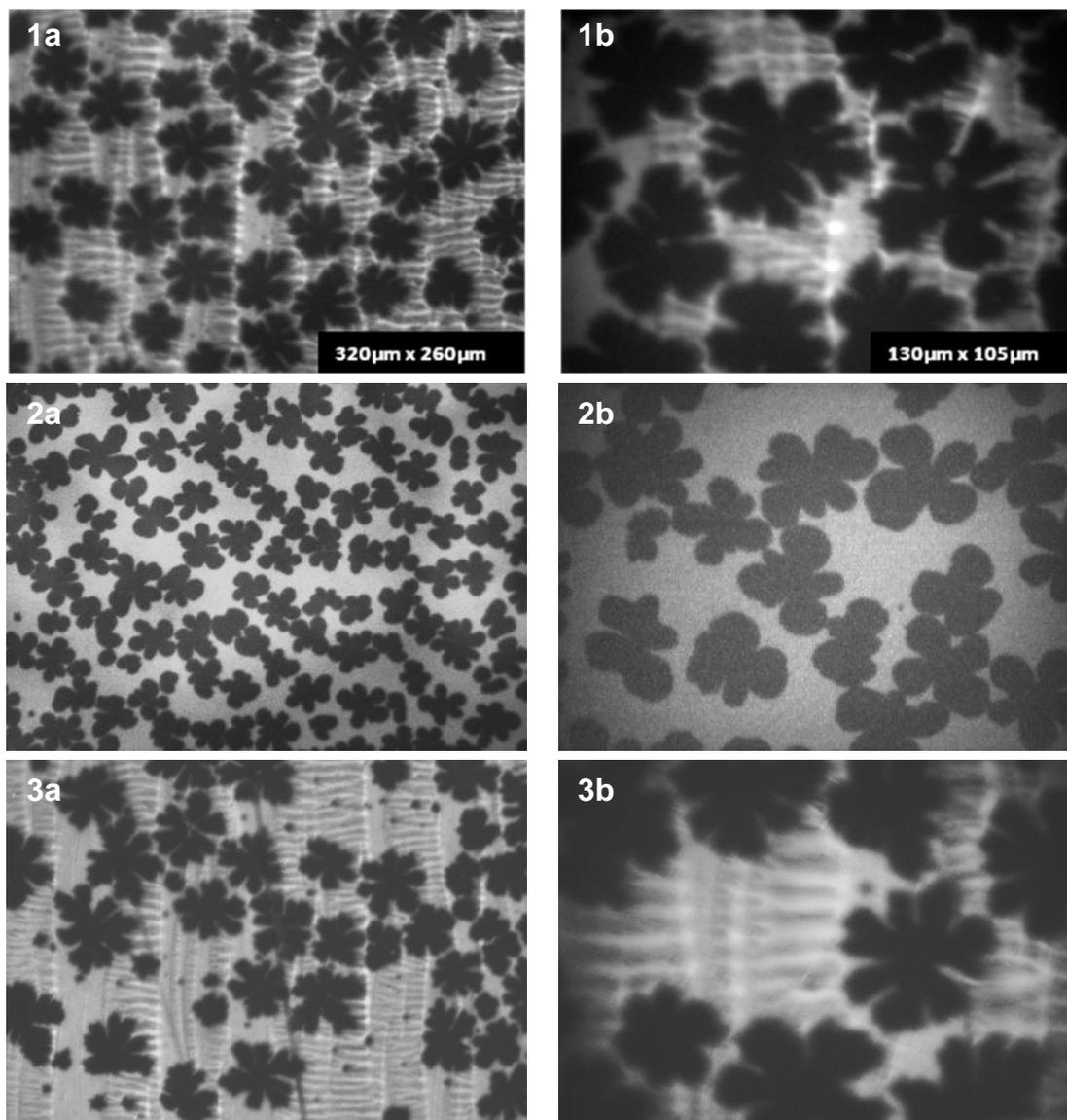
## Différents films LB de SM-Egg



**Figure 70.** Comparaison de différents films LB de SM-Egg + 0,5 mol % de NBD-PC transférés à 30 mN/m et à  $20 \pm 1^\circ\text{C}$ . Les images présentées ici font  $320 \mu\text{m} \times 260 \mu\text{m}$  (colonne de gauche) ou  $130 \mu\text{m} \times 105 \mu\text{m}$  (colonne de droite), et sont prises juste après le transfert. Ces images sont représentatives de la structuration générale des films.

On remarque également la structure du mica sous-jacent. La sonde NBD-PC étant exclue des phases ordonnées [122, 123], les zones lumineuses correspondent à des lipides organisés en phase  $L_E$ , les zones sombres correspondant à des lipides en phase  $L_C$ . On voit donc ici clairement l'intérêt de coupler les mesures de pression de surface à une étude par microscopie, cette dernière révélant une transition de phase invisible sur l'isotherme.

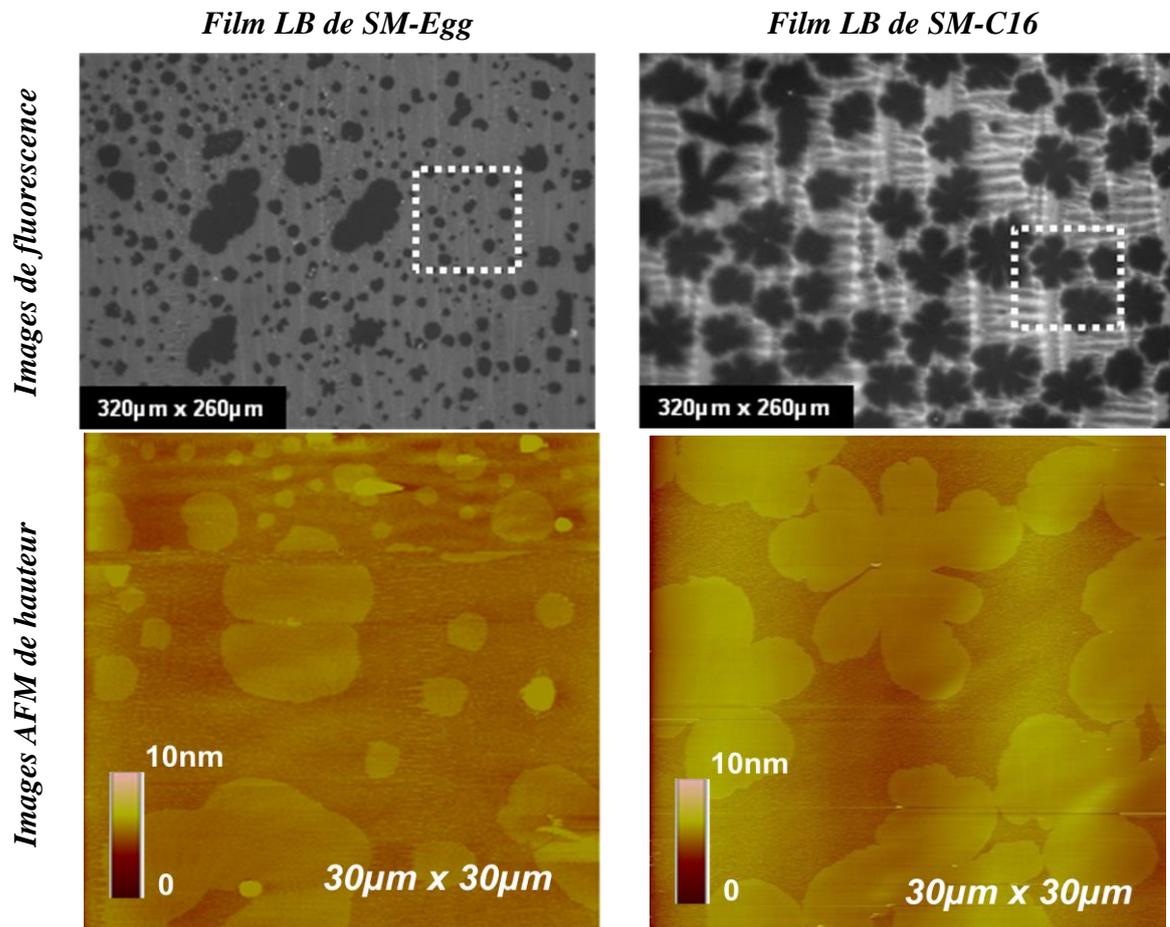
On note cependant une différence de comportement entre la SM-Egg et la SM-C16. Dans le cas de la SM-Egg, les domaines en phase  $L_C$  ont des dimensions variables et des formes irrégulières (en « fleur » ou circulaire) suivant la zone de l'échantillon sondée. Les domaines sont plus homogènes, en dimensions et formes, dans le cas de la SM-C16, la forme en fleur étant nettement prédominante (Figure 71).



**Figure 71.** Comparaison de différents films LB de SM-C16 + 0,5 mol % de NBD-PC transférés à 30 mN/m et à  $20 \pm 1^\circ\text{C}$ . Les images présentées ici font  $320 \mu\text{m} \times 260 \mu\text{m}$  (colonne de gauche) ou  $130 \mu\text{m} \times 105 \mu\text{m}$  (colonne de droite), et sont prises juste après le transfert. Ces images sont représentatives de la structuration générale des films.

Le contraste entre les deux types d'images (image de fluorescence et images AFM) est cependant inversé, les deux méthodes d'imagerie reposant sur des principes totalement différents. En microscopie de fluorescence, le contraste est obtenu par une différence de solubilisation de la sonde fluorescente entre les deux phases, la sonde NBD-PC se solubilisant

préférentiellement dans les zones fluides de l'échantillon [124, 125]. En AFM, le contraste observé en mode topographique est, lui, basé sur les variations de la réponse élastique de l'échantillon et de hauteur. Les domaines en phase  $L_C$  apparaissent plus clairs que la phase  $L_E$  environnante sur les images AFM de topographie. Cette différence de contraste révèle donc que la phase  $L_C$  est plus haute que la phase  $L_E$ .



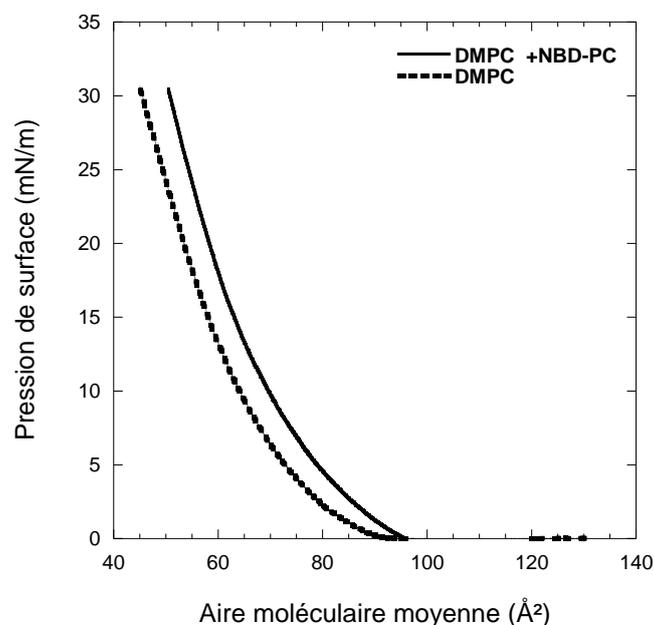
**Figure 72.** Images de fluorescence (ligne du dessus) et d'AFM de hauteur (ligne du dessous) de films LB de SM-Egg et de SM-C16 contenant 0,5 mol % de NBD-PC transférés sur une lame de mica à 30 mN/m et à  $T = 20 \pm 1^\circ\text{C}$ . L'expérience d'AFM est réalisée en mode tapping répulsif à une vitesse de scan comprise entre 0,3 et 1 Hz, à l'air et à température ambiante.

L'analyse des images d'AFM des films LB de SM-Egg et SM-C16 permet de conforter nos premières observations, en confirmant la co-existence des deux phases (Figure 18). Cependant ces images permettent de révéler des détails complémentaires précieux. Ainsi sur les images de topographie, la phase  $L_C$  apparaît plus claire que la phase  $L_E$ . Cette différence de contraste indique une différence de hauteur entre les domaines  $L_C$  et la phase  $L_E$  environnante. Sur les images AFM on constate également que la phase  $L_E$  n'est pas aussi homogène que ce que les images de fluorescence laissent supposer. En effet la phase  $L_E$  est

parsemée de petits domaines (en phase  $L_C$ ) qui ne sont pas visibles sur les images de fluorescence du fait de la limite de résolution de cette méthode.

### 2.2.2. Etude de films LB de DMPC

La Figure 73 présente les isothermes de compression du DMPC et du DMPC contenant 0,5 mol % de NBD-PC. Là encore, les isothermes, d'allures générales similaires, sont très peu décalés (d'environ  $5 \text{ \AA}^2$ ), montrant que l'ajout de la sonde à cette concentration ne modifie pas drastiquement les propriétés de surface de ce lipide. Les aires moléculaires moyennes relevées sur ces isothermes sont du même ordre de grandeur que celles observées dans le cas de la SM-Egg et de la SM-C16, et donc plus faibles que celles observées dans le cas des lipides insaturés POPC et OPPC. Cela suggère donc que le DMPC s'organise en cours de compression de manière assez compacte et dense.

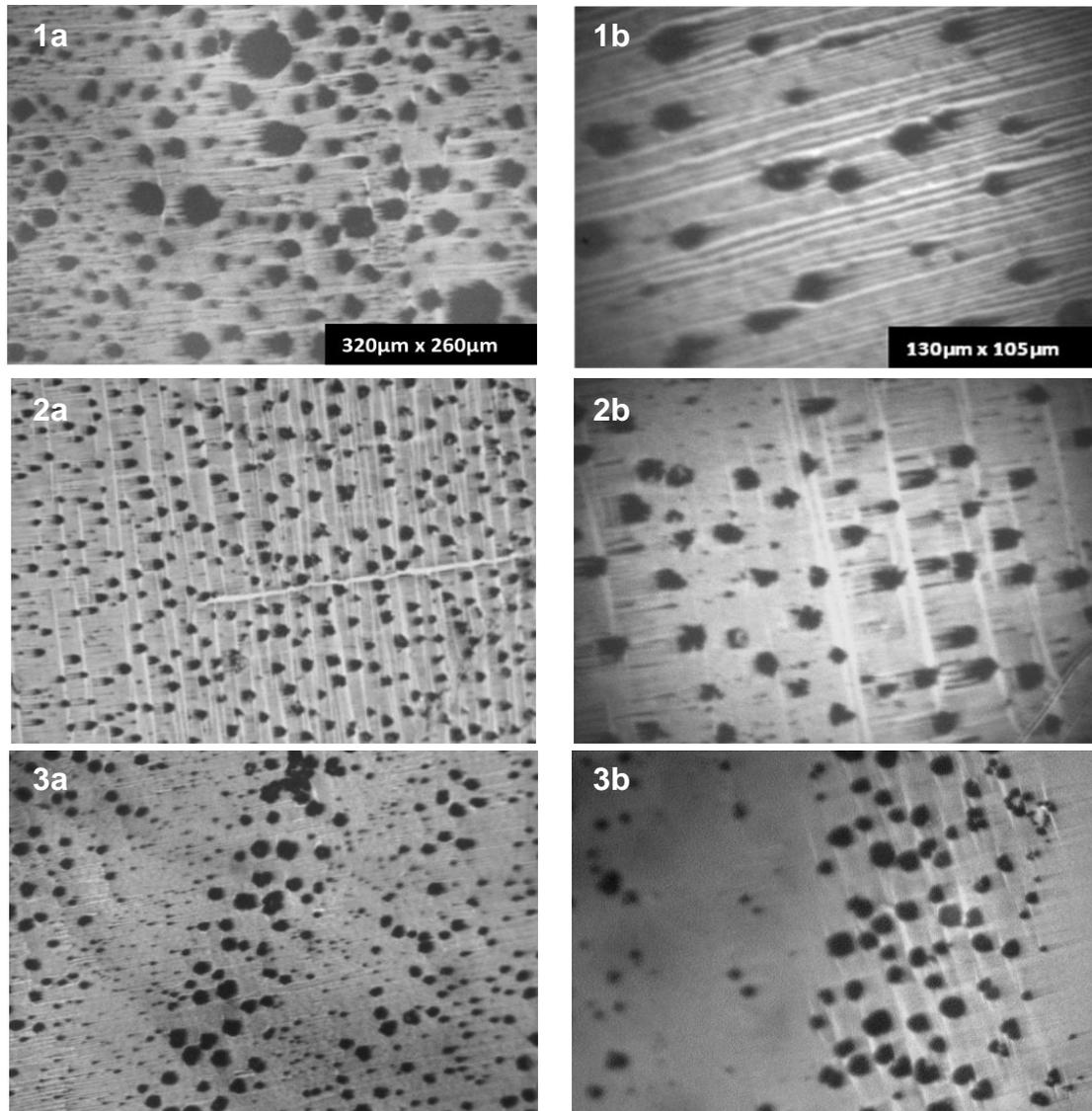


**Figure 73.** Comparaison des isothermes de compression de monocouches de DMPC, sans et avec la sonde NBD-PC (0,5 mol%) à l'interface air-eau à  $30 \text{ mNm}$  et à  $T = 20 \pm 1^\circ \text{C}$ .

Les images des films LB de DMPC obtenues en microscopie de fluorescence (Figure 74) révèlent la coexistence des deux phases lipidiques  $L_C$  et  $L_E$ , la phase  $L_C$  formant des domaines de tailles variables et de forme globalement circulaire. De plus, on observe une distribution spatiale irrégulière des domaines  $L_C$  qui s'organisent en « peloton » sur certaines zones de l'échantillon (Figure 74). On note également l'apparition de stries sur ces films, parallèles à la direction de transfert. Pour vérifier si l'apparition de ces stries est liée à nos conditions

expérimentales de compression ou de transfert, ou au contraire à une structuration intrinsèque du DMPC, différentes vitesses de compression et de transfert ont été testées, de 3 à 10  $\text{cm}^2/\text{min}$  et de 2 à 5  $\text{mm}/\text{min}$ , respectivement.

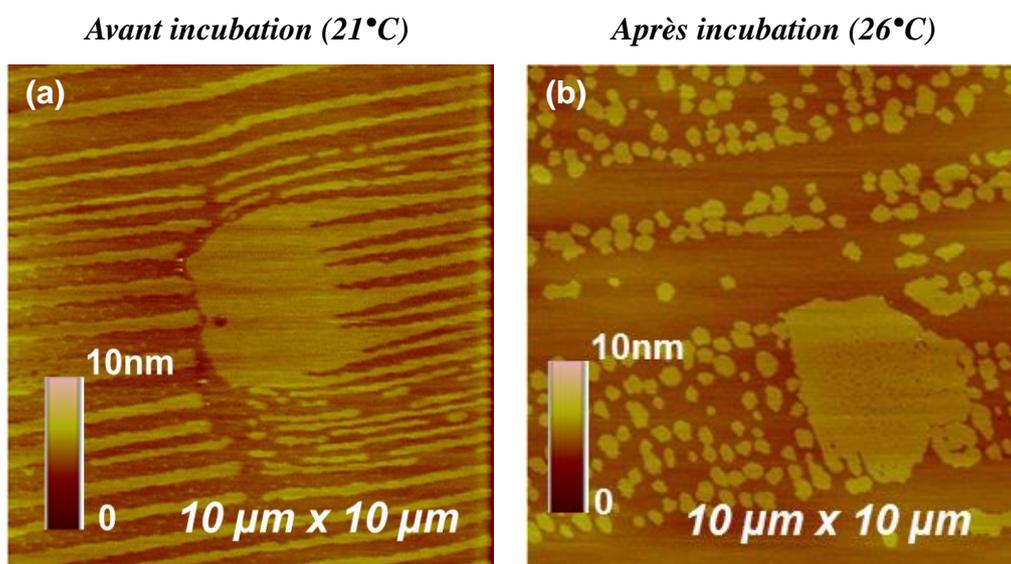
#### *Différents films LB de DMPC*



**Figure 74.** Comparaison de différents films LB de DMPC + 0,5 mol % de NBD-PC transférés à 30  $\text{mN}/\text{m}$  et à  $20 \pm 1^\circ\text{C}$ . Les images présentées ici font  $320 \mu\text{m} \times 260 \mu\text{m}$  (colonne de gauche) ou  $130 \mu\text{m} \times 105 \mu\text{m}$  (colonne de droite), et sont prises juste après le transfert. Ces images sont représentatives de la structuration générale de certaines zones du film, d'autres étant plus homogènes.

Nos résultats montrent la présence de stries dans toutes les conditions testées. De plus les films LB de DMPC sont préparés puis transférés dans les mêmes conditions de vitesse que ceux de SM-C16 et de SM-Egg. Tout ceci suggère que l'apparition des stries est donc intrinsèque aux films de DMPC.

Expérimentalement nos échantillons sont préparés puis caractérisés à température ambiante ( $20\pm 1^\circ\text{C}$ ), ce qui nous amène à être très prudents en ce qui concerne le DMPC qui possède une  $T_m$  très proche de la température expérimentale. Une faible variation de température autour de la température ambiante peut alors induire de profonds changements dans l'organisation lipidique. Nous avons donc vérifié la stabilité des films LB de DMPC pour une variation de température de l'ordre de  $6^\circ\text{C}$ . Pour cela des films LB ont été caractérisés par microscopie de fluorescence puis par AFM avant d'être incubés à  $26^\circ\text{C}$  quelques heures. Ils ont ensuite été replacés sous le dessiccateur à température ambiante puis caractérisés une nouvelle fois par AFM. Les images AFM du film avant et après incubation sont présentées dans la Figure 75. Les images de topographie montrent une structuration différente des domaines en phase  $L_C$  qui deviennent plus petits suite à la hausse de température. De plus, bien que ces domaines soient toujours organisés en peloton, on n'observe plus la présence des stries mentionnées précédemment.

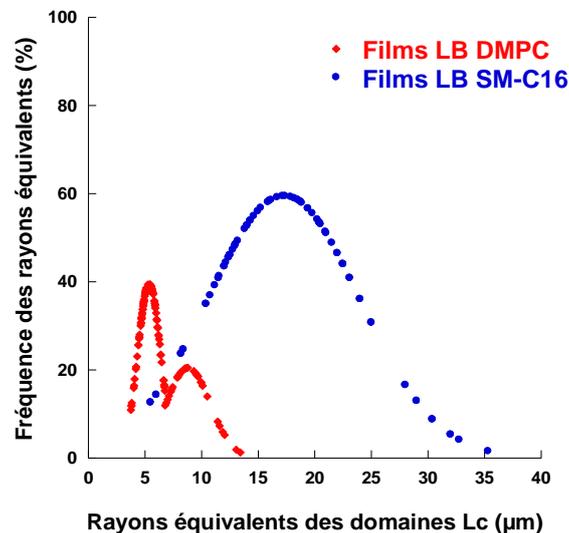


**Figure 75.** Images AFM de hauteur d'un film LB de DMPC à température ambiante (a) et après incubation à  $26^\circ\text{C}$  (b).

### 2.2.3. Comparaison du comportement des lipides saturés DMPC et SM-C16

En comparant les images de microscopie de fluorescence des films LB de DMPC et de SM-C16, il apparaît nettement des différences de morphologie des domaines en phase  $L_C$  en termes de répartition et de taille. Les molécules de DMPC forment des domaines en phase  $L_C$  globalement circulaires et répartis de manière inhomogène. Leurs dimensions sont également

variables, deux rayons moyens ayant été observés (Figure 76), alors que la SM-C16 forme des domaines en forme de « fleur » avec une distribution plus homogène. Les rayons équivalents moyens des domaines sont également différents. L'utilisation du logiciel Gwiddion permet de les estimer à  $5,4 \pm 2,1 \mu\text{m}$  et  $8,6 \pm 4,1 \mu\text{m}$  pour le DMPC et  $17,3 \pm 6,7 \mu\text{m}$  pour la SM-C16 (Figure 76).



**Figure 76.** Distribution des rayons des domaines en phase  $L_C$  dans le cas de films LB de DMPC+0,5 mol % de NBD-PC et de SM-C16 +0,5 mol% de NBD-PC transférés sur une lame de mica à  $30 \text{ mN.m}^{-1}$ . Ces mesures statistiques sont réalisées sur un minimum de 3 échantillons pour chaque lipide et sur une centaine de domaines en phase  $L_C$ .

Dans le Tableau 6 sont présentées les surfaces occupées par chaque phase dans les échantillons. Comme on peut le constater la proportion de phase  $L_E$  est nettement plus importante pour les deux lipides. De plus, la phase  $L_E$  représente un pourcentage supérieur dans le cas du DMPC.

	Surface totale ( $\mu\text{m}^2$ )	Surface $L_C$ ( $\mu\text{m}^2$ )	Surface $L_E$ ( $\mu\text{m}^2$ )	$S_{L_C}/S_{tot}$ (%)	$S_{L_E}/S_{tot}$ (%)
<b>DMPC</b>	83200	11600	71600	13,9	86,1
<b>SM-C16</b>	83200	32800	50400	39,4	60,6

**Tableau 6.** Estimation de l'occupation des deux phases pour des films LB de DMPC et de SM-C16 contenant 0,5 mol % de sonde NBD-PC. L'estimation est réalisée sur des images de  $320\mu\text{m} \times 260\mu\text{m}$  en utilisant le logiciel Gwiddion.

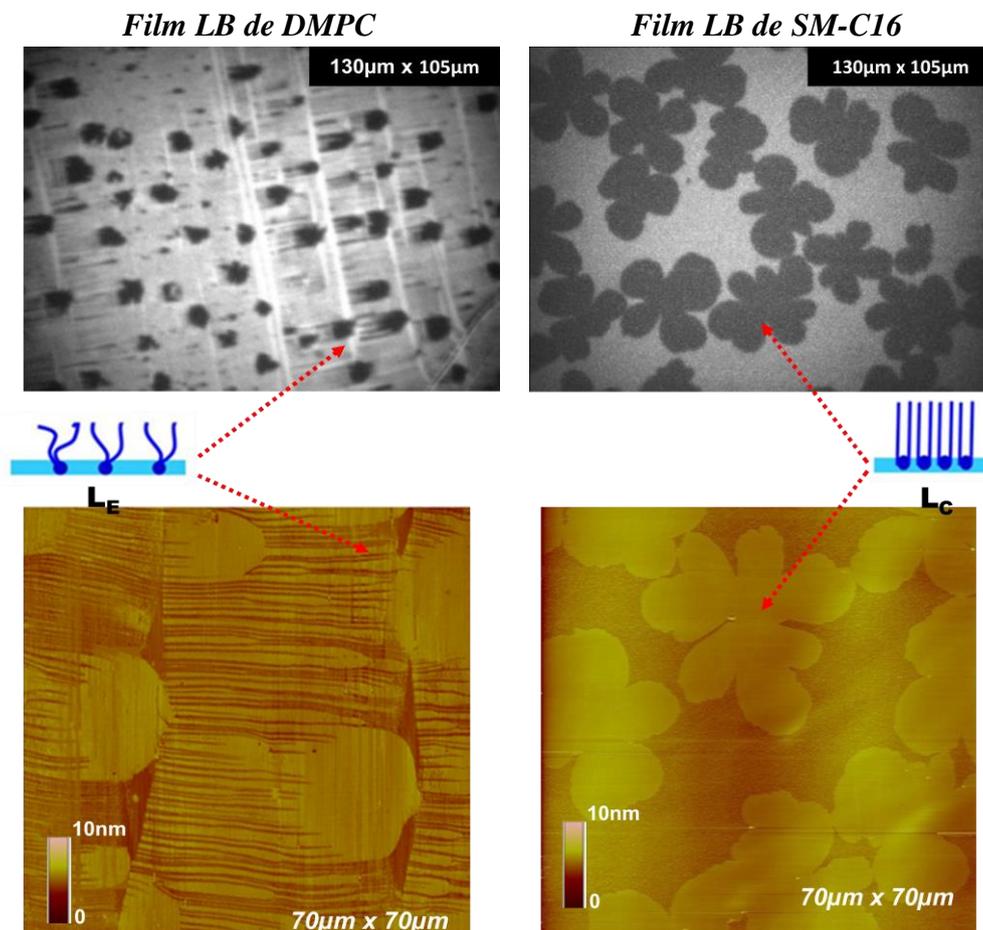
Une telle différence est sans doute liée à la différence de température de transition des deux lipides :  $41^\circ\text{C}$  pour la SM-C16 et  $23^\circ\text{C}$  pour le DMPC, alors que la température expérimentale

est de  $20 \pm 1^\circ\text{C}$ . L'écart plus important entre la température de transition et la température expérimentale explique la proportion plus grande de phase  $L_C$  dans le cas de la SM-C16. On peut toutefois remarquer que les résultats présentés dans le Tableau 6 ne sont que des estimations réalisées sur un minimum de 3 échantillons. Comme nous le disions précédemment, les domaines formés par le DMPC ne sont pas aussi uniformément répartis que ceux formés par la SM-C16, ce qui complique l'analyse.

Il apparaît donc à ce stade de notre étude des différences notables sur le plan organisationnel entre les deux lipides, que l'AFM permet d'affiner [124, 125].

#### 2.2.4. Apport spécifique de l'AFM à l'étude des films LB lipidiques

Sur la Figure 77 sont présentées les images d'AFM de hauteur (topographie) de films LB de DMPC et de SM-C16.

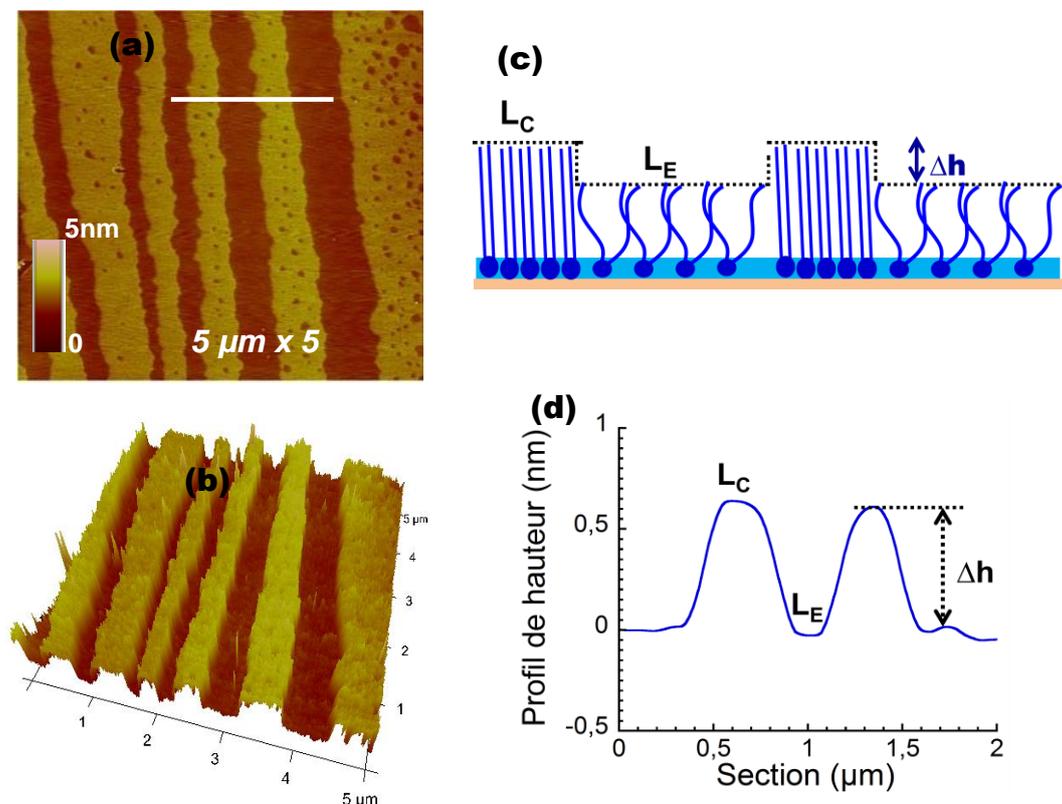


**Figure 77.** Comparaison des images de fluorescence ( $130\mu\text{m} \times 105\mu\text{m}$ ) et des images de hauteur en AFM ( $70\mu\text{m} \times 70\mu\text{m}$ ) de films LB de DMPC +0,5 mol % de NBD-PC et de SM-C16+ 0,5 mol % de NBD-PC transférés sur du mica à  $30 \text{ mN.m}^{-1}$ . La caractérisation par les deux techniques est réalisée à  $T = 20 \pm 1^\circ\text{C}$ .

Ces images, prises en régime répulsif, permettent de mettre en évidence les séparations de phase déjà décrites dans le cas des images de microscopie de fluorescence, mais avec une résolution bien meilleure. Ces images confirment la présence de domaines en forme de fleur pour la SM-C16, et globalement circulaires pour le DMPC, ainsi que la présence de stries pour ce dernier.

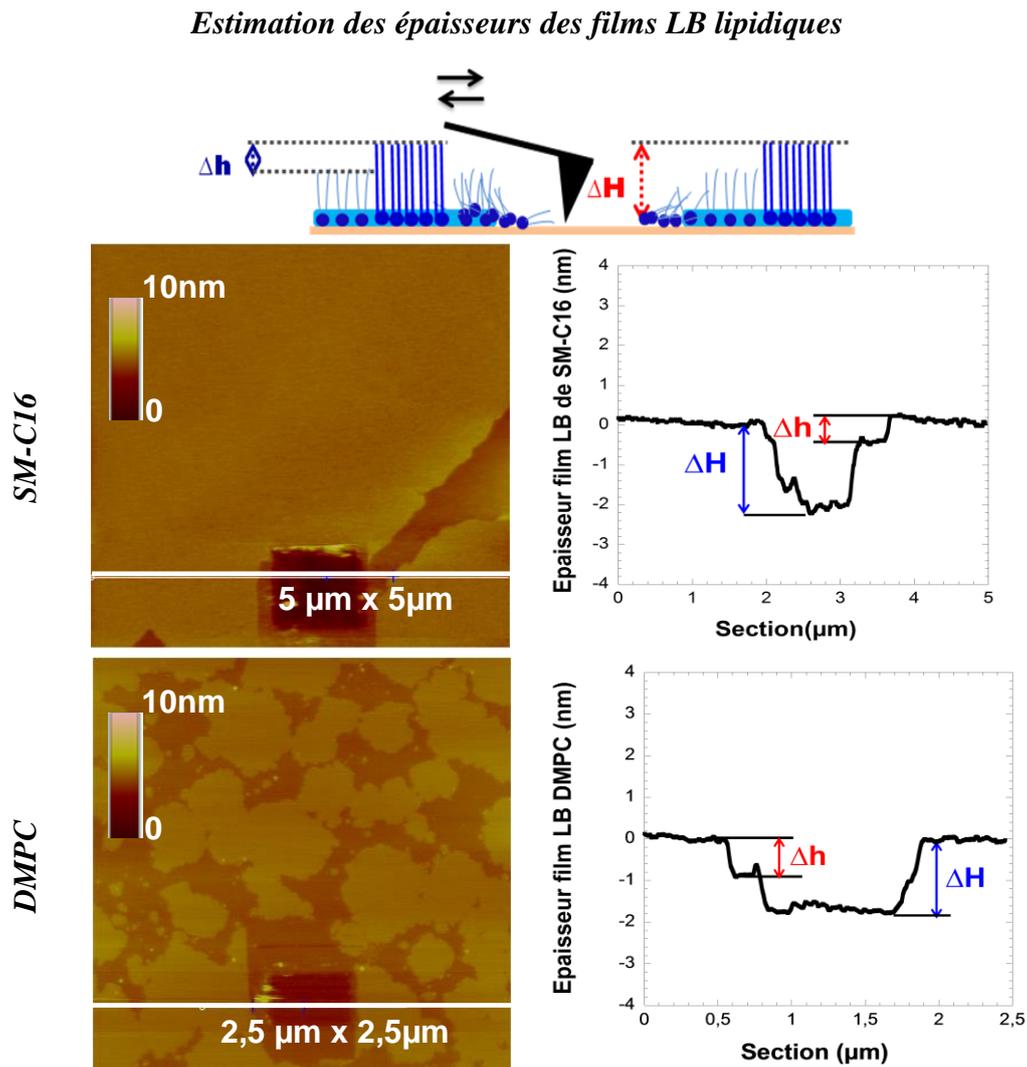
L'AFM permet également d'accéder à la différence de hauteur  $\Delta h$  entre les deux phases lipidiques et à l'épaisseur  $\Delta H$  du film. Ainsi, le mode topographique étant piloté majoritairement par la réponse élastique de la surface sondée et sa topographie, nous avons procédé à l'estimation de la différence de hauteur  $\Delta h$  entre les deux phases (cas d'un film LB de DMPC dans la Figure 78). Ces mesures sont réalisées sur des images de 1 à 5  $\mu\text{m}^2$  faisant 512 pixels par 512 pixels enregistrées en mode répulsif dominant afin d'accéder à une topographie plus réaliste de nos surfaces. Les valeurs de  $\Delta h$  ainsi mesurées pour les films LB de DMPC et de SM-C16 sont de l'ordre de  $0,50 \pm 0,01$  nm et de  $0,90 \pm 0,03$  nm respectivement. Ces valeurs sont en accord avec celles estimées à partir de mesures d'AFM dans des études antérieures [126, 127].

#### Film LB de DMPC



**Figure 78.** (a) et (b) Images 2D et 3D topographiques d'AFM d'un film LB de DMPC+ NBD-PC (contenant 0,5 mol%) à 30 mN/m. (c) Représentation schématique de la différence de hauteur  $\Delta h$  entre les phases  $L_C$  et  $L_E$ ; (d) exemple de section réalisée sur une image de hauteur prise en mode tapping répulsif dominant.

De plus, afin d'estimer l'épaisseur des films LB lipidiques nous avons, comme pour le cas des lipides insaturés, procédé à des expériences de grattage en appliquant différentes forces de scan. Sur la Figure 79 sont présentées des images topographiques de grattage de films LB de DMPC et SM-C16. Les sections présentées ici sont réalisées en faisant la moyenne des sections de la même zone sur les images topographiques dans les sens « aller » et « retour ». Les épaisseurs apparentes ( $\Delta H$ ) mesurées sont de 2.2 nm et 2,0 nm pour la SM-C16 et le DMPC respectivement.



**Figure 79.** Images topographiques de grattage de films LB de DMPC+ 0,5 mol % de NBD-PC et de SM-C16 + 0,5 mol % de NBD-PC avec les sections correspondantes. Une sonde contact de raideur  $\approx 0,35 \text{ N/m}$  et de fréquence 62 KHz est utilisée et les images sont prises à des vitesses comprises entre 0,3 Hz et 1 Hz suivant leurs dimensions.

Ces valeurs sont plus ou moins en accord avec celles trouvées dans la littérature. Deux études par AFM portant sur des bicouches supportées de DMPC transférées sur du mica ont permis

d'estimer l'épaisseur de la bicouche à environ 5 nm, ce qui sous-entend que les monocouches font en moyenne 2,5 nm d'épaisseur [127, 128]. Cependant d'autres études par diffraction des rayons X et modélisation ont permis d'estimer l'épaisseur des monocouches entre 1.7 et 1.8 nm [129, 130]. L'écart entre ces valeurs et les nôtres peut s'expliquer par différents phénomènes. Tout d'abord les images à partir desquelles les épaisseurs sont estimées sont enregistrées en mode contact. Suivant la force de scan appliquée il se peut que le film soit comprimé et les molécules écrasées sous la contrainte de la pointe entraînant une sous-estimation de la valeur  $\Delta H$ . De plus lors du grattage, des molécules peuvent rester sur la zone grattée ce qui implique également une sous-estimation de l'épaisseur apparente du film, comme c'est le cas ici pour le DMPC par exemple.

En plus de la topographie, l'analyse des signatures mécaniques des films nous a permis de mettre en évidence les différences d'interaction de la pointe AFM avec les phases  $L_C$  et  $L_E$ . En effet les images de phase prises en mode dynamique par modulation d'amplitude (mode répulsif dominant à amplitude élevée et mode attractif dominant à amplitude faible, décrits dans la Figure 80) montrent, pour les deux lipides, des phases  $L_E$  plus dissipatives que les phases  $L_C$  (Figure 81).

Ceci peut être lié soit à une adhésion plus grande, soit à une dissipation plus grande dans les phases  $L_E$ . En effet, les deux phases lipidiques dans nos films ont des organisations différentes. Dans la phase  $L_E$ , les molécules sont organisées de manière relativement lâche, et n'entretiennent que peu d'interactions entre elles. Elles sont donc libres d'interagir avec la sonde AFM, d'où une adhésion et une dissipation plus élevées. Au contraire, la phase  $L_C$  est constituée de molécules interagissant fortement entre elles par l'intermédiaire de forces de van der Waals et parfois de liaisons hydrogène (cas de la SM-C16 grâce à la présence de groupes accepteur et donneur de liaison hydrogène sur la même molécule). Cette forte interaction des molécules entre elles instaure une certaine rigidité (cohésion) au sein des domaines en phase  $L_C$  ce qui tend à réduire les interactions entre les molécules des domaines  $L_C$  et la sonde AFM.

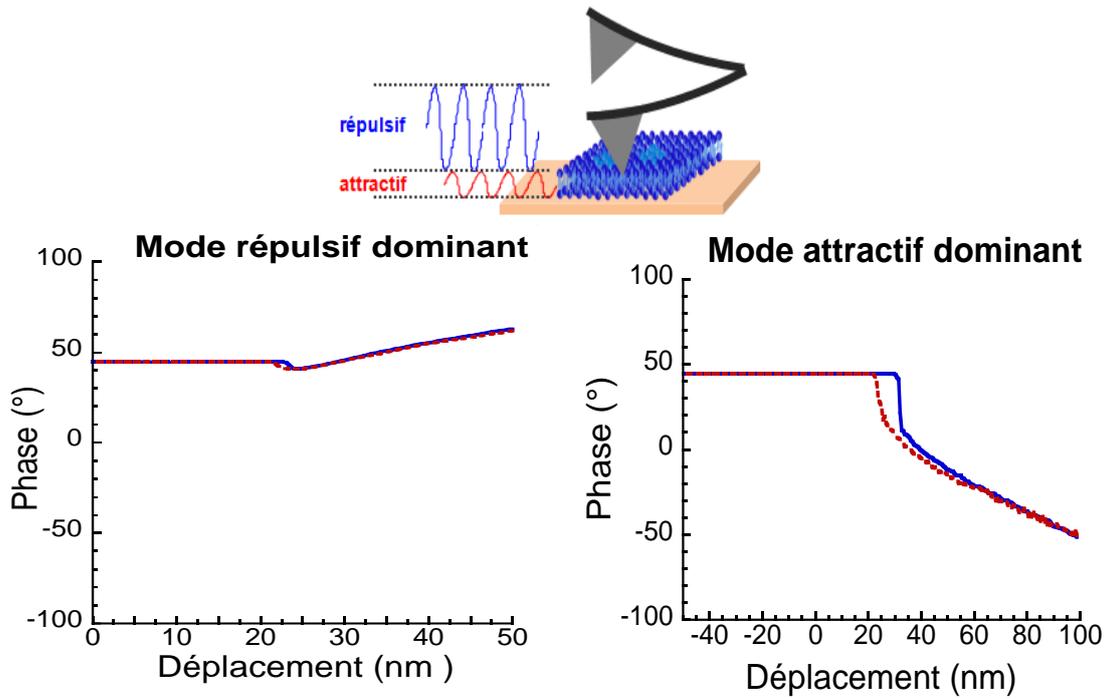


Figure 80. Schéma représentatif des différents points de fonctionnement de la sonde AFM en mode tapping.

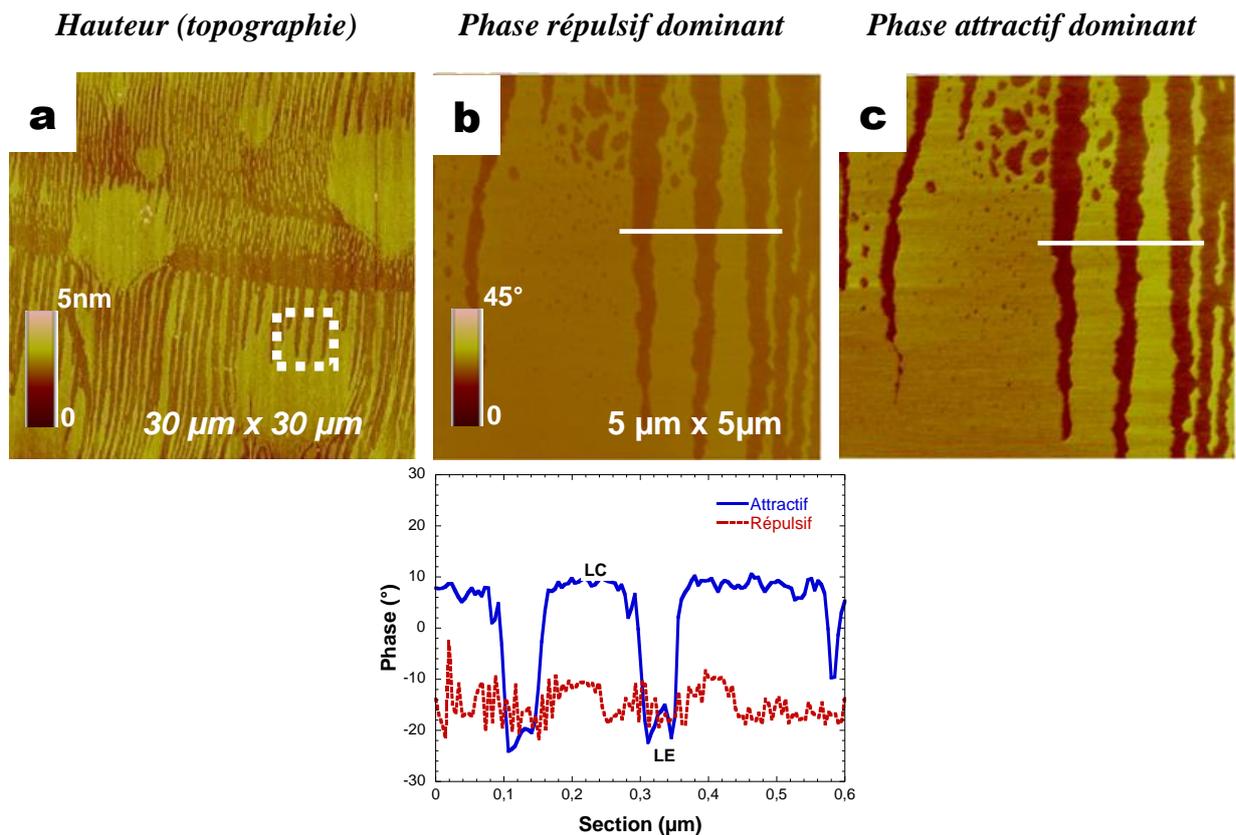
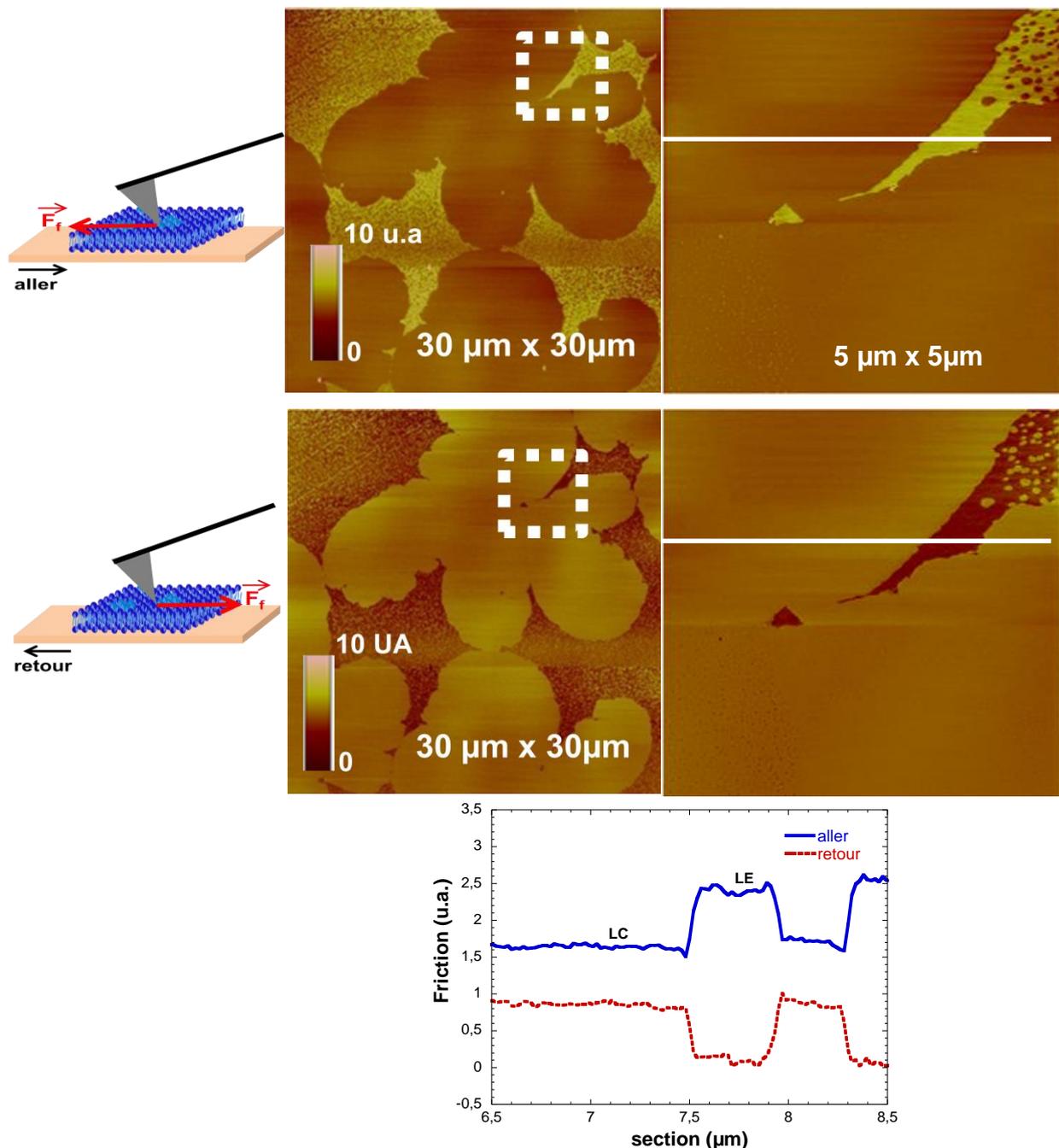


Figure 81. Image AFM de hauteur (a) et images de phase sur le zoom de (a) en modes répulsif dominant (b) et attractif dominant (c) d'un film LB de DMPC + 0,5 mol % de NBD-PC transféré à  $30 \text{ mN.m}^{-1}$  et à  $T = 20 \pm 1^\circ\text{C}$ . Une sonde tapping de raideur  $\approx 36 \text{ N/m}$  et de fréquence  $f_0 = 160 \text{ kHz}$  est utilisée et les images sont prises à des vitesses de scan comprises entre 0,3 Hz et 1 Hz suivant la taille de l'image.

Toujours en AFM, mais cette fois en mode contact nous avons caractérisé le comportement tribologique des deux phases  $L_E$  et  $L_C$  en effectuant des expériences de frottements (ou de friction). On observe une inversion de contraste suivant le sens de balayage de la surface par la sonde AFM qui est liée au changement de signe des forces de frottement. La Figure 82 montre le résultat d'une telle expérience dans le cas de films LB de SM-C16.



**Figure 82.** Images AFM de friction (« aller » et « retour ») de  $30 \times 30 \mu\text{m}^2$  d'un film LB de SM-C16 + 0,5 mol % de NBD-PC transféré à  $30 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$  et à  $T = 20 \pm 1^\circ\text{C}$ . Une sonde contact de raideur  $\approx 0,12 \text{ N/m}$  et de fréquence  $24 \text{ KHz}$  est utilisée et les images sont prises à des vitesses comprises entre  $0,3 \text{ Hz}$  et  $1 \text{ Hz}$  suivant leur taille.

Ces images suggèrent des comportements tribologiques différents des phases  $L_E$  et  $L_C$ . En effet, et comme le montre la section de la Figure 82, le frottement étant plus important dans les phases  $L_E$  que dans la phase  $L_C$ . Cette observation est en accord avec les résultats obtenus en mode dynamique (Figure 81) à savoir que la phase  $L_E$  dissipe beaucoup plus que la phase  $L_C$ , compte tenu de l'organisation des lipides dans les domaines.

### ***2.3. Discussion sur l'ensemble des résultats obtenus dans le cas des lipides saturés***

#### **2.3.1. Comparaison des films LB de SM-Egg et SM-C16**

Les isothermes de compression que nous avons obtenues dans le cas de la SM-Egg et de la SM-C16 sont dans l'ensemble en accord avec les résultats déjà parus dans la littérature. En général, les isothermes de la SM-C16 [70, 131, 132] présentent un palier de transition entre les phases  $L_E$  et  $L_C$  plus prononcé que dans le cas de la SM-Egg [72, 133, 134]. Le palier de transition est centré autour d'une valeur moyenne de  $15 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ , les variations constatées étant très probablement liées à des conditions expérimentales différentes (étalement sur de l'eau pure ou un tampon dont le pH et la composition peuvent varier, et température principalement). La position de ce palier est clairement liée à la nature des chaînes de la SM. Ramstedt et coll. ont ainsi étudié différentes SM saturées, leurs chaînes comportant de 14 à 24 atomes de carbone : une augmentation de la longueur des chaînes provoque une diminution de la pression de surface correspondant à la transition, le palier étant également plus marqué [70]. Cet effet est lié au fait que plus les chaînes sont longues, plus leurs interactions sont favorables à l'organisation des molécules en une phase ordonnée.

Dans le cas de la SM-Egg, nos isothermes ne montrent généralement pas la présence d'un palier. D'autres études, réalisées à une température légèrement plus élevée que la nôtre, ont montré la présence d'un palier peu visible [133, 134]. Cette particularité a été attribuée au fait que la SM-Egg comporte des chaînes de longueurs variables (bien que majoritairement palmitiques) [135]. Par ailleurs, on peut noter que les isothermes de SM extraite de cerveau bovin ne présentent pas de palier [122], ce type de SM étant également constitué d'un mélange de molécules aux chaînes de longueur variable, majoritairement stéariques. Des résultats similaires ont été obtenus dans le cas de différentes SM naturelles : plus la proportion de chaînes insaturées augmente, plus le palier de transition est difficile à mettre en évidence [136].

Enfin, un autre paramètre influence par ailleurs cette organisation, les molécules de SM ayant la possibilité de faire des liaisons hydrogène intermoléculaire, contrairement aux lipides de type phosphatidycholines [135].

Dans ces conditions, les mesures de pression de surface sont donc clairement insuffisantes pour caractériser la SM en termes de transition de phase, ce qui impose l'utilisation d'autres méthodes comme les méthodes d'imagerie. Dans notre cas, la microscopie de fluorescence et l'AFM ont permis de mettre clairement en évidence la présence de domaines formés par les molécules de SM (SM-Egg et SM-C16) aux formes caractéristiques multilobées en « fleurs » dans des films LB transférés à  $30 \text{ mN.m}^{-1}$ . De tels domaines ont également été mis en évidence à l'interface air-eau, soit par microscopie de fluorescence (les monocouches de SM-C16 étant marquées au NBD-cholestérol), soit par microscopie à l'angle de Brewster (BAM) dans le cas de monocouches de SM-Egg [121, 132, 134]. Leurs formes sont similaires, certains domaines pouvant prendre des formes plus arrondies dans le cas de la SM-Egg, du fait probablement de l'hétérogénéité des chaînes. Leurs dimensions (« diamètre » moyen de l'ordre de quelques dizaines de  $\mu\text{m}$  dans ces études) sont du même ordre de grandeur que celles définies dans nos films LB. La nature des chaînes s'avère une fois encore être un paramètre important, puisque la SM extraite de cerveau bovin forme également des domaines en phase  $L_C$ , mais sous la forme d'un réseau sinueux très différent des domaines en « fleur » [126]. La forme en « fleur » des domaines en phase  $L_C$  a été attribuée à la capacité de la SM de former des liaisons hydrogène intermoléculaire [137]. Cependant, d'autres paramètres, comme la nature des chaînes ou les conditions expérimentales, doivent sans doute jouer, étant donné que toutes les SM ne forment pas de tels domaines.

Finalement, la comparaison de nos résultats et de ceux parus précédemment permet de dégager deux premières conclusions :

- Le transfert de la monocouche de l'interface air-eau sur le mica ne semble donc pas modifier l'organisation lipidique, puisque des domaines similaires sont observés dans des monocouches [121, 134] et des films LB.
- La présence de la sonde NBD-PC dans notre étude ne semble pas non plus modifier le comportement des lipides, puisque l'AFM et le BAM révèlent le même type de domaines en absence de sonde dans la monocouche. Rappelons en effet que le BAM repose sur un principe très différent de la microscopie de fluorescence et ne nécessite aucun marquage : il s'agit ici d'utiliser la réflectivité d'un faisceau lumineux incident sur l'interface air-eau et polarisé parallèlement au plan d'incidence. La présence d'une

monocouche à l'interface modifie son indice de réfraction et donc la réflectivité, permettant l'obtention d'images dont le contraste est inversé par rapport à nos images obtenues par microscopie de fluorescence (domaines en phase  $L_C$  « brillants » dans une phase  $L_E$  sombre). L'ajout d'un analyseur en amont de la caméra permet d'aller encore plus loin dans l'analyse, comme le montrent les travaux de Prenner et coll. [134], en révélant la présence d'une organisation interne des molécules à l'intérieur de la phase  $L_C$ .

Ce dernier point est particulièrement important, puisqu'il nous permet de valider le fait que la sonde NBD-PC, bien qu'inutile en AFM, peut être associée aux lipides dans nos échantillons sans en modifier le comportement. Nous discuterons ce point plus longuement à la fin de cette discussion.

L'AFM est par ailleurs une méthode d'imagerie de plus en plus utilisée dans le cas des systèmes lipidiques, de type monocouches ou bicouches planes, et de nature variée [124, 125, 138, 139]. Dans le cas de la SM, peu d'études concernent le comportement de ce lipide seul, la plupart portant sur des mélanges lipidiques, en particulier dans le cadre d'études sur la formation des *rafts* membranaires. L'AFM a par exemple été appliquée à l'étude de la distribution de glycosphingolipides GM1 ou GM3 dans des bicouches composées de DOPC/cholestérol/SM-C16 ou de POPC/cholestérol/SM de cerveau bovin [122, 140]. L'AFM a également permis d'étudier le comportement de monocouches constituées de mélanges de SM semi-synthétique et autres lipides, déposées sur du mica préalablement recouvert d'une monocouche d'acide stéarique [141], ou l'effet du calcium sur l'interaction d'un fragment de la protéine prion avec des bicouches de POPC/SM de cerveau bovin [142]. Dans le cas de monocouches planes de SM pure, Milhiet et coll. ont montré la structuration de la phase  $L_C$  de SM extraite de cerveau bovin en un réseau sinueux [126]. L'équipe de L. Johnston, a également étudié en détails des films LB de différentes SM naturelles (SM-Egg, SM extraite de cerveau porcin, SM extraite du lait) transférées à différentes pressions de surface. La phase  $L_C$  de ces SM naturelles est organisée sous la forme de domaines circulaires interconnectés et alignés. Cet alignement est un effet induit par le transfert [136] et a déjà été observé dans le cas de bicouches phospholipidiques transférées par la méthode LB [143].

Cependant, dans l'ensemble l'AFM est encore sous-exploitée, car souvent limitée à une « simple » méthode d'imagerie. Or l'AFM permet d'accéder non seulement à des détails morphologiques invisibles en microscopie de fluorescence, mais aussi à des informations très intéressantes sur les épaisseurs et les propriétés nanomécaniques des échantillons.

Dans le cas des films LB de SM-C16, il nous a été possible de déterminer leur épaisseur et la différence de hauteur entre les phases  $L_E$  et  $L_C$  :

- L'épaisseur d'un film LB peut être obtenue par le grattage contrôlé d'une zone à l'aide de la pointe. Dans le cas de films LB de SM-C16 transférés à  $30 \text{ mN.m}^{-1}$ , cette épaisseur a été estimée à  $2,2 \pm 0,1 \text{ nm}$ . Dernièrement l'étude de bicouches de différentes SM par diffraction des RX a permis de déterminer la distance entre les groupes phosphates des deux feuilletts composant ces bicouches. Dans le cas de SM naturelles, cette distance est d'environ  $4,2 \text{ nm}$  (SM-Egg) et  $5,5 \text{ nm}$  (SM extraite de cerveau bovin), [144]. Dans le cas de la SM-C16, cette distance est de l'ordre de  $4,6 \text{ nm}$  [145]. En considérant qu'une monocouche a la moitié de l'épaisseur d'une bicouche (si on néglige les effets d'une éventuelle interdigitation des chaînes), nos résultats sont donc cohérents.
- Nous avons également estimé la différence de hauteur existant entre les phases  $L_E$  et  $L_C$  à  $0,9 \text{ nm}$  (films transférés à  $30 \text{ mN.m}^{-1}$ ). Cette estimation est en accord avec celle obtenue dans le cas de la SM extraite de cerveau bovin, de l'ordre de  $1 \text{ nm}$  [126]. On peut par ailleurs noter que cette différence de hauteur dépend non seulement de la nature de la SM, mais également de la pression de surface à laquelle le film LB est transféré. Des mesures réalisées dans le cas de films LB de différentes SM naturelles ont donné des valeurs comprises entre  $0,5$  et  $0,9 \text{ nm}$ , selon la longueur des chaînes composant les mélanges (films LB transférés à  $15 \text{ mN.m}^{-1}$ ). Dans le cas de films LB constitués de SM-Egg, elles sont de l'ordre de  $0,4 \text{ nm}$  et  $0,7 \text{ nm}$ , à  $3 \text{ mN.m}^{-1}$  et  $15 \text{ mN.m}^{-1}$  [136]. On peut cependant supposer qu'une pression de transfert aussi faible ( $3 \text{ mN.m}^{-1}$ ) ne permet pas d'obtenir un film LB réellement organisé et approprié à une étude par AFM.

Les mêmes études ont été réalisées avec la SM-Egg. Cependant, nous avons rapidement abandonné ce lipide car les résultats obtenus étaient peu reproductibles, en particulier pour les mesures de  $\Delta h$  et  $\Delta H$  (l'épaisseur du film), du fait sans doute de la disparité des chaînes constituant ce lipide.

Enfin, dans le cas de nos films LB de SM, l'AFM a permis de mettre en évidence de manière simple des différences entre les phases  $L_E$  et  $L_C$  en termes d'interaction avec la pointe AFM et de friction. Ces deux paramètres se sont révélés plus importants dans le cas de la phase  $L_E$ . En ce qui concerne le premier paramètre, l'interaction plus importante constatée avec la phase  $L_E$  peut être liée à une dissipation plus grande dans cette phase. En effet, les deux phases

lipidiques présentes dans nos films ont des organisations différentes. Dans la phase  $L_E$ , les molécules ont une organisation relativement « lâche » et n'entretiennent que peu d'interactions entre elles. Elles sont donc plus libres d'interagir avec la sonde AFM d'où une adhésion et une dissipation plus élevées. Au contraire, la phase  $L_C$  est constituée de molécules interagissant fortement entre elles par l'intermédiaire de forces de van der Waals et, dans le cas des molécules de SM, de liaisons hydrogène. Cette forte interaction des molécules entre elles instaure une certaine rigidité ou cohésion au sein des domaines en phase  $L_C$ , ce qui tend à réduire les interactions entre cette phase et la sonde AFM. De plus, sous l'effet du déplacement de la pointe AFM on crée des forces de frottement qui s'opposent au déplacement de celle-ci, d'où l'inversion de contraste observée sur les images AFM aller et retour. L'intensité de ces forces dépend de la rugosité de la surface, donc de l'état d'organisation des lipides, mais aussi de la nature des interactions entre la pointe et le film lipidique. L'AFM est donc pertinente pour révéler des différences de comportement des deux phases lipidiques, la phase  $L_E$  étant plus apte, du point de vue structurel, à interagir avec la pointe.

### 2.3.2. Les films LB de DMPC

Concernant le DMPC, son comportement a déjà été largement décrit dans la littérature, en particulier dans le cadre de mesures de pression de surface. L'isotherme de compression que nous avons obtenue dans le cas du DMPC suggère la présence d'une phase unique de type  $L_E$  dans nos conditions expérimentales, l'isotherme étant en accord avec d'autres études réalisées dans des conditions plus ou moins comparables [69, 146, 147]. Cependant, la microscopie de fluorescence et l'AFM révèlent la présence de domaines ayant expulsé la sonde, et donc en phase  $L_C$ , dans les films LB prélevés à  $30 \text{ mN.m}^{-1}$ . Ces domaines, de forme globalement circulaire et de rayon moyen de l'ordre de 5 à 10  $\mu\text{m}$ , ne sont pas répartis de manière homogène dans les films, mais organisés en « pelotons » orientés perpendiculairement à la direction de transfert. Grainger et coll. ont également mis en évidence la présence de domaines condensés dans des monocouches de DMPC à  $22 \text{ mN.m}^{-1}$  et à  $10^\circ\text{C}$  (la phase  $L_E$  étant marquée à la sulforhodamine), mais ces domaines sont de forme étoilée. Ils notent cependant que ces domaines fusionnent au cours du temps pour acquérir finalement une forme arrondie (diamètre moyen de l'ordre de 10  $\mu\text{m}$ ) et s'ordonner en un réseau hexagonal [69, 146, 147].

L'AFM permet également de révéler des détails invisibles en microscopie de fluorescence,

comme la formation de stries formées par le DMPC en phase  $L_C$ , qui disparaissent si le film LB est incubé quelques heures à 26°C. De tels motifs ont déjà été mis en évidence dans des monocouches et bicouches lipidiques réalisées par un transfert de type LB et constituées d'un mélange de deux phospholipides, le DPPC et le DLPC, respectivement en phases  $L_C$  et  $L_E$  dans les conditions expérimentales choisies [143, 148]. L'étude des monocouches par AFM a montré que les stries étaient orientées perpendiculairement à la direction de transfert. De plus, dans le cas des bicouches, les stries, plus hautes de 0,6 à 0,8 nm par rapport au reste de la bicouche, étaient également plus raides. Elles ont été attribuées à une séparation de phase entre les deux lipides, le DPPC étant concentré au niveau des stries. Dans notre cas, ce type de motif se forme dans une monocouche de composition uniforme, mais dans laquelle le lipide peut exister sous deux phases différentes. Le fait qu'elles disparaissent si l'échantillon est incubé à plus haute température confirme l'importance de la séparation de phase dans ce phénomène.

L'AFM permet de plus de déterminer l'épaisseur d'une monocouche de DMPC ainsi que la différence de hauteur entre les phases  $L_E$  et  $L_C$ . Ces deux paramètres sont estimés à 1,8 nm et 0,5 nm, respectivement. D'autres mesures réalisées par AFM sur des bicouches de DMPC ont donné des épaisseurs de l'ordre de 4,8 nm à 30°C [149] à 5,3 nm à 28°C [128]. Le profil de densité électronique de bicouches orientées de DMPC déterminé par diffraction des RX donne, lui, une épaisseur de tête à tête de l'ordre de 3,5 nm [129], résultat conforté par des simulations de type *coarse-grain*, où plusieurs atomes d'une molécule lipidique sont regroupés en « particules » ellipsoïdes [130]. L'ordre de grandeur des dimensions que nous avons obtenues est donc cohérent avec ces précédents résultats, bien que l'épaisseur de nos monocouches semble un peu faible par rapport aux épaisseurs déterminées sur des bicouches. Cet écart peut être lié au fait que la pointe AFM déforme légèrement les molécules en mode contact, ou que la zone grattée par la pointe n'est pas parfaitement « nettoyée ». De plus, les monocouches et bicouches lipidiques constitué d'un même lipide pourraient avoir une résistance mécanique différente vis à vis de la pointe AFM. Enfin, les bicouches sont au contact d'une phase aqueuse, généralement riche en ions. Dans ce contexte, Oncins et coll. ont étudié par AFM l'effet de concentrations croissantes d'ions  $Na^+$  sur des bicouches de DMPC [150]. Ils ont montré que ces ions écrantent les charges présentes au niveau des têtes polaires du DMPC, conduisant à des bicouches plus compactes. Dans notre cas, les monocouches sont transférées à partir d'une interface air-eau pure, donc dépourvue de cations.

Concernant la différence de hauteur entre les deux phases, de 0,50 nm, son ordre de grandeur peut également être comparé à celui estimé à partir de mesures de RMN du deutérium sur des dispersions multilamellaires de DMPC [69, 146, 147]. Ces mesures permettent en effet d'estimer la longueur des chaînes de ce lipide à 1,28 nm à 30°C et 1,20 nm à 50°C, soit une diminution de l'ordre de 0,1 nm alors que le lipide est en phase fluide dans les deux cas. Une différence de hauteur de 0,5 nm entre les phases  $L_E$  et  $L_C$  paraît donc raisonnable.

En conclusion, l'ensemble de ces résultats montre bien encore l'intérêt de compléter les mesures de pression de surface par une étude par microscopie, les isothermes de compression ne fournissant qu'une information parcellaire et moyennée sur l'ensemble de la monocouche.

### 2.3.3. Complémentarité de l'AFM et d'autres méthodes d'étude des systèmes lipidiques

Ces mesures réalisées en AFM sont donc très complémentaires d'autres méthodes permettant de définir l'organisation et la conformation lipidiques dans les deux phases. Parmi ces méthodes, on peut citer par exemple et de manière non exhaustive :

- La calorimétrie différentielle (*Differential Scanning Calorimetry* ou DSC) permettant de définir les températures de transition des systèmes lipidiques. Cette méthode a été largement appliquée à l'étude des SM [132, 151] et d'autres lipides.
- Les méthodes spectroscopiques, comme les spectroscopies Raman et IR classiques [152], ou des méthodes d'optique non linéaires comme la génération de fréquence somme (*Vibrational Sum Frequency Generation* ou VSFG) apparue plus récemment [136]. Plusieurs bandes de vibration sont particulièrement utiles, car elles donnent accès au degré d'organisation des lipides mais aussi à la présence potentielle de défauts de type *gauche*, comme celles à 2850  $\text{cm}^{-1}$  et 2880  $\text{cm}^{-1}$  (étirements symétriques des groupes méthylène et méthyl présents dans les chaînes). La position des bandes en fréquence, mais aussi leurs rapports d'intensité sont riches d'informations. Une éventuelle deutération peut s'avérer utile, car la substitution d'un atome d'hydrogène par un atome de deutérium déplace considérablement la fréquence de vibration de la liaison substituée. L'analyse des modes de vibration ne se limite pas à l'étude des chaînes, les têtes polaires ayant leurs propres modes de vibration. Ces modes ont par exemple été mis à profit dans une étude portant sur l'interaction des ions  $\text{Ca}^{2+}$  avec des bicouches de SM extraite de cerveau bovin [151].

- Les mesures de compressibilité moyenne réalisées en cours de compression, permettant de déterminer le module d'élasticité interfaciale de la monocouche dans différentes phases [134, 153].
- Les différentes méthodes de RMN, dont celle du deutérium ( $^2\text{H}$ -RMN) réalisée sur des membranes lipidiques orientées : un marquage spécifique au deutérium permet d'obtenir des informations sur l'ordre et la mobilité des molécules [154].
- Les simulations de dynamique moléculaire et Monte Carlo qui permettent de compléter les résultats expérimentaux et d'apporter différentes informations : aires moléculaires, paramètres d'ordre des chaînes, profil de densité électronique... Dans le cas de la SM, ces simulations permettent également de mettre en évidence la présence de liaisons hydrogène intramoléculaires [155].

#### 2.3.4. Influence de la sonde fluorescente

Enfin, dans notre cas, nous devons tenir compte du fait que les films LB étudiés comportent 0,5 mol% de sonde NBD-PC. Cette sonde principalement localisée dans la phase  $L_E$  peut donc en altérer le comportement, alors que celui de la phase  $L_C$  n'est pas modifié *a priori*. Différentes études ont déjà été menées en combinant microscopie de fluorescence et AFM ou SFM sur différents systèmes lipidiques. Par exemple Cruz et coll. ont étudié en parallèle le comportement de films LB de DPPC contenant ou pas 1 mol% de NBD-PC par microscopie de fluorescence et SFM [156]. Bien que la présence de la sonde ne modifie pas l'isotherme de compression, elle induit différents changements notables dans l'organisation de la phase  $L_E$  : dans le cas de films LB transférés à  $11 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ , cette phase présente dans les deux cas des nano-domaines en phase  $L_C$ , isolés en présence de sonde, mais interconnectés en réseau en son absence. La présence de la sonde diminue également la différence de hauteur entre les deux phases, celle-ci passant de 1,3 nm à 1,0 nm. Cette différence de hauteur suggère que la sonde NBD-PC rend la phase  $L_E$  apparemment plus haute ou moins déformable sous la pointe. Dans le cas de films prélevés à  $30 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ , la présence de la sonde engendre la formation de zones en phase  $L_E$  piégées dans la phase  $L_C$  et concentrant la sonde à des proportions bien supérieures au pourcentage moyen introduit dans la monocouche initialement. Enfin, la présence de la sonde induit une plus grande fragilité mécanique de la monocouche, cette dernière subissant des fractures lors du transfert.

Malheureusement, à notre connaissance, aucune autre étude n'a été réalisée sur l'influence de la présence d'une sonde fluorescente sur les propriétés nanomécaniques d'un film lipidique,

alors qu'une méthode aussi sensible que l'AFM est parfaitement indiquée. Les études sont souvent limitées à l'aspect purement morphologique des systèmes [157], sans aborder les éventuelles modifications de friction. Or, si on se réfère aux travaux de Cruz et coll., la phase  $L_E$  serait rigidifiée en présence de NBD-PC, ce qui tendrait donc à réduire le contraste entre les deux phases, en particulier dans les images de friction.

#### **2.4. Conclusions**

En conclusion, nous avons pu démontrer dans ce travail l'apport de la combinaison de deux techniques de caractérisation de surface pour étudier qualitativement et quantitativement les films LB lipidiques, d'autant plus que les expériences de mesures de pression de surface pour étudier ces systèmes donnent des résultats incomplets moyennés sur l'ensemble de la monocouche. Nos résultats de microscopie de fluorescence et d'AFM sur les films LB de SM-C16 et de DMPC montrent une coexistence des phases  $L_C$  et  $L_E$ . L'AFM apporte également des informations très intéressantes sur les propriétés mécaniques de ces deux phases. Ces premiers résultats sur les films LB de DMPC et de SM-C16 constituent une base pour passer à l'étape suivante consacrée à l'étude de l'influence des  $SiO_2$ -NPs sur nos modèles de membranes.

### 3. Etude de films LB plans en interaction avec des NPs de silice

Dans cette partie nous traiterons de l'étude de films LB plans en interaction avec des nanoparticules de silice ( $\text{SiO}_2$ -NPs) de tailles variables (4 à 100 nm). En effet, après avoir étudié les surfaces nanostructurées nues ainsi que l'organisation et la structuration des films LB transférés sur une surface de mica, l'étape suivante consiste à étudier l'influence de la présence des  $\text{SiO}_2$ -NPs sur l'organisation des films. Comme pour les films LB lipidiques seuls (en absence de NPs), la méthode LB est utilisée pour le transfert des films mais cette fois-ci sur des surfaces de mica préalablement nanostructurées par le dépôt de  $\text{SiO}_2$ -NPs. Les images présentées par la suite correspondent toutes à des films lipidiques transférés sur mica à une pression de 30 mN/m et à une température de  $20 \pm 1^\circ\text{C}$ . Tous ces films sont marqués à l'aide du fluorophore NBD-PC (0,5 mol%), ce qui nous permet d'observer les mêmes échantillons en microscopie de fluorescence puis en AFM.

Une autre méthode consiste à faire d'abord interagir une monocouche lipidique avec des NPs injectées dans la sous-phase avant le transfert. Comme précédemment, une étude couplant microscopie de fluorescence et AFM est systématiquement menée, l'AFM permettant de plus d'explorer les comportements nanomécaniques des échantillons. L'objectif de cette étude est finalement d'identifier les éventuelles modifications de l'organisation de films LB lipidiques en présence des  $\text{SiO}_2$ -NPs. Pour cela nous avons étudié des films LB de :

- POPC qui sont homogènes et composés d'une phase unique en  $L_E$ ,
- DMPC et de SM-C16 qui, quant à eux, sont hétérogènes avec la coexistence de phases  $L_E$  et  $L_C$ .

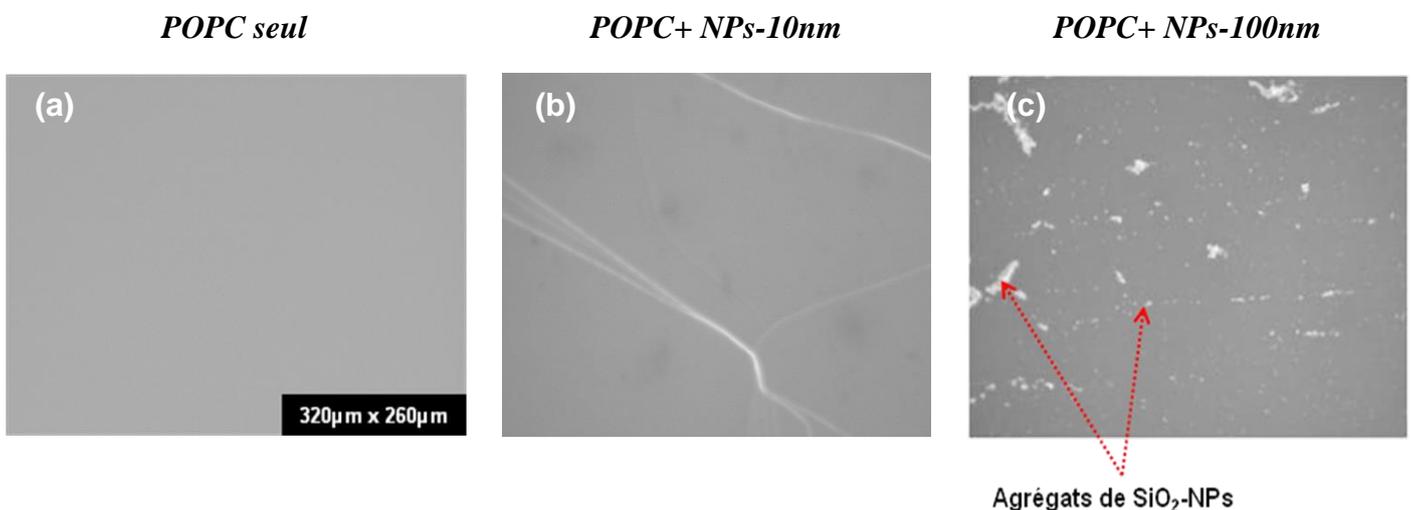
#### 3.1. Etude de lipides insaturés en présence de $\text{SiO}_2$ -NPs : cas du POPC

L'étude de l'interaction NP-film lipidique peut s'avérer très complexe du fait qu'en plus de l'effet des NPs, il faut prendre en compte aussi l'état de phase du lipide étudié. Pour s'affranchir de ce problème, nous avons fait le choix de travailler, dans un premier temps, avec des lipides insaturés présentant une seule phase lipidique tels que les films de POPC.

La présence des NPs sur le mica ne semble pas modifier la qualité du transfert de la monocouche, les courbes de transfert étant similaires en absence et présence des NPs. Les films LB de POPC sont caractérisés par microscopie de fluorescence puis AFM à l'air juste

après leur transfert afin de limiter les effets liés au phénomène de vieillissement du film déjà abordé dans la partie 2 de ce chapitre.

La Figure 83 montre des images de fluorescence de films LB en absence de NPs (a) et en présence de SiO<sub>2</sub>-NPs de 10 nm et de 100 nm de diamètre (b et c respectivement). On peut constater qu'indépendamment de la taille des NPs et à la résolution de la microscopie de fluorescence, les films semblent toujours homogènes, étant composés d'une phase unique, la phase L<sub>E</sub> dans laquelle la sonde fluorescente est uniformément répartie. Concernant les NPs en elles-mêmes, seuls les plus gros agrégats sont visibles et uniquement pour les NPs de 100 nm de diamètre, compte tenu de la résolution de cette méthode (de l'ordre de 400 à 600 nm). Ces agrégats sont de tailles variables et répartis sur l'ensemble de la surface de l'échantillon.

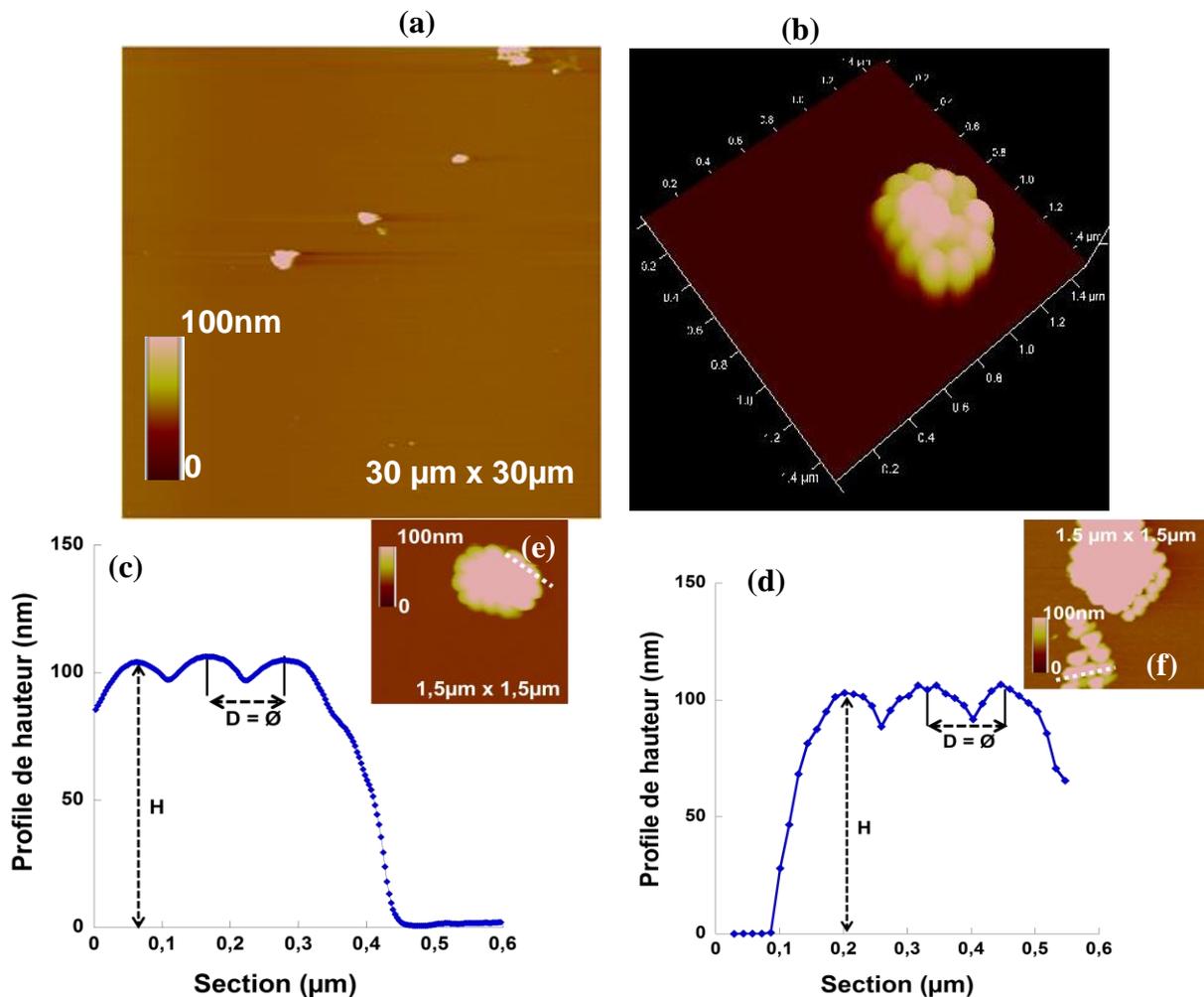


**Figure 83.** Images de fluorescence de films LB de POPC transférés sur une surface de mica nue et des surfaces nanostructurées par dépôt de NPs de 10 nm et de 100 nm de diamètre. Sur l'image centrale, les lignes sont dues aux marches produites lors du clivage du mica avant transfert.

En conclusion, à l'échelle microscopique on n'observe pas d'influence apparente des NPs sur l'état de phase des films de POPC quelle que soit la taille des NPs. Afin de sonder l'échantillon à une échelle plus petite et/ou solliciter d'autres propriétés de nos échantillons nous faisons appel à l'AFM.

La Figure 84 montre les images AFM d'un film LB de POPC transféré sur une surface nanostructurée par dépôt de NPs de 100 nm de diamètre. Ces images confirment nos observations en microscopie de fluorescence : le film lipidique est homogène et constitué uniquement de lipides en phase L<sub>E</sub> même à petite échelle. En revanche, on distingue bien les agrégats de NPs de tailles variables, répartis sur l'ensemble du film. Le zoom sur un des agrégats (Figure 84b) montre distinctement un réseau de NPs. La question posée à ce stade est

de savoir si ces agrégats de NPs sont recouverts ou pas par le film lipidique. Une manière possible de procéder pour répondre à cette question est d'estimer les hauteurs à partir de profils de sections. Si on retrouve une hauteur  $H$  égale au diamètre des NP ( $\phi$ ), cela voudrait dire que les NPs et la surface du mica sont recouvertes uniformément par le film. Dans le cas contraire, notamment pour une hauteur  $H < \phi$  alors les NPs seraient supposées nues.

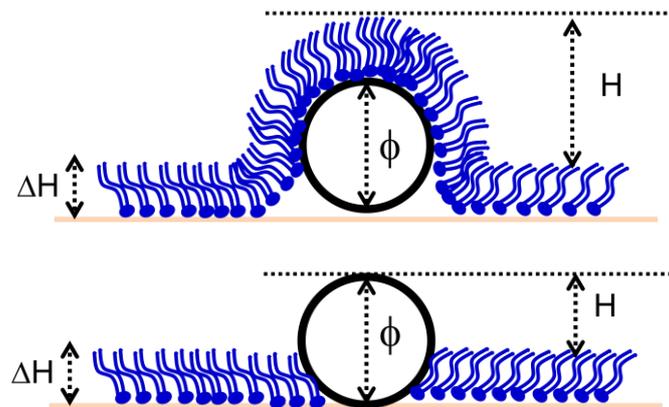


**Figure 84.** Images AFM de hauteur (a, b) d'un film LB de POPC transféré sur une surface nanostructurée par dépôt de NPs de 100 nm de diamètre. Les profils de hauteur (c et d) sont obtenus à partir de sections tracées respectivement sur les images e et f. Les images sont obtenues en modes « tapping » répulsif dominant.

Dans ce cas des sections réalisées sur deux agrégats différents ont été effectuées. La différence de hauteur,  $H$ , entre la surface plane du film et le sommet des NPs (Figures 84c et 84e) déduite est de l'ordre de 100 nm. Par exemple, pour les deux sections présentées (Figures 84c et 84d) nous avons trouvé  $H$  égales à  $106 \pm 1$  nm et  $105 \pm 3$  nm respectivement<sup>22</sup> dans les deux cas. Ces valeurs sont comparables au diamètre des NPs.

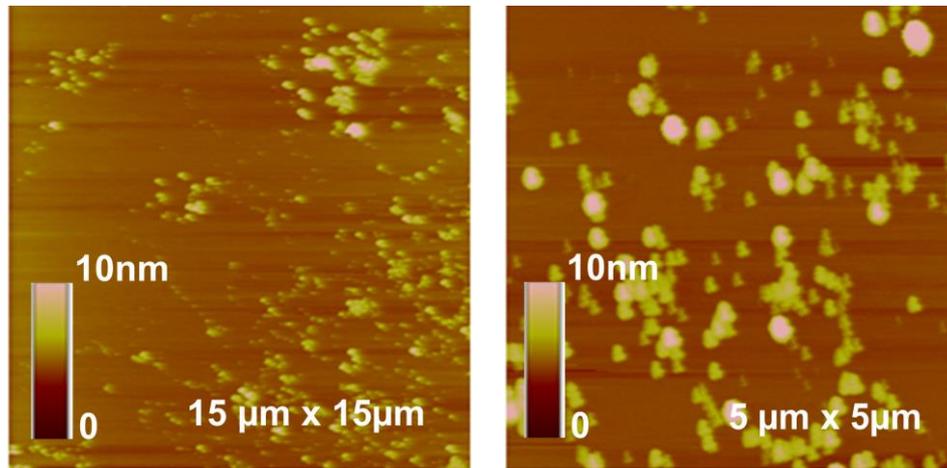
<sup>22</sup> Egalement vérifiable par la mesure de la distance  $D$  indiquée sur les mêmes figures.

Maintenant, la question qui se pose est de savoir si le film lipidique d'épaisseur  $\Delta H$  qui recouvre la surface de mica recouvre aussi la surface des NPs (dont le diamètre est  $\phi$ ). Si la réponse est oui (figure sketch cas 1), on devrait normalement mesurer une hauteur  $H$  égale à  $\phi$  et si la réponse est non alors on devrait trouver  $H = \phi - \Delta H$ . Or dans ce cas précis (film LB de POPC, essentiellement en phase  $L_E$ ),  $\Delta H \approx 1$  nm et  $\phi = 100$  nm, ce qui correspond à une variation relative  $\Delta H/\phi$  de l'ordre de 1%. De plus, si on tient compte des erreurs de mesure comme le bruit (électronique, acoustique, etc...), de l'erreur de positionnement sur le sommet de la NP, etc... on retrouve avec une incertitude relative de même ordre de grandeur que la valeur à trouver. Il nous est donc difficile d'interpréter ces résultats en étant affirmatif dans nos conclusions. Ce n'est donc pas concluant.



**Figure 84bis.** Sketchs montrant les différents cas de figure possible. Cas 1 : recouvrement de la NPs par le film lipidique. Cas2 : NP non recouvert.

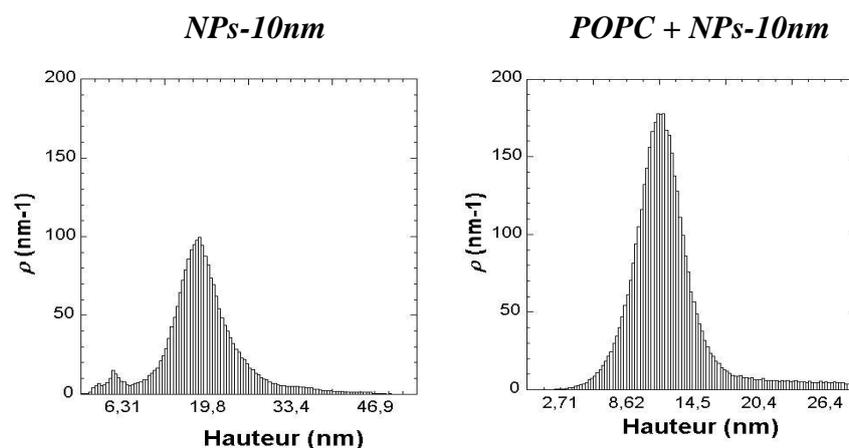
Pour les NPs de petites tailles, contrairement aux images de fluorescence qui n'ont pas permis d'observer la présence de NPs, les images AFM, quant à elles, (Figure 85) mettent bien en évidence la présence d'agrégats de NPs dispersés sur l'ensemble du film lipidique. Là encore, nous n'observons aucune différence de contraste dans le film lipidique en lui-même (sur le mica), ce qui indique la présence d'une phase unique homogène, la phase  $L_E$ . Ce résultat est cohérent avec les résultats précédents (cas de film de POPC sans NPs) et conforte ceux obtenus par microscopie de fluorescence.



**Figure 85.** Images AFM de hauteur (mode tapping répulsif dominant) d'une surface nanostructurée par dépôt de NPs de 10 nm de diamètre après transfert d'un film LB de POPC.

Dans ce cas, et contrairement aux NPs de grandes tailles, théoriquement il y a un facteur 10 environ entre l'épaisseur du film et la taille des NPs. Vérifier l'interaction entre le film lipidique et les NPs, autrement dit le recouvrement ou pas des NPs par le film revient à chercher une variation de l'ordre de 10% sur les mesures des tailles des NPs. Cet ordre de grandeur est accessible par cette technique sauf que les NPs de cette taille là, non seulement, ne forment pas de réseaux 2D mais plutôt ont tendance à former des agrégats dont la forme et la taille sont plus ou moins aléatoires.

En effet, la Figure 86 présente une estimation des hauteurs observées sur des surfaces de mica nanostructurées par des NPs de 10 nm de diamètre avant et après transfert d'un film LB de POPC. Dans les deux cas on note des distributions de hauteurs apparentes des agrégats de NPs assez larges.



**Figure 86.** Les graphes ci-dessus représentent respectivement les densités spectrales d'une surface nanostructurée par dépôt de NPs de 10 nm de diamètre avant et après transfert du film lipidique. Ces hauteurs sont obtenues après l'application sur l'image d'un « masque » caractérisé par une intensité seuil permettant la sélection des NPs (mesures de « densités spectrales »).

En présence du film, les agrégats de NPs ont globalement une hauteur moyenne de 11 nm alors qu'en absence du film elle est de 20 nm (empilement de deux couches de NPs). Cette réduction de hauteur suggère que l'immersion de la lame de mica dans la sous phase entraîne le détachement de certaines NPs de la surface, en particulier celles formant une seconde couche sur la première au contact du mica.

Il nous est aussi impossible, dans ce cas là aussi, de répondre à la question sur le recouvrement éventuel des NPs de 10 nm par le film et de conclure sur la nature de l'interaction film lipidique/NPs outre le fait qu'aucune modification du film (changement de phase) n'apparaît.

### ***3.2. Etude de lipides saturés en présence de SiO<sub>2</sub>-NPs : Cas du DMPC et de la SM-C16***

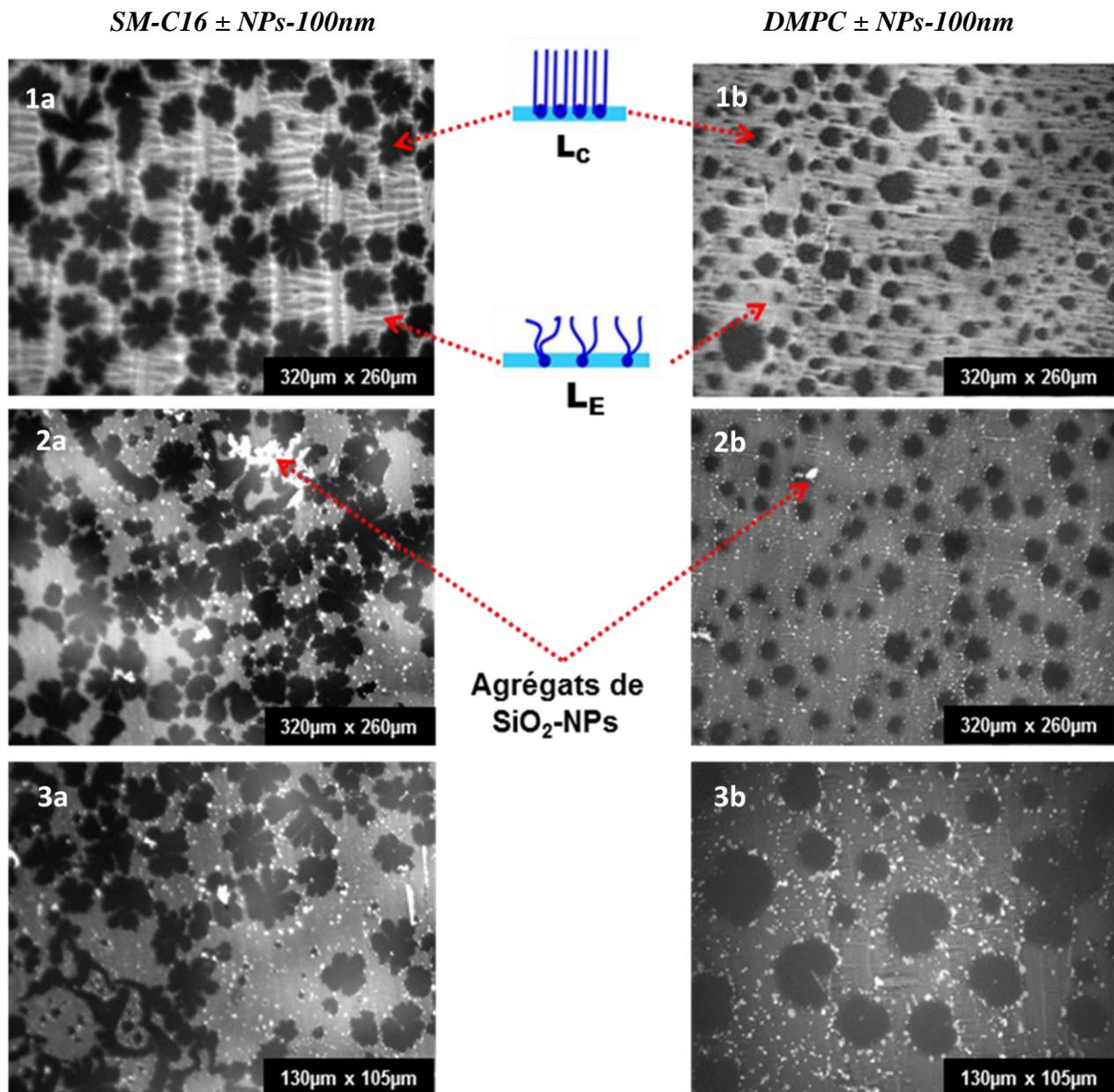
L'étape suivante consiste à étudier des systèmes lipidiques plus complexes présentant initialement une coexistence de phases L<sub>E</sub> et L<sub>C</sub>, l'objectif étant de mettre en évidence une éventuelle corrélation entre la présence de NPs (et en particulier leurs dimensions) et le comportement des deux phases lipidiques. Nous détaillons ci-dessous les résultats obtenus pour chaque dimension de NP testée en abordant trois aspects : une description purement morphologique des films, l'estimation des dimensions apparente des NPs pour essayer de vérifier si elles sont recouvertes ou pas, et la réponse mécanique de la surface. Enfin, les résultats obtenus suggérant des comportements similaires pour la SM-C16 et le DMPC, ces deux systèmes sont donc traités en parallèle.

#### **3.2.1. Localisation des NPs et impact sur l'état de phase de films LB lipidiques**

##### ***3.2.1.1. Films transférés sur des surfaces nanostructurées par des NPs -100 nm***

Dans le cas des films lipidiques en interaction avec de NPs de 100 nm de diamètre, les images de microscopie de fluorescence (Figure 87) révèlent, tout d'abord, la présence des deux phases lipidiques L<sub>E</sub> (zones claires) et L<sub>C</sub> (zones sombres) qui est maintenue, avec des domaines condensés (zone sombres) aux formes caractéristiques déjà mentionnées : circulaires pour le DMPC et en forme de « fleur » pour la SM-C16. La présence de stries observées dans le cas du DMPC est également maintenue.

L'autre observation importante à faire est la présence d'agrégats de NPs de dimensions variables de l'ordre du  $\mu\text{m}$  à la dizaine de  $\mu\text{m}$  (donc suffisamment larges pour être observés par cette méthode dont la résolution est de l'ordre de 0,4-0,6  $\mu\text{m}$ ).

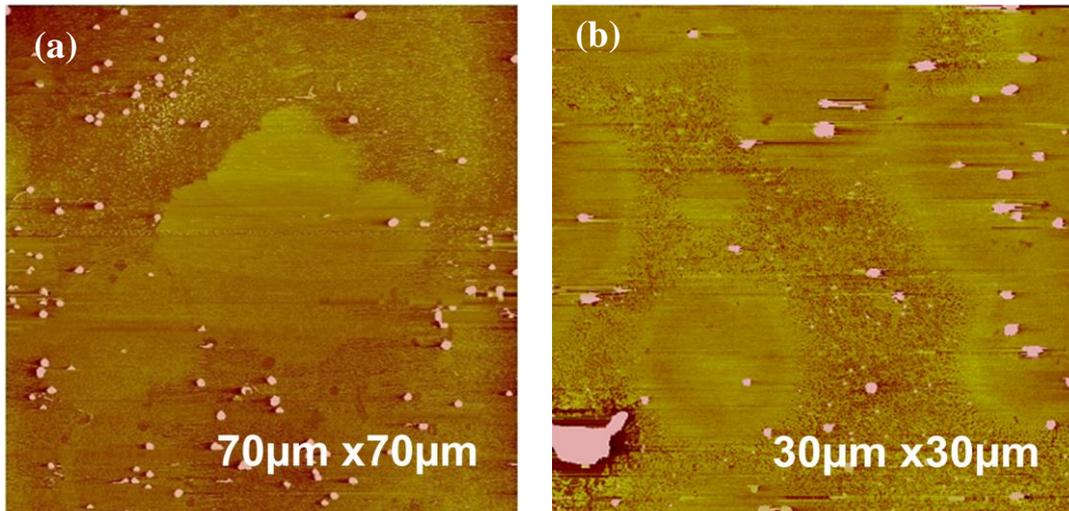


**Figure 87.** Comparaison d'images obtenues par microscopie de fluorescence de films LB de SM-C16 (1a, 2a, 3a) et de DMPC (1b, 2b et 3b) en absence et en présence de NPs de 100 nm de diamètre.

L'étude de ces images suggère également que la dimension latérale des agrégats de NPs semble corrélée avec la nature de la phase lipidique. Ainsi, les gros agrégats (dimensions de l'ordre de la dizaine de  $\mu\text{m}$ ) sont localisés au sein de la phase L<sub>c</sub>, tandis que les agrégats de dimensions moyennes (5-7  $\mu\text{m}$ ) se répartissent entre les deux phases, avec cependant une

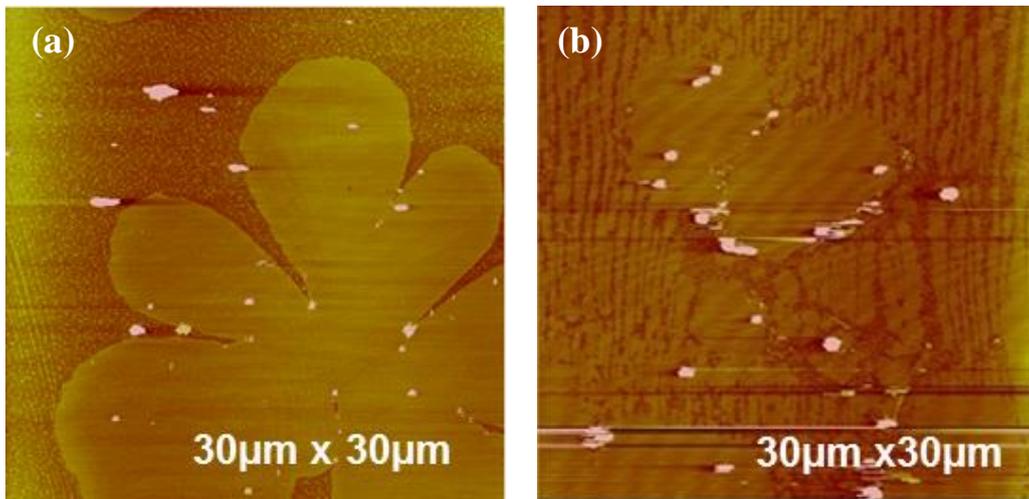
prédominance nette pour la phase  $L_E$ . Quant aux plus petits agrégats observables par cette technique (1-3  $\mu\text{m}$ ), ils sont exclusivement localisés en lisière des domaines en phase  $L_C$ .

Les images AFM (celles de hauteur à grand et petit scans) confirment ces résultats, en montrant clairement la prédominance des agrégats de taille moyenne dans la phase  $L_E$  (zones sombres) et la localisation des petits agrégats en bordure des domaines en phase  $L_C$  (Figures 88 et 89).



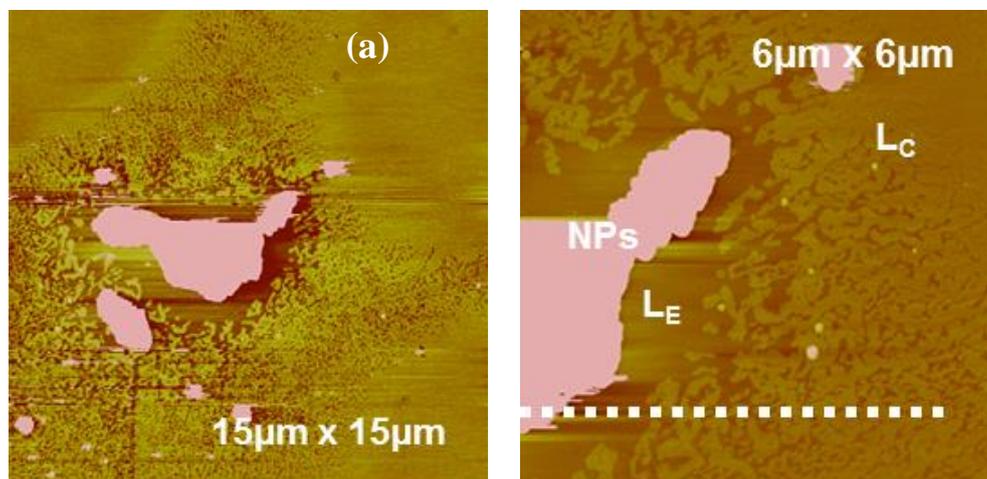
**Figure 88.** Images<sup>23</sup> AFM de hauteur de différents films LB de SM-C16 transférés sur des surfaces nanostructurées par dépôt de NPs de 100 nm de diamètre. Les images sont obtenues en mode « tapping » répulsif dominant à l'air. L'échelle en  $z$  des images est de 100nm.

<sup>23</sup> L'obtention d'images à grand scan (afin de se rapprocher des conditions d'observation en microscopie de fluorescence) nécessite de trouver un compromis entre la vitesse de balayage (à optimiser pour ne pas emporter ou faire glisser des NPs) et l'asservissement (pour ne pas induire d'artéfact ou générer des dérives).



**Figure 89.** Images AFM de hauteur de films LB de SM-C16 (a) et de DMPC (b) transférés sur des surfaces nanostructurées par dépôt de NPs de 100 nm de diamètre. Les images sont obtenues en mode « tapping » répulsif dominant à l'air. L'échelle en z des images est de 100nm.

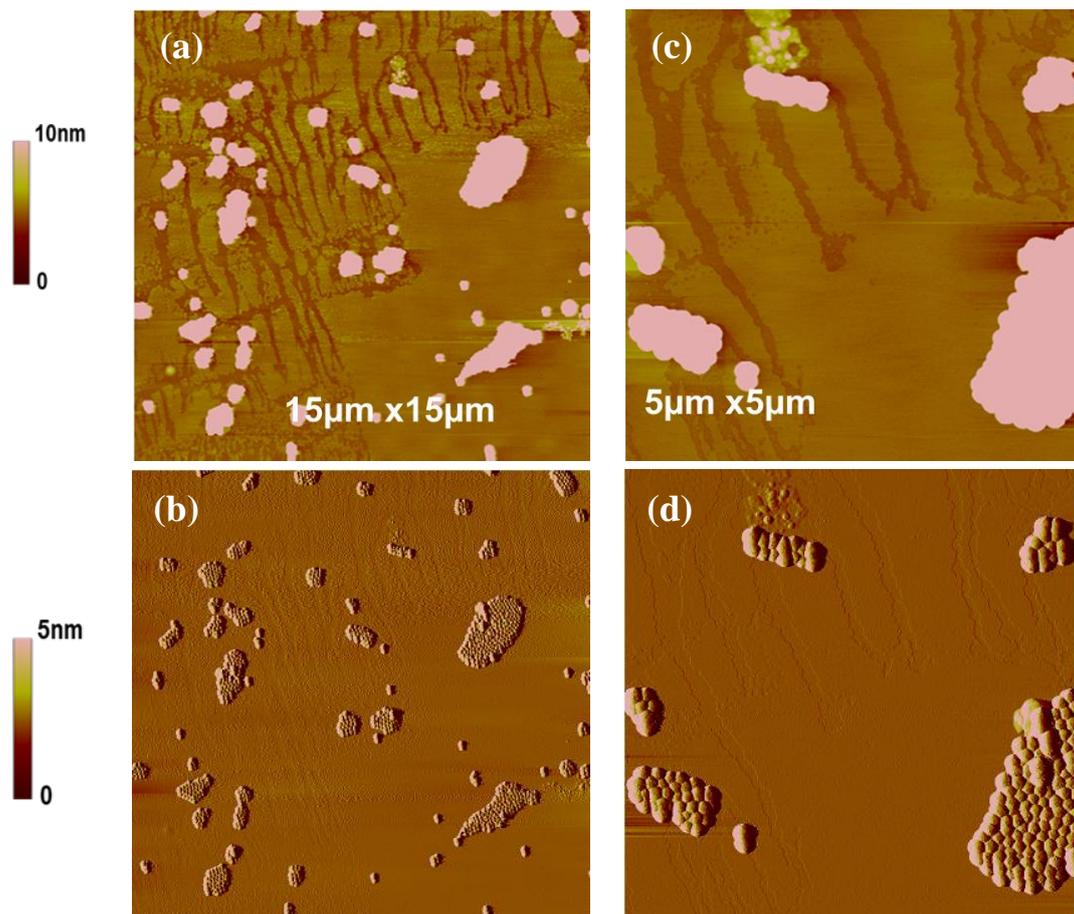
De plus, les résultats obtenus par AFM donnent accès à des informations qui auraient été difficilement visibles (voire invisibles) par la microscopie de fluorescence. A titre d'exemple, le gros agrégat de la figure 88b est entouré d'une zone plus sombre, autrement dit, de la partie du film LB la moins épaisse qui n'est autre que la phase  $L_E$ . Cette observation est confirmée par les zooms successifs sur cette zone de l'échantillon et est illustrée, en particulier sur la figure 90b. Ce résultat a été obtenu pour différents dépôts et dès qu'il s'agit d'un gros agrégat.



**Figure 90.** Images AFM de hauteur d'un film LB de SM-C16 transféré sur une surface nanostructurée par dépôt de NPs de 100 nm de diamètre. Les images sont obtenues en mode « tapping » (en régime répulsif dominant) à l'air. L'échelle en z des images est de 100nm.

La figure 91 présente des images obtenues sur un autre dépôt de film LB sur des NPs de 100nm. On note ici, tout d'abord, la structure habituelle d'un lipide à deux phases ( $L_E$  et  $L_C$ ) mais aussi la présence d'agrégats de tailles très différentes : de la NP isolée au cristal 2D et on retrouve des résultats similaires à ceux observés précédemment, à savoir, différents

situations : les gros agrégats sont dans la phase  $L_C$  et les moyens/ petits agrégats sont dans la phase  $L_E$  et/ ou à la lisière des deux phases.



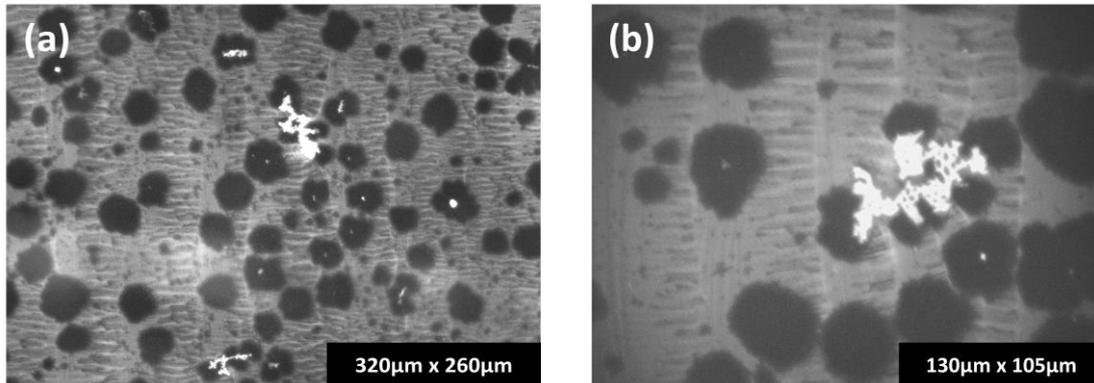
**Figure 91.** Images AFM de hauteur (a, c) et d'amplitude (b, d) de différents films LB lipidiques transférés sur des surfaces nanostructurées par dépôt de NPs de 100 nm de diamètre.

Enfin, les images AFM d'amplitude s'avèrent utiles, comme dans ce cas, en accentuant le contraste de hauteur, révélant ainsi l'organisation régulière des NPs les unes à côté des autres dans les agrégats (Figure 91).

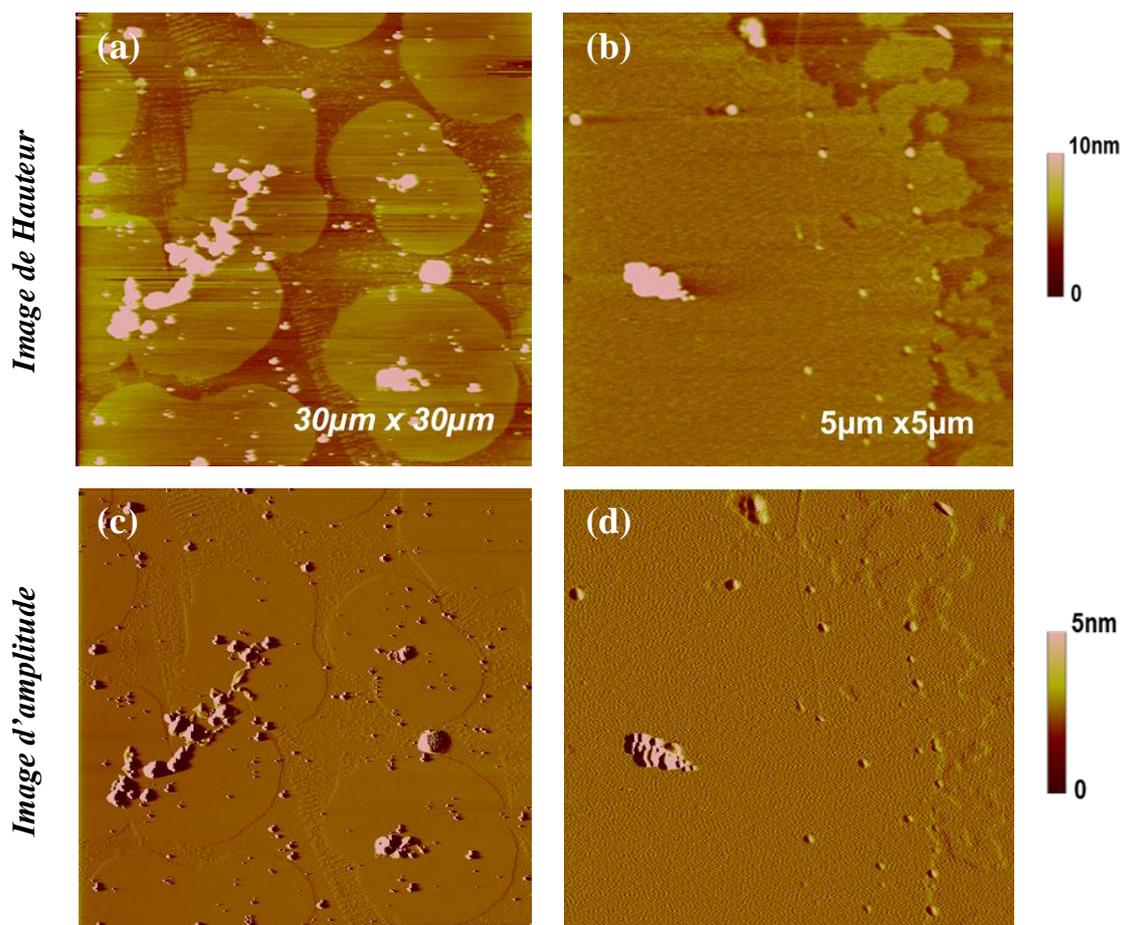
### **3.2.1.2. Films transférés sur des surfaces nanostructurées par des NPs-50 nm**

En présence de NPs de 50 nm de diamètre, l'organisation décrite précédemment reste valable dans l'ensemble comme le montrent les Figures 92 (a et b). En effet, on observe la coexistence des deux domaines  $L_E$  et  $L_C$  (comme pour les autres cas) ainsi que la présence des NPs sous forme d'agregats. Les plus gros d'entre eux sont situées à l'interface entre plusieurs domaines  $L_C$  ou l'interface de plusieurs d'entre eux. Les autres agrégats, les plus petits, se trouvant à l'intérieur de ces domaines  $L_C$ . Notons que ces NPs sont moins nombreuses pour

cet échantillon que dans le cas de celui avec des NPs de 100nm. Par ailleurs, aucun agrégat de NPs n'est visible sur les zones LE. Cela ne veut pas dire qu'il n'y en a pas mais la résolution de cette technique ne nous permet pas de visualiser des agrégats dont la taille est inférieure à 0,4  $\mu\text{m}$ , d'où l'intérêt de faire appel à l'AFM.



**Figure 92.** Images de microscopie de fluorescence de films LB de DMPC en présence de NPs de 50 nm.

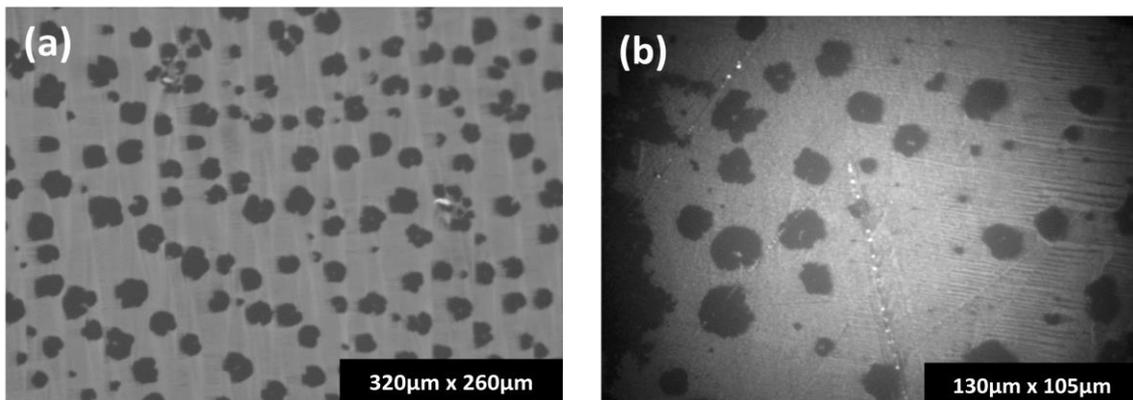


**Figure 93.** Images d'AFM de hauteur (a, b) et d'amplitude (c, d) de films LB lipidiques transférés sur des surfaces de mica nanostructurées par dépôt de NPs de 50 nm de diamètre. Les images AFM présentées ici sont enregistrées en mode tapping (régime répulsif dominant).

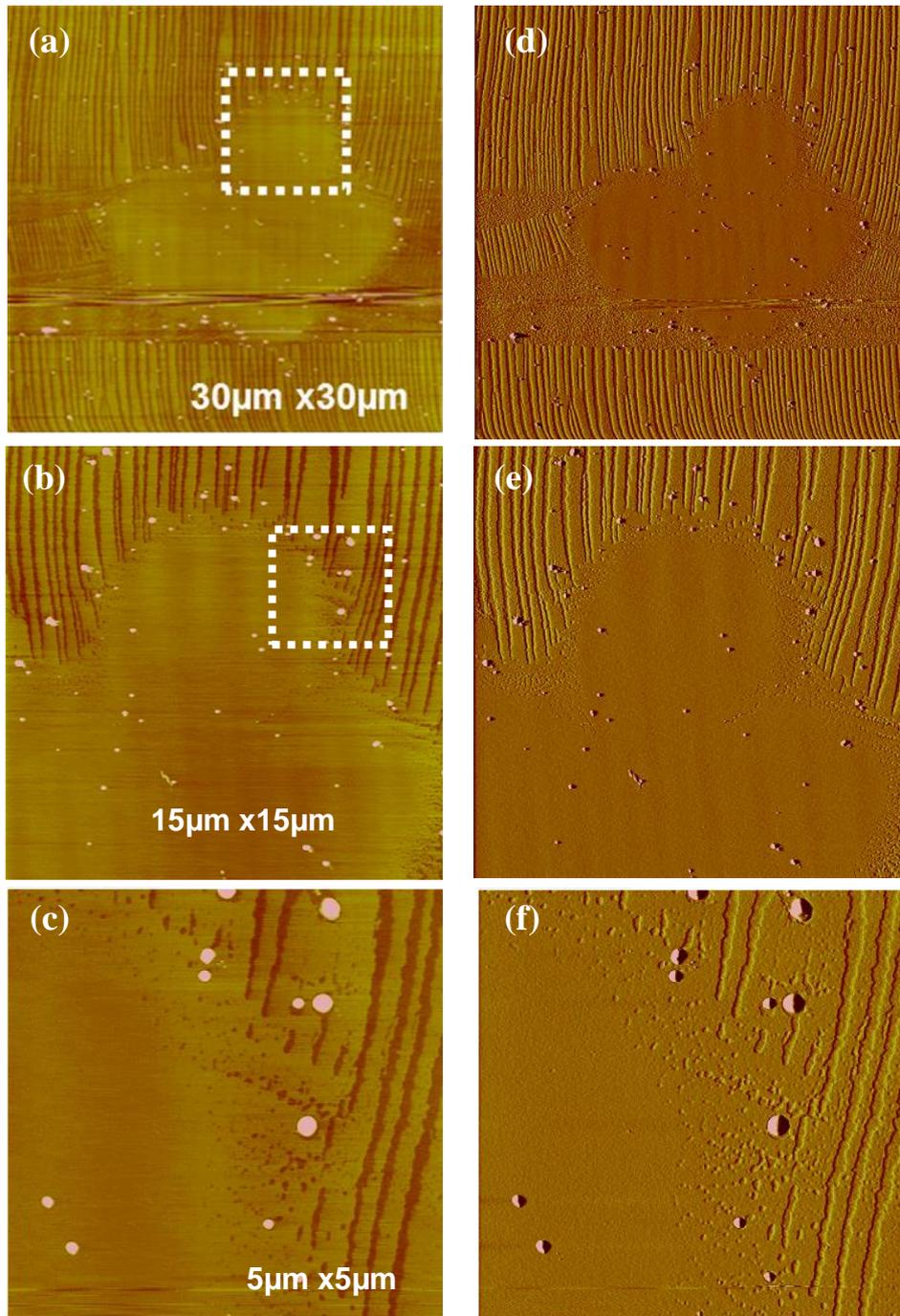
En effet, les images AFM à grande échelle (figure 93) confortent les dernières observations puisque nous retrouvons les gros agrégats (ceux dont la taille est de l'ordre de 2 à 3  $\mu\text{m}$  de large et dont la longueur est supérieure à 10  $\mu\text{m}$ ) dans les zones  $L_C$  ou à la jonction de plusieurs domaines  $L_C$ . On trouve aussi, des agrégats plus petits (de l'ordre du dixième de  $\mu\text{m}$ ), voire même des NPs isolées, situées dans les domaines  $L_C$ , (Figure 93). On observe également la présence d'agrégats de l'ordre du  $\mu\text{m}$  à l'intérieur des domaines en phase  $L_C$  ce qui n'a pas pu être observé en microscopie de fluorescence.

### ***3.2.1.3. Films transférés sur des surfaces nanostructurées par des NPs-10 nm***

D'après la Figure 94, les résultats obtenus par la microscopie de fluorescence confirment, encore une fois, la conservation de la structure du film lipidique en présence des NPs de petite taille. En revanche, ces images ne mettent en évidence que très peu d'agrégats de NPs. Ce qui est très cohérent puisque nous arrivons à la limite de résolution de cette technique. Et c'est ainsi que l'utilisation de l'AFM pour l'étude d'un tel échantillon prend toute son importance.



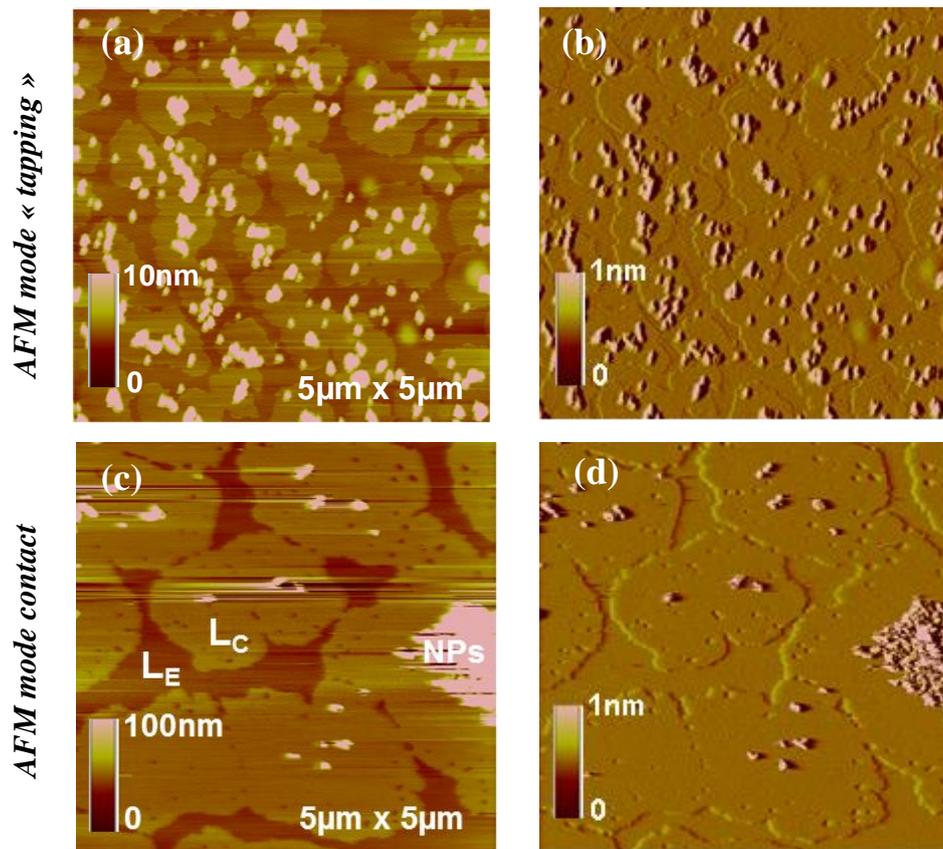
**Figure 94.** Images de microscopie de fluorescence de films LB de DMPC en présence de NPs de 10 nm de diamètre.



**Figure 94-bis 1.** Images AFM de hauteur (a, b, c) et d'amplitude (d, e, f) d'un film LB lipidique transféré sur une surface de mica nanostructurée par dépôt de NP de 10 nm de diamètre. Les images AFM présentées ici sont obtenues en mode « tapping » (régime répulsif dominant). Les images de hauteur et d'amplitude ont des échelles respectives de 10 nm et de 5 nm.

Dans le cas des NPs de 10 nm de diamètre, les images AFM de hauteur et amplitude (Figures 94-bis1 et 95) révèlent la présence de nombreux agrégats de dimensions inférieures au  $\mu\text{m}$ , non observés en microscopie de fluorescence (Figures 94-bis1a et 94-bis1b). Ces agrégats sont essentiellement localisés dans les domaines en phase  $L_C$ , ou organisés sur le pourtour de

ces domaines et parfois ils s'intercalent dans les stries composées de lipides en phase  $L_E$  (Figure 94-bis1b).



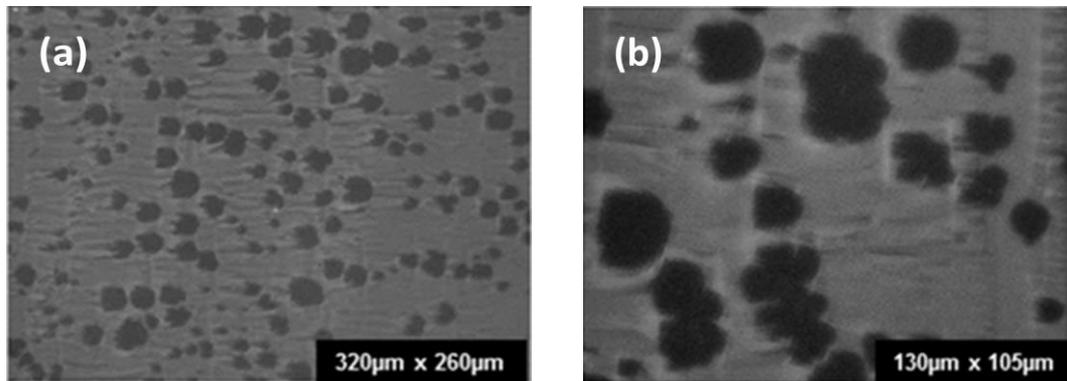
**Figure 95.** Images d'AFM de hauteur (a, c), de phase (b) et de déflexion (d) de deux films LB lipidiques différents transférés sur des surfaces de mica nanostructurées par dépôt de NPs de 10 nm de diamètre. Les images AFM présentées ici sont obtenues en mode contact (c, d) et en mode « tapping » répulsif dominant (a, b).

La figure 95 montre des données obtenues sur deux autres dépôts. La caractéristique des domaines  $L_C$  pour ces différents échantillons (Figures 94-bis1 & 95) est que leurs tailles diffèrent d'un échantillon à l'autre, ce qui n'est pas anormal. On observe aussi, pour ces échantillons, la présence de NPs en petits agrégats (0,4 – 1 μm) dans les phases  $L_C$ . Ce qui diffère, entre les différents échantillons analysés, est la concentration des agrégats.

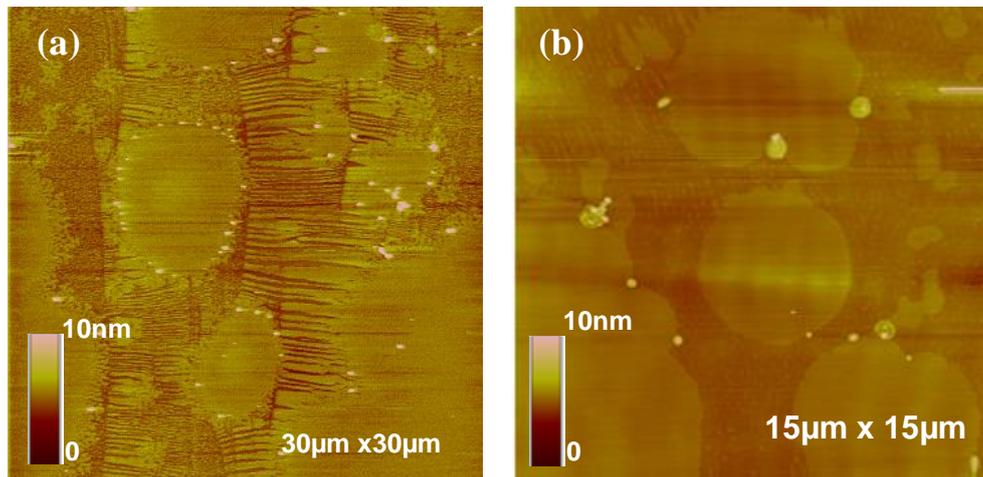
#### 3.2.1.4. Films transférés sur des surfaces nanostructurées par des NPs-4 nm

Enfin dans le cas des NPs les plus petites, la microscopie de fluorescence a confirmé, comme pour les autres tailles de NPs, la non modification de la structure du film (coexistences des phases  $L_C$  et  $L_E$ ). En revanche, aucun agrégat de NPs n'a pu être visible, cela est tout à fait

logique et attendu et voudrait dire qu'avec cette taille de NPs, la taille des agrégats ne dépassent pas les 0,4  $\mu\text{m}$ , valeur correspondant à la résolution limite de cette technique (Figure 96).



**Figure 96.** Images de microscopie de fluorescence de films LB de DMPC en présence de NPs de 4 nm de diamètre.



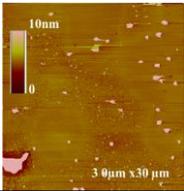
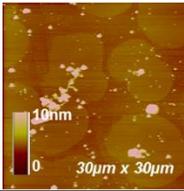
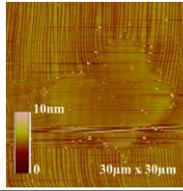
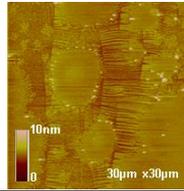
**Figure 96-bis1.** Images d'AFM de hauteur sur deux échantillons différents avec des films LB lipidiques transférés sur des surfaces de mica nanostructurées par dépôt de NPs de 4 nm de diamètre. Les images AFM présentées ici sont enregistrées en mode « tapping » (régime répulsif dominant).

L'AFM confirme ces observations, à savoir que peu d'agrégats sont présents à la surface de cet échantillon. Ceci est sans doute lié au fait qu'un plus grand nombre de NPs se solubilise dans la sous-phase lors de l'immersion de la lame de mica dans la cuve, du fait d'une adhérence plus faible entre les NPs et le mica, à cause de leur petite taille. Dans le cas des agrégats restant sur la surface, on note qu'ils sont de faible taille et sont exclusivement localisés à la lisière des domaines en phase  $L_C$  (Figure 96-bis1).

### 3.3. Bilan de ces premières observations

L'observation purement morphologique des films LB permet de dégager les points suivants :

- Les NPs demeurent sur la surface de mica, même après immersion du mica dans la sous-phase pour le transfert du film lipidique. On note cependant une adhérence moindre dans le cas des NPs de 4 nm.
- La présence des NPs, quelles que soient leurs dimensions ou celles des agrégats qu'elles forment, n'inhibe pas la transition de phase des lipides DMPC et SM-C16.
- On ne note pas d'effet lié au déplacement potentiel des NPs, suggérant que celles-ci sont fixes sur l'échantillon.
- Pour chaque diamètre de NP, la dimension des agrégats est assez clairement corrélée à la nature de la phase lipidique environnante, comme le résume le Tableau 7 ci-dessous. Il en découle que globalement, la présence des NPs semble favoriser la transition des lipides vers la phase  $L_C$ , agrégats et phase  $L_C$  étant le plus souvent co-localisés dans les échantillons.

Diamètre des NPs →	100 nm	50 nm	10 nm	4 nm
Phase lipidique ↓				
$L_E$	5-7 $\mu\text{m}$ (majoritaires)	-	-	-
$L_C$	10 $\mu\text{m}$ , 5-7 $\mu\text{m}$ (minoritaires) agrégat entouré de phase $L_E$	1 $\mu\text{m}$	0,4 - 1 $\mu\text{m}$	0,4 - 1 $\mu\text{m}$
Lisières des domaines $L_C$	1-3 $\mu\text{m}$	< 1 $\mu\text{m}$	0, 4 - 1 $\mu\text{m}$	0,4 - 1 $\mu\text{m}$ NPs isolées

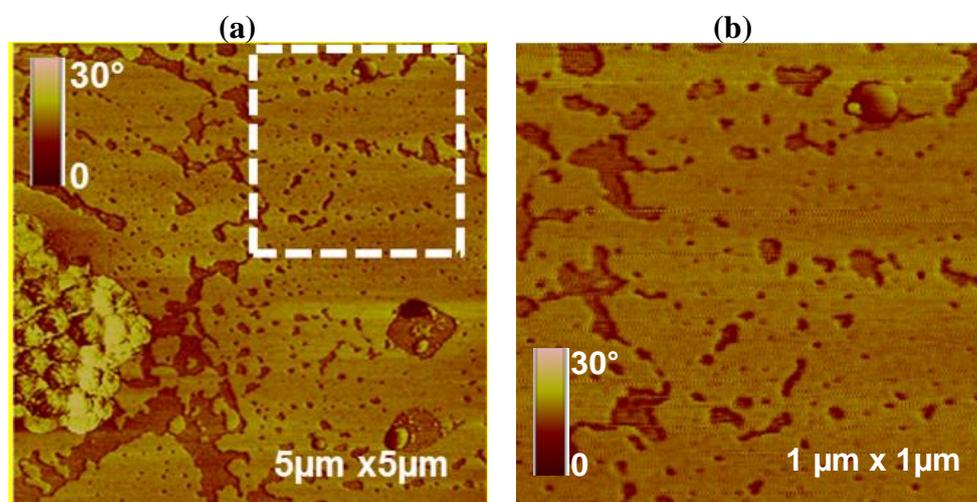
**Tableau 7.** Ordre de grandeur typique des agrégats observés dans les deux phases lipidiques en fonction de la dimension des NPs.

Bien que cette étude morphologique ait révélé des informations qui nous ont permis de commencer à mieux appréhender l'interaction NP-monocouche-lipidique, ces résultats ne

permettent pas encore de répondre à la question que l'on s'était posé au départ : les NPs sont-elles recouvertes ou pas par le film lipidique ? Nous allons nous attacher à cet aspect de l'interaction dans le paragraphe suivant.

### 3.3.1. Estimation des dimensions apparentes et des rugosités par AFM : les NPs sont-elles recouvertes par le film lipidique ?

L'idée, dans cette partie de l'étude, est de vérifier si les données « images topographiques » peuvent être exploitées un peu plus en fournissant des informations quantitatives. Donc, tout comme pour le cas du POPC, nous allons dans un premier temps, via l'estimation des épaisseurs du film et des hauteurs des NPs de nos résultats, essayer de déduire la présence ou pas de film lipidique sur les NPs. Nous allons aussi pousser l'analyse des images obtenues afin d'en extraire un maximum d'informations.

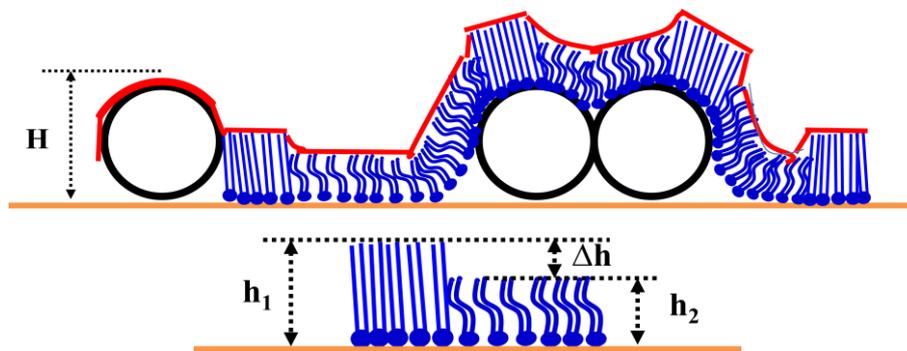


**Figure 97.** Images AFM de phase d'un film LB de SM-C16 transféré sur une surface nanostructurée par le dépôt de NPs de 100 nm.

Avant de passer à l'exploitation des sections, et pour justifier la méthodologie choisie, nous présentons à titre d'exemple le type de dépôt de films LB de SM-C16 en interaction avec des NPs que l'on a obtenu régulièrement et qui est à étudier. Dans un souci de clarté, nous optons donc présenter, ici, des images de phase (et non pas celle de la topographie) afin de s'affranchir du contraste de hauteur qui sature l'image de hauteur et ne permet pas de voir en même temps, distinctement et avec la même résolution aussi bien le film (épaisseur de l'ordre de 1nm) se trouvent sur le substrat (mica) et la surface des NPs (taille de l'ordre de 100nm). La Figure 97 correspond donc à une image de film LB de SM-C16 en interaction avec des NPs de 100 nm de diamètre. Nous identifions deux zones intéressantes à exploiter. L'une, celle du substrat (mica) recouvert uniquement par le film lipidique avec ses deux phases phase  $L_E$  (zones sombres) et  $L_C$  (zones claires). L'autre zone, celle avec des NPs sur lesquelles est

déposé (ou pas) le film lipidique avec ses deux phases. Le contraste à la surface des NPs n'est pas homogène, on y trouve des zones sombres ainsi que des zones claires que l'on pourrait attribuer à la présence sur les NPs des deux phases lipidiques.

Ces observations nous permettent donc d'imaginer aisément les situations que l'on peut supposer présentes dans nos échantillons et que nous avons illustrées dans le schéma de la Figure 98. Ce schéma indique les hauteurs exploitables à partir des profils de hauteur, susceptibles de nous renseigner sur la présence ou pas de lipides sur les agrégats de NPs.



**Figure 98.** Schéma représentant les différentes situations supposées exister dans nos échantillons.  $H$  ;  $H+h_1$  (NPs recouvertes par la phase  $L_C$ ) ;  $H+h_2$  (NPs recouvertes par la phase  $L_E$ ).

Comme, l'interaction entre le film lipidique et les NPs peut conduire à différents cas de figures, on devrait, tout d'abord, observer des profils irréguliers à partir des sections effectuées sur les NPs, comme observé dans la figure 97 et représenté sur le schéma de la figure 98. En effet, ces différents cas sont comme suit : certaines NPs seraient complètement recouvertes par le film lipidique avec ses 2 phases ( $L_E$ ,  $L_C$ ) ou alors uniquement par l'une des deux phases, ou alors partiellement recouvertes par le film (les deux ou uniquement une des deux phases) ou, enfin et tout simplement, complètement non recouvertes par le film. La comparaison des valeurs des hauteurs extraites à partir des sections (profils) pourrait nous donner ces informations si, bien évidemment, la résolution est suffisante et si les images/sections ne sont pas trop bruitées.

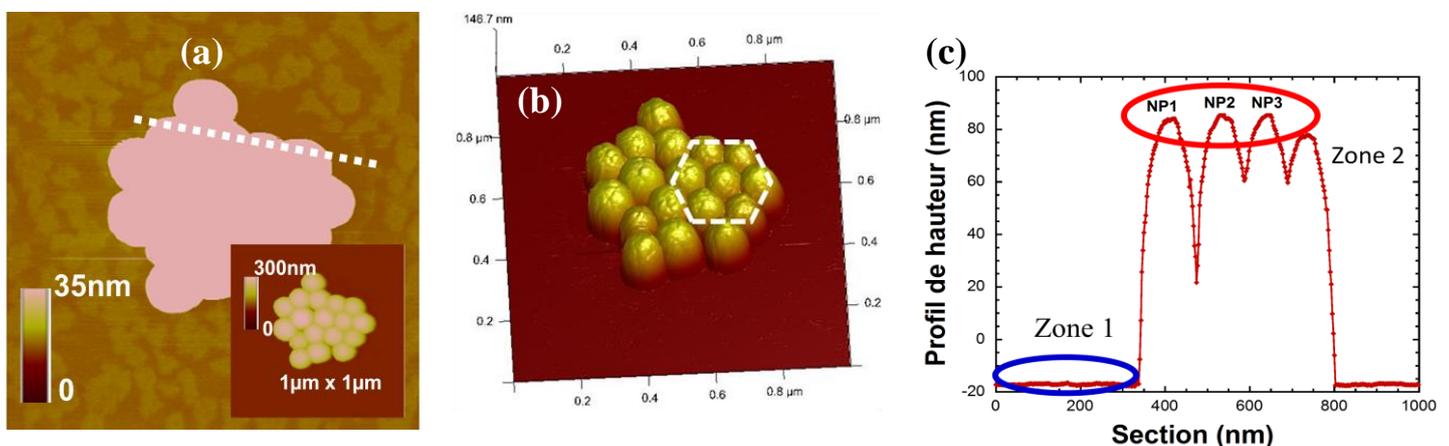
Comme indiqué au début de cette partie, nous avons cherché à exploiter quantitativement nos données en utilisant uniquement des images à petits scans bien résolues afin de s'affranchir des phénomènes de non linéarité. Ces images doivent également être représentatives de l'ensemble de l'échantillon et présenter des agrégats avec un nombre suffisant de NPs (ces dernières devant être organisées en réseaux 2D afin d'éviter tout artéfact possible) et des zones de substrats nues ou recouvertes par le film (en tant que références). Enfin, les mesures de hauteur doivent être analysées en tenant compte de la polydispersité de chaque catégorie de

NPs (plus la polydispersité est importante, plus l'analyse de cette hauteur est sujette à caution) et du rapport entre la hauteur déterminée et la dimension des NPs. Ainsi, et tout comme pour le POPC, il nous sera plus difficile d'exploiter les mesures dans le cas des NPs de grande taille, la différence de hauteur  $\Delta h$  entre les deux phases lipidiques (de l'ordre de 1 nm) ne représentant par exemple que 1% ou 2% de la dimension d'une NP de 100 nm ou 50 nm. Par contre, la variation de hauteur d'une petite NP due à un éventuel recouvrement par le film sera, logiquement, plus facile à détecter,  $\Delta h$  représentant 10% ou 25% de la dimension d'une NP de 10 nm ou 4 nm.

Dans le cas de films LB de SM-C16 en interaction avec des NPs de 100 nm de diamètre, une représentation 3D (image a) est fournie sur la Figure 99 pour mieux mettre en évidence l'organisation hexagonale (réseau 2D) des NPs. L'image (a) de la Figure 99 révèle mieux le contraste dans le film présent sur le support (les deux phases lipidiques), mais le contraste de la zone à la surface des NPs est alors saturé. Sur cette image, nous choisissons les deux zones d'intérêt et à partir desquelles nous allons effectuer les analyses de profils :

- Zone 1 : le substrat (mica) recouvert uniquement par le film avec ses deux phases phase  $L_E$  et  $L_C$  ;

- Zone 2 : les NPs. On effectue les sections sur les maxima des NPs d'où la nécessité de travailler sur une image résolue.

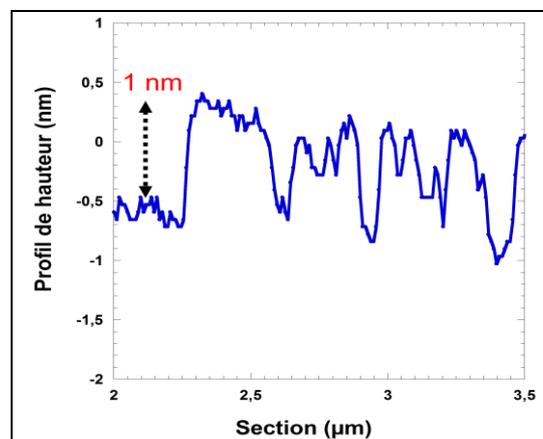


**Figure 99.** Images AFM de hauteur 3D (a) et 2D (b) d'un film LB de SM-C16 transféré sur une surface de mica nanostructurée par dépôt de NPs de 100 nm de diamètre. L'image AFM est obtenue en mode Tapping répulsif dominant. Le profil de hauteur (c) présenté ici est obtenu à partir de la moyenne de sections réalisées sur l'image brute non traitée.

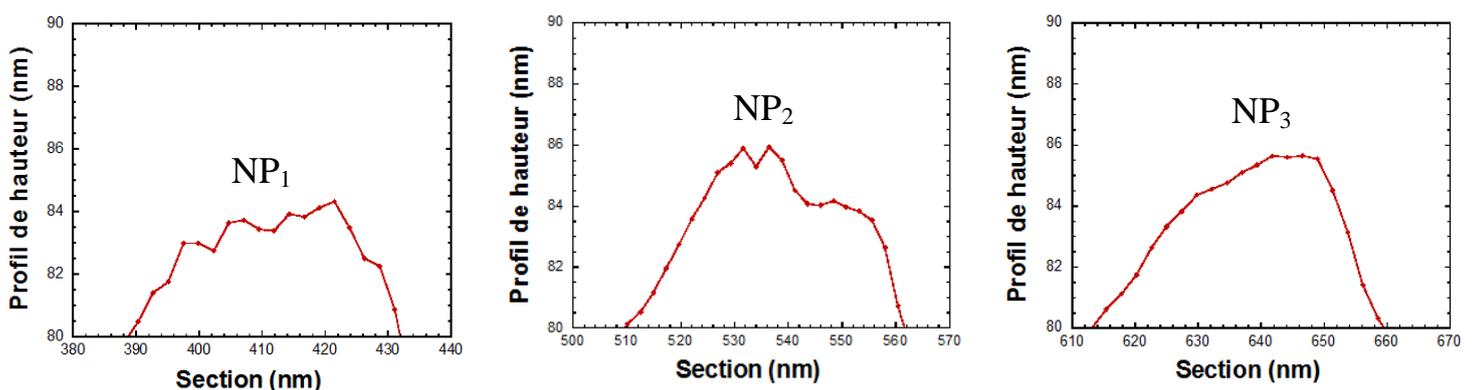
Le profil de hauteur obtenu sur une partie de l'image et correspondant à ces 2 zones est présenté sur la Figure 99c. A première vue, le réseau de NPs semble compact mais l'analyse du profil ne le confirme pas. Seules six des NPs forment un réseau hexagonal (Figure 99b) et

par conséquent les effets de bords pourraient apparaître liés à l'effet de la pointe. Nous avons donc choisi de faire un profil sur quatre NPs parfaitement alignées (Figure 99a) dont trois sont organisées de façon compacte.

Rappelons que, pour estimer les différences de hauteur, la ligne de base considérée n'est pas la surface de mica nue mais plutôt celle du film (avec ses deux phases). Le profil présenté sur la Figure 100 est, lui, effectué sur le film (zone 1) et nous permet d'extraire le paramètre  $\Delta h$ , correspondant à la différence de hauteur entre les deux phases ( $L_E$  et  $L_C$ ). Et on retrouve bien, une différence de niveau,  $\Delta h \approx 1\text{nm}$  (figure 100), grandeur déjà obtenue lors de l'étude du film LB de SM-C16 seul (partie 2 du chapitre 4). Les hauteurs des NPs mesurées sont comprises entre 100 et 105 nm (figure 99c).



**Figure 100.** Profil de hauteur effectué sur le film lipidique révélant la différence de hauteur entre les phases  $L_E$  et  $L_C$ . Le profil présenté ici est obtenu à partir de sections réalisées sur la zone 1 de l'image 99a.



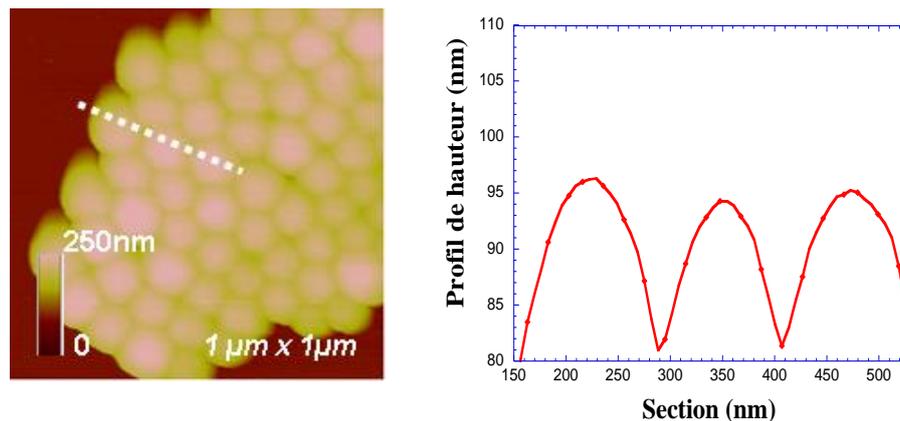
**Figure 101.** Profils de hauteur en zoomant sur la zone 2 au sommet des trois NPs ( $NP_1$ ,  $NP_2$ ,  $NP_3$ ) juxtaposées de la figure 99.

En zoomant les profils de hauteur de la zone 2, au sommet des trois NPs juxtaposées,  $NP_1$ ,  $NP_2$ ,  $NP_3$  (Figure 101), on remarque que :

- les différences de hauteurs entre le substrat et les sommets des 3 NPs (hauteurs maximales) ne sont pas identiques ;

- les profils des trois NPs semblent irréguliers (notamment au sommet). Cette irrégularité pourrait provenir soit de la présence du film avec ses deux phases à leur surface, soit d'une irrégularité intrinsèque de leur surface, soit du bruit.

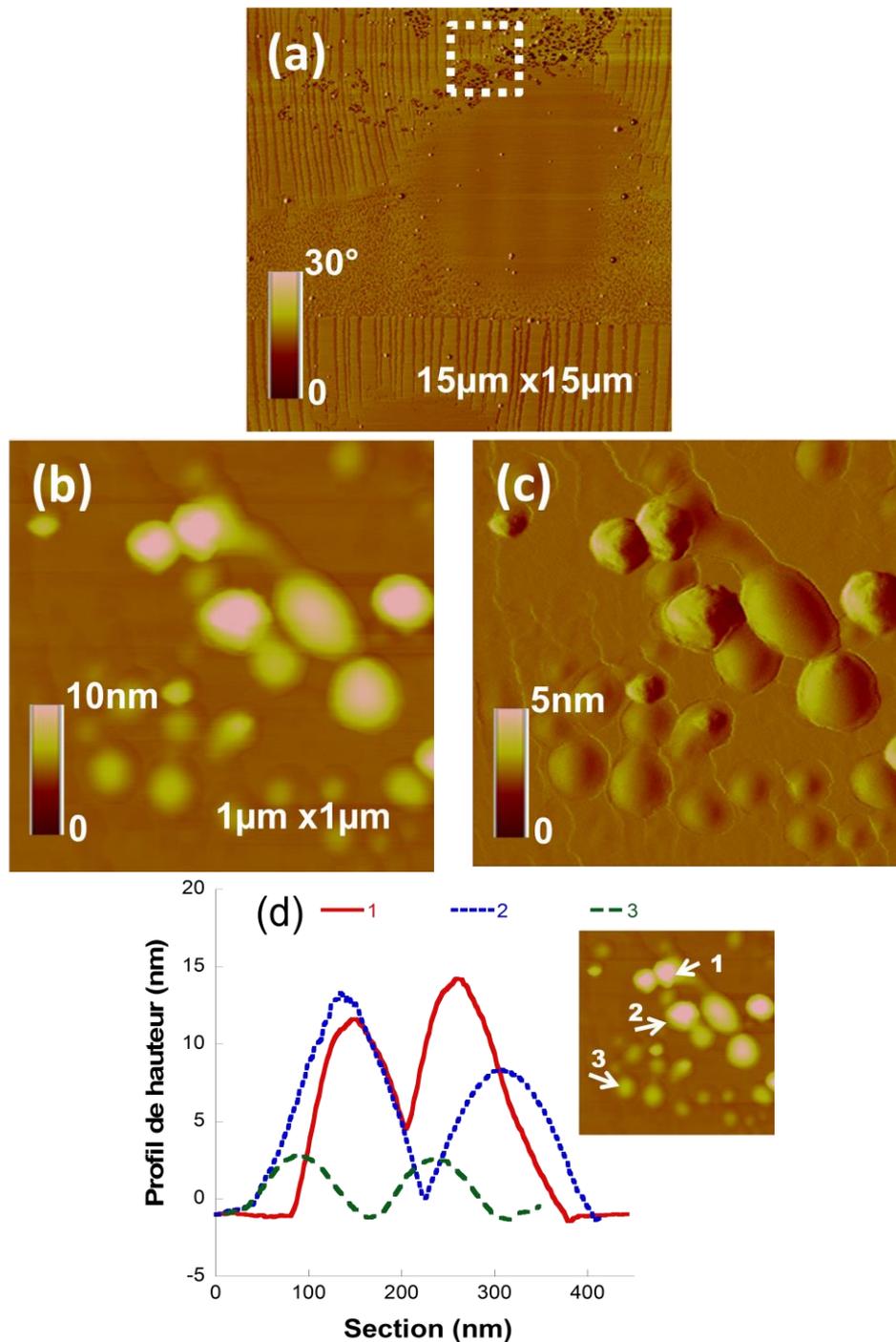
Afin de vérifier ce dernier point, nous avons comparé ces profils (figure 101) à ceux de NPs nues (surface nanostructurée sans le film). Les résultats présentés sur la Figure 102. La section effectuée montre que la surface des NPs est lisse et ne présente pas d'irrégularité.



**Figure 102.** Image AFM de hauteur d'une surface nanostructurée par dépôt de NPs de 100 nm de diamètre (a). Profil de hauteur sont obtenus zoomant sur les sommets des NPs.

Ceci nous amène à conclure que les irrégularités observées sur les NPs (de 100nm) de la Figure 99 sont très probablement liées à la présence du film avec ses deux phases. Mais cette conclusion ne peut pas être transposée à tous les cas de NPs. Par exemple, quand on examine d'autres dépôts, parfois l'inhomogénéité de la surface des NPs et la dispersité de valeurs des hauteurs obtenues est encore plus flagrante, c'est le cas des NPs de 50 nm de diamètre pour lesquelles on note une distribution très hétérogène des hauteurs des agrégats. Cependant, ceci peut être dû au fait que la solution initiale de NPs est très polydisperse comme le montrent nos mesures de DLS ( $\varnothing = 89 \pm 31 \text{ nm}$ ). C'est la raison pour laquelle nous serons amenés à exploiter toutes les informations possibles (image de hauteur, sections, images d'amplitude « signal d'erreur » et aussi celle de la phase qui seront très riches en information).

La même démarche a été effectuée pour des films/dépôts de NPs de plus petite taille. Par exemple, la Figure 103 montre des images AFM de films LB de SM-C16 transférés sur des surfaces nanostructurées par le dépôt de NPs.

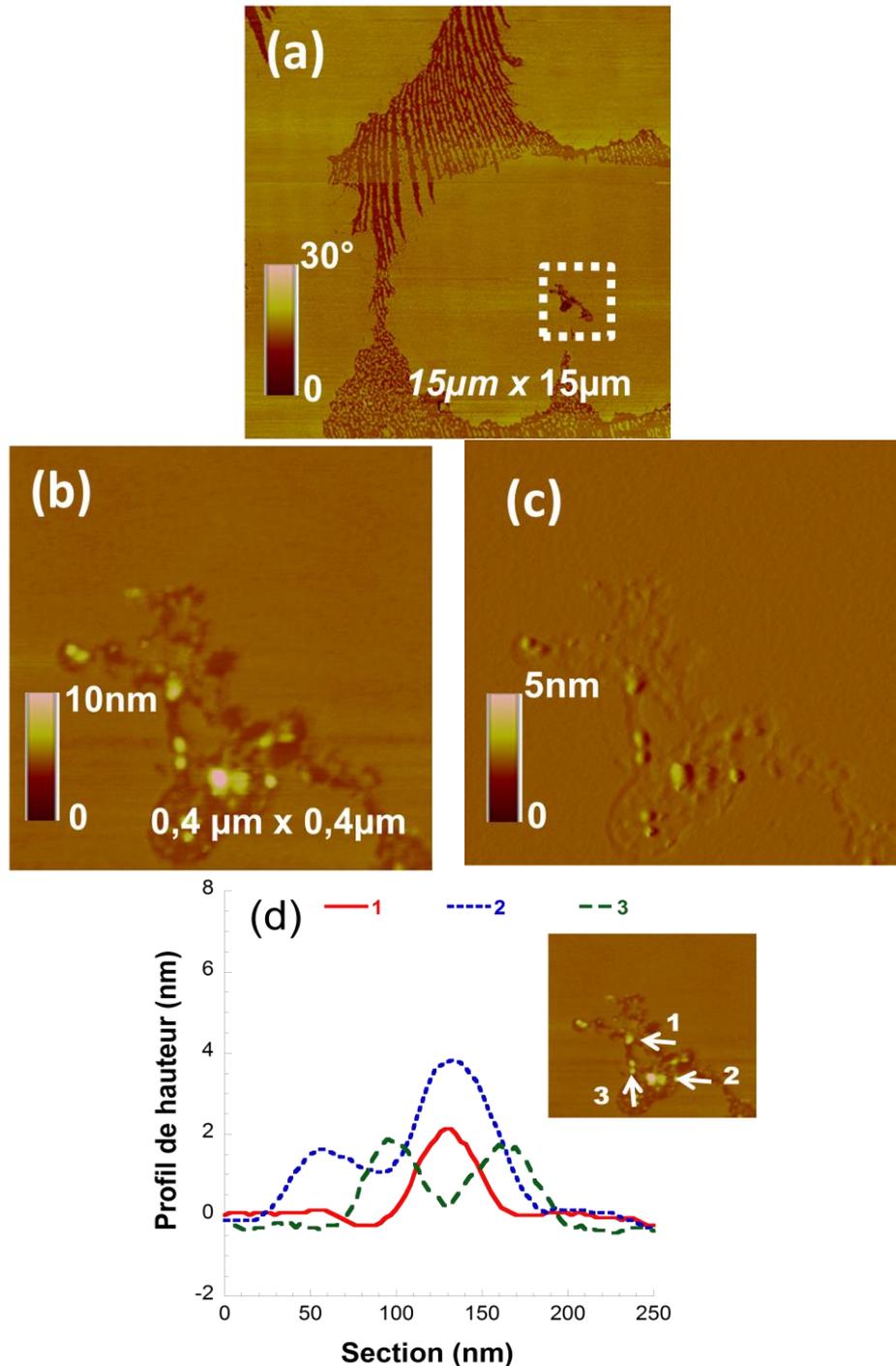


**Figure 103.** Images AFM de phase (a) hauteur (b) et d'amplitude (c) de films LB lipidiques transférés sur des surfaces de mica nanostructurées par le dépôt de NPs de 10 nm. Les profils de hauteur sont obtenus à partir des sections réalisées comme indiqué sur l'image en inset. Les images sont obtenues en mode Tapping répulsif dominant.

La figure 103 a, illustre l'interaction d'un film lipidique avec un dépôt de NPs de 10nm . On y trouve, comme indiqué précédemment, des NPs réparties dans la phase  $L_C$  et/ou à la lisière des deux phases  $L_C$ - $L_E$ . Pour améliorer la résolution et limiter les incertitudes dans la mesure des hauteurs de NPs, un zoom de  $1\mu\text{m} \times 1\mu\text{m}$  est effectué en balayant l'une de ces zones (figure 103 b). L'image topographique (2D) correspondante met en évidence des agrégats mais aussi des NPs isolées. L'analyse des hauteurs, via les sections effectuées (profil, figure 103d) n'est pas évidente à faire. En effet, et d'après nos mesures, on note des hauteurs de NPs allant de 3nm à environ 15nm, les NPs n'en faisant, théoriquement, que 10nm. Le sketch présenté en figure 98 nous aide à trouver des explications partielles, celles indiquées précédemment mais ne permet pas de conclure très précisément.

Par ailleurs, et si on regardait de très près le signal d'erreur correspondant à ces données (figure 103c), on peut relever des comportements très différents selon les agrégats/NPs. En effet, pour certains d'entre eux le contraste du signal d'erreur est uniforme (lisse) similaire à celui d'autres zones de la surface (le film lipidique sur le substrat). On pourrait supposer que ces NPs/agrégats sont recouverts « intégralement » par le film LB. Pour d'autres NPs/agrégats, le contraste du signal d'erreur paraît « accidenté/rugueux », c'est le cas, par exemple, des agrégats les plus hauts, cette zone « accidentée » se trouvant en particulier au sommet de l'agrégat. Par conséquent, via l'étude du signal d'erreur, on peut dire que les surfaces de ces deux types d'agrégats n'est pas de même nature. Certains (les moins hauts) sont recouverts par le film lipidique et d'autres (les plus hauts) ne le sont que partiellement.

Et enfin, une dernière observation peut être faite sur ces données à savoir les films LB avec les NPs de 10nm, il s'agit en particulier de l'image du signal d'erreur qui montre des contours délimitant les domaines  $L_E$ - $L_C$  mais aussi ceux des agrégats de NPs. C'est comme si la phase du film lipidique au voisinage très proche de l'agrégat n'était pas de même nature que celle du film environnant. Cette remarque rejoint certaines de nos observations antérieures, celles des gros agrégats situés dans les phases  $L_C$  et qui étaient entourés par une phase  $L_E$  (figure 90). Pour être appuyée, cette observation mérite d'être vérifiée et étudiée en profondeur et par conséquent nécessite des expériences supplémentaires.



**Figure 104.** Images AFM de phase (a) hauteur (b) (c) et d'amplitude (c) de films LB lipidiques transférés sur des surfaces de mica nanostructurées par le dépôt de NPs de 4 nm. Les images sont obtenues en mode Tapping répulsif dominant.

La même étude a été effectuée sur les échantillons de LB sur des dépôts de NPs de 4nm (figure 104). De la même manière un zoom a été effectué sur des NPs localisées dans la phase LC (figure 104b). Les agrégats observés sont de tailles plus petites mais nous pouvons faire quasiment les mêmes observations que celles effectuées dans le cas des NPs de 10nm. En revanche, ici une des dernières conclusions apparaît de façon plus évidente dans le cas des

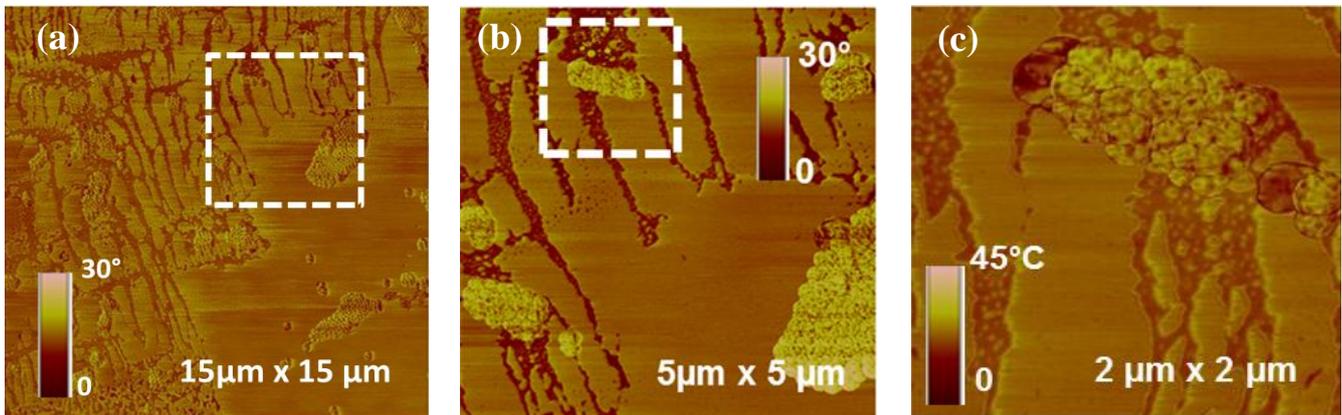
NPs de 4nm que dans le cas des 10nm. En effet, et tout d'abord, d'après les images de topographie (Figure 104a et b), on note que les agrégats de NPs se trouvent dans la zone sombre, autrement dit dans la zone la moins profonde soit la phase  $L_E$ . Ce résultat est bien évidemment appuyé par l'image d'erreur (Figure 104c). L'analyse des 3 sections effectuées sur trois NPs/ agrégats différents (« 1 », « 2 » et « 3 ») et des hauteurs mesurées correspondantes, donne des valeurs allant de 2nm à 4nm. Ces résultats laissent supposer qu'il s'agit, tout d'abord, de NPs isolées dans la majorité des cas (la hauteur maximale ne dépassant pas les 4nm). Par ailleurs, les NPs « 1 » et « 3 » sont difficiles à interpréter car elles sont dans une zone inhomogène avec la co-existence des deux phases. En revanche, les NPs « 2 » méritent que l'on s'y attarde un peu plus. En effet, ces 2 NPs se trouvent isolées dans un sillon de lipide en phase  $L_E$  et entouré de part et d'autre par des domaines  $L_C$ . La section correspondante donne une hauteur de 2 nm.

L'exploitation poussée de ces données ne peut pas se faire sans d'autres expériences complémentaires. En attendant, nous pouvons avancer, à ce stade de l'étude, que cette disparité des hauteurs mesurées pourrait être due à la combinaison de plusieurs paramètres, la rupture du film lipidique entourant les NPs, le recouvrement de la NP par le film et/ou l'empilement de NPs en plusieurs couches.

Dans la suite et pour compléter cette étude, nous allons nous intéresser aux réponses mécaniques des films LB en lien avec leur interaction avec les dépôts de NPs. Pour cela, nous avons effectué des expériences de frottements (friction en mode contact) et des expériences de rhéologie en mode tapping en modulant l'interaction entre la pointe et la surface sondée (régime attractif dominant ou répulsif dominant).

### 3.3.2. Hétérogénéité de la réponse mécanique de surface

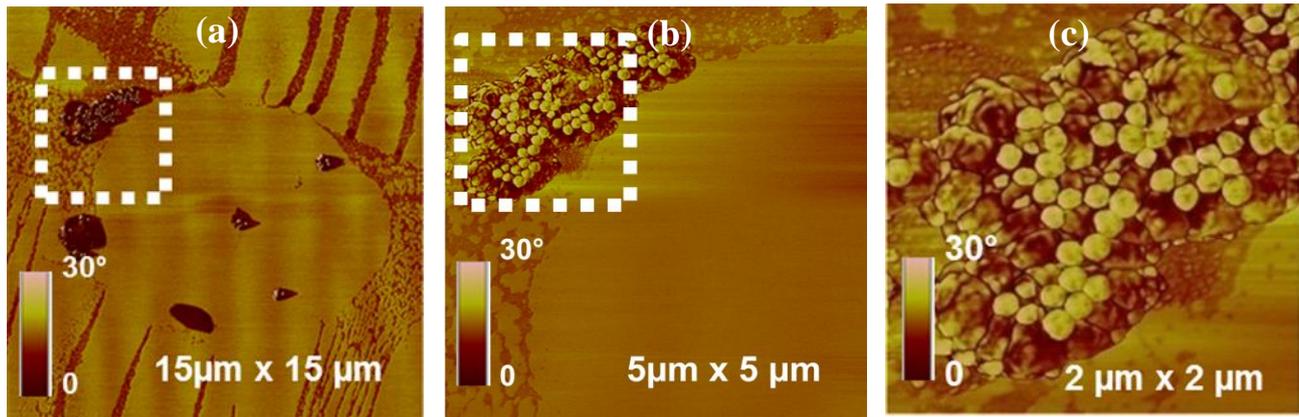
La Figure 105 présente des images de phase<sup>24</sup> obtenues dans le cas d'un film LB de SM-C16 transféré sur une surface nanostructurée par dépôt de NPs de 100 nm de diamètre.



**Figure 105.** Images AFM de phase d'un film LB de SM-C16 en présence de NPs de 100 nm de diamètre. Les images sont obtenues en mode « tapping » répulsif dominant.

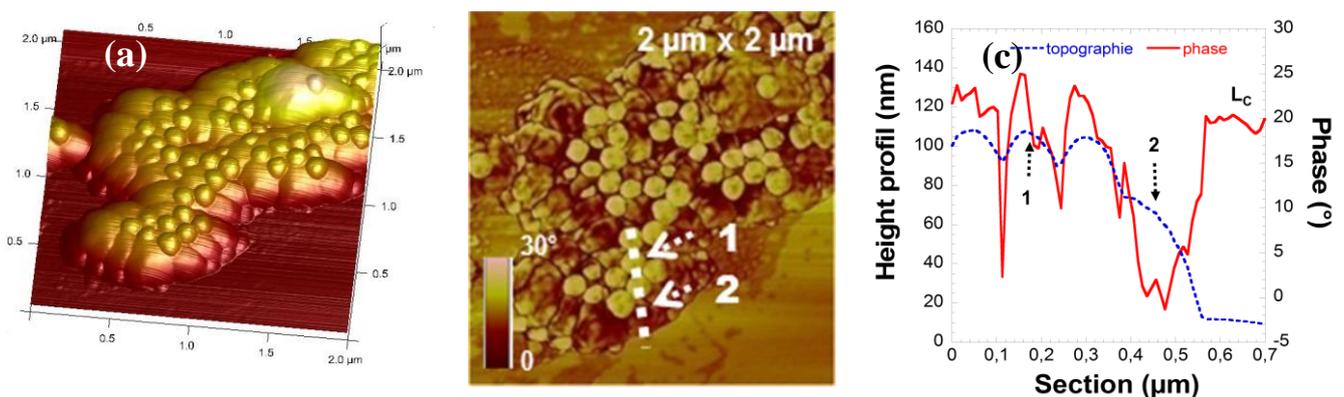
Rappelons que la variation de contraste sur une image de phase correspond à une évolution relative des propriétés mécaniques de la surface sondée (raideur, module élastique, dissipation, etc...). Une variation positive de la phase indiquerait une augmentation relative de la rigidité et, inversement, une variation négative de cette phase correspondrait à une augmentation relative de la dissipation. Dans notre cas, le domaine lipidique  $L_C$  est constitué de molécules plus organisées et par conséquent correspond à une phase (de l'oscillateur, de la sonde AFM) relativement plus élevée (zones claires) que celles du domaine  $L_E$  (zones sombres). C'est ce qu'on observe et c'est ce qui était attendu. Pour les NPs qui ont une dureté plus élevée que les films lipidiques, on s'attendrait à avoir une phase correspondante plus élevée. Et c'est d'ailleurs ce qu'on observe le plus souvent sur cet échantillon (figure 105b). Maintenant, lorsqu'on augmente la résolution de l'image en zoomant sur une zone de l'échantillon (figure 105c), on constate que la phase n'est pas homogène sur toute la surface de l'agrégat, voire même à l'échelle d'une seule NP : certaines parties de l'agrégat présentent un contraste moins élevé que pour d'autres. Ces mêmes observations ont été confirmées pour d'autres échantillons. Un autre exemple est reporté sur les images (b) et (c) de la Figure 106 sur lesquelles on identifie nettement des variations de contrastes en phase assez importantes sur un même agrégat situé à la lisière des domaines  $L_C$ - $L_E$ .

<sup>24</sup> Les images de hauteur correspondantes sont présentées sur la figure 91 (a et c).



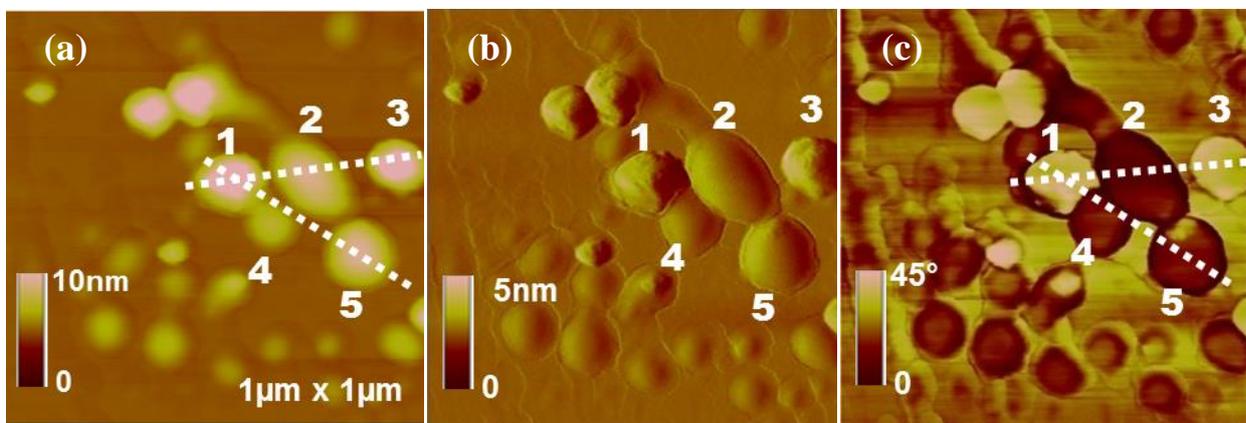
**Figure 106.** Images AFM de phase d'un film LB de SM-C16 transféré sur une surface nanostructurée par dépôt de NPs de 100 nm de diamètre.

Ici, (figure 106c), l'agrégat ne semble pas assez compact et son arrangement n'est pas régulier (contrairement au cas de l'agrégat de la figure 105c). L'image de phase est hétérogène et très contrastée, certaines NPs sont bien visibles avec une phase légèrement plus élevée. En revanche, et à certains endroits de l'agrégat (probablement au dessus de NPs non visibles distinctement mais ce n'est pas évident de l'affirmer), on relève un contraste de phase correspondant qui est relativement bas, voire même plus bas que celui de la phase lipidique  $L_E$  ce qui était inattendu. En fait, on peut supposer que le film LB est par endroit pris entre les NPs, emprisonnant également de l'eau embarquée lors du prélèvement du film ce qui expliquerait une dissipation plus importante et donc un contraste de phase relativement moins élevée. Nous avons ensuite réalisé des sections basées sur les contrastes de phase et comparé ces résultats à ceux des profils de hauteur.

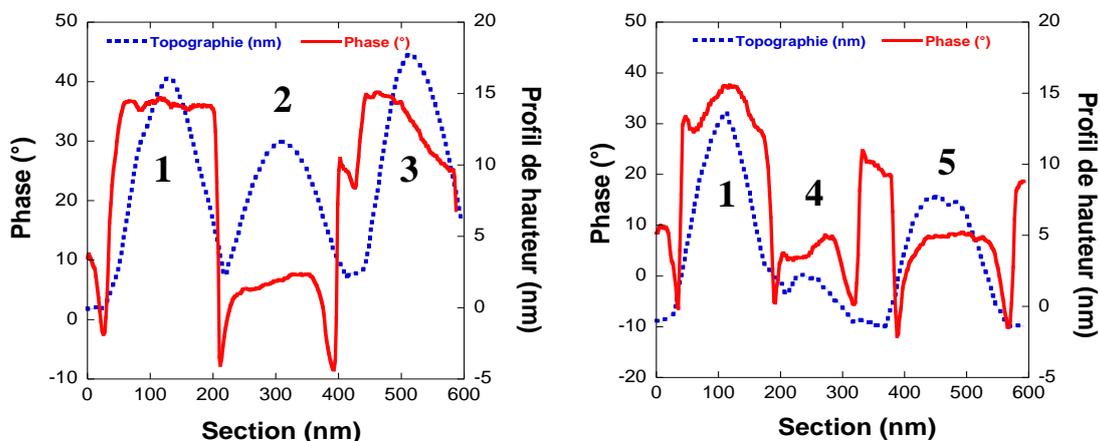


**Figure 107.** Image AFM de hauteur en 3D (a) et de phase (b) d'un film LB de SM-C16 transféré sur une surface nanostructurée par le dépôt de NPs de 100 nm de diamètre. Profils de hauteur et de phase obtenus sur l'agrégat (c). Les sections sont réalisées sur les images brutes non traitées. Ces images sont obtenues en mode Tapping répulsif dominant.

Les profils obtenus à partir des images de hauteur et de phase (figures 107a et 107b), sont présentés sur la Figure 107c. La section « topographique » représente une partie du film lipidique (le substrat ou la référence, à droite) ainsi que le profil de 3 NPs alignées. On note aussi un contraste supplémentaire (visible sur l'image 3D) rehaussant les contours des NPs y compris sur les bords. La section de phase, quant à elle montre un contraste de phase élevé non seulement sur la partie du film L<sub>C</sub> (ce qui était attendu) mais aussi à la surface des NPs. Cependant, cette phase chute brutalement sur les bords des NPs laissant supposer ainsi une dissipation très importante. Ce résultat valide le fait que les NPs sont recouvertes par la phase L<sub>C</sub> du film lipidique à leur sommet, en revanche un film (probablement à base d'eau) les entoure.



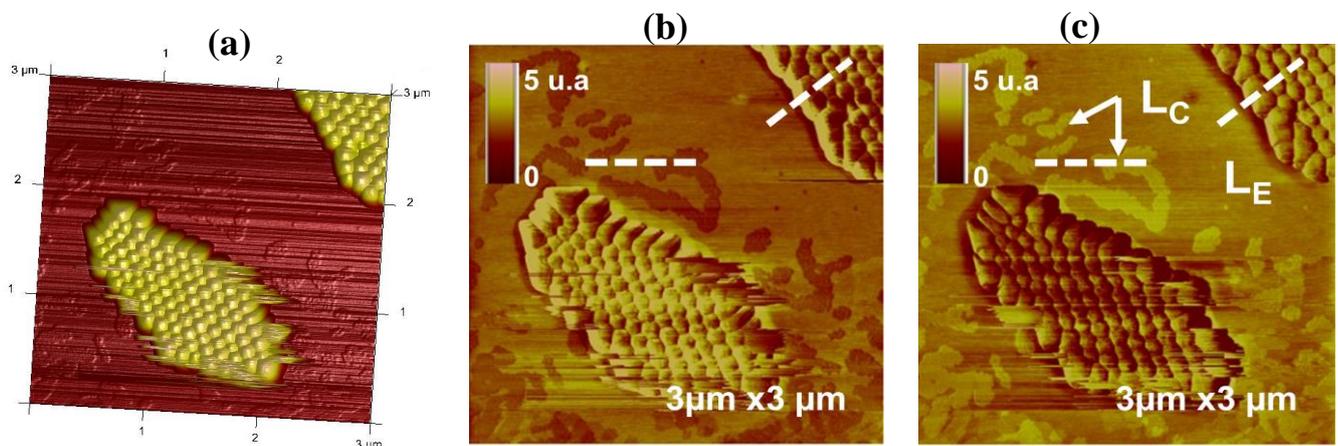
**Figure 108.** Images AFM de hauteur (a), d'amplitude (b) et de phase (c) d'un film LB de SM-C16 en présence de NPs de 10 nm de diamètre montrant différents comportement de phase des agrégats de NPs (zoom de l'image (a) de la Figure 103). Ces images sont obtenues en mode Tapping répulsif dominant.



**Figure 109.** Profils de hauteur et de phase réalisés sur un agrégat de NPs de 100 nm de diamètre en présence d'un film LB de SM-C16. Les sections sont réalisées sur les images brutes non traitées de la Figure 108. Ces images sont obtenues en mode Tapping répulsif dominant.

Des observations similaires ont été notées pour les films LB en interaction avec des NPs de petites tailles. A titre d'exemple, la Figure 108 illustre parfaitement un tel cas de figure qui a fait l'objet d'une discussion plus tôt. On trouve sur cette figure plusieurs agrégats de NPs de différentes tailles ainsi que le film lipidique avec ses deux phases ( $L_C$  et  $L_E$ ). Nous nous intéressons à quelques unes d'entre elles (NPs numérotées de 1 à 5). L'image de phase correspondante est surprenante (Figure 108c). En effet, le contraste est inversé pour certaines NPs, les 1 et 3 ont une phase élevée alors que pour les 2, 4 et 5, elle l'est beaucoup moins. Par conséquent, les NPs 1 et 3 dissipent moins et peuvent être considérées comme non recouvertes par le film lipidique. Cette hypothèse devient très probable suite aux observations extraites à partir de l'image d'erreur, ces NPs n'ayant pas une surface lisse. Les NPs 2, 4 et 5 ont, quant à elles, une dissipation importante laissant penser qu'elles sont enrobées d'une certaine quantité d'eau. La figure 109 présente les sections correspondantes qui corroborent ces observations.

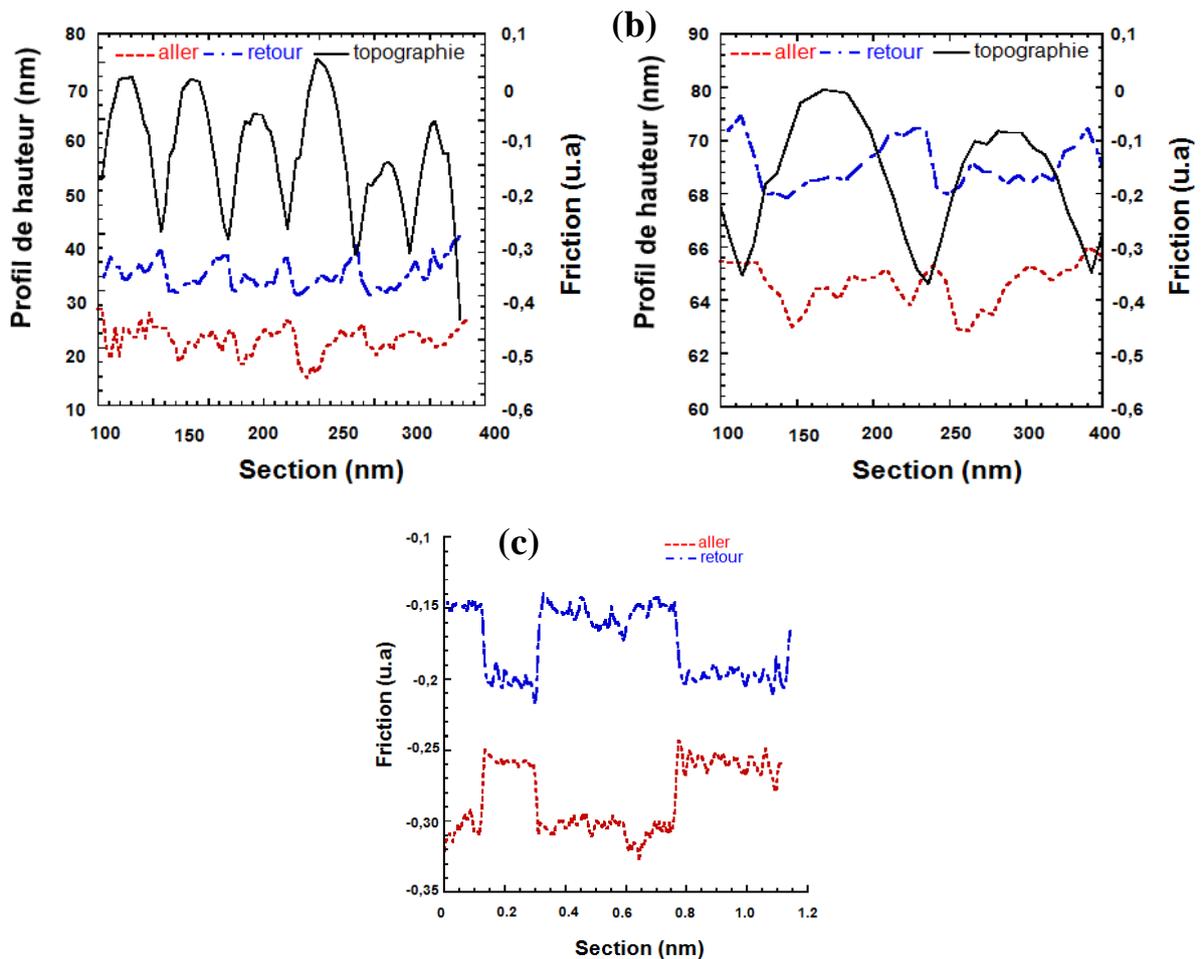
Comme indiqué plus haut, il est possible d'effectuer une étude rhéologique sur ces systèmes soit en mode contact en effectuant une expérience de frottement soit en mode dynamique, en faisant varier l'interaction sonde AFM-surface du répulsif dominant à l' attractif dominant. Dans ce qui va suivre, nous montrerons juste quelques exemples de faisabilité abordés uniquement avec un point de vue qualitatif.



**Figure 110.** Images de hauteur (a) et de friction dans les sens « aller et retour » (b et c respectivement) d'un film LB lipidique transféré sur une surface nanostructurée par dépôt de NPs de 100 nm de diamètre. Les images de friction montrent des agrégats de NPs de contrastes différents. Ces images sont obtenues en mode Tapping répulsif dominant.

La Figure 110 montre des images AFM de hauteur (figure 110a) et de friction « aller et retour » (figures 110 b et c) d'un film de SM-C16 transféré sur une surface nanostructurée par dépôt de NPs de 100 nm de diamètre. Comme observé précédemment, et d'après l'image

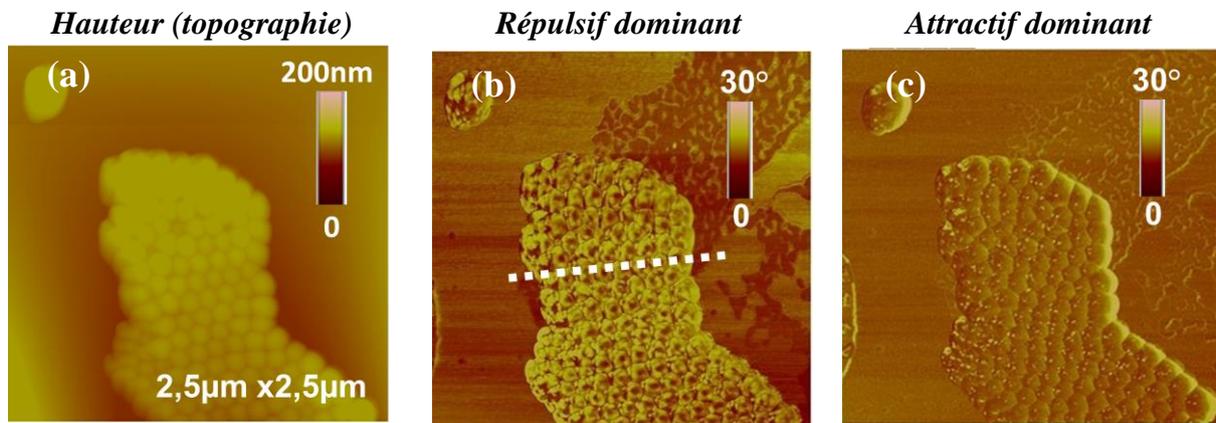
topographique (figure 110a) cet échantillon présente des réseaux 2D de NPs à sa surface et le reste du substrat étant recouvert par le film et ses deux phases lipidiques ( $L_E$  et  $L_C$ ). Comme dans le cas des films LB de SM-C16 seuls, les deux phases lipidiques  $L_E$  et  $L_C$  ont un contraste qui s'inverse selon le sens (aller ou retour) dans lequel la sonde balaye la surface (Figures 110b et 110c). Il en est de même pour les agrégats de NPs ce qui laisse supposer une hétérogénéité de la surface de celles-ci suite à leur couverture par le film lipidique.



**Figure III.** (a) profils de l'agrégat de NPs obtenus à partir des sections réalisées sur les images aller et retour de friction et de hauteur. (b) zoom sur deux NPs du profil en a. (c) profil de obtenu à partir de sections réalisées sur le film lipidique. Les sections sont réalisées comme indiqué sur les images (b) et (c) de la Figure 110.

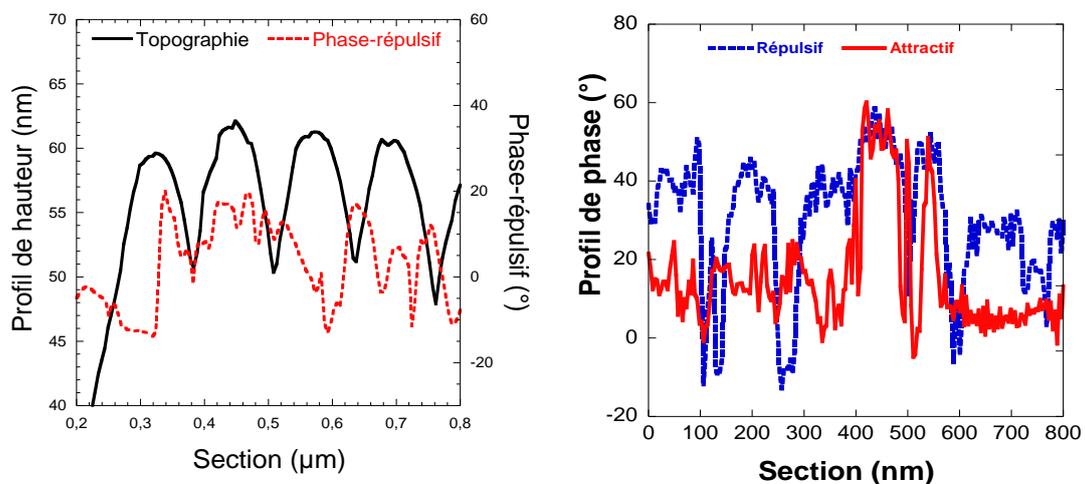
La comparaison des profils obtenus à partir de sections réalisées sur les images de friction permet de vérifier l'inversion de contraste entre les images aller et retour (Figure 111) mais aussi et surtout confirment l'existence d'une dissipation plus importante dans la phase  $L_E$  que ce soit sur le substrat ou sur les agrégats de NPs. Ces observations vont dans le sens que l'agrégat de NPs de 100 nm de diamètre sont bien recouvert par le film lipidique.

L'autre expérience rhéologique en mode dynamique que l'on a effectuée consiste à moduler l'amplitude d'oscillation de la sonde AFM pour faire varier le régime d'interaction. Donc, comme pour les films seuls, la comparaison des deux régimes répulsif et attractif dominants nous permet de mettre en évidence des réponses mécaniques des NPs différentes (par rapport aux NPs nues) et de les lier à la présence ou pas du film lipidique.



**Figure 112.** Image AFM de hauteur (a). Comparaison des contrastes de phase en régime répulsif dominant (b) et en régime attractif dominant (c) de film LB de SM-C16 transféré sur une surface nanostructurée par dépôt de NPs de 100 nm de diamètre.

Des images de phase obtenues en régimes répulsif et attractif dominants pour un film LB de SM-C16 en présence de NPs de 100nm sont présentés sur les images b et c de la Figure 112 à titre d'exemple. Suivant le mode utilisé, les images de phase révèlent une inversion de contraste pour le film lipidique recouvrant le substrat et une anisotropie du contraste de phase aussi bien pour les films que pour les agrégats de NPs.

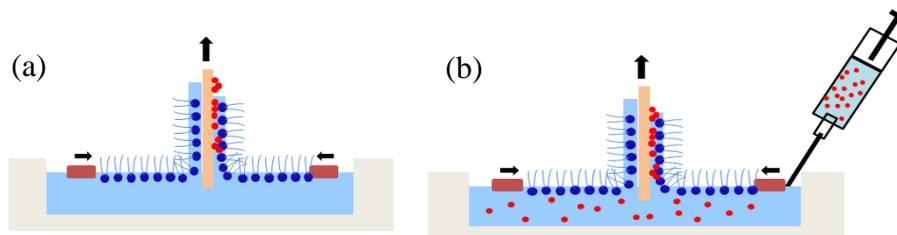


**Figure 113.** Comparaison des profils de hauteur et de phase en régime répulsif dominant (a) et de phases obtenus en régimes attractif et répulsif (b).

Les sections obtenues sur les images de phase sont présentés sur la Figure 113 et montrent, en effet, deux comportements des NPs suivant le régime utilisé. Le profil 1 montre en effet un comportement identique pour les NPs sélectionnées alors que le profil 2 montre une dissipation plus importante sur les NPs qu'au centre de l'agrégat. Les NPs au bord de l'agrégat montrant une dissipation moindre plus faible que celle observé sur la phase  $L_C$  du film lipidique.

### 3.4. Etude de l'interaction de monocouches de Langmuir avec des $SiO_2$ -NPs en sous-phase

Afin d'identifier une éventuelle influence du support dans l'interaction NP-film lipidique, nous avons également étudié l'interaction de NPs avec des monocouches de Langmuir (films à l'interface air-eau) et les films LB transférés à partir de ces monocouches sur une surface de mica. Contrairement à la méthode utilisée jusqu'ici (NPs préalablement déposées à la surface du mica avant de transférer le film), les NPs sont solubilisées dans la sous-phase et l'interaction NPs-lipides se déroule donc à l'interface air-eau (Figure 114).



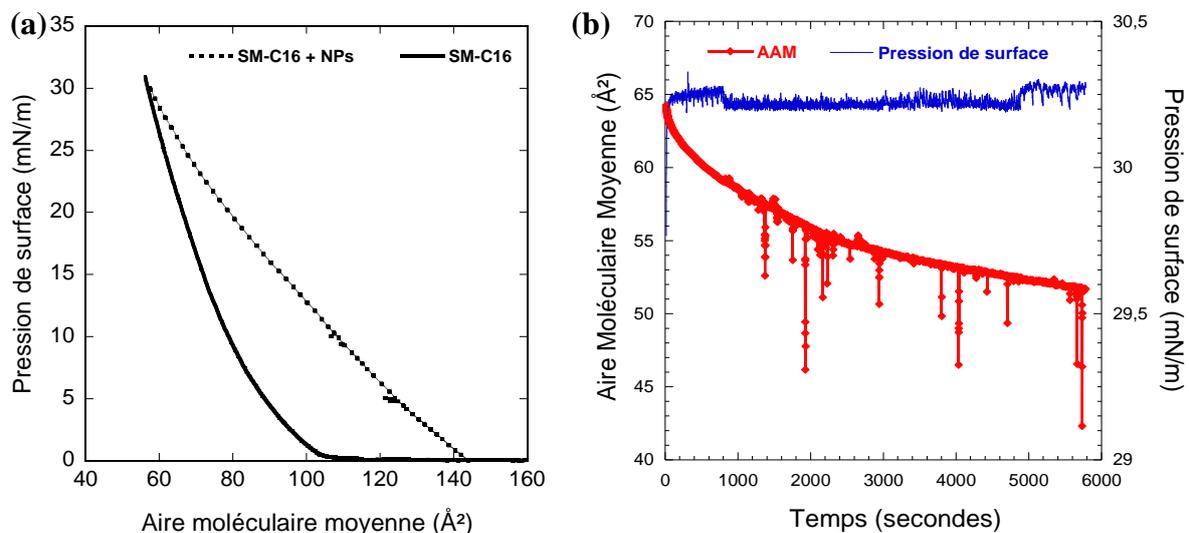
**Figure 114.** Principe de la mise en contact des NPs avec le film lipidique. (a) le film est transféré sur une surface préalablement nanostructurée par le dépôt de NPs ; (b) l'interaction NPs-lipides se déroule à l'interface air-eau et le film est transféré ensuite.

#### 3.4.1. Mesures de pression de surface : exploitation des isothermes

Les NPs sont solubilisées dans de l'eau ultra pure à une concentration finale de 57 g/L puis la solution est plongée dans un bain ultrason pendant trente minute afin d'éviter l'agrégation des NP. Cette solution est ensuite injectée dans la sous-phase à une concentration finale de 1 g/L et la monocouche lipidique est étalée. Un délai d'une heure est respecté avant la compression afin de laisser lipides et NPs interagir. Les mesures de pression de surface sont réalisées dans les mêmes conditions que celles décrites précédemment (vitesse de compression et de transfert, température). Sur la Figure 115a sont présentées des exemples d'isothermes de

compression de monocouches de SM-C16 à l'interface air-eau en absence et en présence de NPs de 100 nm de diamètre. On observe très clairement un décalage de l'isotherme vers les aires moléculaires moyennes plus élevées en présence des NPs, signe probable d'une intercalation des NPs entre les lipides en début de compression. L'écart entre cette isotherme et celle de référence du lipide décroît au cours de la compression, les aires moléculaires moyennes à 30 mN/m étant similaires dans les deux cas, suggérant l'expulsion des NPs de l'interface. Cependant, une adsorption sous la monocouche n'est pas exclue.

La Figure 115b montre elle une courbe de transfert typique (aire moléculaire moyenne au cours du temps) obtenue lors du transfert à une pression de 30 mN/m d'une monocouche préalablement étalée sur une suspension de NPs. Cette courbe est caractérisée par la présence de « sauts » dans les aires moléculaires moyennes et une forme inhabituelle. En effet, si la monocouche est stable à l'interface air-eau et si le transfert est effectué à une vitesse constante, la décroissance d'aire moléculaire moyenne est linéaire, la pente étant liée à la valeur de la vitesse de transfert. Le déclin de l'aire moléculaire moyenne, clairement non linéaire en présence des NPs dans la sous-phase, et la présence des « sauts » suggèrent que la monocouche n'est pas parfaitement stable lors du transfert.

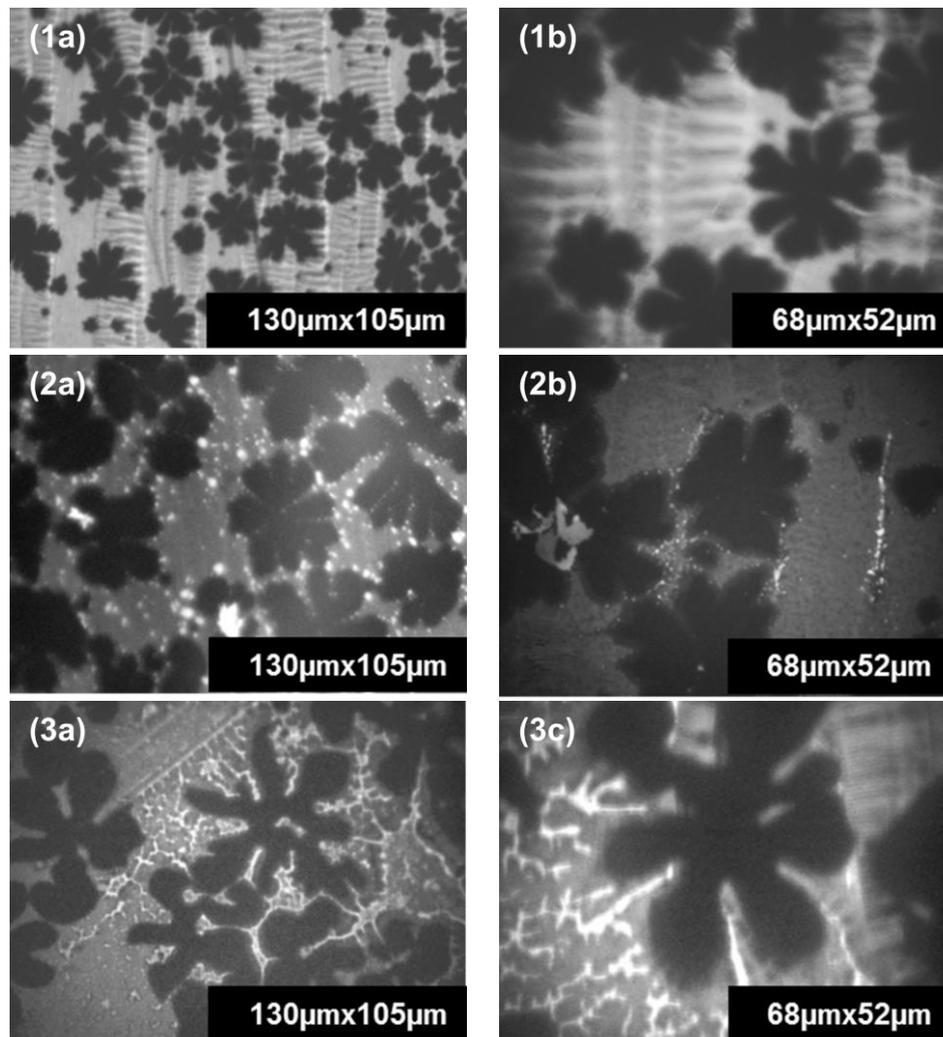


**Figure 115.** Comparaison d'isothermes de compression (a) de monocouches de SM-C16 à l'interface air-eau (courbe SM-C16) et à l'interface air-suspension de NPs de 100 nm de diamètre (SM-C16 + NPs) à température ambiante ( $20 \pm 1^\circ\text{C}$ ). Courbes de transfert des films LB (pression et aire moléculaire en fonction du temps) en présence de NPs dans la sous-phase (b).

### 3.4.2. Caractérisation par microscopie de fluorescence et par AFM

La Figure 116 présente les images de microscopie de fluorescence des films LB obtenus par transfert de ces monocouches. La comparaison de ces images avec celles obtenues précédemment (films LB sur mica nu ou sur mica nanostructuré) suggère trois conclusions :

- la transition de phase  $L_E$  et  $L_C$  est maintenue comme dans les cas précédents ;
- en présence des NPs dans la sous-phase, les contours des domaines en phase  $L_C$  sont plus irréguliers et découpés par rapport à ceux observés précédemment. Ce constat sous-entend que la présence des NPs dans la sous-phase a une influence sur l'organisation latérale des lipides à l'interface air-eau.
- les NPs sont essentiellement organisées sous forme de structures de type fractal. A la résolution microscopique dont nous disposons, les NPs sont majoritairement localisées dans la phase  $L_E$  et exclues de la phase  $L_C$ . Ce dernier point est en particulier à vérifier lors de l'étude par AFM. Contrairement aux films transférés sur une surface de mica nue contenant en moyenne 40% de phase  $L_C$  et 60% de phase  $L_E$ , les proportions des deux phases  $L_E$ ,  $L_C$  sont ici quasi-identiques. Ce résultat sous-entend qu'en présence de NPs, les lipides s'organisent davantage d'où une augmentation de la proportion de phase  $L_C$ .

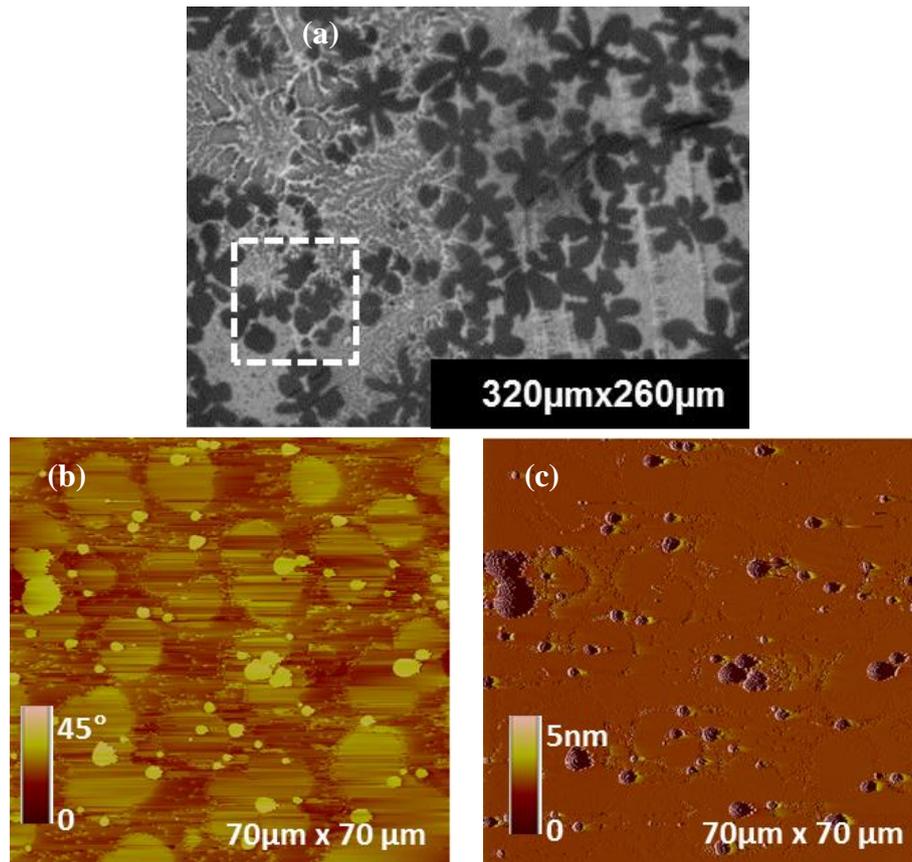


**Figure 116.** Comparaison de trois films LB de SM-C16 transférés de l'interface air-eau sur une surface de mica nue (1a, 1b.), de l'interface air-eau sur une surface nanostructurée par dépôt de NPs de 100 nm de diamètre (2a, 2b) et de l'interface air-suspension de NPs (100 nm de diamètre) sur une surface de mica (3a, 3b).

Ces expériences ayant été effectuées à la fin de mes travaux de thèse nous n'avons pas pu effectuer une étude complète avec un nombre important de ce type d'échantillon. Néanmoins, nous avons réalisé deux expériences seulement et imager ces surfaces en microscopie de fluorescence n'a pas posé de problème (Figure 116 3a et 3b). En revanche, nous avons eu beaucoup plus de mal pour les visualiser à l'aide de l'AFM. La mise en place d'un protocole est en cours afin de pouvoir visualiser de tels échantillons en AFM.

Les rares images AFM obtenues et exploitables sont présentées sur les Figures 117 et 118. La Figure 117 montre bien la présence des deux phases lipidiques  $L_E$  et  $L_C$  qui indique que le film a bien été prélevé. La zone sondée par AFM présente des domaines  $L_C$  adoptant une forme globalement circulaire qu'on a pu repérer aussi en microscopie de fluorescence. Comme on peut le noter sur la Figure 117b (image de phase), on observe des zones avec un

contraste plus clair que celles de la phase  $L_C$ . Il aurait pu s'agir de NPs mais malheureusement l'image d'amplitude montre que l'asservissement dans ces zones là n'est pas bon et que par conséquent, ces parties de l'image n'ont pas de sens et ne peuvent pas être exploitées. Par ailleurs, on observe aussi des stries indiquant que la pointe « colle à la surface » ou transporte de la matière probablement des lipides ou des NPs, sur ces zones lors du balayage. Ceci laisse supposer que pour cet échantillon, au moins, les NPs de 100 nm de diamètre n'ont pas pu être transférées correctement.



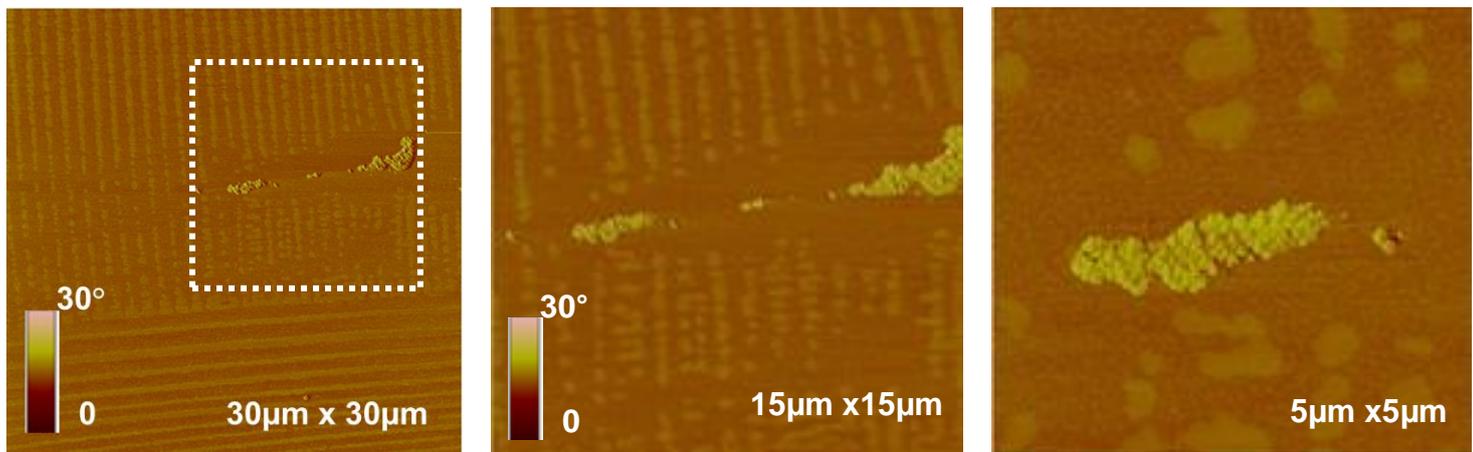
**Figure 117.** Images de fluorescence (a) et images AFM de phase (b) et d'amplitude (c) d'un film LB de SM-16 transféré de l'interface air-suspension de NPs (100 nm de diamètre) sur une surface de mica. Ces images sont obtenues en mode Tapping répulsif dominant.

Nous avons réalisé d'autres préparations, mais le transfert se fait avec beaucoup plus de difficultés.

Pour un autre échantillon, nous avons quand même réussi à imager les NPs et nous avons trouvé quelques agrégats avec une organisation qui peut rappeler celle des structures fractales observées en microscopie de fluorescence.

Des exemples d'images AFM d'un film LB de DMPC transféré de l'interface air-suspension de NPs (diamètre de 100 nm) sont présentés sur la Figure 118, les mesures de pression de

surface étant réalisées dans des conditions similaires aux précédentes et ayant montré un décalage équivalent à celui observé dans le cas de la SM-C16.



*Figure 118. Images AFM de phase d'une monocouche de DMPC transférée de l'interface air-suspension de NPs (diamètre de 100 nm) sur une surface de mica.*

On constate globalement une diminution de la taille des domaines  $L_C$  par rapport au film de DMPC seul, ce qui sous-entend une fluidification du film. Mais comme on vient de le voir la proportion des deux phases sont quasi-identiques.

#### **4. Etude de bicouches lipidiques planes et de leur interaction avec des NPs**

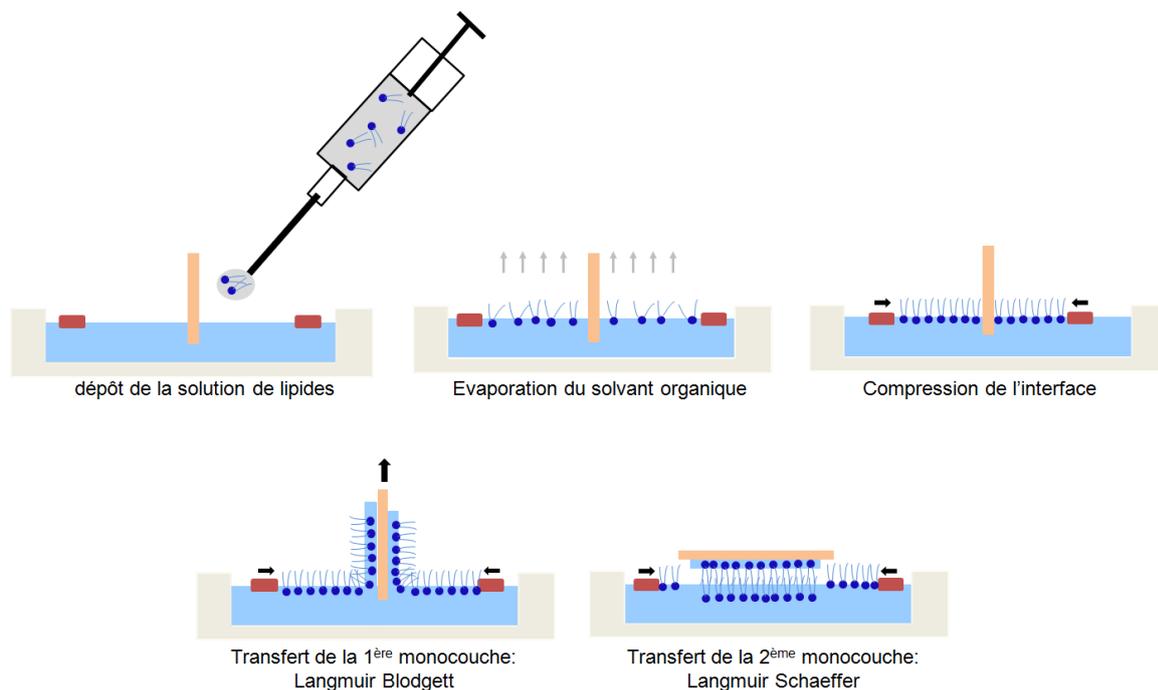
Après avoir étudié l'interaction des  $\text{SiO}_2$ -NPs avec les films LB lipidiques de type monocouche, l'étape suivante consiste à étudier leur interaction avec des bicouches lipidiques supportées car ces dernières constituent un modèle plus proche de la réalité d'une membrane cellulaire. L'objectif final de cette étape est d'identifier les éventuelles modifications de l'organisation et de la morphologie de la bicouche supportée en présence de  $\text{SiO}_2$ -NPs. Notre étude s'est limitée, faute de temps uniquement, au cas de bicouches de DMPC, lipide dont le comportement est bien décrit dans la littérature.

### 4.1. Bicouches en absence de $\text{SiO}_2\text{-NPs}$

Dans un premier temps nous avons étudié les bicouches supportées de DMPC seul en nous attachant à mettre en évidence les avantages et les inconvénients des deux méthodes de préparation utilisées, à savoir la méthode Langmuir Blodgett/Schaefer (LS) et celle par éclatement de vésicules.

#### 4.1.1. Préparation de bicouches supportées de DMPC par la méthode LS

Rappelons que la méthode LS, décrite en détail dans le chapitre 1, consiste à déposer en deux étapes une bicouche lipidique sur un support plan (Figure 119).



*Figure 119. Transfert d'une bicouche lipidique de type LB/LS sur un support plan.*

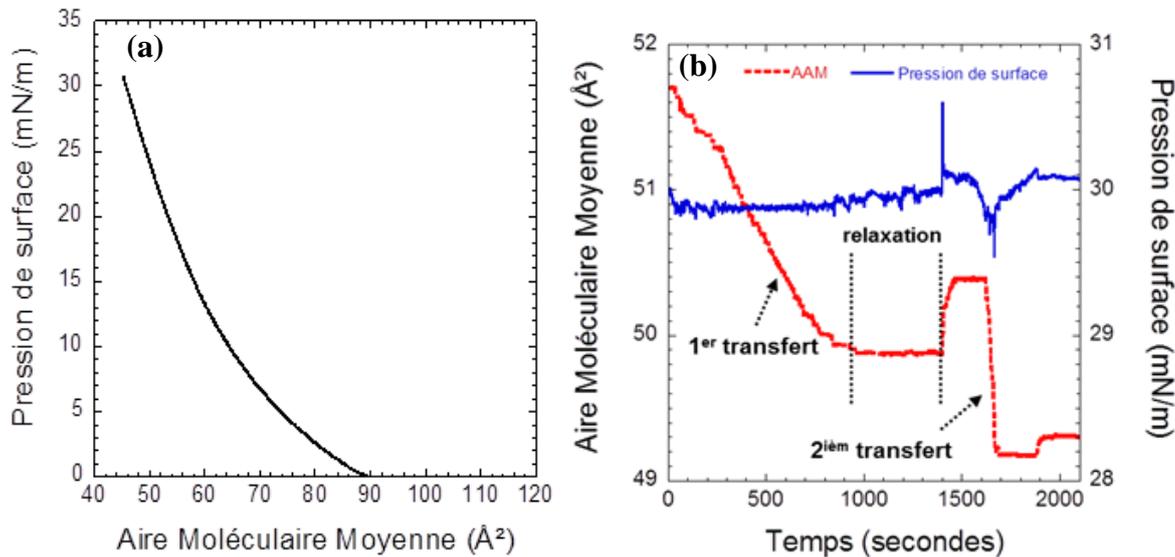
Pour cela une première monocouche est transférée sur le support par la méthode LB (transfert dans le sens vertical, support perpendiculaire au plan de l'interface), puis la seconde est prélevée en appliquant le support horizontalement sur la monocouche à l'interface air-eau.

#### 4.1.2. Mesures de pression de surface et transfert : isothermes et courbes de transfert

Pour rappel, la Figure 120a présente l'isotherme de compression obtenue dans le cas du DMPC. La Figure 120b présente, elle, les courbes représentant les variations de la pression de

surface et de l'aire moléculaire moyenne au cours du temps, correspondant aux deux étapes du transfert de la bicouche.

Comme indiqué précédemment, le premier transfert se traduit par une diminution linéaire de l'aire moléculaire signifiant le transfert des molécules de lipide sur la surface de mica.



**Figure 120.** Isotherme de compression (a) et courbes de transfert (b) d'une bicouche de DMPC sur une surface de mica par la méthode LB/LS. Les films sont transférés à 30mN/m et à température ambiante ( $20\pm 1^\circ\text{C}$ ).

Au cours du transfert de la seconde monocouche, le contact du support avec l'interface se traduit par une hausse temporaire et limitée de la pression de surface (de l'ordre de 0,5 mN/m) immédiatement corrigée par le mouvement des barrières. La vibration occasionnée par le contact peut provoquer un léger décalage en aire moléculaire moyenne. Cette dernière se stabilise lors du transfert tant que le support occupe la même surface à l'interface air-eau.

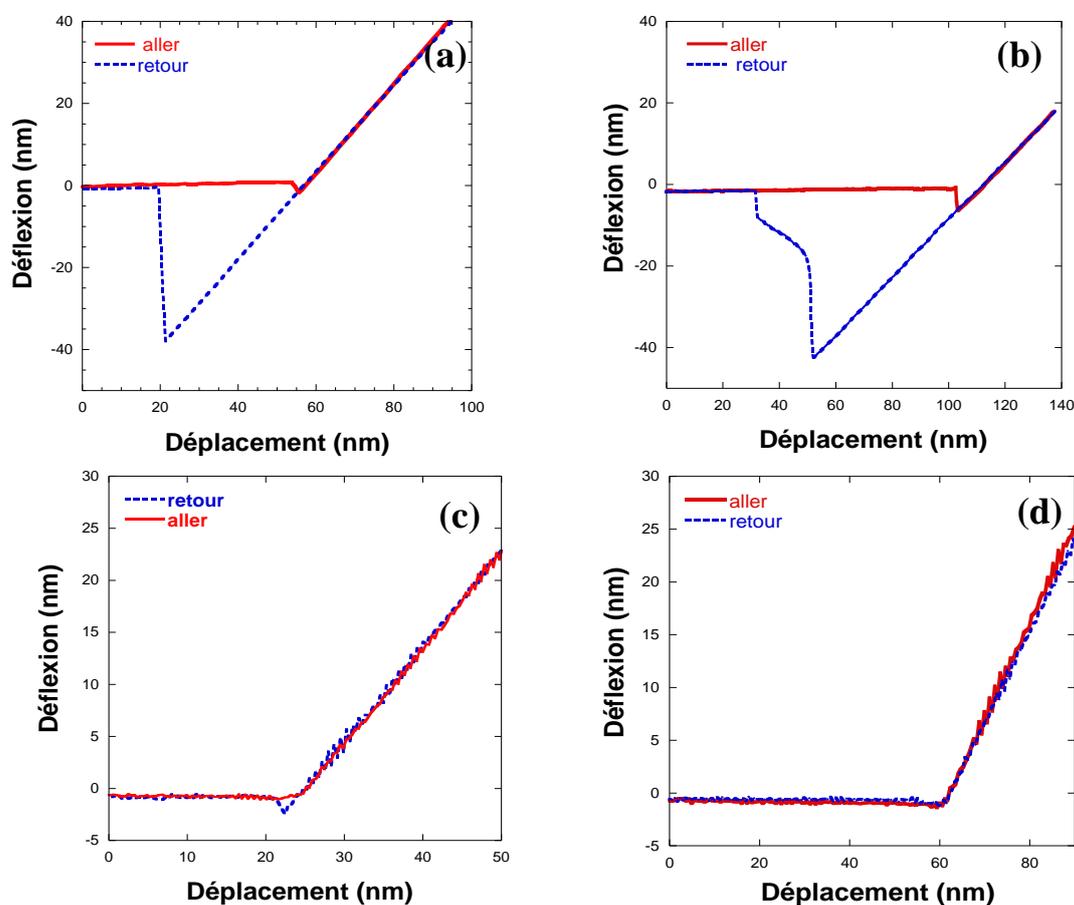
#### 4.1.3. Caractérisation des bicouches par AFM en milieu liquide

La bicouche fraîchement préparée est par la suite caractérisée par AFM en milieu liquide afin d'éviter sa détérioration. Les conditions d'observation doivent être strictement contrôlées pour empêcher le décollement de la bicouche.

**Conditions expérimentales pour une meilleure observation des bicouches lipidiques** Plus la force d'interaction entre la pointe et la bicouche est importante, plus les forces de frottements générées lors du balayage de la surface le seront aussi ce qui pourrait, bien

évidemment, endommager la bicouche. Il est donc nécessaire de minimiser la charge sur la surface de l'échantillon lors du balayage. Une solution consiste, tout d'abord, à utiliser des microleviers contact souples avec de faibles constantes de raideur faibles (0,06 ou 0,12 N/m dans notre cas) pour caractériser nos échantillons. Ensuite, il est nécessaire de minimiser la charge appliquée par la sonde AFM. Cela revient à fixer le point de fonctionnement à une charge appliquée correspondant pratiquement à la limite de décollement de la pointe (la pointe appuie juste suffisamment pour maintenir le contact avec la surface de l'échantillon, voir chapitre 3, paragraphe 3.1.3.).

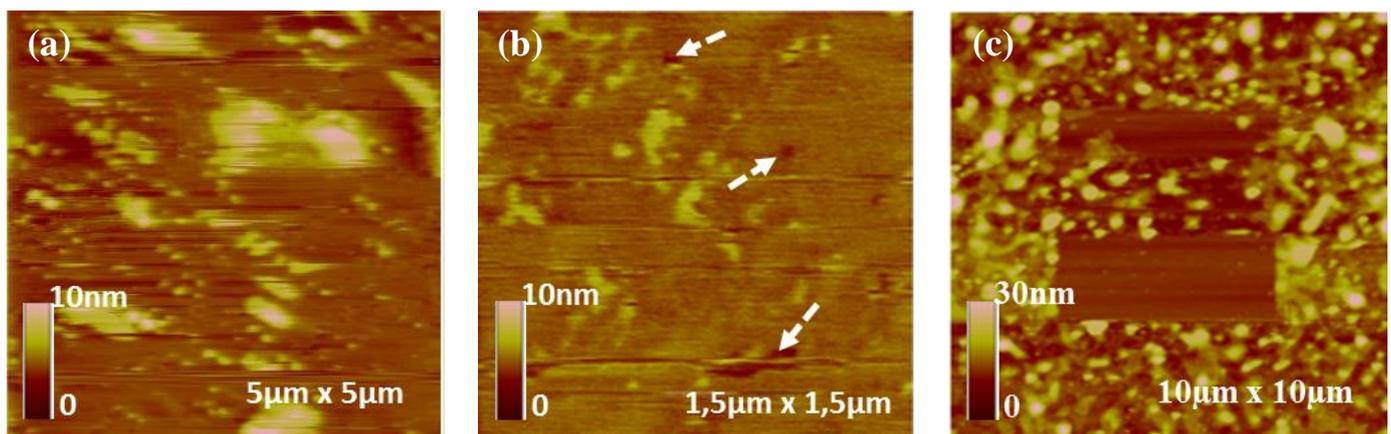
De plus, et comme le montre la Figure 121, le choix du milieu avec lequel la bicouche est en contact a une influence sur la grandeur de la force d'interaction (force d'adhésion entre la pointe et la surface sondée) et par conséquent sur la charge appliquée par la sonde.



**Figure 121.** Courbes de force expérimentales enregistrées sur une surface de mica nue à l'air (a), en présence d'eau déionisée (b), et en présence de tampon Tris-HCl (c et d). Les déflexions en  $z$  sont de 38 nm (à l'air), 42,5 nm (eau déionisée) et 2,5 nm et 1,4 nm en présence de tampon TRIS-HCl ce qui correspond à des forces de balayage ( $k.z$ ) utilisées de 4,6 nN nN, 3,8 nN, 300 pN et 170 pN, respectivement.

En effet, la Figure 121 représente l'évolution de la déflexion du levier en fonction de la distance pointe-surface pour des déplacements « aller » ou « retour » dans différents milieux.

La différence entre la courbe « aller » et celle du « retour » (cycle d'hystérésis) est liée à la force d'adhésion. Par exemple, ce cycle est assez important à l'air car lié à des forces additionnelles (les forces capillaires) s'expliquant par la présence d'un film d'eau adsorbé à la surface sondée. On observe un cycle d'hystérésis, presque aussi important, quand l'ensemble sonde-surface « baigne » dans de l'eau déionisée (Figure 121b). En revanche, si l'ensemble pointe-surface est dans un milieu tamponné (Tris-NaCl), les forces d'interaction (et d'adhésion) sont alors écrantées minimisant ainsi la charge appliquée par la sonde ce qui évite l'endommagement de la bicouche (Figures 121c et 121d). C'est pourquoi nous avons fait le choix de travailler en milieu tamponné (10mM de Tris-HCl, 150 mM de NaCl, à pH=7,4), ce milieu nous permettant également de nous placer dans des conditions physiologiques de pH et de force ionique. Par ailleurs, et en milieu liquide, les forces hydrodynamiques générées par le balayage de la sonde peuvent être suffisamment importantes (de l'ordre de dizaines de nN) pour endommager la bicouche lipidique. Une optimisation de la vitesse de balayage est nécessaire.



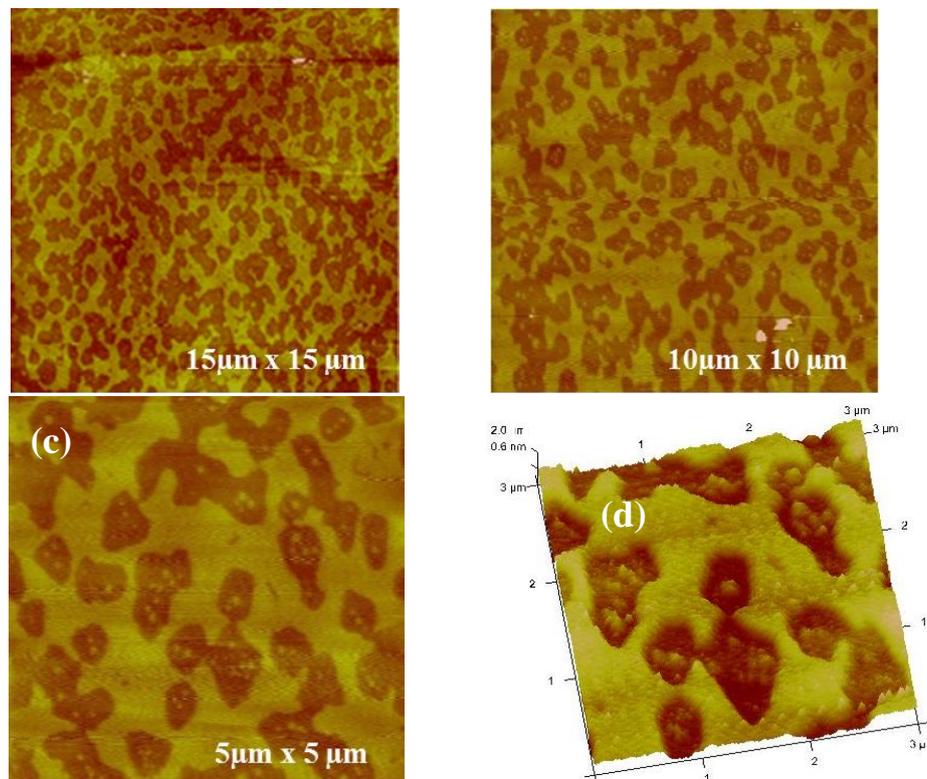
**Figure 122.** Images AFM de hauteur obtenues pour différentes forces de balayage d'une bicouche de DMPC en milieu tamponné et à température ambiante ( $20 \pm 1^\circ\text{C}$ ). Les images (a) et (b) sont obtenues respectivement avec des forces de balayage de 5,8 nN ( $z = 48,5 \text{ nm}$ ) et 13,8 nN ( $z = 115 \text{ nm}$ ). L'image (c) montre une zone de grattage en utilisant une force de balayage de 23,0 nN ( $z = 192 \text{ nm}$ ). Les flèches indiquent la présence probable de trous, la pointe AFM sondant en fait le support de mica au niveau de ces zones.

La Figure 122 illustre le cas d'expériences pour lesquelles les conditions d'imagerie n'avaient pas été optimisées. Il s'agit de dépôts de bicouches supportées de DMPC. On constate, tout d'abord, que l'image de la Figure 122a n'est pas de bonne qualité car elle est mal résolue. Certes, on observe la présence de fragments de bicouche de tailles différentes, cependant, leurs contours ne sont pas nets. De plus, on observe des trainées correspondant au déplacement d'une partie de la matière par la sonde à cause de la charge appliquée qui est élevée. Les mêmes observations peuvent être faites sur la Figure 122b qui présente, en plus, des zones

sombres, des trous (indiqués par des flèches) correspondant aux zones où ont été effectuées des courbes de force (pour estimer la charge appliquée): la pointe y a indenté la bicouche et laissé son empreinte sur le dépôt. D'ailleurs, pour illustrer, de façon non ambiguë, ce qui se passe quand la charge appliquée par la sonde n'est pas optimisée, nous avons effectué le balayage d'une zone de ce même dépôt de  $5\mu\text{m} \times 5\mu\text{m}$  en appliquant une charge relativement importante, de l'ordre de 23 nN, et uniquement sur une partie (bande au milieu) de la surface pour voir l'effet de deux charges appliquées différentes. Nous avons, ensuite, effectué un zoom arrière (zoom out) sur cette zone afin d'imager la surface sondée entourant celle qui vient juste d'être balayée et abimée. Et comme attendu, on observe bien les dégâts causés par la sonde AFM (Figure 122c). En effet, une bonne partie de la bicouche a disparu car elle a été déplacée par la pointe sur les bords de la zone sondée.

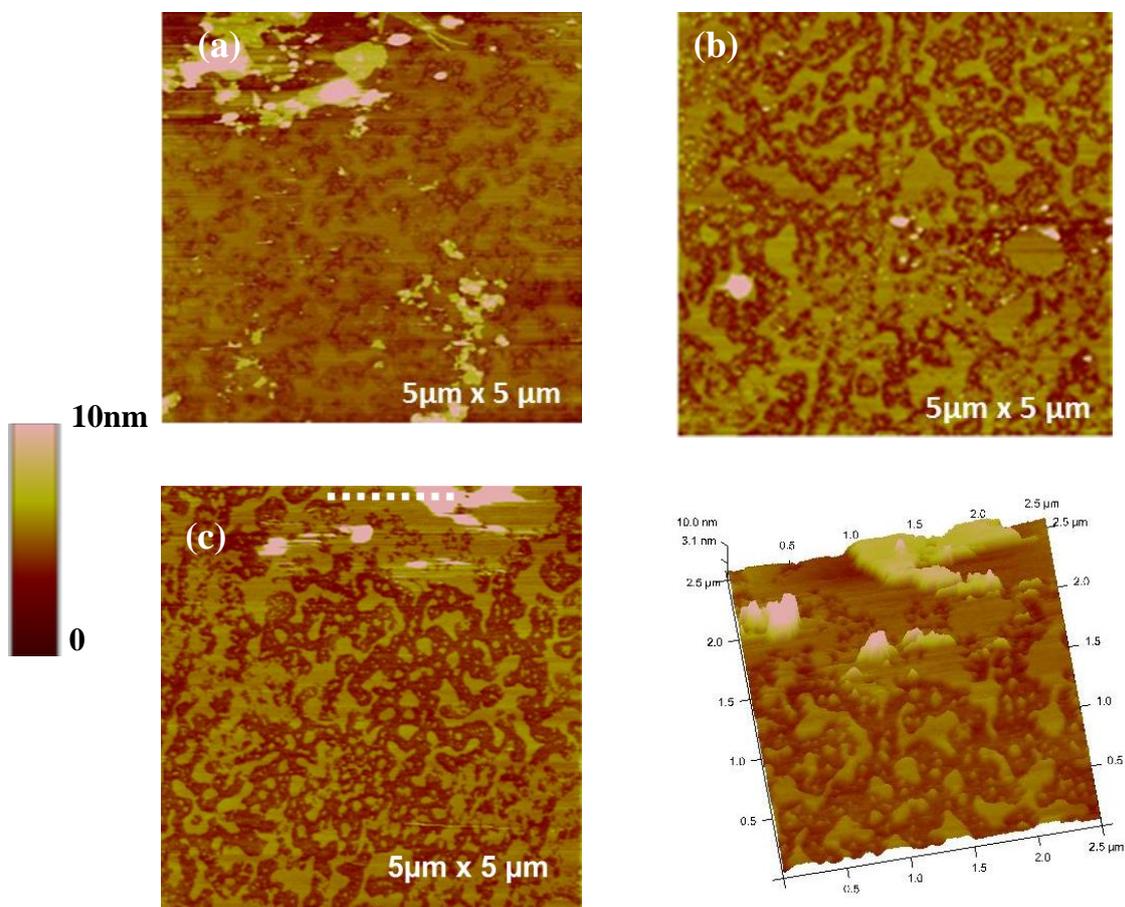
### *Caractérisation de bicouches lipidiques de DMPC*

Les résultats ci-dessus montrent bien l'importance du contrôle du point de fonctionnement à fixer pour sonder nos dépôts et qui correspond à des forces appliquées les plus faibles possibles. C'est le cas des expériences représentées sur la Figure 123.



**Figure 123.** Images AFM de hauteur de différentes zones d'une bicouche de DMPC déposée sur une surface de mica par la méthode LB/LS. Les images sont réalisées en milieu liquide et à température ambiante ( $T=20\pm 1^\circ\text{C}$ ). L'échelle des images est de 10nm.

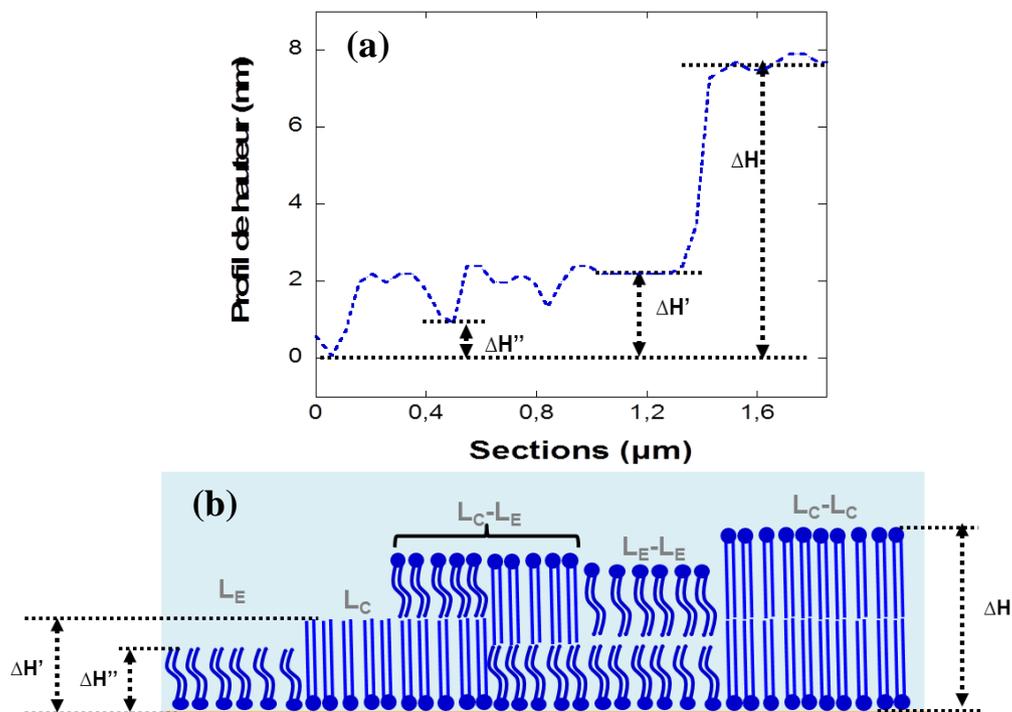
Les images obtenues (Figure 123) sont de meilleure qualité que les précédentes (Figure 122) et sont donc exploitables. On observe, tout d'abord, une surface recouverte partiellement par le dépôt : les zones claires correspondent à la bicouche lipidique tandis que les zones sombres correspondent au substrat de mica. Cette hypothèse est appuyée par l'estimation de l'épaisseur du dépôt (différence de hauteur entre les zones claires et les zones sombres) sur laquelle nous reviendrons un peu plus loin. Dans certains cas (Figure 124), on note enfin la présence d'empilements (zones très claires sur les images de hauteur) correspondant à un voire plusieurs niveaux de couches. Parfois, ces empilements sont instables puisque déplaçables par la sonde AFM. Leur présence pourrait s'expliquer par un transfert imparfait de la deuxième monocouche.



**Figure 124.** Images AFM de hauteur montrant différentes zones d'une bicouche de DMPC déposée sur une surface de mica par la méthode LS, suggérant la présence d'organisations lipidiques de hauteurs différentes. Les images sont réalisées en milieu liquide et à température ambiante ( $T=20\pm 1^\circ\text{C}$ ).

Afin de déterminer les épaisseurs des différentes couches lipidiques, des sections sont réalisées sur différentes zones du dépôt. Les profils de hauteur typiquement obtenus sont

présentés sur la Figure 125a. Ils montrent la présence de marches de hauteurs différentes au-dessus du niveau de référence, celui du substrat, le mica dans notre cas. Les hauteurs  $\Delta H'$  et  $\Delta H''$ , de l'ordre de  $2,1 \pm 0,5$  nm et  $0,9 \pm 0,5$  nm respectivement au-dessus du mica, correspondent sans doute à une seule monocouche lipidique, les fluctuations de hauteur pouvant être attribuées aux deux phases présentes dans la monocouche (phase LE plus fluide et donc « moins épaisse » que la phase LC) ou au fait que la monocouche au contact du milieu aqueux est devenue instable (le contact entre les chaînes hydrophobes et le milieu aqueux n'étant pas favorable d'un point de vue énergétique). Les zones les plus épaisses correspondraient à des zones où le DMPC est organisé en bicouche, la hauteur  $\Delta H$  de l'ordre de  $7,4 \pm 0,5$  nm au-dessus du mica étant en accord avec la hauteur d'une bicouche de ce lipide. La Figure 125b montre une représentation schématisant ces différences de hauteur.



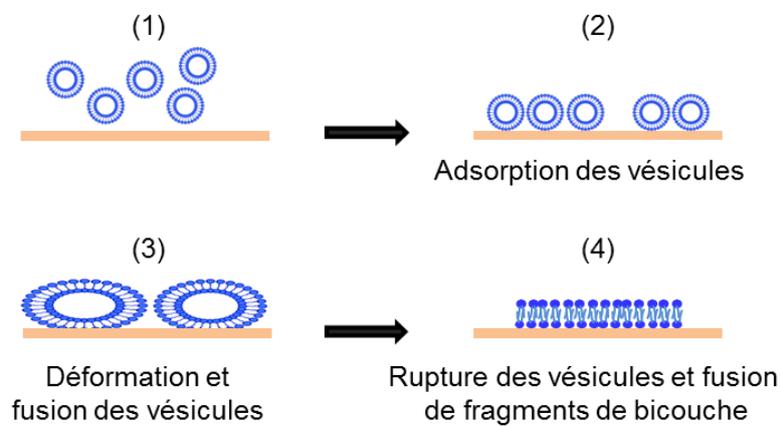
**Figure 125.** Profil de hauteur (a) obtenu à partir des sections réalisées sur les images de hauteur aller et retour brutes. Schéma représentant les différents types d'organisation possibles des lipides sur le support de mica dans le cas d'une bicouche déposée par la méthode LS.

En conclusion, la méthode LS comporte de nombreux avantages puisqu'elle permet de contrôler certains paramètres comme la pression de surface et de réaliser des bicouches asymétriques. Cependant comme nous venons de le constater, cette méthode conduit, au moins dans le cas du DMPC, à la formation d'un film inhomogène, alternant en fait des zones en monocouches et d'autres en bicouches.

#### 4.1.4. Préparation de bicouches supportées de DMPC par éclatement de vésicules

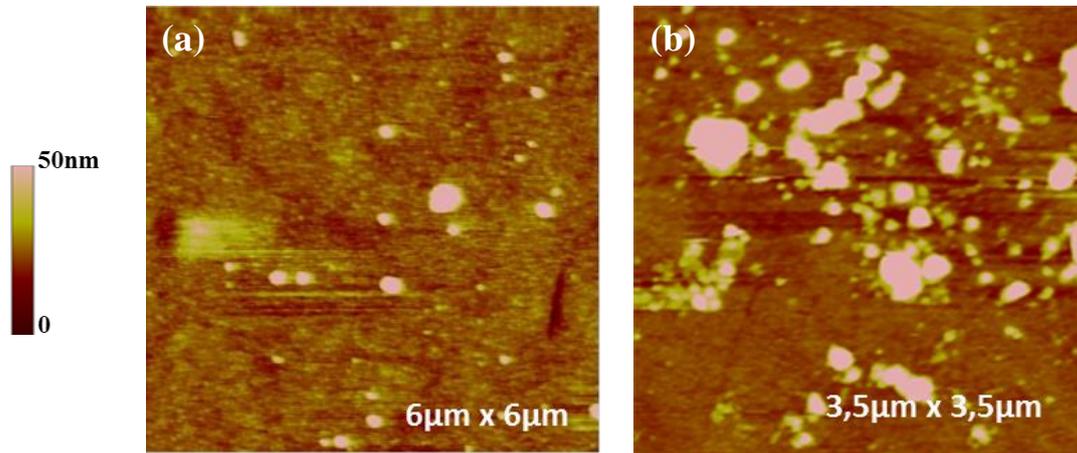
La méthode la plus simple et la plus rapide pour former des bicouches lipidiques planes supportées, est l'adsorption suivie par l'éclatement des vésicules sur une surface solide et la fusion des fragments de bicouches en résultant (Figure 126).

Dans le cadre de ce travail, deux techniques de préparation des vésicules lipidiques ont été testées : par sonication de MLV et par réhydratation d'un film lipidique suivie d'une étape d'extrusion. Des mesures de DLS réalisées sur ces solutions de SUV ainsi obtenues ont permis d'estimer des rayons hydrodynamiques  $R_h$  de l'ordre de  $45 \pm 2 \text{ nm}$  (sonication) et de  $104 \pm 6 \text{ nm}$  (extrusion) (voir chapitre 2 paragraphe 2.2).



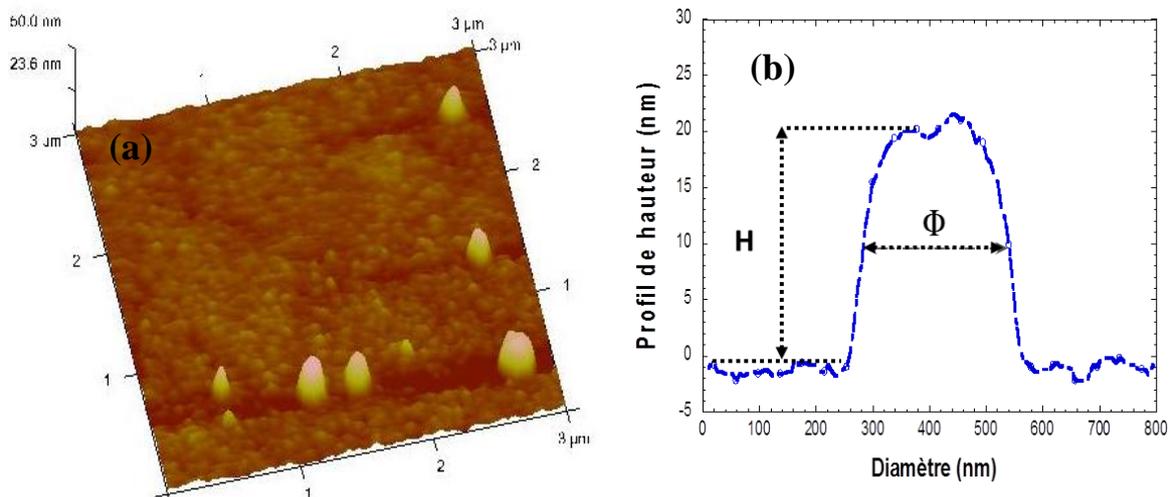
**Figure 126.** Formation de bicouche lipidique supportée par éclatement de vésicules.

Il est par ailleurs possible de confirmer ces résultats en se plaçant dans des conditions expérimentales où les vésicules ne se rompent pas sur la surface du support solide. Par exemple, à une température inférieure à la  $T_m$  du lipide, les vésicules s'adsorbent à la surface du substrat sans qu'aucun phénomène de rupture ne soit observé. La Figure 127 présente des exemples d'images AFM obtenues pour un tel dépôt. Ces images montrent une surface recouverte de façon homogène mais sur laquelle on note la présence de vésicules (zones claires) adsorbées sur une surface de silicium même après rinçage.



**Figure 127.** Images AFM de hauteur de vésicules lipidiques adsorbées sur une surface de silicium (lame de quartz utilisée dans le cadre d'expériences de QCM-D). Ces images sont obtenues sur deux zones différentes. Le dépôt est réalisé avec une solution de vésicules de concentration lipidique de 0,1mg/mL, à  $pH=7,4$  et à une température égale à  $22^{\circ}C$  ( $< T_m$ ).

Dans le cas de vésicules formées par extrusion le profil de hauteur obtenu sur certaines vésicules (globalement sphériques) permet d'estimer une hauteur  $H$  de  $23\pm 2$  nm et un diamètre  $\Phi$  à mi-hauteur de  $240\pm 5$ nm correspondant grossièrement à deux fois le rayon  $R_h$  (Figure 128). La différence observée entre le diamètre hydrodynamique (en DLS) et le diamètre à mi-hauteur (en AFM) peut s'expliquer par la nature différente des systèmes observés : vésicules globalement sphériques en solution mais très probablement déformées suite à leur adsorption sur la surface.

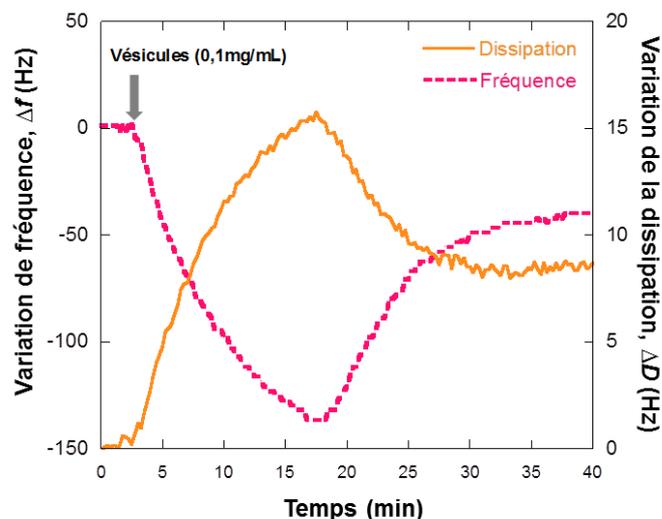


**Figure 128.** Image AFM de hauteur d'un dépôt de SUV de DMPC sur une surface de silicium. Le dépôt est réalisé avec une solution de vésicules de concentration lipidique de 0,1mg/mL, de  $pH=7,4$  et de température égale à  $22^{\circ}C$  ( $< T_m$ ).

#### 4.1.5. Optimisation de la méthode par éclatement de vésicules et suivi par QCM-D

Comme nous avons pu le constater à travers ces résultats préliminaires et ceux de la littérature, l'obtention d'une bicouche plane intacte dépend de différents paramètres tels que la taille des vésicules, le pH, la force ionique, et surtout la température d'incubation. Il est donc nécessaire d'optimiser tous ces paramètres afin d'obtenir des bicouches intactes avec un taux de recouvrement du substrat optimal. La QCM-D est une méthode particulièrement bien adaptée à ce genre de problématique, la variation de fréquence  $\Delta f$  des oscillations propres du cristal de quartz et celle du signal de dissipation  $\Delta D$  donnant des informations sur le comportement des SUV au contact de la surface.

Nous avons donc testé entre autres différentes concentrations lipidiques (de  $0.01 \text{ mg.mL}^{-1}$  à  $1,2 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) et différentes températures (de  $22^\circ\text{C}$  à  $32^\circ\text{C}$ ). La Figure 129 montre, juste à titre d'exemple, un résultat typique obtenu dans le cadre de cette étape d'optimisation et correspondant à un taux de recouvrement optimal de la surface par la bicouche (solution tamponnée à  $\text{pH} = 7,4$ , concentration lipidique de  $0,1 \text{ mg/mL}$ , température de  $32^\circ\text{C}$ ).



**Figure 129.** Suivi de la formation d'une bicouche de DMPC par QCM-D : variations de la fréquence  $\Delta f$  et de la dissipation  $\Delta D$ , obtenues à  $32^\circ\text{C}$  dans du tampon Tris-NaCl (10mM Tris, 150 mM de NaCl, à  $\text{pH} = 7,4$ ). Une solution de SUV de concentration lipidique de  $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$  est utilisée pour la formation de la bicouche.

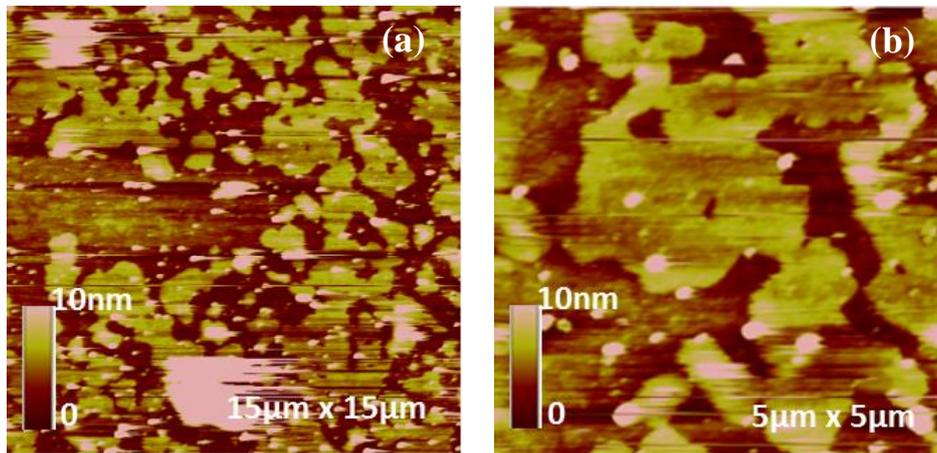
Juste après injection des vésicules celles-ci s'adsorbent sur la surface du quartz : la variation  $\Delta f$  passe par un minimum correspondant à une augmentation maximale de la masse sur la surface du cristal tandis qu'on observe une augmentation de la dissipation  $\Delta D$  (correspondant à une augmentation de la perte d'énergie liée à la flexibilité des vésicules). Au cours du temps la densité de vésicules adsorbées augmente jusqu'à atteindre une valeur critique indiquée par

une amplitude maximale (négative) de  $\Delta f$  et une amplitude maximale (positive) de  $\Delta D$ . A cette valeur critique de recouvrement, les vésicules éclatent à la surface ce qui entraîne alors une diminution de l'amplitude des deux signaux,  $\Delta f$  et  $\Delta D$ , avec une stabilisation finale (entre le début de l'expérience à  $t=0$  et sa fin) à des valeurs de l'ordre de 40 Hz et  $8.10^{-6}$  respectivement dans le cas de la Figure 129.

L'évolution de  $\Delta f$ , significative d'une perte de masse, est liée au relargage du volume de tampon contenu dans les vésicules lors de l'éclatement de celles-ci, alors que celle de  $\Delta D$  est due à la rigidification de l'assemblage lipidique. Quand les conditions optimales sont définies, l'équation de Sauerbrey décrite précédemment [133] permet d'estimer une masse de lipide déposée sur la surface de l'ordre de  $708\text{ng/cm}^2$  après rinçage. Ce résultat peut être comparé à celui obtenu par un calcul simple en considérant que le DMPC occupe une aire moléculaire moyenne de l'ordre de  $45 \text{ \AA}^2$  et qu'il est organisé en une bicouche homogène. Dans ces conditions, une surface de  $1 \text{ cm}^2$  comporte en moyenne un nombre de molécules de l'ordre de  $4,4.10^{14}$ , soit une densité surfacique de l'ordre de  $500 \text{ ng.cm}^{-2}$  en tenant compte de la masse molaire du DMPC. L'ordre de grandeur obtenu par QCM-D est donc cohérent, l'écart entre la densité surfacique expérimentale et celle calculée pouvant s'expliquer par la présence d'une couche de tampon « coincée » entre la surface du substrat et la bicouche. L'écart constaté de l'ordre de  $200 \text{ ng.cm}^{-2}$  permet d'estimer une épaisseur de la couche d'eau de l'ordre de 15-20  $\text{ \AA}$ , valeur cohérente avec celles couramment admises [158].

L'étape d'optimisation consiste donc à définir les conditions expérimentales conduisant à des variations de fréquence et de dissipation maximales (après rinçage), signes d'une rupture efficace des SUV, les images AFM des bicouches formées permettant également de vérifier la pertinence de ces paramètres expérimentaux.

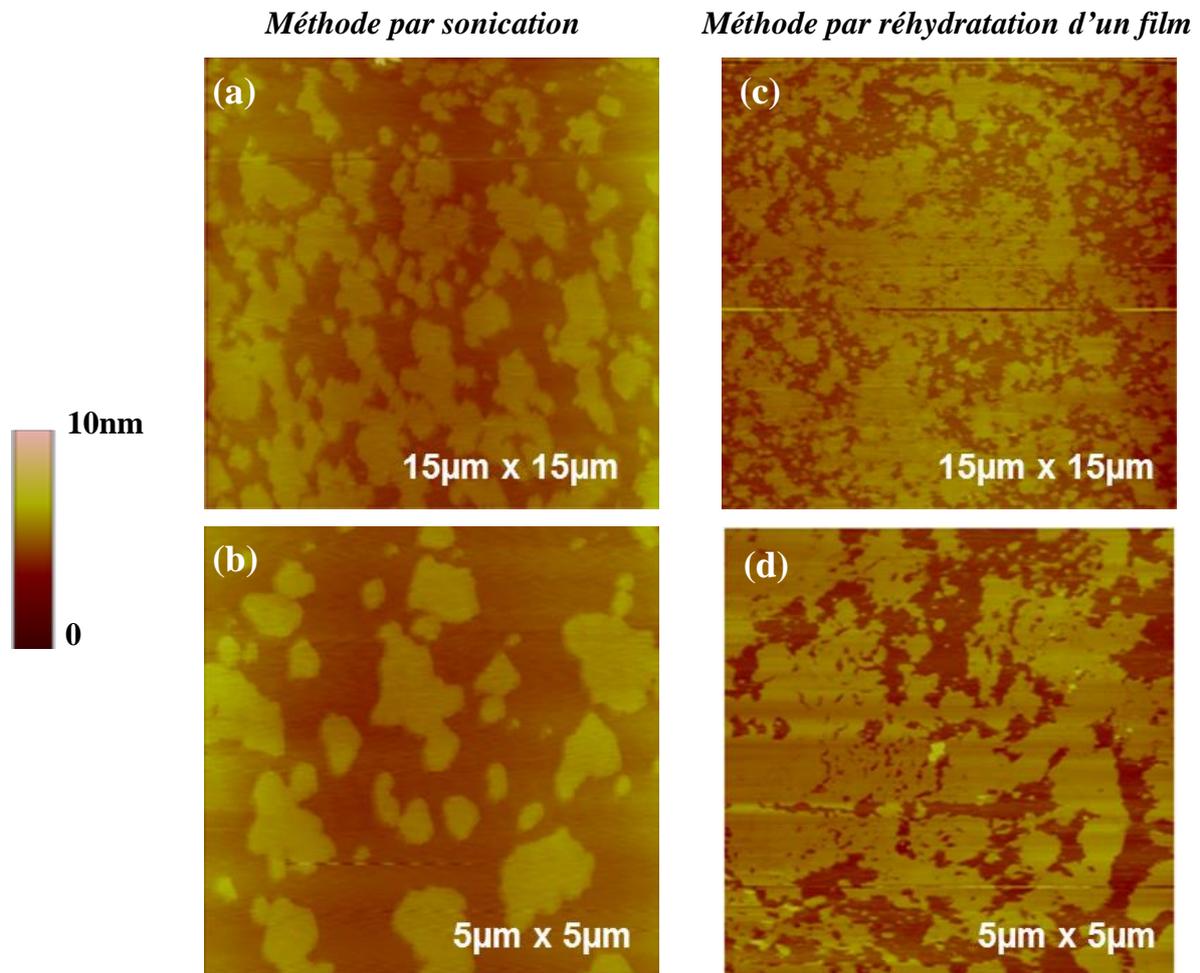
Ainsi concernant la concentration lipidique, nous avons observé qu'il était inutile de forcer la concentration de SUV au-delà de  $1 \text{ mg/mL}$ . En effet, au-delà de cette concentration, on note encore et généralement, sur les images AFM, la coexistence de fragments de bicouches et de vésicules adsorbées mais non rompues, même après plusieurs étapes de rinçage. La Figure 130 illustre l'état de surface d'un échantillon obtenu à partir d'une solution de SUV à  $1,2 \text{ mg/mL}$ . Les images montrent la présence de fragments de bicouches mais également celle de vésicules adsorbées (zones claires) soit sur le support soit à la surface de la bicouche.



**Figure 130.** Images AFM de hauteur d'une bicouche de DMPC déposée sur une surface de silicium, obtenues en milieu liquide (tampon Tris). Une solution de SUV de concentration lipidique de  $1,2\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  est utilisée pour la formation de la bicouche à  $T = 32^\circ\text{C}$ .

Concernant la température d'incubation, nos observations confirment celles déjà reportées dans la littérature : à une température inférieure à  $T_m$  ( $24^\circ\text{C}$  dans le cas du DMPC) ou légèrement supérieure ( $22^\circ\text{C} \leq T \leq 26^\circ\text{C}$ ), les vésicules s'adsorbent sur la surface de quartz mais aucun processus de rupture n'est observé (Figures 127 et 128). Par contre, à une température franchement supérieure à la  $T_m$ , l'adsorption des vésicules est suivie par une étape de rupture de ces dernières sur la surface.

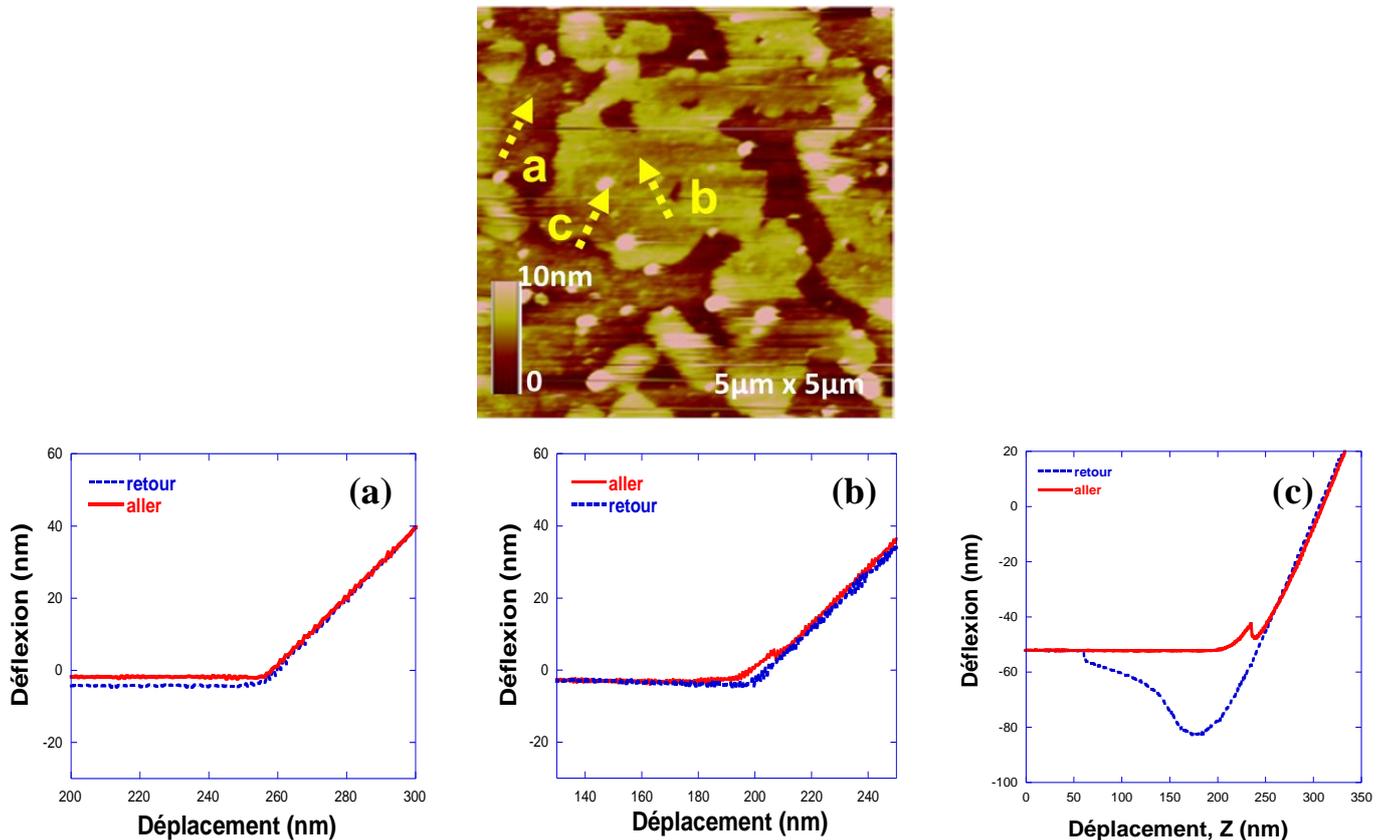
Après avoir fixé ces premières conditions, la dimension des SUV est un dernier paramètre qui reste à tester. Pour cela deux types de solutions vésiculaires obtenues par sonication ( $R_H = 45 \pm 2\text{nm}$ ) et réhydratation d'un film ( $R_H = 104 \pm 6\text{nm}$ ) sont utilisées. Des images d'AFM représentatives de bicouches de DMPC préparées à partir de ces deux solutions sont présentées sur la Figure 131. Dans les deux cas on observe la présence de fragments de bicouches répartis de manière assez uniforme sur la surface. Cependant, leur distribution est différente.



**Figure 131.** Images AFM de topographie et d'amplitude de bicouches de DMPC réalisées à partir de SUV obtenues par sonication ou réhydratation d'un film. La caractérisation par AFM est réalisée en milieu liquide avec un levier triangulaire de raideur  $k = 0.06 \text{ N/m}$ .

Dans le cas des SUV de petite taille, on observe la présence de fragments de différentes dimensions éparpillés à la surface du substrat (Figures 131a et 131b). Dans le cas des SUV de plus grandes dimensions, les fragments sont plus étendus et le taux de recouvrement de la surface par la bicouche lipidique est plus important, passant de 40% à 76% (Figures 131c et 131d). Enfin, quelle que soit la méthode utilisée pour fabriquer les SUV, la surface des dépôts est globalement lisse, suggérant une bicouche lipidique homogène contrairement à celles obtenues par la méthode LB/LS où nous suspectons une coexistence de zones recouvertes par la monocouche et la bicouche.

Par ailleurs, et comme illustré sur la Figure 132, nous avons complété cette étude en utilisant le mode spectroscopique qui a consisté à effectuer des courbes de force sur des zones différentes du dépôt de la Figure 130b.



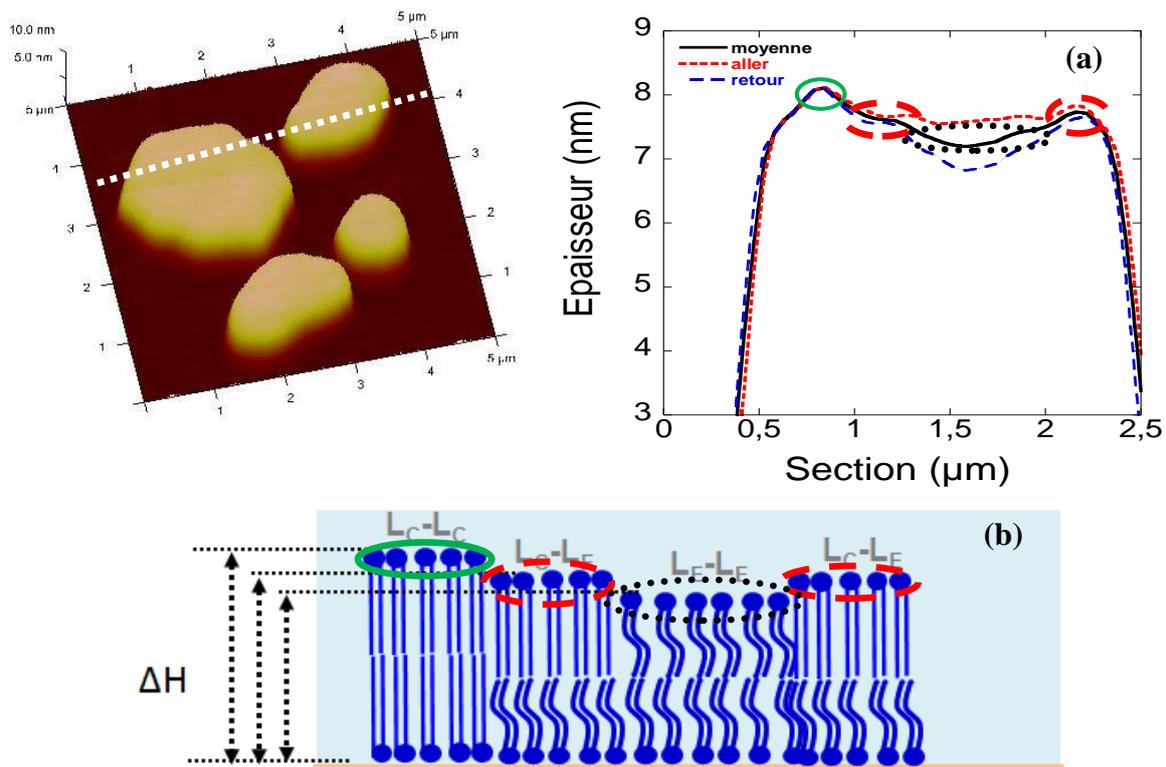
**Figure 132.** Image AFM de hauteur d'une bicouche de DMPC obtenue par élatement de vésicules. Courbes de forces obtenues (a) sur une des zones sombres (plus profondes, mica). (b) sur un fragment (zones claires, bicouche) et (c) sur les agrégats (zones claires saturées, vésicules)

La courbe (a) est régulière, linéaire avec une pente égale à 1<sup>25</sup>. Ce résultat permet de confirmer le fait que les zones sombres apparaissant sur les images AFM correspondent bien au substrat de référence, le mica non recouvert par la bicouche et qui est dur. Par contre, et dans le cas de la Figure 132b, la relation déflexion-déplacement n'est pas complètement linéaire, et la pente dans la partie linéaire de la courbe est inférieure à 1 ce qui confirme qu'il s'agit d'un dépôt mou ce qui est cohérent avec l'image topographique correspondante, à savoir celle d'un fragment de bicouche lipidique. Par ailleurs, la partie de la courbe de force (« aller » dite aussi « approche ») présente un déplacement vertical de 6nm pour lequel aucune déflexion du levier n'est observée alors que la sonde AFM continue à se rapprocher de l'échantillon. Cela s'explique par la pénétration sans aucune résistance de la pointe AFM dans la bicouche et par conséquent sans induire aucune déflexion du levier. La troisième courbe, Figure 132c est aussi en cohérence avec la topographie correspondante, à savoir qu'elle a été effectuée sur une vésicule qui ne s'était pas encore éclatée. L'allure, non linéaire, de la courbe

<sup>25</sup> La pente égale à 1 signifie que le déplacement de l'échantillon est égal à la déflexion du levier ce qui correspond à une indentation de la surface sonde nulle. C'est le cas pour des surfaces dures.

retour (hystérésis de la courbe de force ainsi que le décollement non brutal de la sonde) confirme que la surface sondée est plus molle que celle de la bicouche « à proximité d'un substrat dur » ce qui est bien le cas des vésicules.

Nous poursuivons la caractérisation de ces bicouches en déterminant les épaisseurs. Un profil typique de hauteur issu des sections réalisées sur des images de hauteur est présenté sur la Figure 133a. Les hauteurs  $\Delta H$  estimées sont comprises entre 5 nm et 7 nm, ces valeurs étant globalement cohérentes avec des valeurs d'épaisseurs de bicouches supportées de DMPC données dans la littérature.



**Figure 133.** Image AFM 3D d'une bicouche de DMPC préparé par la méthode par éclatement de vésicules. Profil de hauteur tracé à partir de sections réalisées sur l'image AFM de hauteur aller et retour présentée en (a). Insérer le zoom de la section (b) Schéma montrant les différentes phases possibles pour les deux feuillet de la bicouche (c).

De plus, on observe que ces épaisseurs ne sont pas constantes sur l'ensemble des fragments de bicouches, le centre des fragments étant moins épais que leur circonférence. Cette variation de l'épaisseur pourrait être liée à une répartition inégale des lipides en phase  $L_C$  et  $L_E$ , les deux monocouches constituant la bicouche pouvant être dans la même phase ou dans deux phases différentes. Les zones les plus épaisses correspondraient donc à une bicouche où toutes les molécules de DMPC seraient en phase  $L_C$  (voir sketch de la Figure 133b). L'analyse des sections « aller » et « retour » correspondantes à celle de la Figure 133a (Figure 133d)

présente, en plus, un écart entre les deux courbes notamment dans la zone entourée en noir où, d'après les données topographiques, la présence des lipides en phase  $L_E$  y est majoritaire. Cette différence entre les deux sections peut s'expliquer par une contribution additionnelle des forces de frottements (dissipation) qui sont plus importantes dans la zone la plus fluide.

#### 4.1.6. Conclusions de l'étude de bicouches supportées en absence de $SiO_2$ -NPs

Nos résultats montrent donc tout d'abord que le choix de la méthode utilisée pour préparer les bicouches est primordial :

- La méthode LS, bien que présentant de gros avantages (possibilité de modifier la cohésion des molécules ou de réaliser des bicouches asymétriques) donne des films lipidiques de structure irrégulière, alternant probablement des zones en monocouche et en bicouche. Elle nécessite de plus un savoir-faire particulier, le transfert de la seconde monocouche étant particulièrement délicat.
- L'éclatement de vésicules conduit par contre à des bicouches plus homogènes avec de bons taux de recouvrement, mais à condition de mettre au point un protocole optimisé permettant de définir les gammes optimales de concentration, température, pH..., permettant la rupture des vésicules.

Ces observations nous ont donc conduits à privilégier cette seconde méthode pour l'étude portant sur l'interaction bicouches-NPs. Des solutions de vésicules de  $R_H \sim 200$  nm ont été utilisées afin d'obtenir un taux de recouvrement optimal du substrat par la bicouche.

En ce qui concerne la caractérisation des bicouches par AFM, nous avons également montré l'importance de l'optimisation des conditions expérimentales. Tout d'abord, en minimisant la force de balayage de la surface par la pointe, ce qui implique de travailler en condition de limite de décollement de la sonde. De même, le milieu d'observation influence la nature des forces d'interaction entre la sonde AFM et l'échantillon.

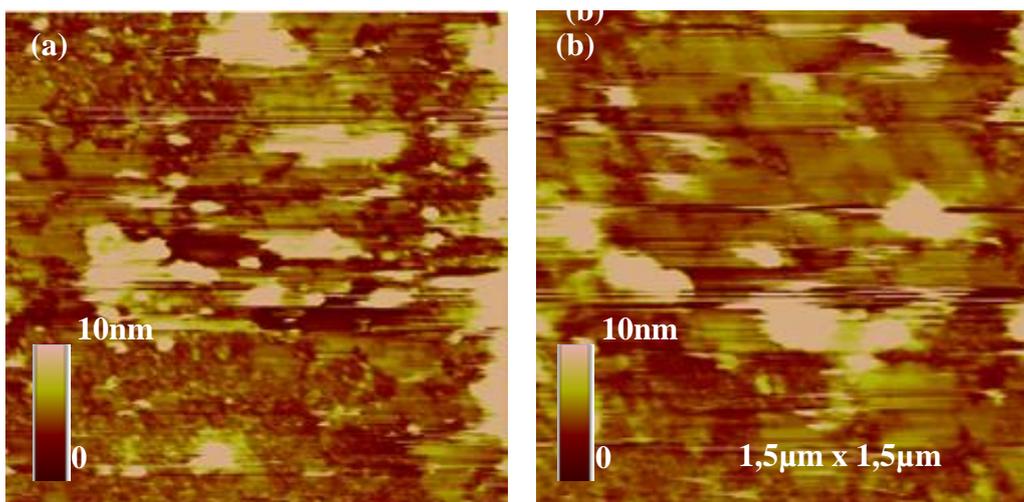
#### 4.2. Etude de l'interaction de bicouches supportées de DMPC avec des $SiO_2$ -NPs

Une fois que l'on a caractérisé les bicouches seules, l'étape d'après consiste à étudier l'effet potentiel des NPs sur la morphologie et l'intégrité de la membrane afin de répondre à différentes questions : la présence des NPs entraîne-t-elle une rupture de la bicouche? Quel est

l'impact de la présence des NPs sur l'organisation des phases lipidiques ? La dimension des NPs joue-t-elle un rôle dans l'interaction ?

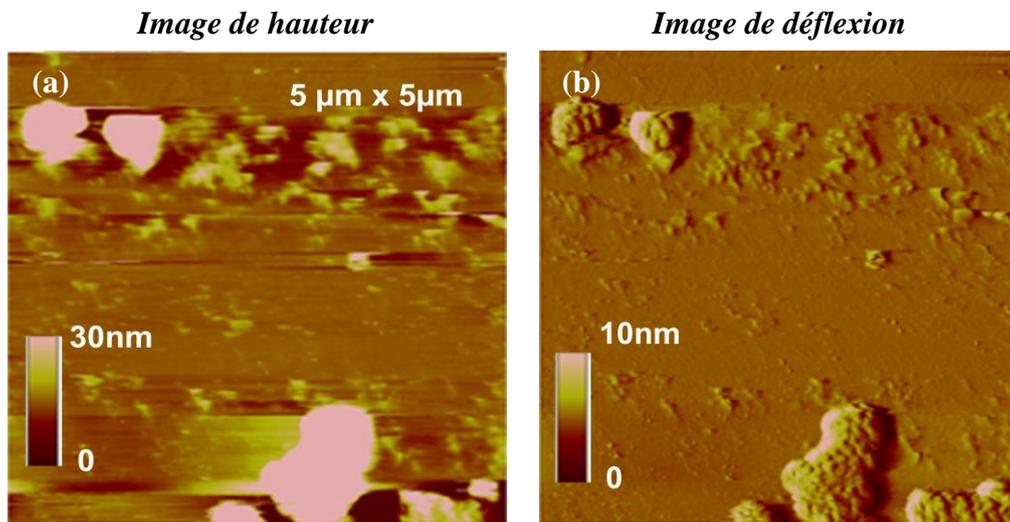
#### 4.2.1. Impact de la présence des NPs sur la morphologie de bicouches supportées de DMPC

Tout comme dans le cas des bicouches seules la caractérisation en présence de NPs, est une étape délicate. En effet, il est nécessaire de minimiser la force de balayage de la surface de l'échantillon afin de protéger la bicouche mais également d'éviter de déplacer les NPs. Lors de cette étude nous avons, en effet, observé des phénomènes de déplacement, par la pointe, des NPs en particulier dans le cas de celles de petite dimension (4 nm et 10 nm). Les images de la Figure 134 illustrent bien cet effet. En cas de glissement, les agrégats de NPs apparaissent comme « flous » sur les images AFM et la mauvaise qualité de ces images empêche toute exploitation ultérieure des données.



**Figure 134.** Images AFM de hauteur d'une bicouche de DMPC en présence de  $\text{SiO}_2$ -NPs de 10 nm de diamètre. Ces images (obtenues en milieu liquide et à température ambiante en utilisant une force d'environ 2 nN) montrent les effets d'une mauvaise optimisation des conditions de balayage.

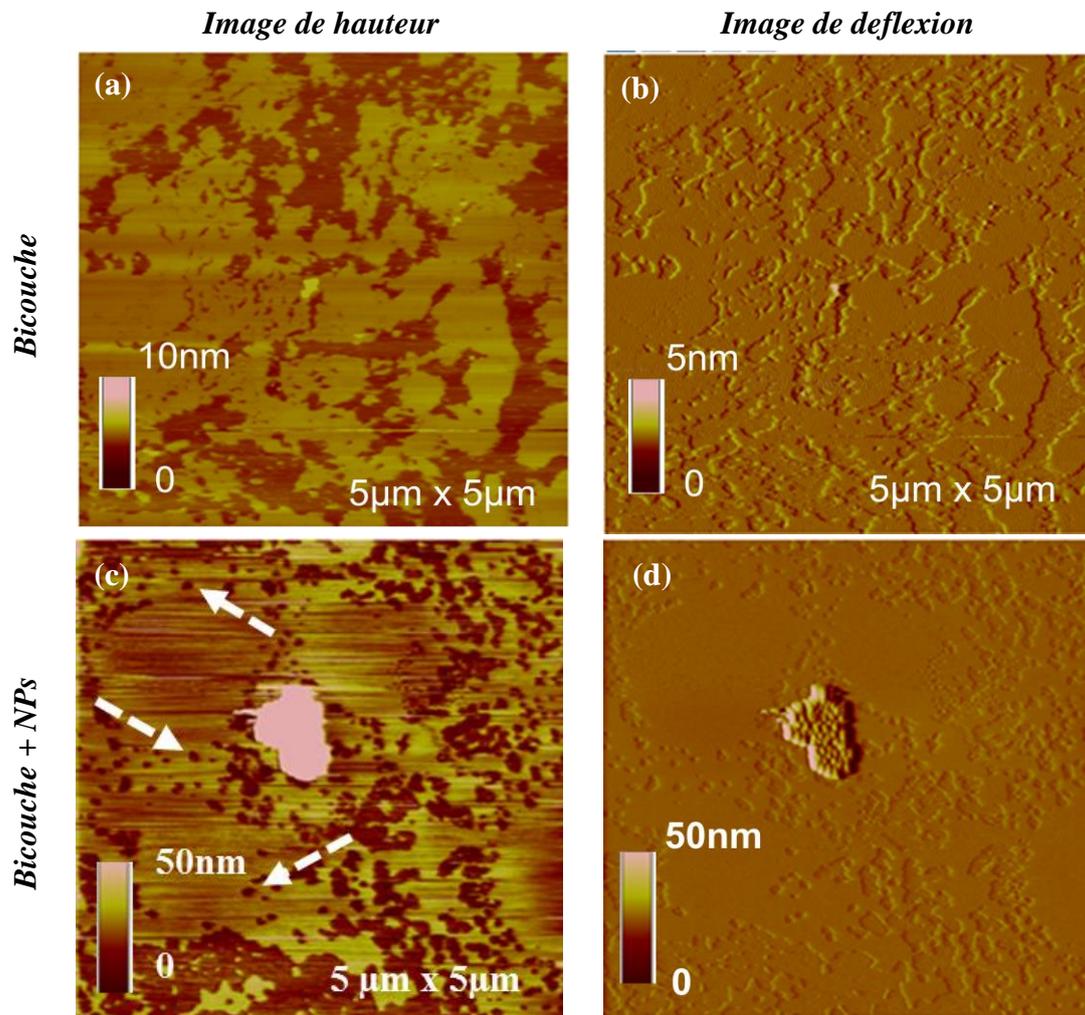
Afin d'éviter ces problèmes nous avons donc procédé à l'optimisation de paramètres tels que la force appliquée par la pointe lors du balayage, la vitesse de balayage, les gains et la taille de l'image afin d'obtenir des images résolues avec le minimum de bruit.



**Figure 135.** Images AFM de hauteur (a) et de déflexion (b) d'une bicouche de DMPC en présence de  $\text{SiO}_2$ -NPs de 100 nm de diamètre. Ces images sont obtenues avec un balayage à la limite de décollement de la sonde AFM.

Dans le cas des NPs de 100 nm (Figure 135), et de façon générale, il nous a été très difficile d'obtenir des images de bonne qualité. Les agrégats de NPs apparaissent ici aussi comme « flous » sur les images, même après optimisation des conditions d'observation, et bien que les images de déflexion soient mieux résolues. En effet, l'image de déflexion (signal d'erreur) montre bien la présence des NPs dans les zones très contrastées (zones claires) mais pour lesquelles le signal de l'image de hauteur (la topographie) est saturée. Il est possible d'optimiser les conditions des expériences sur ces systèmes pour observer à la fois la surface des NPs (recouvertes ou pas par la bicouche) et celle du substrat de référence (recouvertes ou pas la bicouche). Le problème est que, dans ce cas, les NPs sont de grande taille, environ 20 fois supérieure à l'épaisseur de la bicouche, ce qui nous amène à chercher à détecter des variations d'épaisseur de l'ordre de 5% qui seront noyées dans le bruit. L'autre argument qui nous a fait abandonner cette partie de l'étude est le manque de temps. Pour ces raisons nous ne sommes pas allés plus loin dans l'exploitation des données topographiques pour ces grandes tailles de NPs.

Concernant les  $\text{SiO}_2$ -NPs de 50 nm, la Figure 136 présente des images AFM de hauteur et de déflexion de bicouches déposées en absence (Figures 136a et 136b) et en présence de NPs (Figures 136c et 136d).

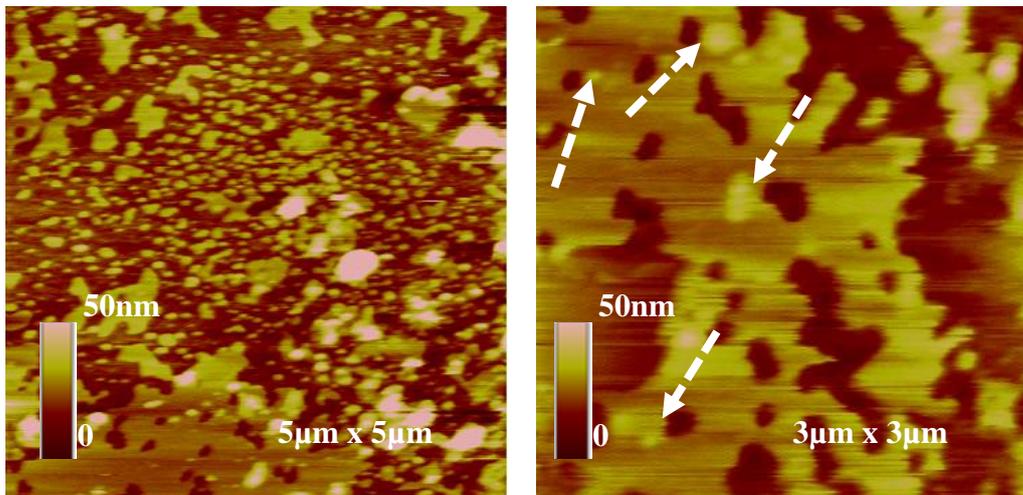


**Figure 136.** Images AFM de hauteur (a, c) et de déflexion (b, d) de bicouches de DMPC déposées sur du mica nu en absence ou avec présence de NPs de 50 nm de diamètre. Les flèches indiquent la présence de trous, répartis sur l'ensemble de la surface.

On peut constater que :

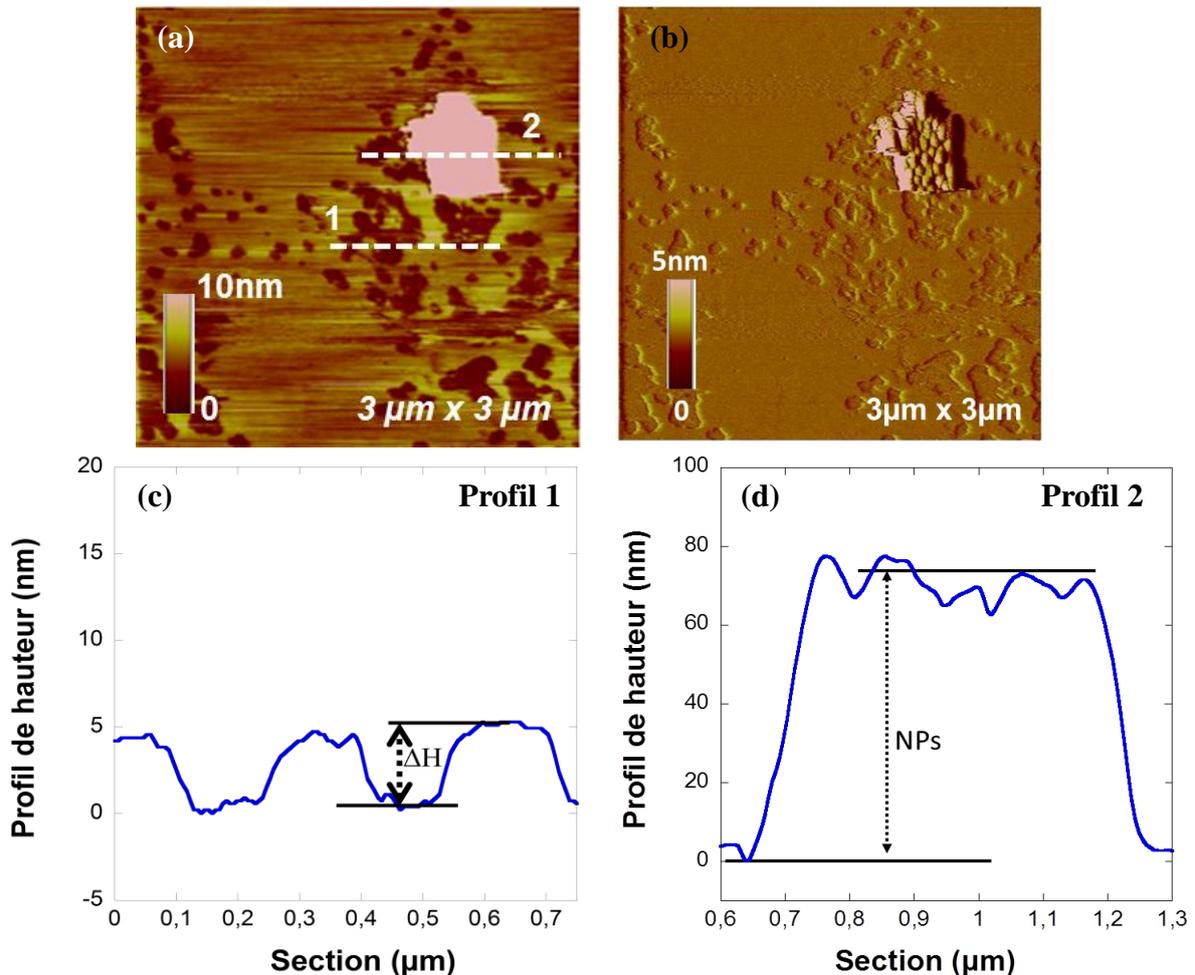
- Les NPs forment des agrégats organisés en réseau hexagonal, nettement identifiables sur l'image de déflexion, ou signal d'erreur (Figure 136d) ;
- Comme précédemment, en absence de NPs la bicouche lipidique recouvre une bonne partie de la surface de mica.
- En présence de NPs on note l'apparition de trous (indiqués par les symboles →) globalement circulaires dans les fragments de bicouches (en plus des zones non recouvertes) (Figures 136c et 136d), ces défauts n'étant pas observés en absence de NPs.

En effectuant un zoom sur des zones présentant ces trous, on remarque la présence d'agrégats de NPs à proximité de certains trous (Figure 137). Cette présence n'est cependant pas systématique.



**Figure 137.** Images AFM de hauteur obtenues sur un dépôt de bicouche de DMPC en interaction avec des NPs de 50 nm de diamètre. Ce dépôt est obtenu par la méthode par éclatement de vésicules. Certaines zones de l'échantillon sont caractérisées par la présence de trous. Les flèches indiquent la présence d'agrégats de NPs (diamètre 50 nm).

Les profils de hauteur obtenus à partir de sections réalisées sur l'image de la Figure 136c sont présentés sur la Figure 138. Le profil de hauteur n°1 correspondant à une section effectuée au niveau d'une zone dépourvue de NP montre une variation de hauteur  $\Delta H$  de l'ordre de 5 nm compatible avec l'épaisseur d'une bicouche et en cohérence avec l'interprétation faite précédemment (le fond des trous apparaissant en plus sombre sur les images correspond au substrat de référence, le mica). Le profil n°2 correspond, lui, à un agrégat et montre une différence de hauteur entre le mica et le sommet de l'agrégat de l'ordre de  $65 \pm 5$  nm, alors que le diamètre des NPs est de l'ordre de 50 nm. Cependant, nous avons montré que ces NPs sont relativement polydisperses. En effet, à partir de précédentes mesures du diamètre de ces NPs en AFM et en DLS nous avons estimé des diamètres de l'ordre de  $61 \pm 7$  nm et de  $89 \pm 31$  nm (diamètre moyen hydrodynamique) respectivement. Cette polydispersité et les incertitudes de mesures constituent un obstacle à une exploitation très poussée du profil et empêchent de définir de manière univoque si la bicouche lipidique recouvre l'agrégat pour des tailles importantes de NPs.



**Figure 138.** Image AFM de hauteur (a) et d'amplitude (b) d'une bicouche de DMPC en interaction avec des NPs de 50 nm de diamètre. Les figures (c) et (d) présentent les moyennes des profils de hauteur (aller et retour) obtenus au niveau de la bicouche et d'un agrégat de NPs respectivement.

La même démarche a été suivie dans le cas de bicouches de DMPC formées en présence de NPs de 10 nm. Les images AFM de hauteur et de déflexion de ces bicouches sont présentées sur les Figures 139 et 140. L'observation des contrastes sur les images de hauteur suggère la présence de fragments de bicouches voire des multi-bicouches superposées et/ou de vésicules adsorbées à la surface et non encore éclatées. Les étendues des fragments sont variables et couvrent généralement une grande partie de la surface. Les épaisseurs de ces fragments sont très variables comme représenté dans la Figure 139bis. Les images de déflexion confirment ces observations. Sur la Figure 139 on note aussi et de façon nette la co-localisation de certains agrégats de NPs avec des fragments de bicouches (les images de déflexion mettent bien en évidence cette remarque). De façon générale, pour ce dépôt, aucune détérioration de la bicouche n'est observée. En revanche, et étant donné, la dispersion des tailles d'agrégats de NPs ainsi que celle des épaisseurs des fragments de bicouches, nous n'avons pas cherché à

exploiter un peu plus les profils de hauteur afin de détecter la présence ou pas de lipides à la surfaces des NPs.

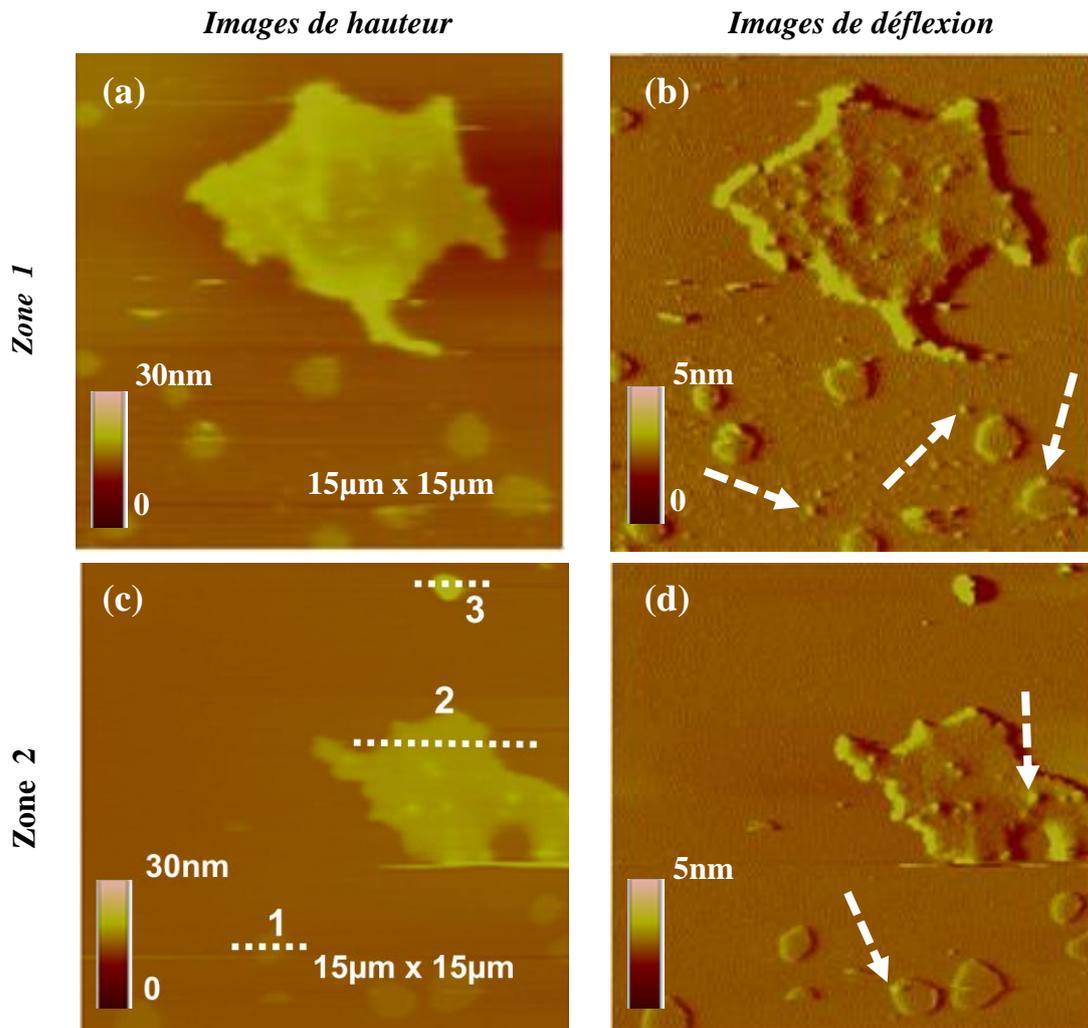


Figure 139. Images AFM de hauteur (a, c) et de déflexion (b, d) d'un depot de bicouche de DMPC en interaction avec des NPs de 10 nm de diamètre.

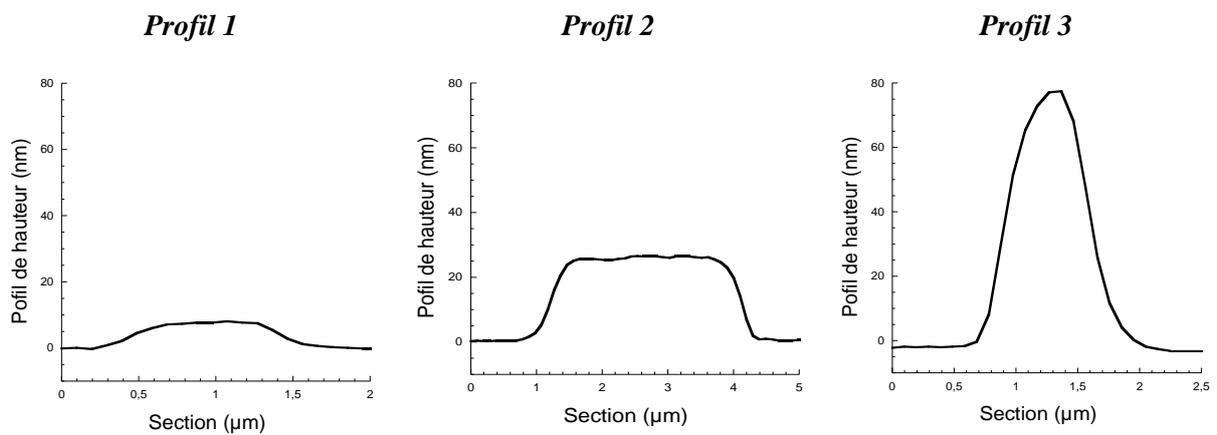
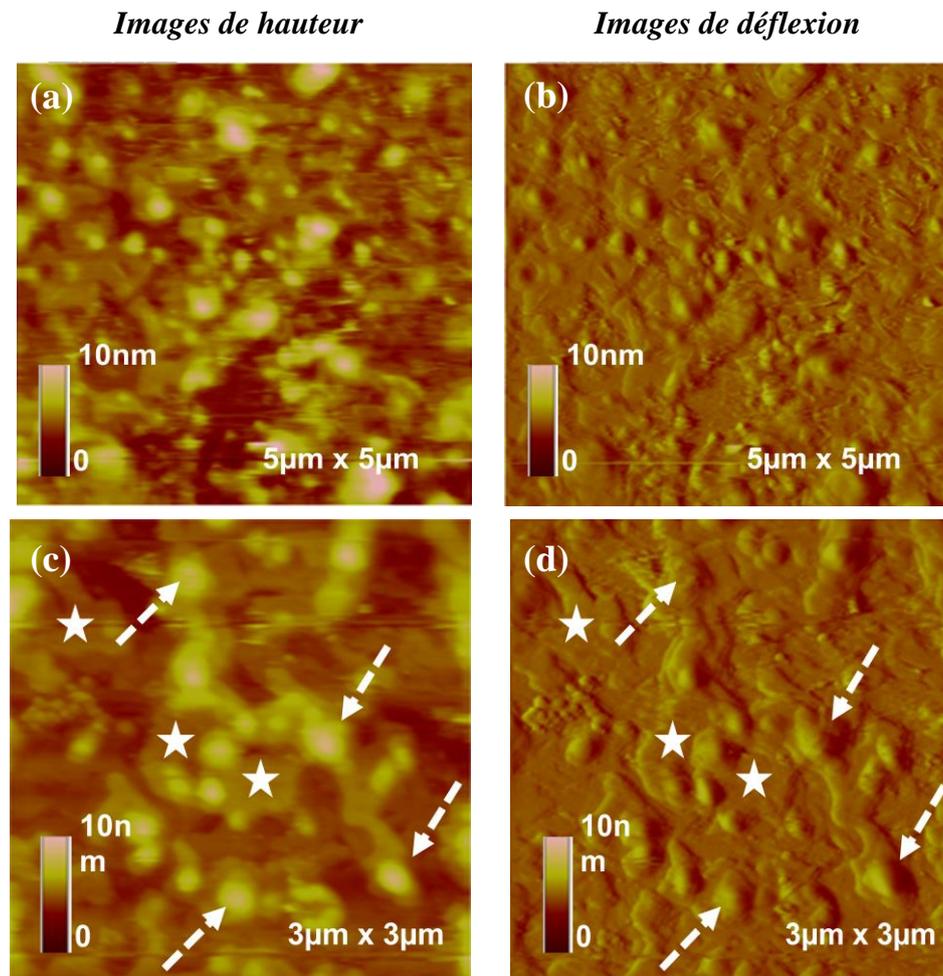


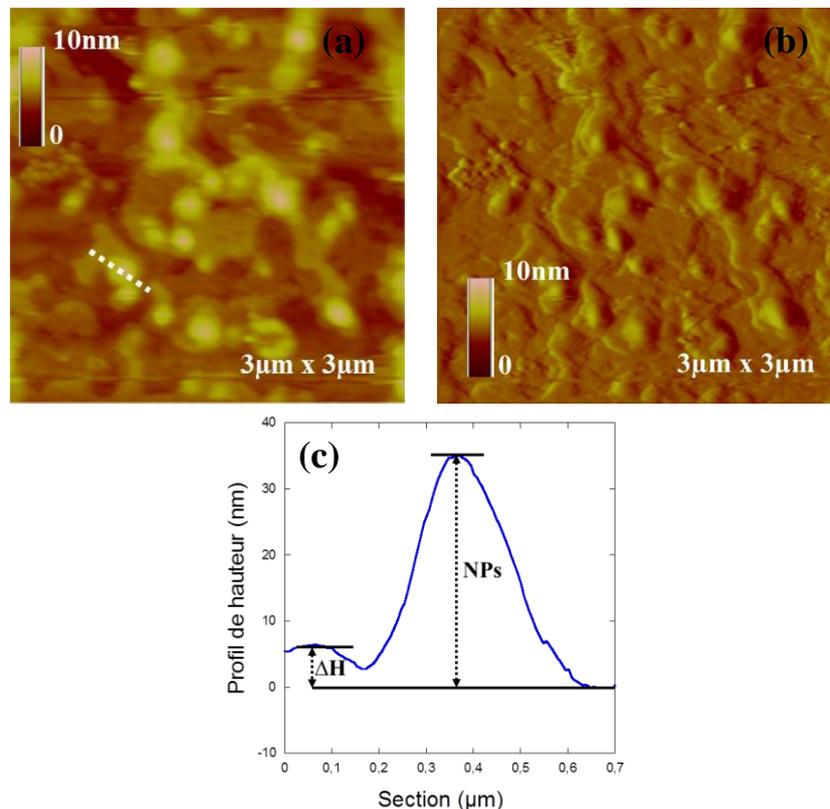
Figure 139bis. Profils de hauteur obtenus à partir des sections indiquées sur l'image c de la Figure 139.

La Figure 140, obtenue pour un autre dépôt, montrant des images à plus faible scan, permet d'observer des détails comme les limites des zones recouvertes par des fragments de bicouches (zones matérialisées sur les images par les symboles ★) et les agrégats de NPs (symboles →) caractérisés par des reliefs plus importants comparés aux zones de bicouches (le signal d'erreur souligne plus clairement ces observations).



**Figure 140.** Images AFM de hauteur (a, c) et de déflexion (b, d) d'une bicouche de DMPC en interaction avec des NPs de 10 nm de diamètre. Ce dépôt est obtenu avec la méthode par éclatement de vésicules. Les étoiles et les flèches indiquent respectivement les zones recouvertes de fragments de bicouche et d'agrégats de NPs.

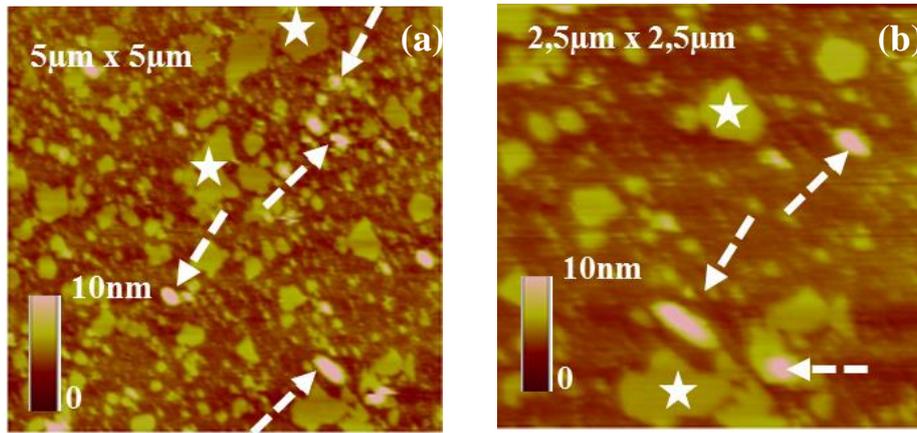
Comme précédemment, des sections ont été réalisées au niveau de fragments de bicouche et d'agrégats de NPs (Figure 141). Encore une fois, la différence de hauteur entre le mica et le sommet des zones supposées recouvertes de bicouche est en accord avec l'épaisseur moyenne attendue pour une bicouche de DMPC, de l'ordre de 6 nm.



**Figure 141.** Images AFM de hauteur (a,b) d'une bicouche de DMPC en interaction avec des NPs de 10 nm de diamètre (a). Profil de hauteur tracé à partir de la section sur l'image (c). Ce décal est obtenu avec la méthode par éclatement de vésicules.

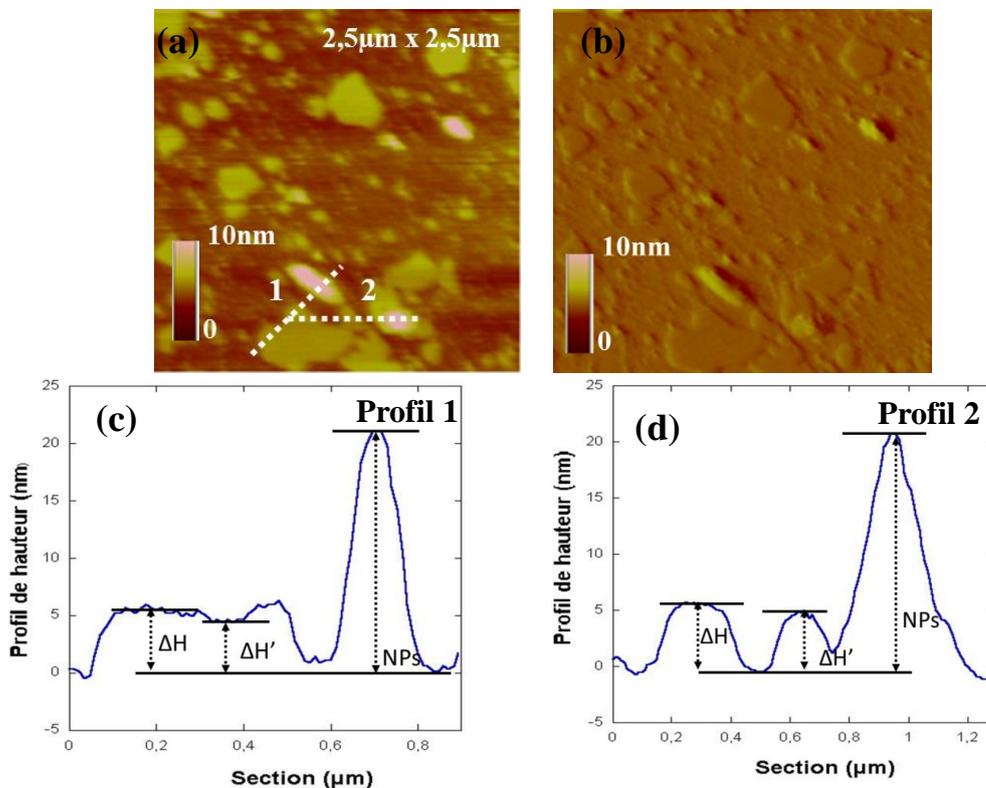
L'analyse est par contre plus difficile dans le cas des agrégats de NPs, les sections effectuées sur différents agrégats de NPs donnant de hauteurs comprises entre 15 et 30 nm, alors que le diamètre des NPs est estimé entre 6 et 20 nm en AFM et à  $38 \pm 11$  nm en DLS. Rappelons de plus que le phénomène d'agrégation a été constaté précédemment, en particulier dans le cas des NPs de petite dimension. Un tel phénomène se produit visiblement dans ces échantillons, conduisant à l'empilement de deux ou trois couches de NPs. Les estimations de hauteur sont donc difficiles à exploiter pour définir si la bicouche recouvre ou pas les NPs. Cependant de façon purement qualitative, compte tenu de ces hauteurs estimées on peut supposer la présence dans les échantillons de différents types de NPs, recouvertes par la bicouche ou nues.

Enfin, dans le cas des NPs de très petite taille (4 nm), les images (Figure 142) montrent des fragments de bicouche lipidique avec la présence d'agrégats d'étendues variables. Cependant, les fragments lipidiques semblent davantage fractionnés suggérant une « dissociation » de la bicouche. Sachant que tous nos échantillons sont préparés dans les mêmes conditions, cela suggère que cet effet de fractionnement serait dû à la présence des NPs de petite taille.



**Figure 142.** Images AFM de hauteur d'une bicouche de DMPC en interaction avec des NPs de 4 nm de diamètre. Les images sont obtenues en milieu liquide (tampon Tris) et à température ambiante. Les étoiles et les flèches indiquent respectivement les zones recouvertes de fragments de bicouche et d'agrégats de NPs.

D'autre part, les profils des sections réalisés sur les images de hauteur (Figures 143c et 143d) montrent la présence de deux hauteurs moyennes  $\Delta H$  et  $\Delta H'$  pour les zones correspondant aux fragments de bicouche, de l'ordre de  $5,5 \pm 0,5$  nm et  $4,8 \pm 0,5$  nm respectivement, suggérant une hétérogénéité d'organisation de la bicouche. Ce type de résultat a déjà été observé sur nos échantillons de bicouche en absence de NPs. Des hauteurs beaucoup plus hautes de l'ordre d'une vingtaine de nanomètres peuvent être attribuées à des agrégats multicouches de NPs.



**Figure 143.** Image AFM de hauteur d'une bicouche de DMPC en interaction avec des NPs de 4 nm de diamètre (a). Profils de hauteur (b) et (c) obtenus selon les sections indiquées sur l'image (b) de la Figure 24.

La modélisation d'un tel résultat est présentée sur la Figure 144. Les variations de hauteur observées sur les profils des zones du substrat couvertes d'une bicouche suggèrent que les deux feuillettes de ces bicouches peuvent avoir des états de phase différents.

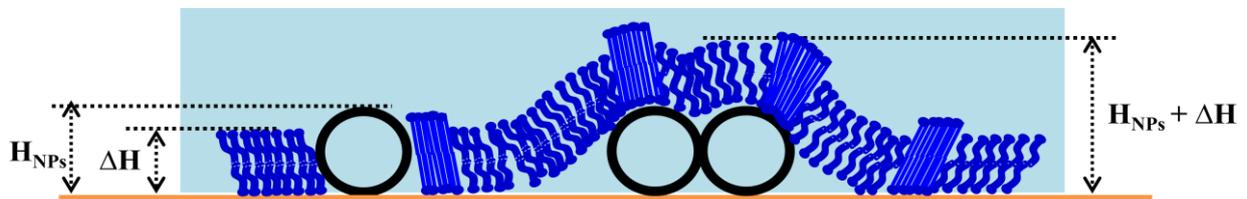
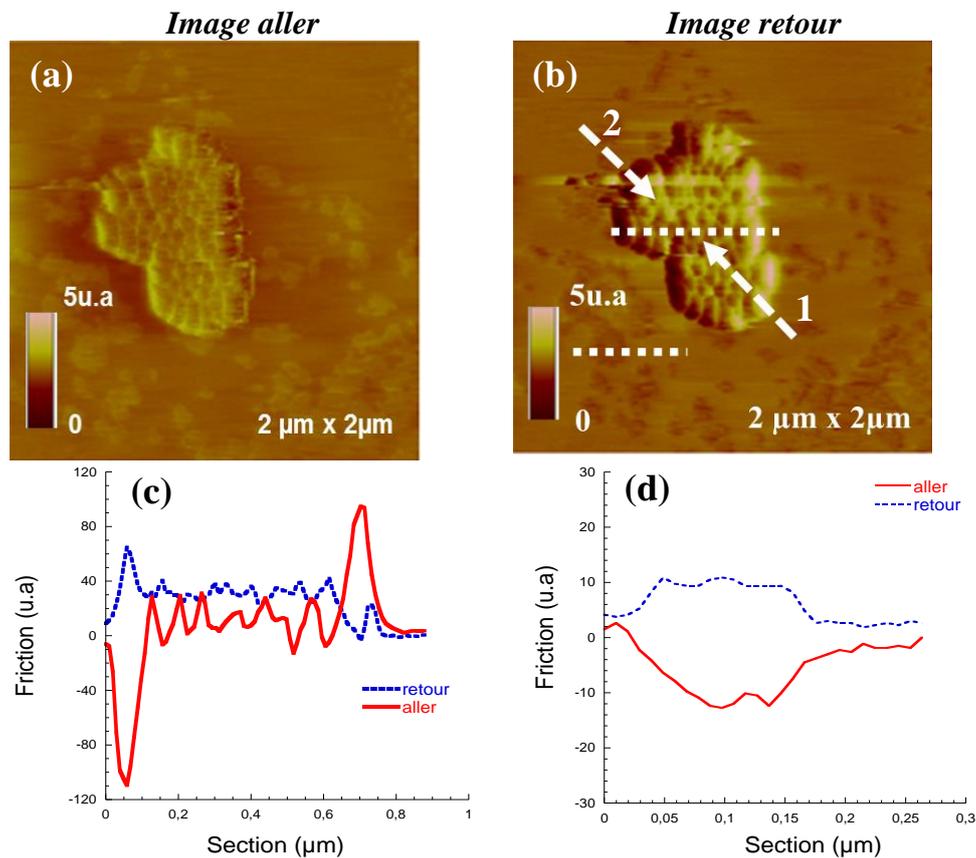


Figure 144. Schéma montrant les différentes configurations possibles de l'interaction des NPs avec une bicouche homogène (phase unique  $L_E$  ou  $L_C$ ).

#### 4.2.2. Hétérogénéité de la réponse nanomécanique

Nous avons essayé d'exploiter les données de friction, comme dans le cas des monocouches en interaction avec des NPs, afin d'apporter d'autres éléments de réponse sur l'éventuel recouvrement (ou pas) des NPs par la bicouche lipidique.

Sur la Figure 145 sont présentées, à titre d'exemple, des images de friction dans les sens aller et retour (images (a) et (b) respectivement) d'une bicouche de DMPC en interaction avec des NPs de 50 nm de diamètre. Notre choix s'est porté sur cette zone parce que les NPs y sont organisés en cristal 2D et du coup, la différence de contraste de frottement obtenue sur la surface des NPs, si elle est hétérogène, ne pourrait être liée qu'à la présence de la bicouche.



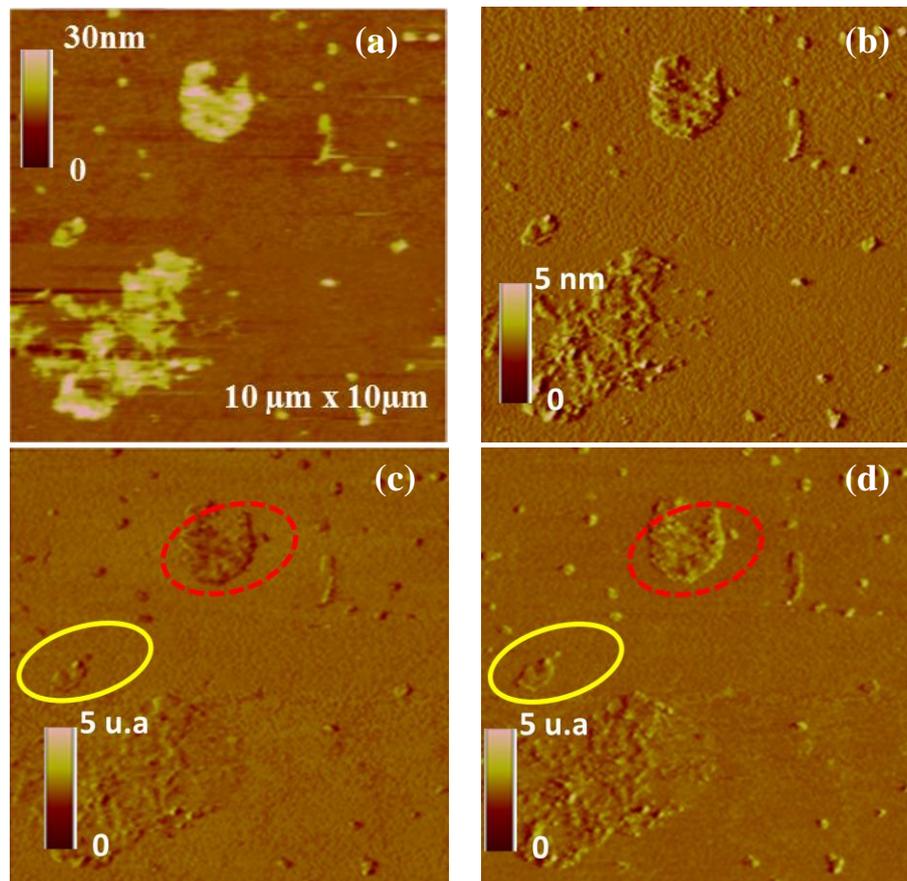
**Figure 145.** Images AFM de friction aller (a) et retour (b) d'une bicouche de DMPC en interaction avec des NPs de 50 nm de diamètre. Les profils tracés à partir des images brutes (a) et (b) sont présentés en (c). Les images sont obtenues en milieu liquide (tampon Tris) et à température ambiante.

Et comme on pouvait s'y attendre, on note une inversion du contraste de friction entre les deux images de frottements (aller et retour), aussi bien sur le substrat qu'à la surface des NPs. En effet, si on suppose que la bicouche ne recouvre pas le dépôt de NPs, on devrait observer un contraste de frottement homogène<sup>26</sup> sur la même image et pour les deux images (aller et retour), ce qui n'est pas le cas (flèche 1 et 2). Ensuite, si on suppose que la bicouche qui recouvre les NPs est homogène (phase unique  $L_E$  ou  $L_C$ ) or ce n'est pas le cas ici. En revanche, on note deux types de comportement. Sur certaines zones de l'agrégat on remarque une atténuation du contraste qui est beaucoup plus importante pour l'image aller (flèche 2 sur l'image 145b) alors que sur d'autres zones l'effet inverse se produit (flèche 1). Ce dernier constat est confirmé par les profils présentés sur la Figure 145c et sous-entend que la dissipation et les forces d'adhésion sont différentes entre les deux zones, la zone la plus sombre dissipant plus que la zone claire. Ces observations laissent supposer que non seulement l'agrégat de NPs est recouvert par la bicouche lipidique sans détérioration de

<sup>26</sup> Les forces de friction dans les sens aller et retour, résultant du déplacement de la pointe à la surface de la bicouche, sont de normes égales mais opposées.

celle-ci, tout au moins pour les NPs de 50nm de diamètre, mais révèlent aussi l'existence des deux phases lipidiques ( $L_E$  et  $L_C$ ) dans cette bicouche.

Nous avons observé, parfois et dans le cas des NPs de petites dimensions, un autre type d'interaction entre les NPs et la bicouche lipidique. Un des exemples est celui de la Figure 146 qui montre une image d'un échantillon de bicouche de DMPC déposée sur une surface nanostructurée par dépôt de  $\text{SiO}_2$ -NPs de 10 nm de diamètre.



**Figure 146.** Images AFM de hauteur (a), d'amplitude (b) et de friction aller (c) et retour (d) d'une bicouche de DMPC en interaction avec des NPs de 10 nm de diamètre. Les images sont obtenues en milieu liquide (tampon Tris) et à température ambiante.

L'image topographique (Figure 146a) montre en effet la présence de fragments de bicouches détériorés qui présentent de nombreux trous et dont les contours sont irréguliers. Ensuite, on note bien la présence de NPs aussi bien dans les fragments lipidiques que sur le reste de la surface qui sont très souvent sous forme isolée, en tous les cas, en petits agrégats. L'état de ces bicouches est tellement instable et dégradé que la pointe en emporte des fragments lors de son passage. Un tel état dégradé des bicouches (en présence de NPs) n'avait pas été observé jusqu'à présent même pour des petites tailles de NPs (résultats de la Figure 139). Par ailleurs, et comme on peut l'observer sur les Figures 146c et 146d, le comportement tribologique de ces dépôts n'est pas homogène. En effet, pour certaines NPs, on ne note pas d'inversion de

contraste lié aux forces de frottement entre les images aller et retour pour les NPs se trouvant dans le fragment du bas (celui entouré par un cercle jaune) alors que c'est le cas pour quasiment l'ensemble des NPs qui se trouve dans le fragment du haut (celui entouré par cercle blanc). Or l'inversion de contraste est observé dans le cas des bicouches lipidiques, ces résultats suggèrent donc que certains agrégats de NPs sont recouverts par la bicouche (zones entourées de pointillés blanc), tandis que d'autres ne le sont pas (zones entourées de pointillés jaunes).

### 5. Discussion de l'ensemble des résultats

Notre étude des monocouches lipidiques déposées sur des supports nanostructurés a permis de dégager les points suivants :

- Dans le cas de monocouches de POPC, lipide insaturé, la présence des NPs n'a aucune influence sur l'organisation lipidique, le POPC restant en phase LE.
- Les résultats obtenus sont dans l'ensemble similaires dans le cas des deux lipides caractérisés par une transition de phase LE/LC, que sont la SM-C16 et le DMPC, bien que leurs structures soient légèrement différentes. Pour rappel, ces résultats sont regroupés dans le tableau ci-dessous.
- localisés dans les échantillons.

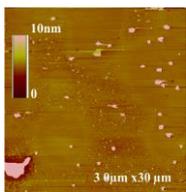
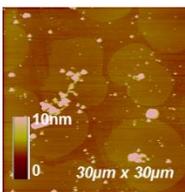
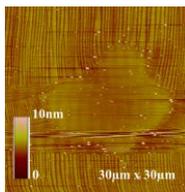
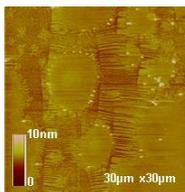
Diamètre des NPs →	100 nm	50 nm	10 nm	4 nm
Phase lipidique ↓				
L <sub>E</sub>	5-7 μm (majoritaires)	-	-	-
L <sub>C</sub>	10 μm, 5-7 μm (minoritaires) agrégat entouré de phase L <sub>E</sub>	1 μm	0,4 - 1 μm	0,4 - 1 μm
Lisières des domaines L <sub>C</sub>	1-3 μm	< 1 μm	0, 4 - 1 μm	0,4 - 1 μm NPs isolées

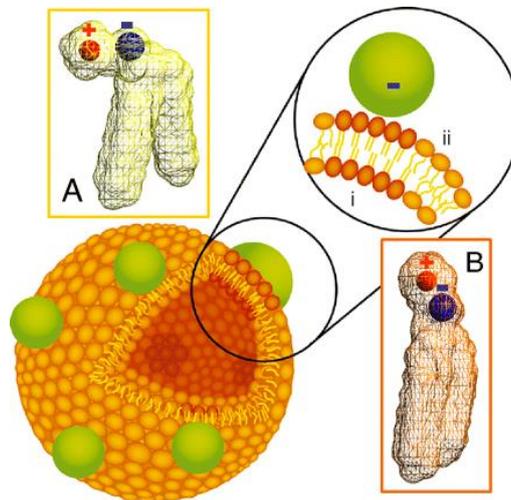
Tableau 8. Ordre de grandeur typique des agrégats observés dans les deux phases lipidiques en fonction de la dimension des NPs.

L'étude de ces films par AFM permet de mettre en évidence un lien entre la taille des agrégats de NPs et la phase lipidique environnante. Globalement, la présence des NPs semble favoriser la transition des lipides vers la phase  $L_C$ , agrégats et phase  $L_C$  étant généralement co-localisés dans les échantillons.

En dehors de ces aspects purement morphologiques, l'AFM permet en outre d'obtenir des informations sur l'épaisseur des systèmes, permettant dans l'idéal de définir si les NPs sont recouvertes ou pas par le film lipidique, connaissant l'épaisseur d'une monocouche lipidique et le diamètre des NPs. En pratique, la réponse à cette question est moins triviale, compte tenu de la dispersion constatée dans les dimensions des NPs et de la coexistence des deux phases lipidiques d'épaisseurs légèrement différentes. Cependant, l'AFM permet de lever dans certains cas l'ambiguïté, puisqu'elle donne également accès aux propriétés de type mécanique directement liées à la dureté du matériau sondé (monocouches ou bicouches lipidiques « molles » par rapport aux NPs « dures »). Dans notre cas, nous pouvons supposer suite aux résultats obtenus que deux populations de NPs coexistent dans les monocouches planes, certaines étant recouvertes par les lipides, d'autres non (au moins pour les NPs de 100 nm, 10 nm et 4 nm). Les résultats obtenus avec les NPs de 50 nm de diamètre sont malheureusement plus difficiles à exploiter, uniquement par faute de temps.

Le fait que la transition de phase  $L_E/L_C$  des deux lipides soit conservée n'est pas, en soi, surprenante. D'autres travaux menés sur différents systèmes ont montré que cette transition était conservée, par exemple dans le cas de monocouches de DPPC déposées sur des billes de silice silanisée. La transition peut, par contre, être déplacée comme le montre une étude par DSC sur ces systèmes [64]. D'autres études montrent également que la transition de la phase  $L_E$  vers la phase  $L_C$  est favorisée en présence de NPs. C'est le cas par exemple dans des vésicules de phosphatidylcholine mises en présence de NPs anionique de polystyrène : le système lipidique transite de la phase fluide vers la phase gel sous l'effet de l'adsorption des NPs [68]. Cet effet est sans doute lié à une modification de l'angle de *tilt* de la tête polaire et donc à une réorientation du dipôle électrique  $P^-N^+$  en présence des NPs anioniques. Ces modifications permettent aux lipides de s'organiser dans une phase plus compacte et plus dense (Figure 147). Un tel effet pourrait donc expliquer la co-localisation des NPs et des lipides en phase  $L_C$  dans nos systèmes. Notons que cet effet « rigidifiant » des NPs a également été observé dans d'autres cas tels que des NPs anioniques de polystyrène en interaction avec des liposomes cationiques [69], ou des quantum dots adsorbés sur des vésicules de charge opposée, cette adsorption conduisant à la disparition des ondulations

d'Helfrich [71]. Par contre, dans le cas de substrats traités par photolithographie pour varier leur rayon de courbure local (surfaces de type « tôle ondulée »), la microscopie de fluorescence montre que des bicouches formées de mélanges lipidiques subissent une séparation de phase : les phospholipides saturés et le cholestérol, organisés en une phase de type *liquid ordered*, sont préférentiellement localisés au niveau des zones de faible courbure (ou de fort rayon) [73].



**Figure 147.** Schéma d'une vésicule lipidique en interaction avec une NP anionique. Son adsorption entraîne une réorientation de la tête polaire des lipides et une transition de la phase fluide  $L_E$  vers la phase  $L_C$  [68].

Nos travaux sont à rapprocher de ceux réalisés par Roiter et coll. qui ont étudié par AFM des bicouches de DMPC déposées sur des substrats préalablement nanostructurés par le dépôt (direct ou assisté par *spin coating*) de NPs de silice de diamètre compris entre 1 et 140 nm [76, 169]. Contrairement à notre cas, ils ont disposé de surfaces sur lesquelles les NPs étaient davantage dispersées (ce qui rend l'exploitation des résultats plus facile), cette différence étant peut-être liée à la nature du substrat : silice dans les études de Roiter et coll. et mica dans le nôtre. Leur étude leur a permis d'aboutir à un diagramme de phase décrivant les différents états d'une bicouche de DMPC selon la dimension de la NP avec laquelle la bicouche est en contact. Ainsi :

- Des NPs de diamètre inférieur à 1,2 nm sont recouvertes par la bicouche de DMPC ;
- Des NPs de diamètre compris entre 1,2 et 22 nm sont à l'origine de « trous » dans la bicouche, cette dernière s'organisant en formant un pore autour de la NP. Si la NP a un diamètre compris entre 5 et 22 nm (donc excédant l'épaisseur de la bicouche), elle est au moins partiellement exposée.

- Des NPs de diamètre supérieur à 22 nm sont, elles, recouvertes par la bicouche qui *a priori* reste intacte, y compris dans la zone de raccordement de la bicouche au substrat plan.

Cette étude permet donc de dégager la notion d'un diamètre critique minimal pour le recouvrement de la NP de l'ordre de la vingtaine de nm. Cette valeur est relativement proche de celle définie par Deserno et Bickel dans une étude théorique de l'enveloppement d'une NP par une membrane sans tension [92] : l'enveloppement total de la NP n'est possible que si la NP a un rayon supérieur à une valeur critique de l'ordre de 10-15 nm, soit un diamètre de 20-30 nm. De même, des NPs de silice « trop petites », de diamètre de l'ordre de 15-20 nm, resteraient adsorbées à la surface de vésicules lipidiques sans provoquer d'invagination de la membrane, du fait d'une adhésion trop faible, elle-même liée à une surface de contact trop faible entre la NP et la membrane, et donc incapable de contrebalancer le coût énergétique associé à la courbure de la membrane [72]. Par contre, des particules de silice-NH<sub>2</sub> d'un diamètre de 50 nm, donc clairement supérieur au rayon critique décrit précédemment sont à l'origine de la formation de trous dans des bicouches de DMPC [77].

Ces résultats ont été obtenus dans le cas de bicouches, et non de monocouches comme dans notre cas initialement. Les bicouches étant des modèles de membrane plus réalistes, nous avons donc entrepris une étude de bicouches de DMPC déposées sur des substrats nanostructurés par des NPs de silice. La première étape a consisté à étudier les bicouches seules, en comparant la qualité des bicouches obtenues par deux méthodes, soit la combinaison d'un transfert vertical puis horizontal d'une monocouche à l'interface air-eau (méthode LS), soit l'éclatement de vésicules. Alors qu'on pouvait s'attendre à obtenir des bicouches homogènes sur de larges surfaces par la méthode LS, nous avons observé que les bicouches ainsi obtenues sont en fait hétérogènes, certaines zones des échantillons étant constituées en fait de monocouches. L'éclatement de vésicules a par contre permis de produire des bicouches plus homogènes, après la détermination des paramètres expérimentaux optimaux.

Des travaux antérieurs ont montré que les propriétés de bicouches réalisées par la méthode LS dépendent de nombreux paramètres, comme la nature des lipides et celle du substrat (définissant l'adhésion de la première monocouche prélevée). Scomparin et coll. ont par exemple comparé les taux de transfert dans le cas de bicouches de DMPC et DPPC : si la première monocouche déposée par la méthode LB présente systématiquement un taux de transfert de 1, le taux de transfert de la seconde monocouche (réalisé également par la

méthode LB) dépend de la nature du substrat, verre ou mica : dans le cas du verre, la méthode LB n'est envisageable pour la seconde monocouche qu'à forte pression (40 mN/m), alors que la gamme de pression est plus large avec le mica. De même, le taux de transfert est significativement plus élevé dans le cas du DPPC (les chaînes plus longues favorisant les interactions lipide-lipide) [53]. De plus, à une pression de surface de l'ordre de 30 mN/m ou plus, le transfert de la seconde monocouche par la méthode LS s'avère efficace. La nature du substrat influence également la diffusion des lipides, étudiée par FRAPP<sup>27</sup>. Cette dernière est similaire dans les deux feuillets d'une bicouche déposée sur du verre, mais plus lente dans le cas de la monocouche au contact du support si la bicouche est déposée sur du mica, suggérant une plus grande adhésion de la monocouche au contact du mica. Ceci est sans doute lié au fait que le mica est lisse à l'échelle de la bicouche, ce qui assure un meilleur contact de la monocouche avec le support ainsi qu'une forte réduction de la couche d'eau lubrifiante entre la monocouche et le support. Enfin, Scomparin et coll. ont comparé la diffusion des lipides dans des bicouches préparées sur du verre par les deux méthodes. Les mesures de FRAPP ont révélé un comportement complexe des lipides dans le cas des bicouches formées par fusion de vésicules, sans qu'il puisse être attribué clairement aux deux populations de lipides présents dans les deux monocouches [53]. Par contre, l'analyse des spectres de SFVS<sup>28</sup> de bicouches de DSPC<sup>29</sup>, déposées par la méthode LS sur des surfaces de silice et marquées au deutérium dans une des monocouches, n'a révélé aucune différence dans la structure des lipides qu'ils soient localisés dans l'une ou l'autre des monocouches (orientation des chaînes et des têtes, quantité de défauts *gauche*...) : ces résultats suggèrent donc que la structure de la bicouche est homogène, formée par deux monocouches elles-mêmes homogènes [202]. De même, à la résolution de la microscopie de fluorescence et de l'imagerie en DIC<sup>30</sup>, des bicouches de POPC déposées sur des substrats de silice semblent homogènes qu'elles soient réalisées par fusion de vésicules ou par transfert LS ; la diffusion des lipides étudiée par FPPR<sup>31</sup> est également similaire [203].

---

<sup>27</sup> FRAPP : Fluorescence Recovery After Patterned Photobleaching

<sup>28</sup> SFVS : Sum-frequency vibrational spectroscopy

<sup>29</sup> DSPC : distéaroyl-phosphatidylcholine (2 chaînes saturées en C18).

<sup>30</sup> DIC : differential interference contrast.

<sup>31</sup> FPPR : Fluorescence Pattern Photobleaching Recovery

Ce très court aperçu de la bibliographie sur le sujet montre donc que la qualité des bicouches dépend de nombreux paramètres et qu'aucune conclusion simple ne peut en être déduite. Dans notre cas, nous pouvons supposer que deux paramètres jouent un rôle dans la différence de qualité des bicouches formées par les deux méthodes. L'un est d'ordre purement pratique, concernant la manipulation des bicouches une fois formées. Une bicouche doit être maintenue en contact avec une phase aqueuse pour demeurer stable, et il s'avère plus compliqué de respecter cette contrainte dans le cas d'une bicouche prélevée par la méthode LS, en particulier lors de la sortie du support hors de la cuve. L'autre concerne les conditions expérimentales. Les bicouches préparées par la méthode LS ont été réalisées en présence d'une phase aqueuse constituée d'eau purifiée, tandis que celles préparées par fusion de vésicules ont nécessité l'utilisation d'un milieu tamponné. De plus, la température expérimentale était différente dans les deux cas : température ambiante dans le cas de la méthode LS, mais supérieure à la  $T_m$  du lipide pour la fusion des vésicules. On peut supposer que la combinaison de ces paramètres joue un rôle dans la qualité des bicouches. Malheureusement, faute de temps, il nous a été impossible de mener d'autres investigations sur ces points, et nous nous sommes focalisés sur l'étude des bicouches obtenues par fusion de vésicules.

Dans le cas des bicouches déposées sur les surfaces nanostructurées, les résultats obtenus avec les NPs de 100 nm, à cause du ratio important entre la taille des NPs et l'épaisseur de la bicouche, se sont malheureusement révélés très compliqués à exploiter et auraient nécessité la mise en place d'un protocole d'observation un peu plus lourd. Faute de temps, nous avons préféré concentré nos efforts sur des ratio plus faibles et par conséquent utiliser des NPs de taille plus petite. Dans le cas des NPs de 50 nm, l'AFM a permis de montrer la présence de trous dans les bicouches, caractérisés par la présence à proximité immédiate d'agrégats de NPs. Les profils de hauteur n'ont pas permis de trancher sur un éventuel recouvrement des NPs par la bicouche, compte tenu de la grande variabilité des dimensions des NPs. Par contre, des variations de la dissipation ont été observées à la surface des agrégats, suggérant un recouvrement inhomogène de ces agrégats par la bicouche. La même hypothèse peut être posée dans le cas des NPs de 10 nm. Quant aux bicouches déposées sur des surfaces nanostructurées par des NPs de 4 nm, elles semblent curieusement dissociées en fragments de petite surface. Cette dissociation n'a pas été constatée dans le cas des autres NPs, ce qui suggère que cet effet est propre à ces petites NPs. Ce résultat est sans doute à rapprocher de ceux obtenus par Roiter et coll. dans le cas des NPs de dimensions comprises entre 1,2 et 5

nm, pour lesquelles la bicouche forme un pore autour de la NP [76], même si dans notre cas, le trou ne semble pas centré sur l'agrégat de NPs.

Comme nous l'indiquions précédemment, le fait d'avoir des agrégats de NPs, s'étendant non seulement latéralement mais également verticalement, complique l'analyse de nos résultats et la comparaison avec ceux publiés par Roiter et coll. et décrits précédemment [76]. En effet, un agrégat de NPs multicouches peut être comparable en hauteur avec les NPs de diamètre supérieur à 22 nm utilisées par cette équipe, tout en influençant différemment le comportement de la bicouche, en particulier au niveau de la zone de raccordement de la bicouche au substrat nu de mica. De même, le rayon de courbure imposé à la bicouche au sommet de l'agrégat sera différent de celui imposé par une seule NP, du fait de sa plus grande étendue. Ceci pourrait donc expliquer le fait que la surface de nos agrégats n'est pas recouverte de manière homogène par la bicouche lipidique. Enfin, dans le cas d'agrégats de NPs, des travaux théoriques ont montré que la distance entre deux NPs est également un paramètre important, jouant sur la rigidité de la bicouche et l'étirement des lipides. En retour, la bicouche exerce elle aussi des forces sur les NPs, ces forces étant capables de moduler à leur tour les interactions entre les NPs [204]. De même les interactions entre le lipide et la NP d'une part, et le lipide et la surface d'autre part, doivent être prises en compte. Par exemple, une attraction forte entre les têtes polaires et les NPs tend à favoriser l'enveloppement, donc la courbure de la membrane et la répulsion à moyenne portée entre les NPs. Par contre, une interaction faible entre le lipide et la surface favorise la déformation de la bicouche induite par les NPs [204].

Enfin, nous avons également étudié l'interaction de monocouches lipidiques étalées à la surface d'une suspension de NPs (100 nm de diamètre), puis transférées sur du mica. L'idée sous-jacente était de laisser les NPs interagir « librement » avec les lipides avant le transfert (alors que l'interaction est « contrainte » dans le cas de monocouches ou bicouches lipidiques déposées sur des surfaces nanostructurées). Nous avons observé un décalage de l'isotherme de compression de la SM-C16 vers les aires moléculaires moyennes plus grandes, indiquant l'insertion de NPs dans la monocouche. L'écart entre cette isotherme et celle de référence (lipide étalé à l'interface air-eau) tend à se réduire lors de la compression, suggérant l'expulsion des NPs. Cependant, la microscopie de fluorescence et l'AFM nous ont permis de montrer que les NPs restent au contact des lipides lors du transfert de la monocouche sur un support plan. De plus, si la présence des NPs n'empêche pas la transition de phase  $L_E/L_C$  de la SM-C16, elle la modifie : la forme des domaines en phase  $L_C$  est affectée par la présence des

NPs, ces derniers semblant plus découpés. Enfin, à la résolution de la microscopie de fluorescence, les NPs sont localisées exclusivement dans les zones fluides en phase  $L_E$  de la monocouche. Cette observation est à rapprocher de celles faites dans le cas de monocouches déposées sur des surfaces nanostructurées par le dépôt de NPs de 100 nm, l'AFM ayant révélé que la grande majorité des agrégats formés par ces NPs est également localisées dans la phase  $L_E$ .

L'ensemble des résultats que nous avons obtenus à l'interface air-eau sont à rapprocher de ceux obtenus dans l'équipe de Guzman [82-84] sur l'interaction de différentes monocouches phospholipidiques (DPPG, DPPC, POPC) en interaction avec des NPs de silice de diamètre 30 nm ou de polyorganosiloxane. La présence des NPs induit également l'expansion des monocouches, attribuée à la formation de complexes lipides-NPs par le biais d'interactions électrostatiques. Les complexes ainsi formés, partiellement hydrophobes, s'incorporeraient aux monocouches provoquant leur expansion. Dans le cas des monocouches de DPPC, les monocouches ont été transférées sur des supports plans pour une étude par AFM qui a révélé une répartition hétérogène des NPs et la formation de domaines de DPPC en phase  $L_C$  aux formes irrégulières [84]. De la même manière, l'étude à l'interface air-eau de monocouches lipidiques par microscopie de fluorescence montre que la transition de phase  $L_E/L_C$  est retardée en présence des NPs de polyorganosiloxane [82]. Nos résultats, très similaires, confortent donc les observations de Guzman et coll., et semblent indiquer que la présence des NPs (ou des complexes lipides-NPs) tend à affaiblir la cohésion des lipides et à induire une organisation plus lâche. La formation de ces complexes ainsi que l'organisation plus relâchée de lipides pourraient par ailleurs expliquer que la courbe de transfert (variation de l'aire moléculaire au cours du temps) est non linéaire lors du transfert.

## 6. Conclusions générales et Perspectives

Le but initial de cette thèse était d'étudier les interactions de NPs de silice de dimensions variables avec des films lipidiques plans de type monocouches et bicouches déposées sur des surfaces nanostructurées. Dans une première étape, il a été nécessaire de caractériser chaque « acteur » de l'interaction séparément. Les principaux résultats sont les suivants :

- En ce qui concerne les surfaces nanostructurées, leur réalisation par *spin coating* s'est avérée performante, permettant d'obtenir des surfaces couvertes de réseaux denses et

organisés de NPs. Nous nous sommes heurtés cependant à des problèmes dans le cas des NPs de 4 nm de diamètre, dont l'adhésion à la surface est faible.

- L'étude des monocouches planes lipidiques a permis de mettre en évidence un phénomène d'oxydation par l'oxygène de l'air dans le cas des lipides insaturés, se traduisant par la formation de domaines surélevés par rapport à la phase lipidique intacte. Nous avons attribué cette surélévation au retournement de la chaîne oxydée, et donc plus polaire, en direction de la phase aqueuse, en accord avec d'autres publications basées sur des méthodes d'étude très différentes. Bien que ce phénomène d'oxydation soit plutôt lent, il est nécessaire d'en tenir compte, en minimisant autant que possible le temps entre la préparation de la monocouche plane et son observation.
- Dans le cas des lipides saturés (SM-C16 et DMPC), notre étude a confirmé des résultats déjà connus sur la transition de phase  $L_E/L_C$  de ces lipides, mais l'AFM a permis d'aller plus loin en mettant en évidence des différences dans la dissipation de ces phases. Il s'avère que cette méthode, pourtant performante, est sous-exploitée dans l'étude des films lipidiques, se limitant trop souvent à une étude purement morphologique.
- L'étude par AFM en milieu liquide a également montré que des bicouches lipidiques formées par la méthode LS ou par éclatement des vésicules (après optimisation des paramètres expérimentaux, en particulier la température) n'ont pas les mêmes caractéristiques : les bicouches formées par éclatement de vésicules sont plus homogènes, alors que celles formées par la méthode LS semblent caractérisées par la coexistence de zones en monocouche et en bicouche. Il s'est avéré que la force exercée sur la bicouche lors de son examen est un paramètre crucial, une force trop importante endommageant irrémédiablement cette bicouche.

Dans la seconde partie de ce travail, l'étude de l'interaction NPs-films lipidiques plans a permis de dégager les points suivants [213]:

- La présence de NPs ne modifie pas le comportement des lipides insaturés, qui demeurent (de manière peu surprenante) en phase  $L_E$ .
- Dans le cas des lipides saturés, la SM-C16 et le DMPC ont donné, dans l'ensemble, des résultats similaires. Leur étude a permis de mettre en évidence un lien entre la taille des agrégats de NPs et la phase lipidique environnante, la présence des NPs

semblant globalement favoriser la transition vers la phase  $L_C$ . Cependant, un autre paramètre est à prendre en compte, comme le montre l'étude de films LB transférés à partir d'une monocouche étalée sur une suspension de NPs : la méthode utilisée pour mettre en contact NPs et lipides semble être un paramètre important dans l'interaction.

- Une question importante concernait l'éventuel recouvrement des NPs par les monocouches ou bicouches lipidiques. Une manière *a priori* simple de répondre à cette question consiste à étudier les profils de hauteur. Il s'est avéré que cette méthode n'est pas aussi simple qu'on peut l'imaginer, car les NPs utilisées ne sont pas toutes rigoureusement monodisperses. L'analyse des profils de hauteur doit donc prendre en compte cette variabilité de hauteur des NPs, ce qui complique leur exploitation. Par contre, l'AFM présente l'avantage d'être sensible à la plus ou moins grande dureté de la surface. Cela permet donc de distinguer les matériaux « durs » (NPs) des matériaux « mous » (film lipidique sur le mica ou recouvrant une NP), un même agrégat pouvant être caractérisé par la coexistence des deux types de surface, suggérant son recouvrement incomplet. Si on extrapole ce résultat à la situation au niveau d'une membrane cellulaire, on peut supposer que l'interaction NPs-membrane sera à l'origine de défauts dans la membrane, pouvant aller jusqu'à sa rupture.

Finalement, il semble donc que l'interaction NPs-membrane est un subtil compromis entre différents facteurs, comme la dimension des NPs, leur nature (aspect non traité dans ce travail de thèse) et celle des lipides, la nature du support plan, si il est présent... définissant si l'interaction est attractive ou répulsive, ainsi que la rigidité de la bicouche. La présence de sel ou d'un milieu tamponné est un autre paramètre à prendre en compte.

Concernant à présent les perspectives de ce travail de thèse, elles sont nombreuses. Nous les détaillons ci-dessous.

### ***6.1. Interactions de NPs avec des modèles membranaires simplifiés***

Nos modèles membranaires étaient constitués de phospholipides ou sphingolipides. Cependant, la composition lipidique d'une membrane est bien plus riche et ne se limite pas à des lipides zwitterioniques. Il serait intéressant de poursuivre cette étude en incluant par exemple dans les modèles des lipides anioniques (en particulier dans le cas où les NPs seraient cationiques) ainsi que le cholestérol, ce dernier jouant un rôle majeur dans la

régulation de la fluidité de la membrane. On peut aussi envisager des modèles de membranes dont la composition mime celle de membranes bactériennes, certaines NPs s'avérant cytotoxiques pour de nombreuses bactéries (voir le paragraphe suivant).

De même, il serait nécessaire d'étudier d'autres natures de NPs, polaires et/ou chargées, mais aussi hydrophobes, ces dernières interagissant probablement de manière privilégiée avec le cœur de la membrane, comme l'ont montré par exemple des études sur des nanotubes [97, 98].

## 6.2. Interactions de NPs avec des bactéries : au-delà du modèle simplifié

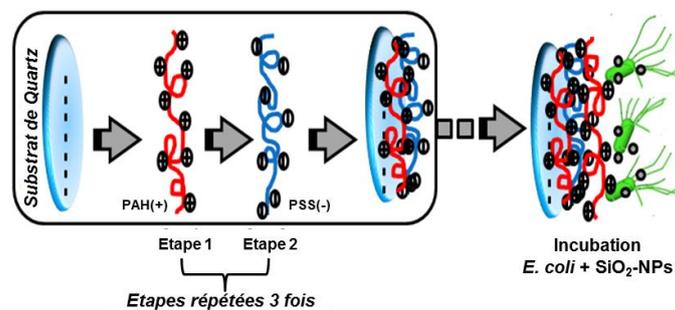
Dans la continuité de nos travaux menés sur l'interaction des NPs de silice avec des films lipidiques, une étude portant sur l'interaction de SiO<sub>2</sub>-NPs avec des bactéries *Escherichia coli* (*E. coli*) a été entreprise dans l'équipe au travers des travaux menées par I. Gammoudi, dans le cadre de son poste ATER (2012-2013) et par M. Mathélié-Guinlet, dans le cadre de son stage PFE (2013-2014).

. Plusieurs raisons motivent ce genre d'études :

- Elles permettent de mieux comprendre les interactions de ces nano-objets avec des cellules vivantes ainsi que les phénomènes de toxicité associés. Différents travaux suggèrent en effet que les mécanismes de toxicité des NPs vis-à-vis des bactéries sont multiples : dommages au niveau des membranes (formation de trous entraînant une fuite des molécules), génération d'espèces réactives de l'oxygène endommageant les lipides, protéines et acides nucléiques (ADN, ARN) bactériens, interférence des produits de dissolution des NPs avec le métabolisme [214-216]. Cependant, tous ces mécanismes ne s'appliquent probablement pas tous à tous les types bactériens et à toutes les natures de NPs. Ces études permettent donc de définir les NPs les plus efficaces d'un point de vue bactéricide en termes de composition, dimension, forme, traitement et fonctionnalisation de surface. Une application directe concerne le développement de textiles dits « intelligents », des NPs étant incorporées dans le tissu à des fins bactéricides.
- Dans notre cas, l'interaction spécifique entre les NPs et les bactéries sera principalement mise à profit dans une application à visée non bactéricide. Il s'agira au contraire d'utiliser la spécificité de l'interaction pour la mise au point d'un biocapteur

de type *whole cell* [216, 217], permettant la détection rapide et sélective de bactéries dans un milieu donnée, sans passer par un protocole lourd, chronophage et onéreux de purification de protéines ou ADN bactérien. La détection sera par exemple assurée par des NPs immobilisées à la surface du capteur. Notre équipe possède un savoir-faire dans le domaine, Touria Cohen-Bouhacina (responsable de l'équipe) ayant dernièrement participé à l'encadrement d'une thèse portant sur l'élaboration et la caractérisation de biocapteurs pour la détection de métaux lourds.<sup>32</sup> Ces biocapteurs sont constitués par l'empilement de plusieurs couches de polyélectrolytes de charges opposées (PAH et PSS) sur une surface de quartz, la dernière couche de polyélectrolyte permettant l'immobilisation de bactéries *E. coli* organisées en biofilms (Figure 148) et mises en contact avec une solution de métaux lourds. L'AFM (en combinaison entre autres avec des mesures de QCM-D) a permis d'une part de caractériser chaque étape de réalisation de ce biocapteur, mais aussi de suivre le stress bactérien induit par la présence des métaux lourds.

Le principe de ce biocapteur a donc été repris afin d'étudier le comportement des bactéries *E. coli* en présence des SiO<sub>2</sub>-NPs utilisées dans le cadre de cette thèse. Dans un premier temps, seule l'influence de la dimension des NPs a été évaluée, l'incubation des bactéries avec les NPs étant réalisée avant la formation du biofilm [218].



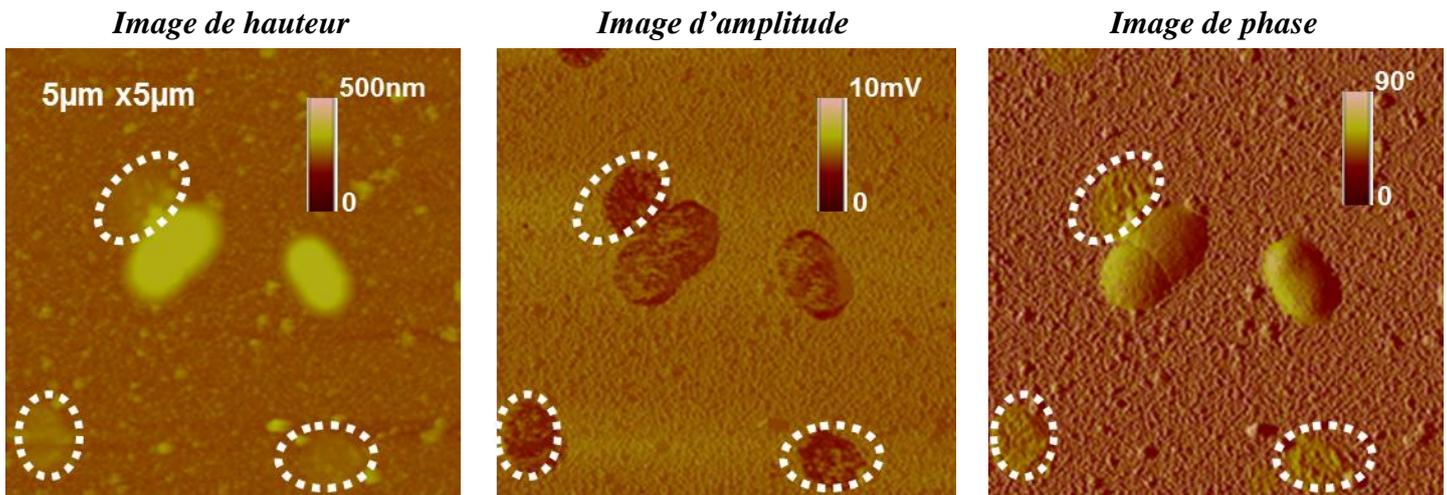
**Figure 148.** Immobilisation des bactéries *E. coli* sur un substrat de quartz fonctionnalisé par dépôt de polyélectrolytes.<sup>33</sup>

Des résultats préliminaires ont mis en évidence le caractère toxique des NPs de 10nm, provoquant parfois la lyse des bactéries *E.coli* (Fig 149), qui se vident alors de leur contenu et

<sup>32</sup> Thèse d'Ibtissem Gammoudi en co-tutelle, intitulée Biocapteur à base de bactéries pour le contrôle environnemental, soutenue le 18 Juin 2012. Encadrement coté français : Corinne Dejous (IMS, université Bordeaux 1) et Touria Cohen-Bouhacina (LOMA, UMR CNRS 5798, université Bordeaux 1) et Rafik Kalfat (coté tunisien).

<sup>33</sup> I. Gammoudi, N. R. Faye, F. Moroté, D. Moynet, C. Grauby-Heywang, T. Cohen-Bouhacina, Engineering and Technology 79, 607-613, 2013.

adoptent une forme plus ou moins sphérique. A l'inverse, les NPs de 100nm ne semblent pas induire de changements morphologique et rhéologique chez ces bactéries.



**Figure 150.** Images AFM de hauteur, d'amplitude et de phase de bactéries *E. coli* en interaction avec des SiO<sub>2</sub>-NPs de diamètre 10 nm.

Ces résultats montrent l'intérêt que présente l'AFM dans un tel contexte, notamment les images de phase obtenues en mode *tapping* qui permettent de distinguer nettement les NPs (matériau « dur ») de la surface des bactéries (matériau « mou »), ou encore les variations de raideur de la surface des bactéries induites par l'adsorption des NPs.

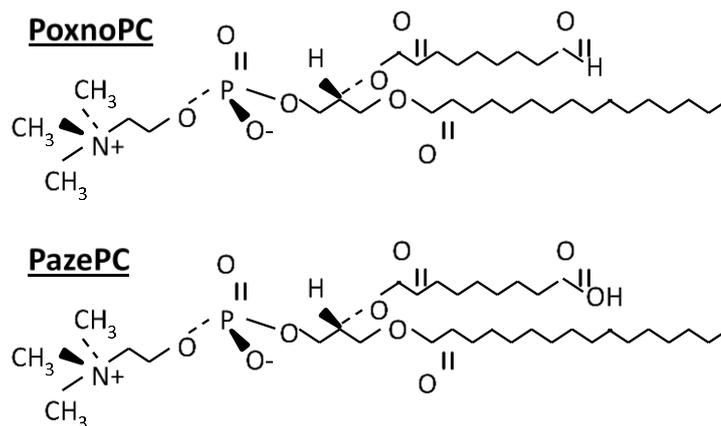
Cette étude se poursuit actuellement dans le cadre d'une thèse, menée par M. Mathélié-Guinlet, intitulée « Interaction NPs-bactéries - Application à l'élaboration d'un biocapteur pour la détection de bactéries ». Dans ce cadre, l'influence de la taille et de la chimie de surface des NPs (fonctionnalisation) sera abordée et les interactions avec des bactéries Gram-positives et Gram-négatives étudiées.

### 6.3. Comportement des lipides oxydés

L'étude des films LB de POPC et OPPC par AFM a permis de mettre en évidence un phénomène d'oxydation de ces lipides insaturés [219]. Malheureusement, il était par contre impossible de déterminer la nature des dérivés oxydés. Une étude complémentaire a donc été menée dans l'équipe, consistant à étudier par AFM des films LB composés de POPC et d'un dérivé oxydé connu de ce lipide en quantité variable définie (4 à 20 mol%), afin de déterminer si les lipides oxydés se comportent de la même manière que dans nos films LB oxydés

« naturellement ». Nous avons choisi d'étudier deux dérivés, possédant tous deux une chaîne tronquée se terminant par un groupe polaire :

- soit une fonction acide carboxylique : le 1-palmitoyl-2-azelaoyl-sn-glycero-3-phosphocholine ou PazePC ;
- soit une fonction aldéhyde : le 1-palmitoyl-2-(9'-oxo-nonanoyl)-sn-glycero-3-phosphocholine ou PoxnoPC (Figure 151).



**Figure 151.** Structure chimique des lipides oxydés dérivés du POPC, PoxnoPC et PazePC.

Les premiers résultats montrent que les deux lipides sont en phase  $L_E$  dans nos conditions expérimentales. Ils suggèrent également que les deux lipides oxydés se comportent de manière différente quand ils sont inclus dans une monocouche de POPC. Le PoxnoPC induirait une expansion de la monocouche, contrairement au PazePC. Compte tenu de leur structure chimique très proche, l'explication la plus probable réside dans une orientation différente de la chaîne oxydée, allongée à l'interface air-eau dans le cas du PoxnoPC ou retournée pour plonger plus profondément dans la phase aqueuse dans le cas du PazePC, plus polaire.

Les images AFM des films LB mixtes (transférés à  $30 \text{ mN.m}^{-1}$ ) montrent dans l'ensemble la présence d'une phase homogène unique, suggérant que les deux dérivés oxydés et le POPC sont miscibles. Cependant, dans le cas des films LB POPC/PazePC, des zones plus épaisses que la phase fluide environnante (de 2 à 8 nm) sont également observées. Ces zones pourraient être dues à des regroupements locaux de molécules de PazePC, qui seraient éjectés de la monocouche lors de la compression, du fait de la structure plus polaire de ce lipide. Ces

premiers résultats encourageants nous incitent à poursuivre cette étude, l'AFM étant un outil particulièrement bien adapté pour ce genre d'étude.<sup>34</sup>

---

<sup>34</sup> Un article portant sur le comportement des lipides PoxnoPC et PazePC est actuellement en cours de rédaction.

## Annexes AFM

### Montages et conditions expérimentales

En AFM, les résolutions aussi bien latérale que verticale dépendent essentiellement du rayon de courbure de l'apex et de la sensibilité de la sonde mais également de la finesse de déplacement du scanner. Ces trois paramètres sont en effet très importants car plus ils sont optimisés, plus l'image reflètera la surface sondée. La première étape consiste donc à choisir le dispositif d'étude approprié (type de pointe et de scanner).

#### 1. Montages expérimentaux

Dans le cas de notre étude, nous avons utilisé différents types de scanners et dispositifs expérimentaux suivant la nature des échantillons :

- un montage AFM multimode (Nanoscope III de chez Veeco-Brucker, Santa Barbara, CA, Etats-Unis) doté de deux types de scanners du même fournisseur : un scanner E et un scanner J avec des déplacements  $x$ ,  $y$  et  $z$  limités à ( $10\ \mu\text{m}$  ;  $10\ \mu\text{m}$  ;  $2.5\ \mu\text{m}$ ) et ( $125\ \mu\text{m}$  ;  $125\ \mu\text{m}$  ;  $5\ \mu\text{m}$ ) respectivement (Figure-annexes 1) ;
- un montage AFM bioscope II (Nanoscope 7.3 Veeco-Brucker, Santa Barbara, CA, Etats-Unis) doté d'un scanner G (déplacements  $x$ ,  $y$  et  $z$  limités à  $150\ \mu\text{m}$  ;  $150\ \mu\text{m}$  ;  $12\ \mu\text{m}$  respectivement) et d'une caméra (Figure-annexes 1).

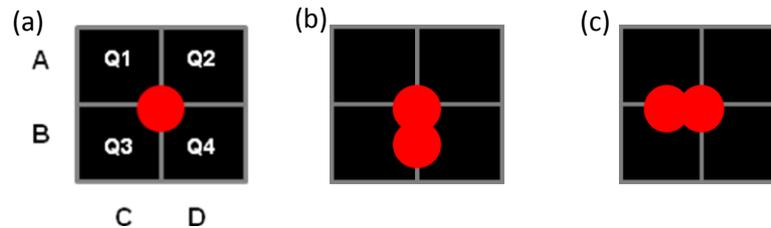


*Figure-annexes 1. Photographies des montages du multimode (a) et du bioscope (b) utilisés dans le cadre de cette étude.*

Une calibration du système piézoélectrique est effectuée régulièrement en utilisant deux types de réseaux de calibration en  $\text{SiO}_2$  de dimensions suivant  $x$ ,  $y$  et  $z$  égales à ( $10\ \mu\text{m}$  ;  $10\ \mu\text{m}$  ;  $180\ \text{nm}$ ) et ( $3\ \mu\text{m}$  ;  $3\ \mu\text{m}$  ;  $17\ \text{nm}$ ).

## 2. Réglage des photodiodes

Le photodétecteur (ou photodiodes) est composé de quatre quadrants *A*, *B*, *C* et *D* qui permettent de mesurer les déflexions verticales et latérales (ou torsions). Ces déformations du levier sont déduites de l'expression des valeurs de signal  $(A+B)-(C+D)$  et  $(A+C)-(B+D)$ , respectivement. Le calcul de ces quantités à partir des quatre signaux délivrés par chaque photodiode est donné dans la Figure-annexes 2.



**Figure-annexes 2.** Schéma du système de détection à quatre quadrants.  $Q_1$ ,  $Q_2$ ,  $Q_3$  et  $Q_4$  sont les tensions délivrées par chaque photodiode en réponse à la position du spot laser après réflexion sur le levier.

En l'absence d'interaction entre la pointe et la surface, le chemin optique est réglé de façon à ce que le spot laser soit centré, donc réparti également sur les quatre éléments du photodétecteur. Un alignement parfait des photodiodes est réalisé lorsque les deux conditions suivantes sont satisfaites : les tensions  $(Q_1+Q_2) - (Q_3+Q_4)$  et  $(Q_1+Q_3) - (Q_2+Q_4)$  sont nulles. La puissance recueillie par les photodiodes est alors maximale et la différence des courants provenant de deux quadrants opposés est nulle. Si, au contraire, la pointe interagit avec l'échantillon, le microlevier se courbe d'un angle  $\Theta$  et le faisceau laser sur les photodiodes est dévié verticalement d'un angle  $2\Theta$ .

### Non-alignement des photodiodes

Lors de la calibration il est nécessaire de s'assurer du bon alignement des photodiodes. Si le système de quatre quadrants n'est pas parfaitement aligné par rapport à l'axe du levier, la tache lumineuse peut être décalée verticalement pour une déflexion ou horizontalement pour une torsion du levier. La conséquence de ce non-alignement des photodiodes est une erreur dans la calibration des déflexions verticales car elle aura été réalisée seulement avec la tension A-B (Figure-annexes 2). De plus, l'exploitation éventuelle du frottement en mode « contact » serait compromise car la tension C-D subirait les conséquences pour une torsion du levier. Le domaine de réponse linéaire du signal de détection vertical des photodiodes est faible. Une attention particulière est nécessaire afin de toujours se placer dans ce domaine.

Avant chaque expérimentation, la sensibilité de la céramique piézoélectrique est évaluée. Le but de cette calibration est de connaître avec précision de combien se déplace l'échantillon pour une tension donnée. Pour cela on applique une tension triangulaire du temps à la céramique. L'échantillon est alors déplacé verticalement de façon périodique. On suit les mouvements de la céramique en mesurant les déflexions du microlevier et en enregistrant des courbes de force.

Sur une surface dure (mica nu dans notre cas) le déplacement de 1 nm de la surface provoque un déplacement vertical de la pointe de 1 nm qui se traduit par une déflexion que l'on peut calibrer. La sensibilité en nm/V peut ainsi être mesurée.

### 3. Forces en milieu liquide

La nature de l'environnement pointe-surface de l'échantillon (gaz, liquide, vide) peut altérer significativement les informations (topographie, propriétés mécaniques...) car les forces à prendre en compte sont différentes.

En milieu liquide, les forces agissant sur le système « pointe-échantillon » sont majoritairement de deux types : les forces attractives de van der Waals et les forces répulsives de la couche électrostatique dues à la présence d'ions. Ces forces sont décrites par la théorie DLVO qui repose sur l'approximation que le potentiel d'interaction entre deux surfaces est donné par la somme des contributions répulsives et attractives qui agissent sur ce système (ici l'ensemble pointe-échantillon). Ainsi, en milieu liquide, les anomalies de hauteur proviennent non pas des déformations mécaniques du matériau mais de la présence d'interactions électrostatiques entre la pointe et l'échantillon. Pour éviter ces problèmes, il est préférable de travailler dans un milieu aux conditions contrôlées (en particulier la force ionique).

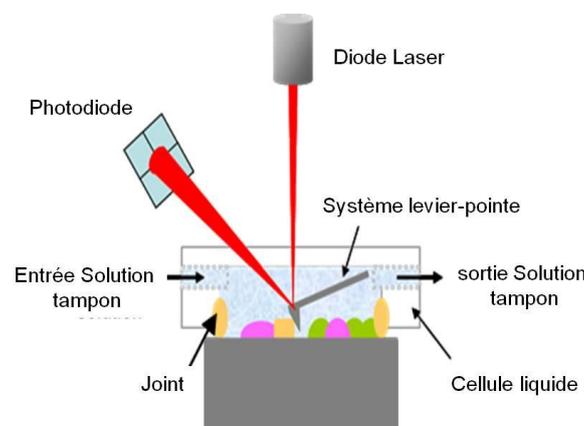


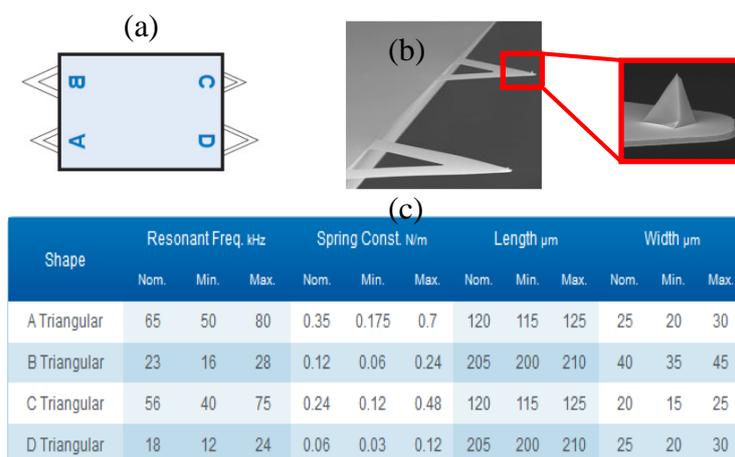
Figure-annexes 3. Schéma du montage de l'AFM en milieu liquide.

Dans le cadre de notre étude, les expériences d'AFM sont réalisées à l'air pour les monocouches et en milieu liquide (tampon Tris-NaCl) pour les bicouches. Dans ce dernier cas l'utilisation d'une solution tampon permet d'écranter les forces électrostatiques. Le dispositif utilisé pour réaliser les expériences AFM en milieu liquide est présenté sur la Figure-annexes 3. Le montage AFM au sens strict du terme est similaire à celui permettant des mesures à l'air. La différence réside dans la présence d'une cellule et d'un système de circulation de liquide.

#### 4. Microleviers AFM utilisés

Pour nos expériences en AFM, différents leviers avec différentes caractéristiques (forme de la pointe en particulier) ont été utilisés :

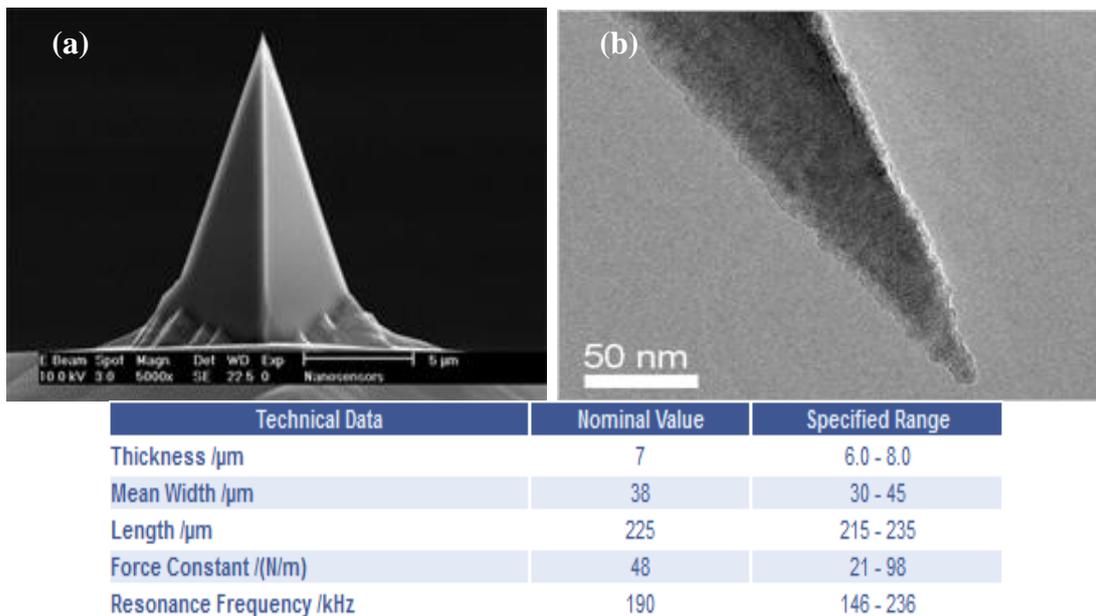
- Des levier SNL de chez Veeco en nitrure de silicium portant 4 pointes triangulaires A, B, C et D de fréquences de résonance différentes et de faibles constantes de raideur leur procurant une sensibilité élevée (Figure annexes 4). Ils permettent également le contrôle de la force sur n'importe quel échantillon et sur n'importe quel support.



**Figure-annexes 4.** Représentation schématique d'un levier SNL (a). Image MEB d'un levier SNL et zoom sur la pointe (b). Tableau présentant les caractéristiques de chaque pointe (c). Toutes les informations présentées sur cette figure proviennent du site <http://www.brukerafmprobes.com/>.

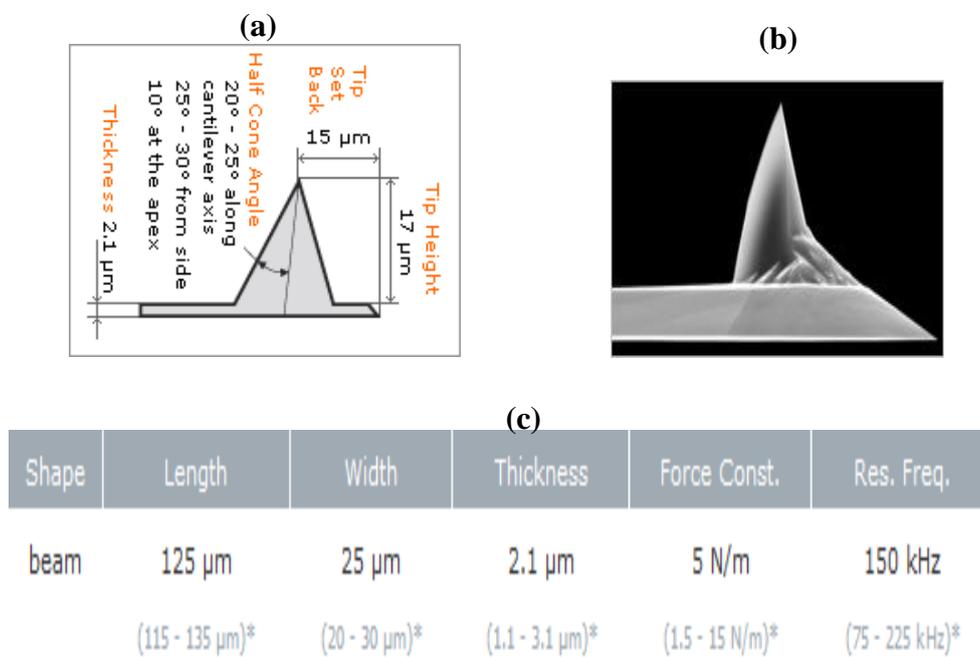
Pour les expériences de grattage à l'air et les expériences en milieu liquide sur les bicouches, nous avons utilisé les pointes A et B de constantes de raideur de 0,35 N/m et 0,12 N/m respectivement.

- Des leviers PPP-NCL achetés chez NanoAndMore, qui combinent la stabilité de fonctionnement, une sensibilité exceptionnelle et la capacité de scanner la surface rapidement (Figure-annexes 5).



**Figure-annexes 5** Images en microscopie à balayage d'une pointe PPP-NCL (a). Tableau présentant les caractéristiques des leviers NCL (b). Toutes les informations présentées sur cette figure proviennent du site <http://www.brukerafmprobes.com/>.

- Des leviers TAP pour les mesures en mode dynamique. Les caractéristiques de ces leviers sont données dans la Figure annexes 6.



**Figure-annexes 6**. Représentation schématique d'un levier TAP (a). Image MEB d'un levier SNL(b).Tableau regroupant les caractéristiques de ce levier (c).Toutes les informations présentées sur cette figure proviennent du site <http://www.brukerafmprobes.com/>.

#### 4.1. Calibration des leviers

Pour chaque nouvelle sonde nous procédons à la calibration de l'expérience. Nous sondons dans un premier temps un substrat de référence considéré comme matériau dur (mica ou  $\text{SiO}_2$ ). Nous réalisons une courbe de force et fixons (via le logiciel) la pente  $p$  à 1. Cette opération permet de convertir le signal électrique des photodiodes en nanomètres et se base sur le fait que pour un déplacement  $\Delta z$  donné de l'échantillon, le levier subit une déflexion  $\Delta z$ , sans indentation de l'échantillon par la pointe (matériau dur).

Les raideurs associées  $k$  dépendent du type de levier mais aussi du mode propre d'oscillation de ce dernier. Différentes approches de calibration des raideurs ont été documentées dans la littérature, thermodynamiques, hydrodynamiques, voire numériques [205-211]. Dans le cadre de notre étude, la raideur  $k$  de chaque levier est déduite préalablement à partir de la mesure du bruit thermique [212]. Cette dernière approche permet en effet la détermination de  $k$  en mesurant les effets de l'agitation thermique sur le levier.

Une fois la sonde calibrée, nous procédons aux différentes analyses (topographiques ou autres) du substrat de référence selon le protocole établi. Ensuite, l'échantillon à étudier est positionné et, comme pour la référence, les courbes de force sont enregistrées. Fournissant des informations sur la raideur effective de l'échantillon ainsi que sur son énergie de surface  $W$  à partir de la mesure de force, ces courbes permettent aussi de fixer le point de fonctionnement de l'expérience. En particulier, elles déterminent la force imposée au niveau du contact avec laquelle les images topographiques et/ou mécaniques seront effectuées. La force imposée est déduite à partir de la loi de Hooke.

#### 4.2. L'usure de la pointe

Lors du balayage de la surface par la pointe, il se peut que la pointe subisse des modifications physiques liées à différents mécanismes d'usure impactant les paramètres de taille et de forme de la pointe. Trois mécanismes sont ainsi identifiés [209] : le premier mécanisme est lié à l'abrasion de la pointe. Par exemple, dans le cas des surfaces dures présentant des protubérances, le balayage répété de cette surface peut entraîner des cassures ou des défauts au niveau de la pointe.

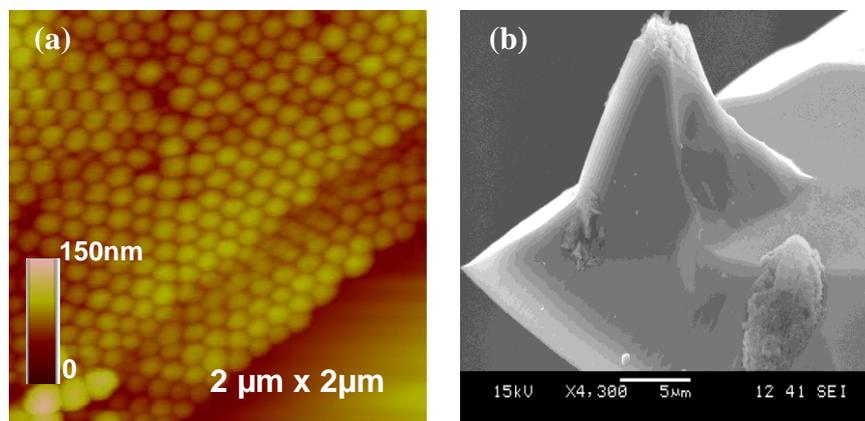
Le deuxième mécanisme, appelé usure de fatigue, est un processus qui peut aussi conduire à des dommages ou à des ruptures au niveau de la pointe au cours du balayage. Il désigne une évolution locale et progressive mais irréversible des caractéristiques mécaniques de la pointe

soumise à des contraintes et des déformations variables et répétées. Cette fatigue, dite de contact, est superficielle car elle s'initie à la surface ou à une faible profondeur de la pointe.

Enfin, on peut également évoquer l'usure par adhésion qui, quant à elle, a l'effet inverse sur la taille de la pointe, puisqu'on note une augmentation du rayon de courbure de la pointe au cours du balayage. Ceci s'explique par le dépôt de matière arrachée à l'échantillon lors du balayage ou lors de l'engagement de la pointe. Ce dernier mécanisme est souvent constaté lors de l'étude de surfaces molles.

### 4.3. Artéfacts

La géométrie de la pointe peut également avoir un impact sur la résolution spatiale des images enregistrées. Ces effets sont appelés artéfacts ou dilatations. La détermination de la taille d'un objet en AFM dépend non seulement de la forme et de la taille de la pointe mais également de la topographie environnante. Un exemple illustrant l'évolution de la pointe est présenté sur la Figure-annexes 7. Comme on peut le constater, les structures visibles sur l'image AFM semblent dédoublées. L'observation par MEB de la pointe montre, elle, une cassure à son extrémité, d'où ce phénomène de dédoublement observé sur l'image AFM.

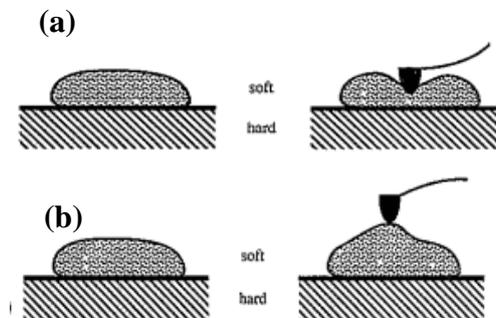


**Figure-annexes 7.** Image AFM de NPs de silice de 100 nm de diamètre déposées sur une surface de mica (a). Image obtenue en MEB de la pointe AFM ayant servi à réaliser l'image précédente (b).

Enfin, lors du balayage de surfaces molles, comme les matériaux biologiques déposés sur un substrat dur, il se peut que la pointe entraîne des déformations mécaniques, en fonction de l'intensité de la force appliquée (Figure-annexes 8). A l'air ces déformations peuvent avoir deux conséquences opposées:

- la pointe indente le matériau jusqu'à sa déformation. Ceci peut induire une sous-estimation de la hauteur apparente mesurée ;

- s'il existe une forte adhésion entre la pointe et l'échantillon, il peut arriver que le matériau soit étiré par la pointe entraînant cette fois-ci une surestimation de l'épaisseur apparente.



**Figure-annexes 8.** Schéma des déformations de matériaux mous causées par la pointe AFM. (a) déformation induisant une sous-estimation de la hauteur apparente par indentation ; (b) déformation liée à l'étirement du matériau [209].

Ceci met en évidence la nécessité de calibrer la pointe avant chaque utilisation. Dans notre cas, l'état des pointes utilisées est vérifié systématiquement en déterminant la fréquence de résonance du levier et en calibrant la pointe sur une surface de référence (surface de mica nu fraîchement clivée).

## 5. Commandes du contrôleur PID<sup>35</sup>

Il existe trois commandes sur l'interface utilisateur pour actionner le contrôleur PID. On peut jouer sur :

- le gain proportionnel,  $G_p$ , qui est proportionnel à l'erreur. Il permet de faire réagir le système plus rapidement, en faisant croire à ce dernier que l'erreur est plus importante qu'elle ne l'est réellement (si  $G_p > 1$  bien entendu). Plus la valeur de ce gain est grande, plus la réponse du système l'est aussi. Cependant, si l'on augmente trop fortement la valeur de  $G_p$ , le système perd en stabilité car il aura alors tendance à réagir excessivement à chaque fois que l'erreur est non nulle ;

- le gain intégral,  $G_I$ , qui est quant à lui souvent qualifié d'effet « mémoire » car l'idée sous-jacente est de faire prendre en compte au système une partie des erreurs passées. Ce gain fait intervenir la notion de temps car en l'augmentant le signal d'erreur diminue avec le temps

<sup>35</sup> Le contrôleur PID est un contrôleur proportionnel, intégral et différentiel qui permet d'effectuer une régulation en boucle fermée d'une grandeur physique d'un système.

si on a un fort dépassement de la valeur de consigne (déflexion en mode contact et amplitude en mode « tapping »);

- le gain différentiel,  $G_D$  qui est proportionnel à la dérivée de l'erreur. En l'augmentant le temps de réponse est plus court.

En règle générale, pour des gains trop forts les images sont bruitées et pour des gains faibles, elles ne sont pas assez résolues.

## 6. Traitement des images AFM

Les images sont enregistrées sans traitement. Puis, les logiciels Nanoscope 7.3, Gwiddion, et Nanoscope Analysis sont utilisés pour les traiter. Deux types de filtres sont utilisés pour le traitement de nos images : le « *flatten* » et le « *plane-fit* ».

**La commande « *flatten* »** est un filtre qui permet d'éliminer le bruit de basse fréquence et d'enlever l'effet éventuel d'inclinaison à partir d'une image. En effet, l'existence d'impuretés en surface peut provoquer un saut de la pointe ou un décalage suivant  $z$  de la ligne à scanner par rapport à ses voisines. Le filtre « *flatten* » élimine ces discontinuités en soustrayant la courbe des moindres carrés d'ordres 0 à 3 au signal enregistré sur la ligne. A noter que toutes les sections présentées dans cette thèse sont réalisées sur des images non traitées et que des ajustements de pente ont été nécessaires pour certaines d'entre elles.

**La commande « *plane-fit* »** est un traitement d'image permettant de soustraire les défauts de forme d'ordre  $n$ , en calculant l'écart d'altitude entre la surface réelle et la surface des moindres carrés d'ordre  $n$ . En pratique, l'ordre  $n$  du *Plan fit* varie entre 0 et 3. L'ordre 0 correspond juste à un décalage de l'origine. L'ordre 1 permet de soustraire le défaut d'inclinaison. Les ordres 2 et 3 permettent de soustraire les défauts d'ondulation d'ordre 2 et 3.

## Références Bibliographiques

1. Buzea, C., Pacheco, II, and K. Robbie, *Nanomaterials and nanoparticles: sources and toxicity*. Biointerphases, 2007. **2**(4): p. Mr17-71.
2. Simate, G.S., et al., *The production of carbon nanotubes from carbon dioxide: challenges and opportunities*. Journal of Natural Gas Chemistry, 2010. **19**(5): p. 453-460.
3. Lanone, S. and J. Boczkowski, *Les sources de nanoparticules*. Revue Française d'Allergologie, 2010. **50**(3): p. 211-213.
4. J.L.Lorrain, D.Raoul. *Nanosciences et progrès médical*. 2004; 1-300]. Available from: [http://www.assemblee-nationale.fr/12/rap-off/i1588.asp#P523\\_54103](http://www.assemblee-nationale.fr/12/rap-off/i1588.asp#P523_54103).
5. Colvin, V.L., *The potential environmental impact of engineered nanomaterials*. Nat Biotechnol, 2003. **21**(10): p. 1166-70.
6. Lewinski, N., V. Colvin, and R. Drezek, *Cytotoxicity of Nanoparticles*. Small, 2008. **4**(1): p. 26-49.
7. Maynard, A.D., et al., *Safe handling of nanotechnology*. Nature, 2006. **444**(7117): p. 267-9.
8. Hoet, P., I. Bruske-Hohlfeld, and O. Salata, *Nanoparticles - known and unknown health risks*. Journal of Nanobiotechnology, 2004. **2**(1): p. 12.
9. Nel, A., et al., *Toxic potential of materials at the nanolevel*. Science, 2006. **311**(5761): p. 622-7.
10. Huang, Y. and A.J. Ghio, *Controlled human exposures to ambient pollutant particles in susceptible populations*. Environ health, 2009. **8**: p. 33.
11. Ghio, A.J., et al., *Case report: supraventricular arrhythmia after exposure to concentrated ambient air pollution particles*. Environ Health Perspect, 2012. **120**(2): p. 275-7.
12. Beelen, R., et al., *Long-term exposure to traffic-related air pollution and lung cancer risk*. Epidemiology, 2008. **19**(5): p. 702-10.
13. de Hartog, J.J., et al., *Effects of Fine and Ultrafine Particles on Cardiorespiratory Symptoms in Elderly Subjects with Coronary Heart Disease: The ULTRA Study*. American Journal of Epidemiology, 2003. **157**(7): p. 613-623.
14. Hoek, G., et al., *The association between air pollution and heart failure, arrhythmia, embolism, thrombosis, and other cardiovascular causes of death in a time series study*. Epidemiology, 2001. **12**(3): p. 355-7.
15. Engelman, D.M., *Membranes are more mosaic than fluid*. Nature, 2005. **438**(7068): p. 578-580.
16. Singer, S.J. and G.L. Nicolson, *The Fluid Mosaic Model of the Structure of Cell Membranes*. Science, 1972. **175**(4023): p. 720-731.
17. Brown, D.A. and E. London, *Functions of lipid rafts in biological membranes*. Annual Review of Cell and Developmental Biology, 1998. **14**(1): p. 111-136.
18. Brown, D.A. and J.K. Rose, *Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface*. Cell, 1992. **68**(3): p. 533-544.
19. Simons, K. and W.L.C. Vaz, *Model systems, lipid rafts and cell membranes 1*. Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure, 2004. **33**(1): p. 269-295.
20. Stier, A. and E. Sackmann, *Spin labels as enzyme substrates Heterogeneous lipid distribution in liver microsomal membranes*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, 1973. **311**(3): p. 400-408.
21. Brown, D.A. and E. London, *Structure and Origin of Ordered Lipid Domains in Biological Membranes*. The Journal of Membrane Biology, 1998. **164**(2): p. 103-114.
22. Simons, K. and D. Toomre, *Lipid rafts and signal transduction*. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2000. **1**(1): p. 31-39.

23. Karp, G., J. Bouharmont, and J.C. Wissocq, *Biologie cellulaire et moléculaire*. 2004: De Boeck.
24. Alberts, B., *L'essentiel de la biologie cellulaire*. 2005: Médecine Sciences Publications.
25. Berde, C.B., H.C. Andersen, and B.S. Hudson, *A theory of the effects of head-group structure and chain unsaturation on the chain melting transition of phospholipid dispersions*. *Biochemistry*, 1980. **19**(18): p. 4279-4293.
26. Cevc, G., *How membrane chain-melting phase-transition temperature is affected by the lipid chain asymmetry and degree of unsaturation: an effective chain-length model*. *Biochemistry*, 1991. **30**(29): p. 7186-7193.
27. Fantini, J., et al., *Lipid rafts: structure, function and role in HIV, Alzheimer's and prion diseases*. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 2002. **4**(27): p. 1-22.
28. Barenholz, Y. and T.E. Thompson, *Sphingomyelin: biophysical aspects*. *Chem Phys Lipids*, 1999. **102**(1-2): p. 29-34.
29. Israelachvili, J.N., *Intermolecular and Surface Forces*, Academic Press, New York, 1991.
30. Cullis, P.R. and B. de Kruijff, *Lipid polymorphism and the functional roles of lipids in biological membranes*. *Biochim Biophys Acta*, 1979. **559**(4): p. 399-420.
31. Seu, K.J., et al., *Influence of Lipid Chemistry on Membrane Fluidity: Tail and Headgroup Interactions*. *Biophysical Journal*, 2006. **91**(10): p. 3727-3735.
32. Crane, J.M. and L.K. Tamm, *Role of Cholesterol in the Formation and Nature of Lipid Rafts in Planar and Spherical Model Membranes*. *Biophysical Journal*, 2004. **86**(5): p. 2965-2979.
33. Axelrod, D., et al., *Mobility measurement by analysis of fluorescence photobleaching recovery kinetics*. *Biophysical journal*, 1976. **16**(9): p. 1055-1069.
34. Veatch, S.L., et al., *Fluorescent Probes Alter Miscibility Phase Boundaries in Ternary Vesicles*. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2007. **111**(3): p. 502-504.
35. Orädd, G., G. Lindblom, and P.W. Westerman, *Lateral Diffusion of Cholesterol and Dimyristoylphosphatidylcholine in a Lipid Bilayer Measured by Pulsed Field Gradient NMR Spectroscopy*. *Biophysical Journal*, 2002. **83**(5): p. 2702-2704.
36. Kahya, N. and P. Schwille, *How Phospholipid-Cholesterol Interactions Modulate Lipid Lateral Diffusion, as Revealed by Fluorescence Correlation Spectroscopy*. *Journal of Fluorescence*, 2006. **16**(5): p. 671-678.
37. Macháň, R. and M. Hof, *Recent Developments in Fluorescence Correlation Spectroscopy for Diffusion Measurements in Planar Lipid Membranes*. *International Journal of Molecular Sciences*, 2010. **11**(2): p. 427-457.
38. Webb, W.W., *Applications of Fluorescence Correlation Spectroscopy*. *Quarterly Reviews of Biophysics*, 1976. **9**(01): p. 49-68.
39. Kumar, A. and C.M. Gupta, *Transbilayer distributions of red cell membrane phospholipids in unilamellar vesicles*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1984. **769**(2): p. 419-428.
40. Haest, C.W.M. and B. Deuticke, *Possible relationship between membrane proteins and phospholipid asymmetry in the human erythrocyte membrane*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1976. **436**(2): p. 353-365.
41. McConnell, H.M. and R.D. Kornberg, *Inside-outside transitions of phospholipids in vesicle membranes*. *Biochemistry*, 1971. **10**(7): p. 1111-1120.
42. Devaux, P.F., *Phospholipid flippases*. *FEBS Letters*, 1988. **234**(1): p. 8-12.
43. Sackmann, E., *Supported membranes: scientific and practical applications*. *Science*, 1996. **271**(5245): p. 43-8.
44. Bangham, A.D., M.M. Standish, and J.C. Watkins, *Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids*. *J Mol Biol*, 1965. **13**(1): p. 238-52.

45. Lorin, A., C. Flore, and A. Thomas, *Les liposomes: description, fabrication et applications*. Biotechnol. Agron. Soc., 2004. **8**(3): p. 163-176.
46. Mui, B., L. Chow, and M.J. Hope, *Extrusion Technique to Generate Liposomes of Defined Size*, in *Methods in Enzymology*, D. Nejat, Editor. 2003, Academic Press. p. 3-14.
47. Langmuir, I., *The constitution and fundamental properties of solids and liquids*. Journal of the American Chemical Society, 1917. **39**(9): p. 1848-1906.
48. Mingeot-Leclercq, M.-P., et al., *Atomic force microscopy of supported lipid bilayers*. Nat. Protocols, 2008. **3**(10): p. 1654-1659.
49. Richter, R.P., R. Bérat, and A.R. Brisson, *Formation of Solid-Supported Lipid Bilayers: An Integrated View*. Langmuir, 2006. **22**(8): p. 3497-3505.
50. Hamai, C., et al., *Effect of Average Phospholipid Curvature on Supported Bilayer Formation on Glass by Vesicle Fusion*. Biophysical journal, 2006. **90**(4): p. 1241-1248.
51. Reimhult, E., F. Höök, and B. Kasemo, *Intact Vesicle Adsorption and Supported Biomembrane Formation from Vesicles in Solution: Influence of Surface Chemistry, Vesicle Size, Temperature, and Osmotic Pressure†*. Langmuir, 2002. **19**(5): p. 1681-1691.
52. Seantier, B. and B. Kasemo, *Influence of mono- and divalent ions on the formation of supported phospholipid bilayers via vesicle adsorption*. Langmuir, 2009. **25**(10): p. 5767-72.
53. Scomparin, C., et al., *Diffusion in supported lipid bilayers: influence of substrate and preparation technique on the internal dynamics*. Eur Phys J E Soft Matter, 2009. **28**(2): p. 211-20.
54. Wang, T., et al., *Cellular uptake of nanoparticles by membrane penetration: a study combining confocal microscopy with FTIR spectroelectrochemistry*. ACS Nano, 2012. **6**(2): p. 1251-9.
55. AshaRani, P.V., et al., *Cytotoxicity and Genotoxicity of Silver Nanoparticles in Human Cells*. ACS Nano, 2008. **3**(2): p. 279-290.
56. Nel, A., et al., *Toxic Potential of Materials at the Nanolevel*. Science, 2006. **311**(5761): p. 622-627.
57. Hillaireau, H. and P. Couvreur, *Nanocarriers' entry into the cell: relevance to drug delivery*. Cellular and Molecular Life Sciences, 2009. **66**(17): p. 2873-2896.
58. Iversen, T.-G., T. Skotland, and K. Sandvig, *Endocytosis and intracellular transport of nanoparticles: Present knowledge and need for future studies*. Nano Today, 2011. **6**(2): p. 176-185.
59. Kumari, A. and S.K. Yadav, *Cellular interactions of therapeutically delivered nanoparticles*. Expert Opinion on Drug Delivery, 2011. **8**(2): p. 141-151.
60. Slowing, I., B.G. Trewyn, and V.S.Y. Lin, *Effect of Surface Functionalization of MCM-41-Type Mesoporous Silica Nanoparticles on the Endocytosis by Human Cancer Cells*. Journal of the American Chemical Society, 2006. **128**(46): p. 14792-14793.
61. Jiang, W., et al., *Nanoparticle-mediated cellular response is size-dependent*. Nat Nanotechnol, 2008. **3**(3): p. 145-50.
62. Jin, H., et al., *Size-dependent cellular uptake and expulsion of single-walled carbon nanotubes: single particle tracking and a generic uptake model for nanoparticles*. ACS Nano, 2009. **3**(1): p. 149-58.
63. Arvizo, R.R., et al., *Probing novel roles of the mitochondrial uniporter in ovarian cancer cells using nanoparticles*. J. Biol. Chem., 2013. **288**: p. 17610-18.
64. Linseisen, F.M., et al., *Differences in the physical properties of lipid monolayers and bilayers on a spherical solid support*. Biophys. J., 1997. **72**: p. 1659-1667.

65. Ahmed, S., and S.L. Wunder, *Effect of high surface curvature on the main phase transition of supported phospholipid bilayers on SiO<sub>2</sub> nanoparticles*. Langmuir, 2009. **25**: 3682-3691.
66. Mornet, S., et al., *The formation of supported lipid bilayers on silica nanoparticles revealed by cryoelectron microscopy*. NanoLetters, 2005. **5**(2): p. 281-285.
67. Savarala, S., et al., *Formation and colloidal stability of DMPC supported lipid bilayers on SiO<sub>2</sub> nanobeads*. Langmuir, 2010. **26**(14): p. 12081-12088.
68. Wang, B. et al., *Nanoparticle-induced surface reconstruction of phospholipid membranes*. PNAS, 2008. **105**(47): p. 18171-18175.
69. Goertz, M.P., et al., *Substrate effects on interactions of lipid bilayer assemblies with bound nanoparticles*. J. Coll. Inter. Sc., 2011. **358**: p. 635-638.
70. Zhang, X., and S. Yang, *Nonspecific adsorption of charged quantum dots on supported zwitterionic lipid bilayers: real-time monitoring by quartz crystal microbalance with dissipation*. Langmuir, 2011. **27**: p. 2528-2535.
71. Dif, A., et al., *Interaction between water-soluble peptidic CdSe/ZnS nanocrystals and membranes: formation of hybrid vesicles and condensed lamellar phases*. J. Am. Chem. Soc., 2008. **130**: 8289-8296.
72. Le Bihan, O., et al., *Cryo-electron tomography of nanoparticle transmigration into liposome*. J. Struct. Biol., 2009. **168** : p. 419-425.
73. Parthasarathy, R., et al., *Curvature-modulated phase separation in lipid bilayer membranes*. Langmuir, 2006. **22** : p. 5095-5099.
74. Lee, S.-W., et al., *Nondisruptive micropatterning of fluid membranes through selective vesicular adsorption and rupture by nanotopography*. Langmuir, 2009. **25**(10): p. 5421-5425.
75. Werner, J.H., et al., *Formation and dynamics of supported phospholipid membranes on a periodic nanotextured substrate*. Langmuir, 2009. **25**: p. 2986-2993.
76. Roiter, Y., et al., *Interaction of Nanoparticles with Lipid Membrane*. Nano Letters, 2008. **8**(3): p. 941-944.
77. Leroueil, P.R., et al., *Nanoparticles interactions with biological membranes: does nanotechnology present a Janus face ?* Accounts for Chemical Research, 2007. **40**(5) : p.335-342.
78. Leroueil, P.R., et al., *Wide varieties of cationic nanoparticles induce defects in supported lipid bilayers*. NanoLetters, 2008. **8**(2): p. 420-424.
79. Tanaka, M., and E. Sackman, *Polymer-supported membranes as models of the cell surface*. Nature, 2005. **437**: p. 656-663.
80. Garg, S., et al., *Domain registration in raft-mimicking lipid mixtures studied using polymer-tethered lipid bilayers*. Biophys. J., 2007. **92**(4): p. 1263-1270.
81. Parikh, A.N., *Membrane-substrate interface : phospholipid bilayers at chemically and topographically structured surfaces*. Biointerphases, 2007. **3**(2): p. FA22-32.
82. Harishandra, R.H., et al., *Nanoparticle interaction with model lung surfactant monolayers*. J. R. Soc. Interface, 2010. **7**: p. S15-S26.
83. Guzman, E., et al., *Effect of hydrophilic and hydrophobic nanoparticles on the surface pressure response of DPPC monolayers*. J. Phys. Chem. C, 2011. **115**: p. 21715-21722.
84. Guzman, E., et al., *DPPC-DOPC Langmuir monolayers modified by hydrophilic silica nanoparticles: phase behaviour, structure and rheology*. Coll. Surf. A., 2012. **413**: p. 174-183.
85. Guzman, E., et al., *Influence of silica nanoparticles on phase behavior and structural properties of DPPC-palmitic acid Langmuir monolayers*. Coll. Surf. A., 2012. **413**: p. 280-287.

86. Guzman, E., et al., *Mixed DPPC-cholesterol Langmuir monolayers in presence of hydrophilic silica nanoparticles*. Coll. Surf. B., 2013. **105**: p. 284-293.
87. Wang, Z., et al., *Studies of dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) monolayers embedded with endohedral metallofullerene (Dy@C<sub>82</sub>)*. Langmuir, 2009. **25**(22): p. 12968-12973.
88. Smith, K., et al., *Designing synthetic vesicles that engulf nanoscopic particles*. J. Chem. Phys., 2007. **127**: p. 084703-1-10.
89. Monticelli, L., et al., *Effects of carbon nanoparticles on lipid membranes: a molecular simulation perspective*. Soft Matter, 2009. **5**: p. 4433-4445.
90. Choe, S., et al., *Molecular dynamics simulation study of a pulmonary surfactant film interacting with a carbonaceous nanoparticle*. Biophys. J., 2008. **95**: p. 4102-4114.
91. Deserno, M., and W. Gelbart, *Adhesion and wrapping in colloid-vesicle complexes*. J. Phys. Chem. B, 2002. **106**: p. 5543-5552.
92. Deserno, M., and T. Bickel, *Wrapping a spherical colloid by a fluid membrane*. Europhys. Lett., 2003. **62**(5): p. 767-773.
93. Livadaru, L., and A. Kovalenko, *Fundamental mechanism of translocation across liquidlike membranes: towards control over nanoparticle behavior*. Nano Letters, 2006. **6**(1): p. 78-83.
94. Fleck, C.C., and R.R. Netz, *Electrostatic colloid-membrane binding*. Europhysics Letters, 2004. **67**(2): p. 314-320.
95. Ginzburg, V.V. and S. Balijepalli, *Modeling the thermodynamics of the interaction of nanoparticles with cell membranes*. NanoLetters, 2007. **7**(12): p. 3716-22.
96. Li, Y., et al., *Coputational investigation of interaction between nanoparticles and membranes : hydrophobic/hydrophilic effect*. J. Phys. Chem. B, 2008. **112**: p. 16647-16653.
97. Qiao, R., et al., *Translocation of C<sub>60</sub> and its derivatives across a lipid bilayers*. Nano Letters, 2007. **7**: p. 614-619.
98. Höfinger, S., et al., *A computational analysis of the insertion of carbon nanotubes into cellular membranes*. Biomaterials, 2011. **32**: p. 7079-7085.
99. Ting, C.L., and Z.-G. Wang, *Interactions of a charged nanoparticle with a lipid membrane : implications for gene delivery*. Biophys. J., 2011. **100**: p. 1288-1297.
100. Liu, B. et al., *Carbon nanotube based artificial water channel protein: membrane perturbation and water transportation*. Nano Letters, 2009. **9**: p. 1386-1394.
101. Chaudhuri, A., et al., *The effect of interactions on the cellular uptake of nanoparticles*. Phys. Biol. , 2011. **8**: p. 1-9.
102. Slotte, J.P. and P. Mattjus, *Visualization of lateral phases in cholesterol and phosphatidylcholine monolayers at the air/water interface-a comparative study with two different reporter molecules*. Biochim Biophys Acta, 1995. **1254**(1): p. 22-9.
103. Davis, P.J., et al., *Gel to liquid-crystalline transition temperatures of water dispersions of two pairs of positional isomers of unsaturated mixed-acid phosphatidylcholines*. Biochemistry, 1981. **20**(12): p. 3633-6.
104. Tada, K., et al., *Barotropic and thermotropic bilayer phase behavior of positional isomers of unsaturated mixed-chain phosphatidylcholines*. Biochim Biophys Acta, 2009. **1788**(5): p. 1056-63.
105. Koynova, R. and M. Caffrey, *Phases and phase transitions of the phosphatidylcholines*. Biochim Biophys Acta, 1998. **1376**(1): p. 91-145.
106. Tamm, L.K. and H.M. McConnell, *Supported phospholipid bilayers*. Biophysical Journal, 1985. **47**(1): p. 105-113.
107. Ramstedt, B. and J.P. Slotte, *Interaction of Cholesterol with Sphingomyelins and Acyl-Chain-Matched Phosphatidylcholines: A Comparative Study of the Effect of the Chain Length*. Biophysical Journal, 1999. **76**(2): p. 908-915.

108. Sripada, P., et al., *Partial synthesis and properties of a series of N-acyl sphingomyelins*. Journal of lipid research, 1987. **28**(6): p. 710-718.
109. Epand, R.M., and R.F. Epand, *Studies of thermotropic phospholipid phase transitions using scanning densitometry*. Chem. Phys. Lipids, 1980. **27**(2): p. 139-150.
110. Bangham, A.D., M.M. Standish, and J.C. Watkins, *Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids*. Journal of Molecular Biology, 1965. **13**(1): p. 238-IN27.
111. de Araújo Lopes, S.C., et al., *Liposomes as Carriers of Anticancer Drugs*. 2013.
112. Lhert, F., *Étude par microspectroscopie Raman de l'interaction lipide/peptide dans les films noirs de phospholipides*. 2002: p. 202. Thèse de l'université Bordeaux 1.
113. Binnig, G., C.F. Quate, and C. Gerber, *Atomic Force Microscope*. Physical Review Letters, 1986. **56**(9): p. 930-933.
114. Rugar, D. and P. Hansma, *Atomic Force Microscopy*. Physics Today, 1990. **43**(10): p. 23-30.
115. Bouhacina, T., S. Kopp-Marsaudon, and P. Aime J, *Evolution des microscopies à sonde locale, domaines d'applications*. Spectra 2000 analyse, 1998. **27**(203): p. 11-20.
116. Pawlizak, S., *thesis: Mechanosensitive behavior of neuronal growth cones*. 2009.
117. Détrez, F., *Nanomécanismes de déformation des polymères semi-cristallins étude in situ par microscopie à force atomique et modélisation*, ed. R. Séguéla and t. Université Lille 1 - Sciences et. 2008, [S.l.]: [s.n.]. 1 vol. (non paginé [ix]-[154] p.).
118. Israelachvili, J.N., *Chapter 13 - Van der Waals Forces between Particles and Surfaces*, in *Intermolecular and Surface Forces (Third Edition)*, J.N. Israelachvili, Editor. 2011, Academic Press: San Diego. p. 253-289.
119. Hamaker, H., *The London—van der Waals attraction between spherical particles*. physica, 1937. **4**(10): p. 1058-1072.
120. Odin, C., et al., *Tip's finite size effects on atomic force microscopy in the contact mode: simple geometrical considerations for rapid estimation of apex radius and tip angle based on the study of polystyrene latex balls*. Surface Science, 1994. **317**(3): p. 321-340.
121. Boisset, M.-C. and C. Frétiigny, *Monocouches de billes de latex ou de silice : utilisation pour la calibration et pour le contrôle des pointes en AFM*. Microsc. Microanal. Microstruct., 1994. **5**(1): p. 71-77.
122. Berman, A., C. Drummond, and J. Israelachvili, *Amontons' law at the molecular level*. Tribology Letters, 1998. **4**(2): p. 95-101.
123. Bouhacina, T., et al., *Tribological behavior of a polymer grafted on silanized silica probed with a nanotip*. Physical Review B, 1997. **56**(12): p. 7694-7703.
124. Simon, A., et al., *Characterization of dynamic cellular adhesion of osteoblasts using atomic force microscopy*. Cytometry Part A, 2003. **54A**(1): p. 36-47.
125. Overney, R. and E. Meyer, *Tribological Investigations Using Friction Force Microscopy*. MRS Bulletin, 1993. **18**(05): p. 26-34.
126. Garcia-Manyes, S., et al., *Atomic force microscopy and force spectroscopy study of Langmuir–Blodgett films formed by heteroacid phospholipids of biological interest*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, 2007. **1768**(5): p. 1190-1198.
127. Kumar, S. and J.H. Hoh, *Direct Visualization of Vesicle–Bilayer Complexes by Atomic Force Microscopy*. Langmuir, 2000. **16**(25): p. 9936-9940.
128. Zhong, Q., et al., *Fractured polymer/silica fiber surface studied by tapping mode atomic force microscopy*. Surface Science, 1993. **290**(1–2): p. L688-L692.
129. Nony, L., *Analyse de la microscopie de force dynamique : application à l'étude de l'ADN*. 2000. p. 256. Thèse de l'université Bordeaux 1.

130. Aimé, J.P., et al., *Influence of noncontact dissipation in the tapping mode: Attempt to extract quantitative information on the surface properties with the local force probe method*. The Journal of Chemical Physics, 2001. **114**(11): p. 4945-4954.
131. Nony, L., R. Boisgard, and J.P. Aimé, *Nonlinear dynamical properties of an oscillating tip-cantilever system in the tapping mode*. The Journal of Chemical Physics, 1999. **111**(4): p. 1615-1627.
132. García, R. and A. San Paulo, *Attractive and repulsive tip-sample interaction regimes in tapping-mode atomic force microscopy*. Physical Review B, 1999. **60**(7): p. 4961-4967.
133. Sauerbrey, G., *Use of quartz vibration for weighing thin films on a microbalance*. J. Physik, 1959. **155**: p. 206-212.
134. Trau, M., et al., *Electric-field-induced pattern formation in colloidal dispersions*. Nature, 1995. **374**(6521): p. 437-439.
135. Böhmer, *In Situ Observation of 2-Dimensional Clustering during Electrophoretic Deposition*. Langmuir, 1996. **12**(24): p. 5747-5750.
136. Fulda, K.-U. and B. Tieke, *Langmuir films of monodisperse 0.5  $\mu\text{m}$  spherical polymer particles with a hydrophobic core and a hydrophilic shell*. Advanced Materials, 1994. **6**(4): p. 288-290.
137. Denkov, N., et al., *Mechanism of formation of two-dimensional crystals from latex particles on substrates*. Langmuir, 1992. **8**(12): p. 3183-3190.
138. Prasad, G.S., et al., *Effects of mitochondrial respiratory stimulation on membrane lipids and proteins: an electron paramagnetic resonance investigation*. Biochim. Biophys. Acta, 1998. **1372**(2): p. 163-173.
139. Megli, F.M. and K. Sabatini, *Respiration state IV-generated ROS destroy the mitochondrial bilayer packing order in vitro. An EPR study*. FEBS Letters, 2003. **550**(1-3): p. 185-189.
140. Megli, F.M. and K. Sabatini, *Mitochondrial phospholipid bilayer structure is ruined after liver oxidative injury in vivo*. FEBS Letters, 2004. **573**(1-3): p. 68-72.
141. Sabatini, K., et al., *Characterization of two oxidatively modified phospholipids in mixed monolayers with DPPC*. Biophys J, 2006. **90**(12): p. 4488-99.
142. Wong-Ekkabut, J., et al., *Effect of lipid peroxidation on the properties of lipid bilayers: a molecular dynamics study*. Biophys J, 2007. **93**(12): p. 4225-36.
143. Megli, F.M. and L. Russo, *Different oxidized phospholipid molecules unequally affect bilayer packing*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, 2008. **1778**(1): p. 143-152.
144. Megli, F.M., L. Russo, and E. Conte, *Spin labeling EPR studies of the properties of oxidized phospholipid-containing lipid vesicles*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, 2009. **1788**(2): p. 371-379.
145. Khandelia, H. and O.G. Mouritsen, *Lipid Gymnastics: Evidence of Complete Acyl Chain Reversal in Oxidized Phospholipids from Molecular Simulations*. Biophysical journal, 2009. **96**(7): p. 2734-2743.
146. Beranova, L., et al., *Oxidation changes physical properties of phospholipid bilayers: fluorescence spectroscopy and molecular simulations*. Langmuir, 2010. **26**(9): p. 6140-4.
147. Li, X.-M., et al., *Conformation of an endogenous ligand in a membrane bilayer for the macrophage scavenger receptor CD36*. Biochem., 2007. **46**(17): p. 5009-50017.
148. Lai, C.C., et al., *Interactions of monolayers of unsaturated phosphocholine with ozone at the air-water interface*. Langmuir, 1994. **10**(12): p. 4637-4644.
149. Grechishnikova, I.V., et al., *New fluorescent cholesterol analogs as membrane probes*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, 1999. **1420**(1-2): p. 189-202.

150. Davis, P.J., et al., *Gel to liquid-crystalline transition temperatures of water dispersions of two pairs of positional isomers of unsaturated mixed-acyl phosphatidylcholines*. *Biochem.*, 1981. **20**(12): p. 3633-3636.
151. Tada, K., et al., *Barotropic and thermotropic bilayer phase behavior of positional isomers of unsaturated mixed-chain phosphatidylcholines*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 2009. **1788**(5): p. 1056-1063.
152. Gericke, A., et al., *Partially deuterated phospholipids as IR structure probes of conformational order in bulk and monolayer phases*. *Journal of Molecular Structure*, 1996. **379**(1): p. 227-239.
153. Navarre, S., et al., *Structural Characterization of Self-Assembled Monolayers of Organosilanes Chemically Bonded onto Silica Wafers by Dynamical Force Microscopy*. *Langmuir*, 2001. **17**(16): p. 4844-4850.
154. Grossfield, A. and T.B. Woolf, *Interaction of Tryptophan Analogs with POPC Lipid Bilayers Investigated by Molecular Dynamics Calculations*. *Langmuir*, 2001. **18**(1): p. 198-210.
155. Rappolt, M., et al., *Structure and elasticity of phospholipid bilayers in the La phase : A comparison of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine membranes*. *Recent Research Developments in Biophysics*, 2004. **3**: p. 363-394.
156. O'Donnel, V.B., *Mass spectrometry analysis of oxidized phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine*. *Biochim. Biophys. Acta*, 2011. **1811**(11): p. 818-826.
157. Koppaka, V. and P.H. Axelsen, *Accelerated accumulation of amyloid beta proteins on oxidatively damaged lipid membranes*. *Biochemistry*, 2000. **39**(32): p. 10011-6.
158. Jacob, R.F. and R.P. Mason, *Lipid peroxidation induces cholesterol domain formation in model membranes*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(47): p. 39380-7.
159. McLean, L.R. and K.A. Hagaman, *Effect of lipid physical state on the rate of peroxidation of liposomes*. *Free Radic Biol Med*, 1992. **12**(2): p. 113-9.
160. Olzynska, A., et al., *Molecular interpretation of fluorescence solvent relaxation of Patman and 2H NMR experiments in phosphatidylcholine bilayers*. *Chem Phys Lipids*, 2007. **147**(2): p. 69-77.
161. Grauby-Heywang, C., and J.-M. Turlet, *Behavior of GM3 ganglioside in lipid monolayers mimicking rafts or fluid phase in membranes*. *Chem. Phys. Lipids*, 2006. **139**(1): p. 68-76.
162. Lancelot, E. and C. Grauby-Heywang, *Comparison of the interaction of dihydrocholesterol and cholesterol with sphingolipid or phospholipid Langmuir monolayers*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2007. **59**(1): p. 81-86.
163. Yuan, C., et al., *The Size of Lipid Rafts: An Atomic Force Microscopy Study of Ganglioside GM1 Domains in Sphingomyelin/DOPC/Cholesterol Membranes*. *Biophysical Journal*, 2002. **82**(5): p. 2526-2535.
164. Smaby, J.M., H.L. Brockman, and R.E. Brown, *Cholesterol's Interfacial Interactions with Sphingomyelins and-Phosphatidylcholines: Hydrocarbon Chain Structure Determines the Magnitude of Condensation*. *Biochemistry*, 1994. **33**(31): p. 9135-9142.
165. El Kirat, K., S. Morandat, and Y.F. Dufrêne, *Nanoscale analysis of supported lipid bilayers using atomic force microscopy*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 2010. **1798**(4): p. 750-765.
166. Giocondi, M.-C., et al., *Surface topography of membrane domains*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 2010. **1798**(4): p. 703-718.
167. Milhiet, P.E., et al., *Domain Formation in Models of the Renal Brush Border Membrane Outer Leaflet*. *Biophysical Journal*, 2001. **81**(1): p. 547-555.
168. Garcia-Manyes, S., et al., *Nanomechanics of lipid bilayers: heads or tails?* *J Am Chem Soc*, 2010. **132**(37): p. 12874-86.

169. Roiter, Y., et al., *Interaction of Lipid Membrane with Nanostructured Surfaces*. Langmuir, 2009. **25**(11): p. 6287-6299.
170. Kučerka, N., et al., *Structure of Fully Hydrated Fluid Phase DMPC and DLPC Lipid Bilayers Using X-Ray Scattering from Oriented Multilamellar Arrays and from Unilamellar Vesicles*. Biophysical Journal, 2005. **88**(4): p. 2626-2637.
171. Mario, O., M. Julien, and W.E. Jonathan, *Coarse-grain modelling of DMPC and DOPC lipid bilayers*. Journal of Physics: Condensed Matter, 2010. **22**(15): p. 155106.
172. Lund-Katz, S., et al., *Influence of molecular packing and phospholipid type on rates of cholesterol exchange*. Biochemistry, 1988. **27**(9): p. 3416-3423.
173. Kuikka, M., et al., *Membrane Properties of D-erythro-N-acyl Sphingomyelins and Their Corresponding Dihydro Species*. Biophysical Journal, 2001. **80**(5): p. 2327-2337.
174. Shaikh, S.R., et al., *Lipid phase separation in phospholipid bilayers and monolayers modeling the plasma membrane*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, 2001. **1512**(2): p. 317-328.
175. Prenner, E., et al., *Imaging of the domain organization in sphingomyelin and phosphatidylcholine monolayers*. Chemistry and Physics of Lipids, 2007. **145**(2): p. 106-118.
176. Smaby, J.M., et al., *The interfacial elastic packing interactions of galactosylceramides, sphingomyelins, and phosphatidylcholines*. Biophysical Journal, 1996. **70**(2): p. 868-877.
177. Weeraman, C., et al., *A Combined Vibrational Sum Frequency Generation Spectroscopy and Atomic Force Microscopy Study of Sphingomyelin–Cholesterol Monolayers*. Langmuir, 2012. **28**(36): p. 12999-13007.
178. Lalitha, S., et al., *Chirality in Membranes: First Evidence that Enantioselective Interactions Between Cholesterol and Cell Membrane Lipids Can Be a Determinant of Membrane Physical Properties*. Journal of Supramolecular Chemistry, 2001. **1**(2): p. 53-61.
179. Johnston, L.J., *Nanoscale Imaging of Domains in Supported Lipid Membranes*. Langmuir, 2007. **23**(11): p. 5886-5895.
180. Goksu, E.I., et al., *AFM for structure and dynamics of biomembranes*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, 2009. **1788**(1): p. 254-266.
181. Iijima, K., et al., *Observations of the distribution of GM3 in membrane microdomains by atomic force microscopy*. Journal of Colloid and Interface Science, 2009. **337**(2): p. 369-374.
182. Kulma, M., et al., *Sphingomyelin-rich domains are sites of lysenin oligomerization: Implications for raft studies*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, 2010. **1798**(3): p. 471-481.
183. Zhong, J., et al., *The role of calcium ions in the interactions of PrP106-126 amide with model membranes*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2010. **77**(1): p. 40-46.
184. Moraille, P. and A. Badia, *Nanoscale Stripe Patterns in Phospholipid Bilayers Formed by the Langmuir–Blodgett Technique*. Langmuir, 2003. **19**(19): p. 8041-8049.
185. Quinn, P.J. and C. Wolf, *Hydrocarbon chains dominate coupling and phase coexistence in bilayers of natural phosphatidylcholines and sphingomyelins*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, 2009. **1788**(5): p. 1126-1137.
186. Quinn, P.J., *Structure of Sphingomyelin Bilayers and Complexes with Cholesterol Forming Membrane Rafts*. Langmuir, 2013. **29**(30): p. 9447-9456.
187. Welzel, P.B. and H.K. Cammenga, *Equilibrium Penetration of DMPC Monolayers by Sodium Cholate*. Journal of Colloid and Interface Science, 1998. **207**(1): p. 70-77.

188. Gaboriaud, F., et al., *Organization and Structural Properties of Langmuir Films Composed of Conjugated Polydiacetylene and Phospholipids*. Langmuir, 2001. **17**(12): p. 3651-3657.
189. Grainger, D.W., et al., *Hydrolytic action of phospholipase A<sub>2</sub> in monolayers in the phase transition region: direct observation of enzyme domain formation using fluorescence microscopy*. Biochim. Biophys. Acta, 1990. **1023**: p. 365-379.
190. Moraille, P. and A. Badia, *Highly Parallel, Nanoscale Stripe Morphology in Mixed Phospholipid Monolayers Formed by Langmuir-Blodgett Transfer*. Langmuir, 2002. **18**(11): p. 4414-4419.
191. Enders, O., et al., *Structural Calorimetry of Main Transition of Supported DMPC Bilayers by Temperature-Controlled AFM*. Biophysical Journal, 2004. **87**(4): p. 2522-2531.
192. Oncins, G., S. Garcia-Manyes, and F. Sanz, *Study of Frictional Properties of a Phospholipid Bilayer in a Liquid Environment with Lateral Force Microscopy as a Function of NaCl Concentration*. Langmuir, 2005. **21**(16): p. 7373-7379.
193. Bayerl, T.M., and M. Bloom, *Physical properties of single phospholipid bilayers adsorbed to microglass beads*. Biophys. J., 1990. **58**(2): p. 357-362.
194. Rujoi, M., et al., *Interactions of Ca<sup>2+</sup> with Sphingomyelin and Dihydrosphingomyelin*. Biophysical Journal, 2002. **82**(6): p. 3096-3104.
195. Lamba, O.P., et al., *Structure and molecular conformation of anhydrous and of aqueous sphingomyelin bilayers determined by infrared and Raman spectroscopy*. Journal of Molecular Structure, 1991. **248**(1-2): p. 1-24.
196. Li, X.-M., et al., *Sphingomyelin Interfacial Behavior: The Impact of Changing Acyl Chain Composition*. Biophysical Journal, 2000. **78**(4): p. 1921-1931.
197. Guo, W., et al., *A Solid-State NMR Study of Phospholipid-Cholesterol Interactions: Sphingomyelin-Cholesterol Binary Systems*. Biophysical Journal, 2002. **83**(3): p. 1465-1478.
198. Khelashvili, G.A. and H.L. Scott, *Combined Monte Carlo and molecular dynamics simulation of hydrated 18:0 sphingomyelin-cholesterol lipid bilayers*. The Journal of Chemical Physics, 2004. **120**(20): p. 9841-9847.
199. Cruz, A., et al., *Influence of a Fluorescent Probe on the Nanostructure of Phospholipid Membranes: Dipalmitoylphosphatidylcholine Interfacial Monolayers*. Langmuir, 2005. **21**(12): p. 5349-5355.
200. Shaw, J.E., et al., *Correlated Fluorescence-Atomic Force Microscopy of Membrane Domains: Structure of Fluorescence Probes Determines Lipid Localization*. Biophysical Journal, 2006. **90**(6): p. 2170-2178.
201. Gromelski, S., et al., *The formation of lipid bilayers on surfaces*. Colloids Surf B Biointerfaces, 2009. **74**(2): p. 477-83.
202. Liu, J., and J.C. Conboy, *Structure of a gel phase lipid bilayer prepared by the Langmuir-Blodgett/Langmuir-Schaefer method characterized by sum-frequency vibrational spectroscopy*. Langmuir, 2005. **21**: p. 9091-9097.
203. Starr, T.E., and N.L. Thompson, *Formation and characterization of planar phospholipid bilayers supported on TiO<sub>2</sub> and SrTiO<sub>3</sub> single crystals*. Langmuir, 2000. **16**: p. 10301-10308.
204. Liang, Q., et al., *Membrane-mediated interactions between nanoparticles on a substrate*. J. Phys. Chem. B, 2010. **114**: p. 5359-5364.
205. Sader, J.E., et al., *Calibration of rectangular atomic force microscope cantilevers*. Review of Scientific Instruments, 1999. **70**(10): p. 3967-3969.
206. Sader, J.E., et al., *Method for the calibration of atomic force microscope cantilevers*. Review of Scientific Instruments, 1995. **66**(7): p. 3789-3798.

207. Green, C.P., et al., *Normal and torsional spring constants of atomic force microscope cantilevers*. Review of Scientific Instruments, 2004. **75**(6): p. 1988-1996.
208. Sader, J.E., et al., *Spring constant calibration of atomic force microscope cantilevers of arbitrary shape*. Review of Scientific Instruments, 2012. **83**(10): p. 103705-1-103705-16.
209. Weisenhorn, A.L., et al., *Deformation and height anomaly of soft surfaces studied with an AFM*. Nanotechnology, 1993. **4**(2): p. 106-113.
210. Cleveland, J.P., et al., *A nondestructive method for determining the spring constant of cantilevers for scanning force microscopy*. Review of Scientific Instruments, 1993. **64**(2): p. 403-405.
211. Gibson, C.T., G.S. Watson, and S. Myhra, *Scanning force microscopy—calibrative procedures for 'best practice'*. Scanning, 1997. **19**(8): p. 564-581.
212. Hutter, J.L. and J. Bechhoefer, *Calibration of atomic-force microscope tips*. Review of Scientific Instruments, 1993. **64**(7): p. 1868-1873.
213. Faye, N.R., et al., *Phase behavior and structure properties of supported lipid monolayers and bilayers in interaction with silica nanoparticles*. Engineering and Technology, 2013. **78**: p. 1594-1601.
214. Singh, G., et al., *Evaluation of antibacterial activity of ZnO nanoparticles coated sonochemically onto textile fabrics*. J. Microbiology, Biotechnology and Food Sciences, 2012. **2**(1): p. 106-120.
215. Heinlaan, M., et al., *Toxicity of nanosized and bulk ZnO, CuO and TiO<sub>2</sub> to bacteria Vibrio fischeri and crustaceans Daphnia magna and Thamnocephalus platyurus*. Chemosphere, 2008. **71**: p. 1308-1316.
216. McQuillan, J.S., and A.M. Shaw, *Whole cell Escherichia coli-based bio-sensor assay for dual zinc oxide nanoparticle toxicity mechanisms*. Biosensors and Bioelectronics, 2014. **51**: p. 274-279.
217. Bashir, R., *BioMEMS : state-of-the-art in detection, opportunities and prospects*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2004. **56**(11): p. 1565-1586.
218. Gammoudi, I., et al., *Characterization of silica nanoparticles in interaction with Escherichia coli bacteria*. Engineering and Technology, 2013. **79**: p. 607-613.
219. Faye, N.R., et al., *Oxidation of Langmuir-Blodgett films of monounsaturated lipids studied by atomic force microscopy*. Int. J. Nanotechnology, 2013. **10**(5/6/7): p. 390-403.