



**HAL**  
open science

# Production et excitation mécanique d'un mécanorécepteur artificiel

Pierre Tapie

► **To cite this version:**

Pierre Tapie. Production et excitation mécanique d'un mécanorécepteur artificiel. Biophysique [physics.bio-ph]. Sorbonne Université, 2023. Français. NNT : 2023SORUS313 . tel-04308390v2

**HAL Id: tel-04308390**

**<https://theses.hal.science/tel-04308390v2>**

Submitted on 27 Nov 2023

**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 DE DOCTORAT**  
de Sorbonne Université

**Spécialité : Physique**

École doctorale n°564: Physique en Île-de-France

réalisée

au Laboratoire Jean Perrin - UMR 8237

sous la direction de Elie Wandersman

présentée par

**Pierre TAPIE**

Sujet de la thèse :

**Production et excitation mécanique d'un  
mécanorécepteur artificiel**

soutenue le lundi 25 septembre 2023

devant le jury composé de :

M.	FORTERRE Yoël,	Rapporteur
Mme	MASSIERA Gladys,	Rapportrice
Mme	MÉNAGER Christine,	Présidente du jury
M	CAMPILLO Clément,	Examineur
M.	THIAM Abdou-Rachid,	Examineur
M.	WANDERSMAN Elie,	Directeur de thèse
Mme	PONTANI Léa-Laetitia,	Co-Encadrante de thèse
M.	PREVOST Alexis,	Co-Encadrant de thèse



## Résumé

L'Homme est capable de sonder tactilement son environnement à l'aide d'un contact direct entre un objet et ses doigts. Ce contact induit des contraintes mécaniques qui se propagent dans la peau jusqu'à des cellules nerveuses mécanosensibles appelées mécanorécepteurs. Le caractère mécanosensible de ces derniers est dû à des nanopores transmembranaires mécanosensibles qui s'ouvrent lors d'une excitation mécanique et qui induisent un flux d'ions à travers la membrane. Ce phénomène provoque une dépolarisation de la membrane qui génère in fine des potentiels d'action qui se propagent vers le système nerveux central.

Pour étudier ces mécanismes d'un point de vue physique, nous avons construit un système biomimétique de ces mécanorécepteurs sous la forme d'une vésicule décorée de nanopores transmembranaires, piégée dans un hydrogel. Ces mécanorécepteurs artificiels sont fabriqués par une méthode fluïdique originale très simple, qui ne nécessite qu'une simple micropipette. Par des mesures de fuite de fluorophores à travers la membrane, nous avons montré que la bicouche lipidique de la vésicule pouvait être fonctionnalisée par des nanopores transmembranaires passifs, non-mécanosensibles. Nous avons également utilisé des méthodes de biologie synthétique pour y insérer des nanopores mécanosensibles de la famille MscL. Nous avons montré que ce mécanorécepteur artificiel était déformable mécaniquement par simple indentation de la surface du gel et nous avons caractérisé et modélisé comment les contraintes mécaniques extérieures étaient encodées dans la déformation. Nous avons montré que mécaniquement le système était analogue à une cavité noyée dans un milieu élastique. En particulier, le caractère anisotrope des déformations de la membrane a été mis en évidence. Nous nous sommes également intéressés à la réponse dynamique d'une cavité (comme analogue mécanique du mécanorécepteur) lorsqu'un doigt artificiel la contenant est frotté contre une surface rugueuse. Nous avons montré que les fluctuations de forme de la cavité encodaient la texture de la surface explorée, et mis en évidence la présence d'une surmodulation de ces fluctuations lorsque la surface du doigt est décorée d'empreintes digitales.

**Mots-clés :** mécanorécepteur · biomimétisme · mécanotransduction · perception tactile · vésicule · protéine transmembranaire ·

## Abstract

To finely probe the geometrical/mechanical features of their immediate environment, humans can perform tactile exploration through direct contact between their fingers and an object. This contact induces mechanical stresses that propagate through the skin to mechanosensitive nerve cells called mechanoreceptors. Their mechanosensitivity is due to mechanosensitive transmembrane nanopores that open upon mechanical stimulation, inducing an ion flux across the membrane. This phenomenon depolarizes the membrane, eventually generating action potentials that propagate to the central nervous system.

To study this mechanism from a physical perspective, we constructed a biomimetic system of these mechanoreceptors in the form of a vesicle decorated with transmembrane nanopores, embedded in a hydrogel. These artificial mechanoreceptors are manufactured using a simple and original fluidic method that only requires a standard micropipette. By measuring the leakage of fluorophores across the membrane, we demonstrated that the lipid bilayer of the vesicle could be functionalized with passive, non-mechanosensitive transmembrane nanopores. We also used synthetic biology tools to insert mechanosensitive nanopores of the MscL family. We showed that this artificial mechanoreceptor could be mechanically deformed by simply indenting the surface of the gel, and we characterized and modeled how external mechanical stresses were encoded in the membrane deformation. We showed that mechanically, the system was analogous to a cavity embedded in an elastic medium. In particular, an anisotropic nature of membrane deformations was evidenced. We also investigated the dynamic response of a cavity (as a mechanical analogue of the mechanoreceptor) when an artificial finger was rubbed against a rough surface. We showed that fluctuations of the shape of the cavity encoded the texture of the explored surface, and we revealed the presence of periodic modulations in these fluctuations if the surface of the finger was decorated with fingerprints.

**Keywords :** mechanoreceptor · biomimic system · mechanotransduction · tactile perception · vesicle · transmembrane protein ·

# Remerciements

*Dans le désordre.*

Avant tout j'aimerais remercier l'école de la république pour m'avoir offert un enseignement de qualité sans lequel il m'aurait été impossible de réaliser une thèse également financée avec des fonds publics.

J'aimerais remercier mon directeur de thèse Elie Wandersman pour sa patience et sa bienveillance à mon égard. Mais également son honnêteté lorsque mon travail n'était pas à la hauteur des exigences demandées. J'aimerais également remercier Léa-Laetitia Pontani et Alexis Prevost pour le temps qu'ils m'ont consacré.

Je remercie également Vincent Noireaux qui m'a permis de visiter son laboratoire à Minneapolis ainsi que Seth, David et Ziane pour leurs accueils ainsi que les parties endiablées de tennis et basket-ball.

Merci à Malika Pierrat pour avoir toujours trouvé des solutions à mes différents problèmes administratifs.

Enfin je remercie toutes les personnes que j'ai cotoyé au laboratoire Jean Perrin pour leurs sympathies. Je n'en citerai aucune pour n'oublier personne à l'exception de ma voisine de bureau Nidia pour ça bonne humeur chaque matin.



# Table des matières

<b>1</b>	<b>Introduction</b>	<b>1</b>
1.1	La perception mécanosensorielle de l’environnement . . . . .	1
1.1.1	Le sens du toucher chez l’humain . . . . .	1
1.1.1.1	La perception tactile digitale . . . . .	1
1.1.1.2	La perception de textures en bouche . . . . .	2
1.1.2	La perception tactile vibrissale . . . . .	2
1.2	La chaîne de perception sensorielle dans le toucher digital humain . . . . .	3
1.2.1	Les mécanorécepteurs du toucher : physiologie et réponse neuronale . . . . .	3
1.2.2	Le codage neuronal . . . . .	5
1.2.2.1	Les différents ordres de neurones . . . . .	6
1.2.2.2	Le décodage neuronal par la mesure du taux de décharge . . . . .	6
1.2.2.3	Détection par coïncidence des potentiels d’action . . . . .	7
1.3	La mécanotransduction . . . . .	8
1.3.1	Encodage par les propriétés mécaniques de l’organe tactile . . . . .	8
1.3.1.1	Effet d’une texturation de la peau : l’effet “empreintes” . . . . .	9
1.3.1.2	Effet des propriétés de résonance de la peau . . . . .	10
1.3.2	Les pores mécanosensibles . . . . .	11
1.3.2.1	La protéine responsable de la mécanosensibilité chez les mammi- fères : <i>Piezo</i> . . . . .	11
1.3.2.2	Mécanismes d’ouverture . . . . .	13
1.3.2.3	Reconstitution <i>in vitro</i> et seuils d’ouverture de <i>Piezo</i> . . . . .	13
1.4	Objectifs de la thèse . . . . .	14
<b>2</b>	<b>Un mécanorécepteur biomimétique : la pseudo-vésicule</b>	<b>19</b>
2.1	Introduction . . . . .	19
2.1.1	Un système modèle de cellule : la vésicule . . . . .	19
2.1.1.1	La membrane plasmique . . . . .	19
2.1.1.2	Membranes modèles . . . . .	20
2.1.1.3	Liposomes et applications . . . . .	21
2.1.2	Méthodes de formation de vésicules géantes (GUVs) . . . . .	23
2.1.2.1	Méthodes d’hydratation et électroformation . . . . .	23
2.1.2.2	Méthodes microfluidiques . . . . .	24
2.1.2.3	Autres méthodes d’encapsulation . . . . .	25

2.1.3	Création d'un nouveau modèle membranaire . . . . .	25
2.2	La pseudo-vésicule en trois phases . . . . .	27
2.2.1	Phase lipidique . . . . .	27
2.2.2	Phases aqueuses . . . . .	28
2.2.2.1	Phase interne . . . . .	28
2.2.2.2	Phase externe . . . . .	28
2.2.2.3	Équilibre osmotique . . . . .	28
2.3	Formation des pseudo-vésicules . . . . .	28
2.4	Caractérisation et fonctionnalisation . . . . .	29
2.4.1	Caractérisation de la membrane de la pseudo-vésicule . . . . .	29
2.4.2	Fonctionnalisation de la membrane . . . . .	32
2.4.2.1	L'alpha-hémolysine : un pore passif . . . . .	32
2.4.2.2	Tension de surface . . . . .	32
2.4.2.3	Insertion de pores dans des SUVs . . . . .	34
2.4.2.4	Fuite de fluorescence et mesures de contraste . . . . .	35
2.5	Excitabilité du système . . . . .	37
2.5.1	Dispositif expérimental d'excitation mécanique . . . . .	37
2.5.2	Mesures de déformation . . . . .	39
2.6	Limites du système et évolutions envisagées . . . . .	43
2.7	Conclusion . . . . .	44
<b>3</b>	<b>L'inclusion comme modèle mécanique du mécanorécepteur</b>	<b>47</b>
3.1	Introduction . . . . .	47
3.1.1	Problématique . . . . .	47
3.1.2	Les inclusions comme capteurs de contraintes dans les tissus biologiques . . . . .	47
3.1.3	Mécanique d'une inclusion dans un milieu élastique . . . . .	48
3.1.4	L'inclusion liquide et les contributions interfaciales . . . . .	49
3.2	Déformations d'une cavité circulaire ou sphérique sous compression uniaxiale . . . . .	50
3.2.1	Cavité circulaire 2D . . . . .	50
3.2.2	Cavité sphérique 3D . . . . .	51
3.3	Modélisation expérimentale : la cavité tactile . . . . .	52
3.3.1	Comment inclure une bulle/goutelette unique dans un élastomère? . . . . .	52
3.3.1.1	Fabrication de la matrice de PDMS . . . . .	52
3.3.1.2	Fabrication d'une cavité gazeuse . . . . .	53
3.3.1.3	Fabrication d'une cavité liquide . . . . .	53
3.3.1.4	Moulage en cuve parallélépipédique . . . . .	54
3.3.2	Expériences de compression uniaxiale : résultats . . . . .	54
3.3.2.1	Mesure des contraintes et des déformations . . . . .	54
3.3.2.2	Ajustement par des modèles de cavité . . . . .	55
3.3.3	Discussion . . . . .	56
3.4	Réponse dynamique d'une cavité en frottement sur une surface texturée . . . . .	58
3.4.1	Système et méthodes de mesure . . . . .	58
3.4.1.1	Un doigt artificiel cylindrique . . . . .	58

3.4.1.2	Montage tribologique . . . . .	59
3.4.2	Réponse statique dans le cas du contact cylindre plan . . . . .	60
3.4.2.1	Contact de Hertz . . . . .	60
3.4.2.2	Déformation de la cavité dans un contact cylindre/plan . . . . .	61
3.4.3	Réponse dynamique en frottement . . . . .	62
3.4.3.1	Frottement contre des marches de hauteur contrôlées . . . . .	63
3.4.3.2	Frottement contre des surfaces réelles de rugosité statistique . . . . .	66
3.4.3.3	L'effet empreinte à l'échelle d'un mécanorécepteur . . . . .	66
3.5	Conclusion . . . . .	67
<b>4</b>	<b>Vers un système biomimétique mécanosensible</b>	<b>71</b>
4.1	<i>MscL</i> : une protéine mécanosensible bactérienne . . . . .	71
4.2	Méthodes de synthèse de protéines <i>in vitro</i> . . . . .	72
4.2.1	Présentation de deux modèles de synthèse de protéines <i>in vitro</i> : <i>TxTL</i> et <i>PURE</i> . . . . .	73
4.3	Design, amplification et purification d'un plasmide . . . . .	74
4.3.1	Choix du plasmide et amplification . . . . .	74
4.3.1.1	Culture bactérienne . . . . .	75
4.3.1.2	Purification du plasmide d'intérêt . . . . .	75
4.3.2	Amplification et purification d'un plasmide linéaire par PCR . . . . .	76
4.3.3	Synthèse de la protéine MscL . . . . .	76
4.3.3.1	Protocole et résultats pour la méthode <i>TxTL</i> . . . . .	76
4.3.3.2	Protocole et résultats pour la méthode <i>PURE</i> . . . . .	77
4.4	La pseudo-vésicule mécanosensible . . . . .	79
4.4.1	Stabilité . . . . .	79
4.4.2	Premiers résultats . . . . .	79
4.5	Conclusion . . . . .	80
<b>5</b>	<b>Conclusion et perspectives</b>	<b>83</b>
5.1	Conclusion . . . . .	83
5.2	Perspectives . . . . .	84
<b>A</b>	<b>Réalisation d'une PCR q5</b>	<b>87</b>
	<b>References</b>	<b>97</b>



# Chapitre 1

## Introduction

### 1.1 La perception mécanosensorielle de l'environnement

Les mammifères appréhendent et interagissent avec leur environnement immédiat grâce à cinq sens que sont la vision, le toucher, l'ouïe, le goût et l'odorat [1]. Parmi ces cinq sens, le sens du toucher en particulier occupe une place essentielle puisqu'il permet d'évaluer par contact direct entre un organe tactile et un objet donné les propriétés mécaniques de cet objet. Comme nous le décrivons ci-dessous au travers de trois exemples choisis et loin d'être exhaustifs, l'organe tactile pourra être le doigt ou la langue chez l'Homme, mais aussi la moustache faciale chez les rongeurs.

#### 1.1.1 Le sens du toucher chez l'humain

##### 1.1.1.1 La perception tactile digitale

Chez l'Homme, la sensibilité tactile est généralement associée à nos mains et plus précisément nos doigts qui constituent un organe tactile d'une très grande finesse et d'une précision remarquable. Les doigts permettent en effet d'évaluer non seulement la forme mais aussi la texture de surface (lisse ou rugueuse) d'un objet. En pratique, lors de la prise en main d'un objet, l'être humain est capable d'ajuster très finement la pression exercée sur l'objet pour éviter que celui-ci ne glisse entre les doigts ou que celui-ci soit écrasé, comme dans le cas d'un oeuf par exemple.

De manière générale, lorsqu'un doigt touche la surface de l'objet, la peau de l'extrémité du doigt se déforme et active des capteurs de contraintes/déformations présents sous la surface de la peau. Ces unités de mesure sont des cellules nerveuses mécanosensibles appelées communément *mécanorécepteurs* dont les propriétés physiologiques et de réponse seront discutées plus loin. Ces mécanorécepteurs convertissent les contraintes/déformations perçues en signaux nerveux appelés potentiels d'action qui remontent les voies afférentes du nerf jusqu'au cerveau.

La grande sensibilité tactile de nos mains est due à la forte densité de ces mécanorécepteurs (Fig. 1.4). On dénombre environ 17 000 cellules mécanosensibles dans chaque main sous l'épiderme [2]. La densité de cellules nerveuses mécanosensibles est variable le long de la main avec un maximum de densité au bout des doigts ( $10/mm^2$  contre  $1/mm^2$  pour le reste de la main) [3, 4].

### 1.1.1.2 La perception de textures en bouche

La langue est traditionnellement associée au sens gustatif, mais constitue aussi un organe tactile impliqué dans la perception des textures d'un aliment liquide, solide ou divisé en bouche. C'est un muscle dont la muqueuse dorsale est recouverte d'un grand nombre de papilles de différents types dont les rôles sont distincts. Il y a d'une part les papilles circumvallates, foliées et fongiformes qui participent directement au sens gustatif. Il y a d'autre part un quatrième type de papilles appelées papilles filiformes qui sont impliquées dans la perception mécanique de la texture d'un aliment. Ces dernières ont une forme légèrement conique, assimilables en première approximation à de longs cylindres de longueur typique  $100\ \mu\text{m}$  à  $600\ \mu\text{m}$  et de diamètre environ  $25\ \mu\text{m}$  à  $250\ \mu\text{m}$  [5, 6]. Elles sont composées d'un cœur de tissus conjonctifs partiellement couvert d'un épithélium kératinisé sur lequel sont branchées d'autres papilles secondaires [7, 8, 9]. Leur densité sur la langue varie de 60 à 500 papilles par  $\text{cm}^2$  avec un maximum de densité sur le bout de la langue [10].

Comme dans le cas du toucher digital humain, lors d'un contact entre un aliment et une papille, cette dernière fléchit et induit un moment en base de la papille [11, 12, 13] qui est mesuré par des mécanorécepteurs dont la nature exacte n'est toujours pas connue. On sait en revanche, depuis les travaux récents de Moayedi *et al.* [14], qu'il existe bien en base des papilles des cellules nerveuses mécanosensibles qui expriment la protéine mécanosensible *Piezo2* (voir la Section 1.3.2). Une fois encore, les mécanorécepteurs génèrent des potentiels d'action dont la séquence temporelle donne des informations sur la texture des aliments sondés en bouche.

### 1.1.2 La perception tactile vibrissale

Nous venons de voir deux exemples qui mettent en jeu le sens du toucher chez l'Homme. Dans le monde animal, ce sens est aussi largement utilisé par d'autres espèces. C'est le cas notamment des rongeurs, dont l'acuité visuelle est faible, et pour lesquels il a été démontré dès 1912 [15] qu'ils utilisent plutôt leurs moustaches faciales (encore appelées *vibrisses*) pour leur locomotion, leur équilibre mais aussi pour la détection de parois environnantes et la discrimination de texture de surface. Les rongeurs utilisent donc leurs vibrisses pour sonder tactilement leur environnement.

Ces vibrisses sont totalement dépourvus de mécanorécepteurs et transportent l'information tactile sous forme de déformations/vibrations mécaniques depuis l'endroit du contact vibrisse/substrat jusqu'au follicule où sont logés les mécanorécepteurs. En pratique pour discriminer une texture, le rat agit selon deux modes exploratoires qui peuvent être utilisés simultanément. Dans le premier mode, dit *actif* ou de *whisking* [16], le rongeur se déplace peu et bouge activement dans un mouvement de va et vient ses vibrisses à une fréquence comprise entre 5 et 25 Hz. Dans le second mode, dit *passif*, le rat se déplace rapidement tout en frottant ses vibrisses maintenues à une position fixe.

Pour obtenir des informations sur la texture d'un objet, les études réalisées jusqu'à présent montrent que le rat obtient des informations sur la texture d'un objet principalement grâce à ces deux mécanismes. Le premier met en jeu le caractère résonant des vibrisses [17]. En effet, de par leur forme allongée, celles-ci se comportent comme un oscillateur amorti, agissant comme un filtre passe-bande, dont la fréquence caractéristique est définie par la géométrie de chaque vibrisse. Ceci suggère un mécanisme de décomposition spectrale de l'information tactile par l'ensemble des vibrisses. Le deuxième mécanisme est quant à lui basé sur les résultats d'études [18] qui semblent indiquer que dans la majorité des situations d'exploration, la dynamique des vibrisses est dominée

par la séquence temporelle des événements de “stick-slip”, dont la statistique serait directement reliée aux propriétés de rugosité de la surface sondée. L'importance relative des deux mécanismes proposés est toujours discutée à ce jour.

## 1.2 La chaîne de perception sensorielle dans le toucher digital humain

Chez l'être humain, les mécanorécepteurs génèrent des séquences temporelles de potentiels d'action directement interprétables par le système nerveux central, sous contrainte ou déformation mécanique, lors du frottement de l'extrémité du doigt contre une surface microtexturée par exemple.

### 1.2.1 Les mécanorécepteurs du toucher : physiologie et réponse neuronale

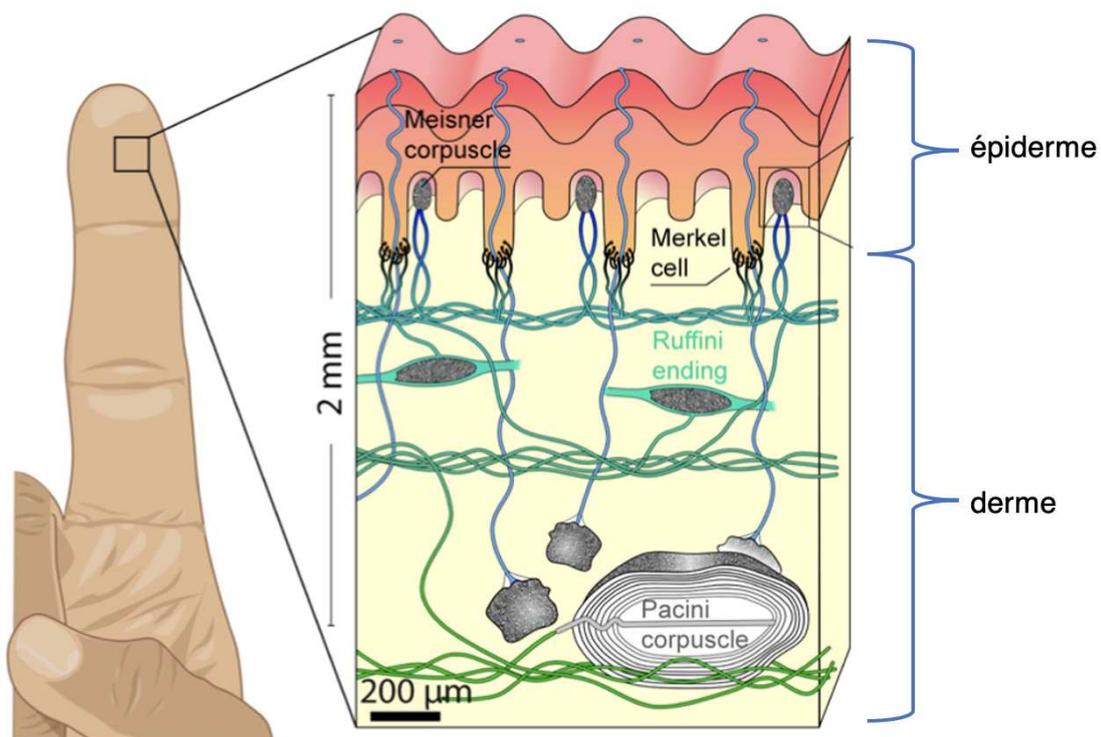


FIG. 1.1 Schéma en coupe d'un doigt montrant la répartition spatiale des mécanorécepteurs du toucher. Les couches couleur corail représentent l'épiderme. Le derme est jaune. L'interface entre le derme et l'épiderme est composée de crêtes épidermiques. Les cellules de Merkel et les corpuscules de Meissner sont situés au niveau des crêtes épidermiques. Les terminaisons de Ruffini et les corpuscules de Pacini sont situés plus profondément dans le derme. Adapté de [19].

Il existe quatre types de mécanorécepteurs du toucher digital humain : les corpuscules de Meissner, les corpuscules de Pacini, les cellules de Merkel et les terminaisons de Ruffini. Ceux-ci sont situés à différentes profondeurs sous la surface de la peau. Les corpuscules de Meissner et les cellules de Merkel sont à l'interface entre le derme et l'épiderme au niveau des crêtes épidermiques, à quelques centaines de  $\mu\text{m}$  sous la surface de la peau. Les terminaisons de Ruffini sont localisées dans le derme à une profondeur d'environ 1 mm. Les corpuscules de Pacini quant à eux sont les

plus profondément enfouis à environ 2 mm (Fig. 1.1). Les cellules de Meissner ont une forme ellipsoïdale dont le grand axe mesure entre 80 et 150  $\mu m$  et le petit axe mesure entre 20 et 40  $\mu m$ . Les corpuscules de Pacini mesurent environ 1 mm de diamètre, les cellules de Merkel mesurent environ 500  $\mu m$  de diamètre.

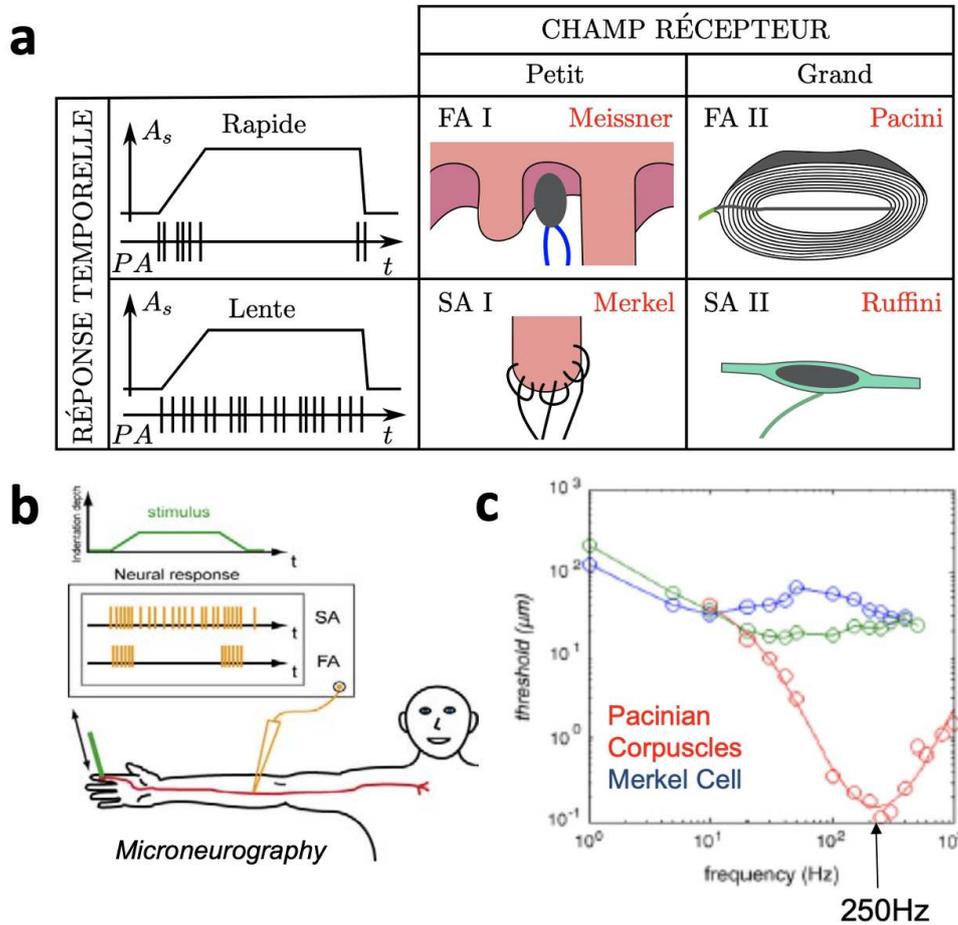


FIG. 1.2 a) Tableau récapitulatif des caractéristiques des mécanorécepteurs en fonction de la taille de leur champ récepteur et de leur réponse temporelle. Les panels dans la partie gauche du tableau sont des représentations schématiques des résultats de mesure de type "ramp and hold". Pour chaque panel, le graphe du haut montre l'amplitude  $A_s$  du stimulus mécanique appliqué fonction du temps  $t$  et le graphe du bas montre la réponse neuronale fonction du temps  $t$  où chaque segment vertical représente un potentiel d'action  $PA$  produit par la cellule. Adapté de [3]. b) Détails d'une expérience "ramp and hold" sur l'Homme. Une microélectrode en tungstène est plantée dans l'avant-bras jusqu'à un nerf afférent d'une des terminaisons nerveuses. Lors d'une stimulation mécanique (tige en vert) la microélectrode mesure l'activité électrique du nerf. c) Seuil de sensibilité en déformation en fonction de la fréquence de stimulation. Reproduit de [20].

Pour mesurer leur réponse nerveuse individuelle, Knibestöl et Vallbo [21] ont utilisé la technique de microneurographie qui consiste à insérer sur l'avant bras une microélectrode de tungstène jusqu'à ce qu'on accroche le nerf afférent d'une des terminaisons nerveuses. Ils ont ensuite mesuré l'activité électrique du nerf en réponse à une sollicitation localisée de la peau à l'aide d'une pointe par exemple. Il est alors possible de déterminer la taille du champ récepteur associé à la cellule sélectionnée, c'est-

à-dire la zone de la peau pour laquelle une réponse est enregistrée pour un stimulus d'amplitude donnée [22]. Ces mesures ont permis de distinguer les mécanorécepteurs de type I (les cellules de Merkel et les corpuscules de Meissner) qui ont un champ récepteur de l'ordre de  $10\text{ mm}^2$ , de ceux de type II qui ont un champ récepteur plus grand, d'environ  $60\text{ mm}^2$  pour les terminaisons de Ruffini et  $100\text{ mm}^2$  pour les corpuscules de Pacini [22]. Plus le mécanorécepteur se situe profondément sous la peau, plus son champ récepteur est large (Fig. 1.2).

La réponse à une sollicitation de type “ramp and hold” (Fig. 1.2) a également permis de caractériser les propriétés d'adaptation des mécanorécepteurs : les cellules de Merkel et de Ruffini, à adaptation lente (en anglais, *Slowly Adapting – SA*) répondent durant toute la durée de la sollicitation. A l'inverse, les corpuscules de Meissner et de Pacini, à adaptation rapide (en anglais *Fast Adapting – FA*) répondent principalement lorsque le stimulus varie et sont donc sensibles aux vibrations. Ils participent notamment au fait que lorsqu'on enfle un vêtement, on en perçoit sa présence au début pour en oublier son contact rapidement après. En faisant vibrer la pointe, il a également été possible de caractériser le seuil de sensibilité en déformation à différentes fréquences de sollicitation, c'est-à-dire l'amplitude minimale de déplacement de la pointe qui déclenche une réponse nerveuse mesurable. Ce seuil, de l'ordre de  $100\ \mu\text{m}$ , est quasi-indépendant de la fréquence d'excitation pour les cellules de type SA (Fig. 1.2). En revanche, pour les cellules de type FA, il en dépend fortement (Fig. 1.2). Pour les corpuscules de Pacini, il est minimal pour une fréquence d'excitation de la pointe de  $250\text{ Hz}$  et est alors d'environ  $100\text{ nm}$ , soit deux ordres de grandeur plus faible [20]. Ces mécanorécepteurs en particulier possèdent donc une réponse spectrale de type passe-bande.

En résumé, l'ensemble de ces mesures ont permis d'obtenir la classification suivante pour les mécanorécepteurs :

- Les cellules de Merkel sont de type SA I et sont sensibles à des stimuli à basses fréquences ( $< 5\text{ Hz}$ ) sur une zone localisée.
- Les terminaisons de Ruffini sont de type SA II et montrent une forte sensibilité aux contraintes d'étirement de la peau [23, 24]. Celle-ci sont donc plus associées à la proprioception c'est-à-dire à la perception dans l'espace de la position des doigts ou plus généralement des membres.
- Les corpuscules de Meissner sont de type FA I et sont sensibles aux déformations dynamiques et locales dans une gamme de fréquence comprise entre  $5$  et  $50\text{ Hz}$  [25, 26].
- Les corpuscules de Pacini sont de type FA II, sont sensibles aux vibrations hautes fréquences dans la gamme  $40 - 400\text{ Hz}$  (qui peuvent notamment se propager sur de grandes distances à la surface de peau [27]). Leur réponse fréquentielle est de type passe-bande avec un maximum de sensibilité autour de  $250\text{ Hz}$  [26].

### 1.2.2 Le codage neuronal

Une fois que les potentiels d'action ont été produits par les mécanorécepteurs suite à une stimulation mécanique, comment le système somatosensoriel du cerveau les décode-t-il et les interprète-t-il pour produire une perception ?

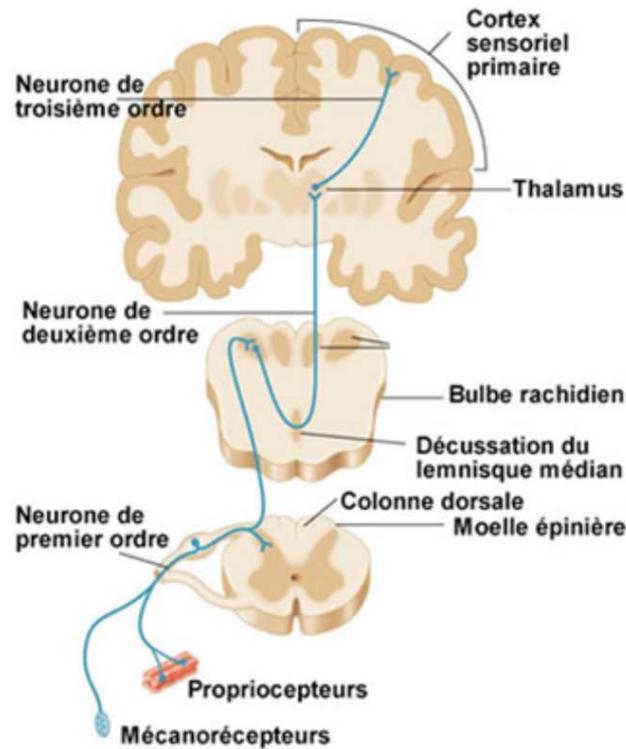


FIG. 1.3 Schéma de la voie ascendante du système nerveux central. Reproduit du site web à l'adresse "<http://neurobiologie.weebly.com/les-nerfs-et-voies-sensitivesmotrices.html>".

### 1.2.2.1 Les différents ordres de neurones

Les potentiels d'action empruntent d'abord la voie dite afférente du système nerveux vers diverses régions encéphaliques grâce à trois types de neurones consécutifs unis par des synapses :

- *Les neurones du premier ordre* : leurs corps cellulaires sont situés dans le ganglion spinal ou crânien et ils transmettent les potentiels d'action des mécanorécepteurs jusqu'à la moelle épinière où ils font synapses.
- *Les neurones du second ordre* : leurs corps cellulaires se trouvent dans la corne dorsale de la moelle épinière ou dans les noyaux du bulbe rachidien. Ils transmettent les potentiels d'action au thalamus ou au cervelet où ils font synapses.
- *Les neurones du troisième ordre* : leurs corps cellulaires sont situés dans le thalamus. Ils acheminent les potentiels d'action au cortex sensoriel.

### 1.2.2.2 Le décodage neuronal par la mesure du taux de décharge

Un premier type de codage neuronal repose sur l'idée que l'information est encodée par le taux de décharge, *i.e.* le nombre de potentiels d'action par unité de temps [28]. Sur cette base, Katz [29] a notamment proposé en 1925 deux mécanismes d'encodage (théorie duale) pour la discrimination de textures : une pour les textures fines (taille latérale typique  $< 200 \mu m$ ) et une autre pour les textures grossières (taille latérale typique  $> 200 \mu m$ ).

Le codage des textures grossières est assuré par les cellules de Merkel (SA I) et ne nécessite pas de mouvement du doigt sur la surface explorée au contraire des textures fines [30]. En effet

des expériences d'électrophysiologie sur le singe et de psychophysique sur l'homme, qui consistent à indenter l'extrémité du doigt avec un tambour décoré de plots distribués selon un motif régulier, ont montré que les corpuscules de Merkel sont activés avec un taux de décharge qui dépend de l'indentation. Ils agissent donc comme des pixels tactiles par analogie avec un capteur optique. En revanche, les cellules de Meissner (FA I) et de Pacini (FA II) ne répondent que très peu à un stimulus provenant d'une texture grossière [31].

Les textures fines sont généralement détectées par un mouvement du doigt sur la surface d'intérêt. Ce frottement génère des vibrations dans la peau qui se propagent et sont détectées par les cellules de Meissner (FA I) et de Pacini (FA II). Ces derniers sont les acteurs essentiels impliqués dans la discrimination de textures fines [32]. De plus, la vibration forcée du doigt à 100 Hz empêche la discrimination des textures fines mais pas celles des textures grossières [30].

Ces résultats sont quelque peu paradoxaux, puisque les corpuscules de Pacini en particulier sont situés à environ 2 mm sous la surface de la peau, et ont donc une faible résolution spatiale (un grand champ récepteur) puisqu'ils intègrent les fluctuations de contraintes dans une zone en surface de taille typique  $\sim 2 \text{ mm}^2$ .

### 1.2.2.3 Détection par coïncidence des potentiels d'action

Un autre type de codage neuronal a été proposé plus récemment par Johansson et ses collaborateurs [33, 34] pour rendre compte notamment de la rapidité de réponse du système nerveux central à des stimulations mécaniques brèves.

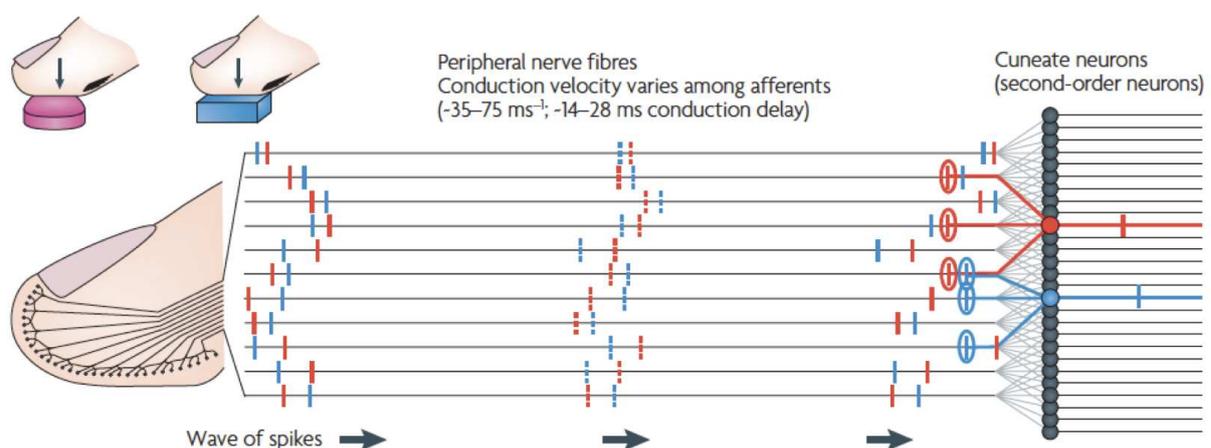


FIG. 1.4 Schéma d'un doigt qui touche deux surfaces de forme différente, l'une ronde (en rouge), l'autre plate (en bleu). Les neurones du premier ordre génèrent des potentiels d'action représentés par les segments verticaux rouges et bleus. Les neurones du second ordre détectent la coïncidence entre les potentiels d'action, comme indiqué par les ellipses entourant les segments concernés. Reproduit de [35].

Ce type de stimulation existe lorsqu'on essaye de détecter la forme d'un objet au premier contact avec l'extrémité du doigt (Fig. 1.4) ou encore lorsque l'on saisit un objet entre deux doigts et que l'on maintient sa prise dans le temps. Dans ce deuxième cas, l'objet peut à tout moment glisser

entre les doigts et s'échapper si l'on relâche la pression appliquée, et instinctivement on ré-ajuste en permanence la pression pour maintenir l'objet en place. Chez un individu typique, cette réaction se produit en un temps court  $\leq 100$  ms. Ce temps est la somme du temps nécessaire au signal nerveux pour se propager des neurones du premier ordre jusqu'aux neurones du troisième ordre, du temps de traitement par le cortex somatosensoriel, du temps de retour jusqu'aux muscles et du temps de contraction musculaire.

Pour estimer un taux de décharge, deux potentiels d'action consécutifs au minimum sont normalement nécessaires. En pratique cependant, pour un neurone donné, la distribution des intervalles de temps entre potentiels d'action est stochastique et une estimation fiable du taux de décharge nécessite donc de moyennner sur une fenêtre de temps relativement longue, incompatible avec les temps de réaction courts impliqués dans le type de stimulations évoquées ci-dessus [36].

Johansson et ses collaborateurs ont donc proposé que c'est la mesure relative des instants des premiers potentiels d'action émis par une population de plusieurs mécanorécepteurs qui encode l'information tactile. La courbure d'un objet par exemple (Fig. 1.4) est encodée dans la distribution spatio-temporelle des premiers potentiels d'action. Celle-ci sera différente pour un objet plat ou pour un objet rond puisque les mécanorécepteurs sont recrutés dans les deux cas dans un ordre temporel différent (Fig. 1.4). A cause de la variabilité des vitesses de conduction des neurones associés à chaque mécanorécepteur, la détection du motif spatio-temporel spécifique des premiers potentiels d'action est assurée en aval par les neurones secondaires avec une méthode de coïncidence (Fig. 1.4).

Ce mécanisme de décodage, discuté ici sur l'exemple de la détection de forme d'un objet au premier contact, permet aussi de détecter la direction d'une force appliquée sur le doigt. Il offre une détection beaucoup plus rapide que ne le permettrait la seule mesure des variations du taux de décharge des neurones [35].

## 1.3 La mécanotransduction

### 1.3.1 Encodage par les propriétés mécaniques de l'organe tactile

Avant tout codage neuronal, on peut se demander si les propriétés mécaniques et topographiques de l'organe tactile participent au filtrage de l'information tactile. La peau humaine est en effet un milieu stratifié comportant une partie molle, le derme, recouverte d'une partie plus rigide d'épaisseur plus fine, l'épiderme, que l'on peut assimiler à un milieu élastique déformable. La surface elle-même de l'extrémité des doigts présente également une micro-texturation sous la forme d'empreintes digitales. Afin d'obtenir une description complète de la perception tactile, il est donc nécessaire de comprendre comment les différentes caractéristiques physiques d'un substrat comme sa forme, sa dureté, sa rugosité de surface ou encore ses propriétés adhésives se traduisent mécaniquement au niveau sous-cutané dans des conditions d'exploration naturelles. A noter que par conditions naturelles, on entend les conditions de vitesse relative et de pression impliquées quand on frotte ses doigts sur une surface, avec typiquement, des vitesses relatives de l'ordre de 10 cm/s et des charges normales appliquées de l'ordre de quelques N.

### 1.3.1.1 Effet d’une texturation de la peau : l’effet “empreintes”

Pour étudier ces questions, Scheibert *et al.* [37] ont développé une approche *biomimétique* qui consiste à reproduire le fonctionnement de l’extrémité du doigt humain en se limitant à un nombre restreint de paramètres qui le caractérise (Fig. 1.5a). En reproduisant le fonctionnement du doigt de manière simplifiée, il devient en effet possible d’étudier et d’identifier les contributions individuelles des paramètres physiques au filtrage mécanique de l’information tactile. Dans leurs travaux, l’extrémité de la peau du doigt est modélisée par une calotte sphérique d’un élastomère silicone de PolyDiMéthylSiloxane (PDMS) dont les propriétés élastiques sont proches de celles de l’ensemble derme-épiderme (module élastique de Young de l’ordre de quelques MPa). A la base de cette calotte sphérique d’épaisseur millimétrique, ont été placés un ou plusieurs micro-capteurs de force de type MEMS (Micro-Electro-Mechanical System) qui simulent un ou plusieurs mécanorécepteurs sous-cutanés (Fig. 1.5a).

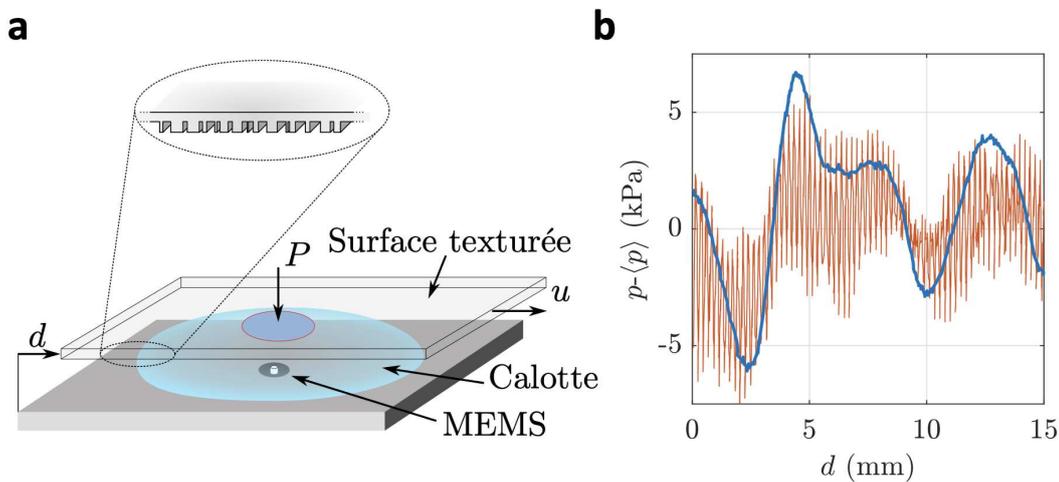


FIG. 1.5 a) Représentation schématique du doigt artificiel. La calotte sphérique en PDMS, dont la surface est texturée avec un réseau régulier de sillons comme analogue des empreintes digitales, contient un ou plusieurs micro-capteurs de force de type MEMS qui jouent le rôle de mécanorécepteurs. Ce doigt artificiel est ensuite frotté contre une surface micro-texturée sous charge normale et vitesse imposées. b) Contrainte de pression  $p - \langle p \rangle$  mesurée par un capteur MEMS en fonction de la distance  $d$  parcourue par le doigt artificiel. En bleu, la contrainte est mesurée pour une calotte lisse (sans empreinte) et en rouge la contrainte est mesurée pour une calotte avec empreintes. Reproduit de Scheibert *et al.* [37].

Deux types de capteurs ont été déclinés, l’un pour lequel la calotte sphérique avait une surface lisse, l’autre pour lequel la surface de PDMS était texturée à l’image des empreintes digitales, *i.e.* recouverte d’un réseau régulier de sillons de profondeur  $\sim 30\mu\text{m}$  et de période spatiale  $\lambda \sim 200\mu\text{m}$ . Scheibert *et al.* ont ensuite frotté ces deux types de capteurs contre des surfaces planes rugueuses modèles, fabriquées par photolithographie et dont la topographie a un spectre de type bruit blanc gaussien unidimensionnel. En comparant les signaux de contraintes mesurés par les deux capteurs, à des vitesses relatives  $v$  de quelques centaines de  $\mu\text{m/s}$ , Scheibert *et al.* ont montré qu’en présence d’empreintes, ceux-ci présentaient de larges fluctuations à une fréquence déterminée par le rapport

$v/\lambda$  (Fig. 1.5b). La peau à empreintes se comporte donc mécaniquement comme un filtre passe-bande centré sur cette fréquence.

Les conséquences pour la perception tactile de leur résultat deviennent évidentes si l'on se replace dans le contexte d'une exploration réelle chez l'humain. Dans des conditions d'exploration naturelle typiques pour le doigt humain, les vitesses de déplacement relatives sont en effet de l'ordre de 10 cm/s et les empreintes digitales humaines ont une longueur d'onde moyenne d'environ 500  $\mu\text{m}$ . On peut ainsi construire une fréquence temporelle d'environ 200 Hz, qui est justement adaptée à la fréquence de réponse optimale des corpuscules de Pacini, d'environ 250 Hz. La présence d'empreintes lève le voile sur le paradoxe d'une détection des textures fines par des capteurs à grand champ récepteur, en produisant des vibrations qui peuvent être perçues par ces mécanorécepteurs à adaptation rapide. Les travaux de Scheibert *et al.* ont donc permis d'élucider le rôle essentiel de la texturation de la peau sous forme d'empreintes pour la transduction de l'information tactile dans le cas de textures fines et constitue à ce titre un premier exemple de filtrage et d'encodage par les propriétés mécaniques et topographiques de la peau.

### 1.3.1.2 Effet des propriétés de résonance de la peau

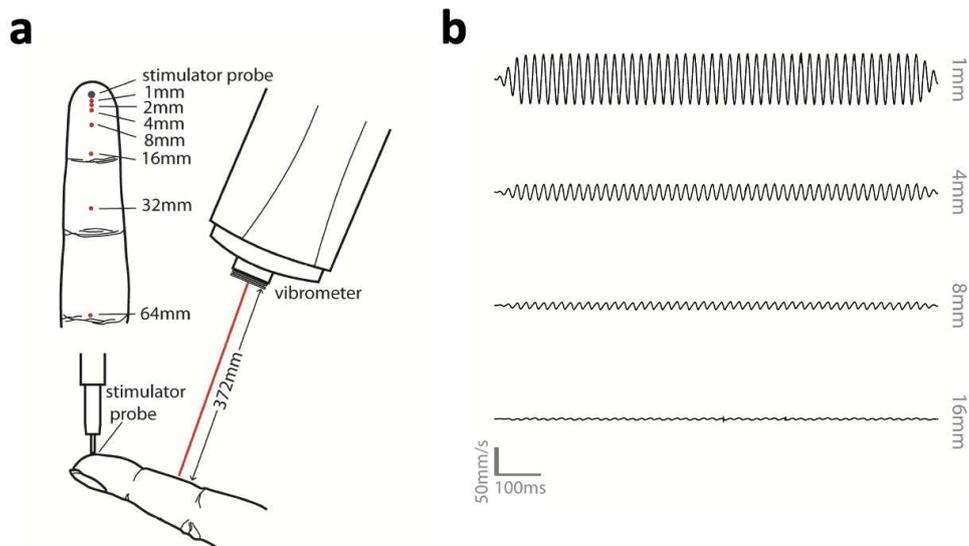


FIG. 1.6 Mise en évidence des propriétés de résonance de la peau humaine. a) Schéma de l'expérience : on impose une oscillation sinusoïdale ponctuelle au bout de doigt. Les amplitudes des vibrations de la peau à différentes distances du stimulus sont mesurées avec un vibromètre laser. b) Amplitude des vibrations au cours du temps à différentes distances du point d'application du stimulus pour une excitation sinusoïdale de fréquence 50 Hz.

Nous avons vu dans la Section 1.1.2 que les vibrisses des rongeurs possédaient des propriétés de résonance qui participent au mécanisme de transduction. De manière analogue, on peut supposer que les propriétés de résonance de la peau humaine elle-même joue un rôle similaire dans la transduction de l'information tactile. C'est en effet un aspect qui a été étudié par Manfredi *et al.* [38]. Ces derniers ont caractérisé la propagation d'ondes de vibration sur des doigts humains soumis à une indentation localisée, de fréquence et d'amplitude contrôlées (Fig. 1.6). Ils ont établi que pour

des fréquences de stimulation proches des fréquences propres de résonance de la peau, de l'ordre de  $250\text{ Hz}$ , la perturbation induite est la moins amortie et peut se propager sur des distances de l'ordre de la taille du doigt. Notons que cette fréquence correspond également au maximum de sensibilité des corpuscules de Pacini. Ce mécanisme s'ajoute à l'effet empreintes discuté plus haut et pourrait avoir des conséquences importantes sur la perception tactile, car il permettrait un recrutement de mécanorécepteurs situés loin de la zone de contact.

### 1.3.2 Les pores mécanosensibles

Au niveau microscopique, la capacité des mécanorécepteurs de mammifères à détecter les contraintes mécaniques dépend principalement de la présence sur leur membrane plasmique [39, 40, 41] d'assemblées de canaux ioniques activables sous contrainte mécanique appelés pores mécanosensibles. Ces derniers sont transmembranaires et de taille nanométrique et leurs changements de conformation, induits par une contrainte mécanique, produisent une modification de la perméabilité ionique de la membrane. La modification des flux d'ions à travers la membrane conduit à sa dépolarisation et déclenche *in fine* un potentiel d'action, dès que le potentiel membranaire dépasse le seuil requis pour déclencher ce potentiel d'action.

#### 1.3.2.1 La protéine responsable de la mécanosensibilité chez les mammifères : *Piezo*

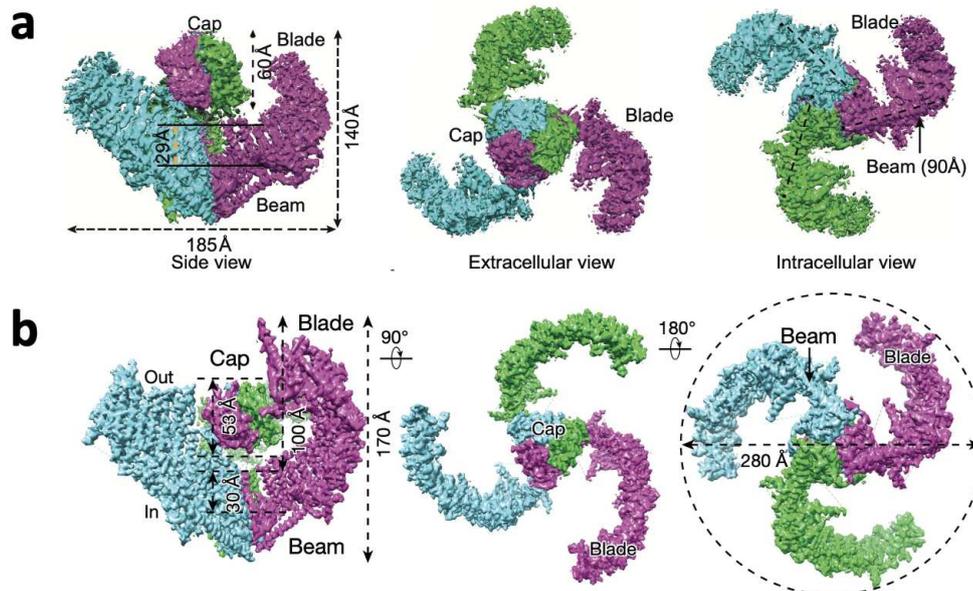


FIG. 1.7 a) Structure de *Piezo1* dans l'état fermé. Le pore transmembranaire est constitué de trois sous-unités, ici représentées avec trois couleurs différentes. Il mesure  $14\text{ nm}$  de long et  $18,5\text{ nm}$  de large. Reproduit de [42]. b) Structure de *Piezo2*. Le pore transmembranaire est constitué de trois sous-unités, ici également représentées avec trois couleurs différentes. Il mesure  $17\text{ nm}$  de long et  $28\text{ nm}$  de large. Reproduit de [43].

Les pores mécanosensibles responsables de la mécanosensibilité chez les mammifères appartiennent à la famille des protéines transmembranaires de type *Piezo*. La découverte de cette protéine par l'équipe d'Ardem Patapoutian en 2010 [44] a été récompensée en 2021 par le prix Nobel de

Physiologie et de Médecine. Le nom de la protéine *Piezo* vient du grec “piesi” qui signifie pression et elle est déclinée en deux protéines : *Piezo1* et *Piezo2*. Peu de temps après leur découverte, elles ont été décrites comme des pores mécanosensibles constitués de plusieurs sous-unités au même titre que l’alpha-hémolysine, une toxine produite par la bactérie *Staphylococcus aureus* et la protéine mécanosensible *MscL* présente chez la bactérie *Escherichia coli* que nous décrivons respectivement dans les Chapitres 2 et 4 [45]. A titre de comparaison, la protéine *Piezo* possède environ 2500 acides aminés [46], soit environ 20 fois plus que *MscL* [47]. Ce n’est qu’en 2018 et 2019 que les structures de *Piezo1* et *Piezo2* ont été respectivement décrites à l’aide de techniques de cryo-microscopie [42, 43]. Les deux structures sont composées de trois sous-unités qui une fois assemblées forment le pore mécanosensible avec une forme d’hélice (Fig. 1.7). *Piezo2* est 33 % plus large et 18 % plus long que *Piezo1*.

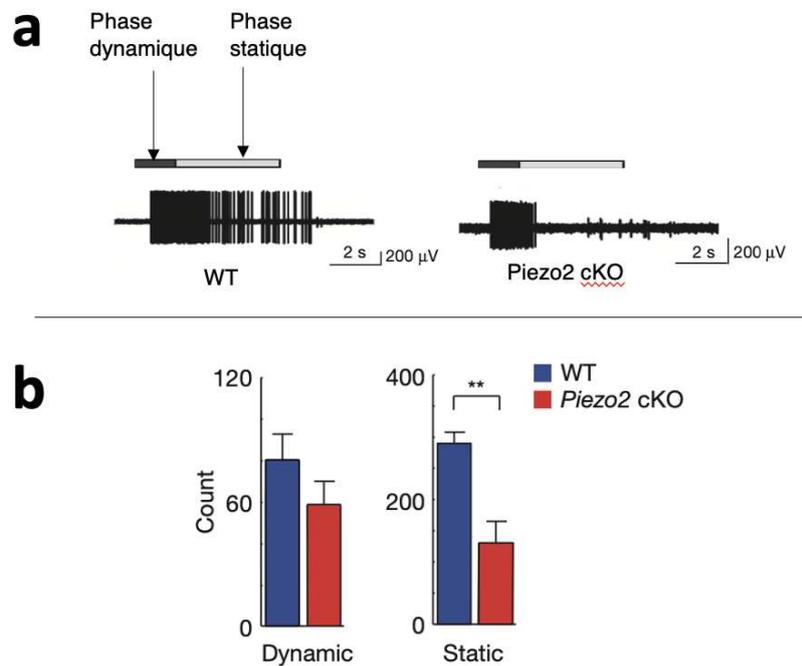


FIG. 1.8 a) Potentiels d’action activés lors d’une excitation mécanique d’une cellule de Merkel WT et *Piezo2* cKO en fonction du temps. Deux phases sont discriminées : la phase dynamique qui correspond au moment où l’on indente sur la cellule et la phase statique où l’on maintient l’indentation sur la cellule. b) Histogramme du nombre de potentiels d’action activés lors de l’expérience effectuée en (a). Les colonnes en bleu représentent le nombre de potentiels d’actions activés pour les cellules sauvages ( $N = 5$ ) et en rouge pour les cellules *Piezo2* cKO cKO ( $N = 6$ ). Reproduit de [48].

La protéine *Piezo1* est principalement requise dans le développement vasculaire [49, 50, 51] et lymphatique [52]. Il a également été découvert plus récemment que *Piezo1* était impliquée dans les mécanismes des démangeaisons cutanées chez la souris [53], mais celle-ci n’est pas exprimée à des niveaux élevés dans les neurones sensoriels. La protéine *Piezo1* ne semble donc pas être impliquée dans le sens du toucher chez l’Homme même si aujourd’hui cela ne peut pas encore être totalement exclu. A l’inverse, la protéine *Piezo2* est décrite comme le pore mécanosensible principal de la sensation de toucher [54] et de la proprioception consciente et inconsciente chez la souris [55]. Chez la

souris, la protéine *Piezo2* est exprimée dans les cellules de Merkel, et est activée lors de l'application d'une contrainte mécanique [48]. Pour le démontrer, Ardem Patapoutian et ses collaborateurs ont mesuré la réponse neuronale de complexes de Merkel chez des souris sauvages (WT) et des souris "knock-out" (*Piezo2 cKO*), *i.e* pour lesquelles l'expression de *Piezo2* a été inhibée. Ils ont notamment observé que le taux de décharge des potentiels d'action était considérablement réduit chez les souris *Piezo2 cKO* pendant la phase statique ("hold") d'expériences de type "ramp and hold" (Fig. 1.8), confirmant ainsi que la protéine *Piezo2* était sans doute possiblement l'origine moléculaire de la mécanosensibilité des cellules de Merkel chez la souris, et plus généralement chez les mammifères.

### 1.3.2.2 Mécanismes d'ouverture

Les mécanismes d'ouverture des pores mécanosensibles font encore débat aujourd'hui mais deux modèles sont dominants (Fig. 1.9b). Dans le premier modèle, la tension additionnelle dans la membrane lipidique due à une contrainte mécanique appliquée permet à elle seule d'ouvrir le canal d'un pore mécanosensible. Ce scénario est supporté par le fait qu'il est possible d'ouvrir une protéine mécanosensible transmembranaire insérée dans la membrane d'un liposome artificiel à l'aide d'une contrainte mécanique sans avoir besoin d'utiliser d'autres éléments biochimiques (Fig. 1.9b). Ce mode d'ouverture concerne entre autre la protéine mécanosensible *MscL* [56].

Le second modèle propose que la force transmise à la protéine mécanosensible ne provienne pas de la membrane mais de molécules liées à la protéine mécanosensible (Fig. 1.9b). Cette dernière possède un domaine de liaison sur lequel des structures moléculaires comme par exemple des microtubules peuvent se lier et transmettre une force qui augmente la probabilité d'ouverture de la protéine mécanosensible.

### 1.3.2.3 Reconstitution *in vitro* et seuils d'ouverture de *Piezo*

Pour identifier les mécanismes d'ouverture des protéines mécanosensibles sous contrainte mécanique, une des approches qui a été utilisée ces dernières années consiste à isoler et purifier la protéine que l'on veut étudier dans des membranes lipidiques modèles comme des liposomes ou des *Droplet Interface Bilayers* (DIB). Ce dernier système consiste à mettre en contact deux gouttelettes aqueuses qui baignent dans un mélange d'huile et de lipides [58] pour obtenir une bicouche lipidique plane. Ce système a été utilisé par Patapoutian *et al.* [59] pour démontrer que la protéine *Piezo1* ne nécessitait qu'une tension dans la membrane pour s'activer. En effet, à l'aide d'un choc osmotique, ils ont démontré que *Piezo1* est fonctionnelle dans des membranes reconstituées. Il est également aussi possible de former ce que l'on appelle une *Droplet Hydrogel Bilayer* (DHB) en utilisant plutôt une gouttelette aqueuse en contact avec un hydrogel, le tout baignant dans un mélange d'huile et de lipides. C'est cette dernière configuration qui a été utilisée par Martinac *et al.* [60] pour insérer, imager et mesurer avec une technique de type *patch-clamp* l'activité de la protéine *Piezo1-GFP* sous contrainte mécanique. Ces deux expériences suggèrent qu'une tension de la membrane bilipidique seule suffit donc pour ouvrir le canal *Piezo1* (voir la Section 1.3.2.2). Tout récemment, Xiao *et al.* [61] ont mis en évidence deux conformations structurales de *Piezo1* dans un liposome. La première dite *courbée* correspond à l'état fermé de la protéine. A l'inverse, la seconde dite *aplatie* intervient lors d'une tension membranaire et correspond à l'état activé de la

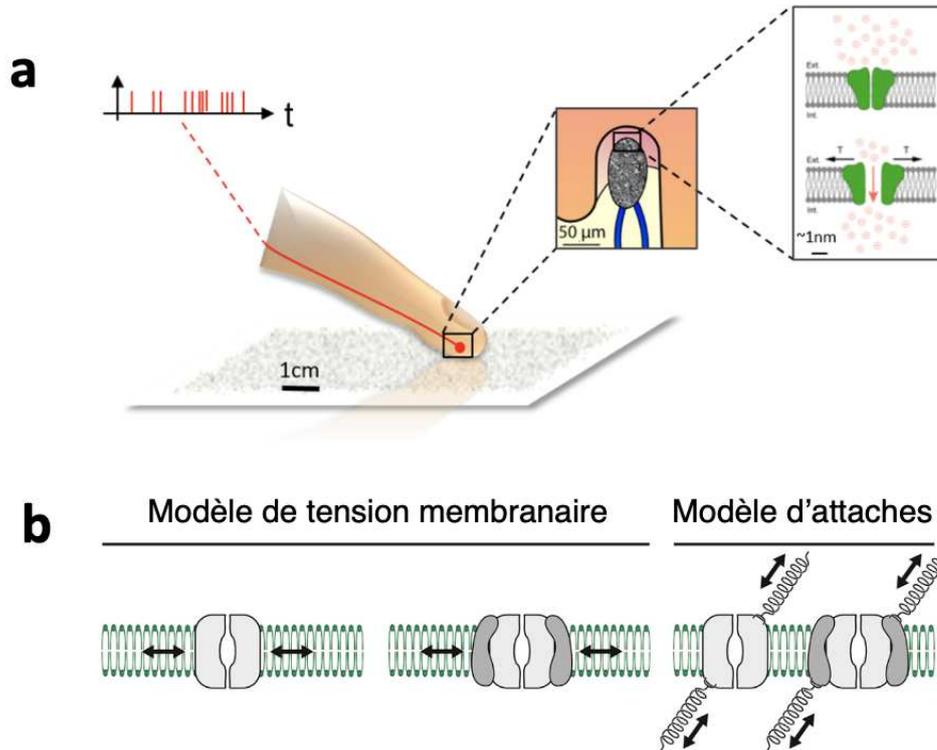


FIG. 1.9 a) Schéma d'un doigt touchant une surface. Dans l'encadré en haut à droite, on peut voir que lorsqu'un mécanorécepteur est excité mécaniquement (ici les cellules de Meissner), des pores mécanosensibles s'ouvrent. Cette ouverture laisse passer des ions, ce qui va induire une dépolarisation de la membrane et éventuellement un potentiel d'action qui se propage vers le cerveau. b) Représentation schématique des deux modèles d'ouverture des pores mécanosensibles. Adapté de [57].

protéine. Enfin, à noter qu'il existe une voie chimique d'activation de la protéine *Piezo1* sans excitation mécanique. En effet, les molécules *Yoda1* et *Jedi1* jouent un rôle d'agoniste sur cette protéine [62, 63, 64]. À l'inverse, la molécule *Dooku1* joue un rôle d'antagoniste [64, 65].

Ces expériences ont permis de déterminer un seuil d'ouverture de *Piezo1* égal à  $1,9 \text{ mN/m}$  ce qui est une valeur proche du seuil d'ouverture mesuré *in vivo* ( $5,1 \pm 0,2 \text{ mN/m}$ ) [66].

À ce jour, la protéine *Piezo2* qui est plus grosse que *Piezo1* n'a pas encore pu être isolée et son seuil d'ouverture n'a également pas été déterminé.

## 1.4 Objectifs de la thèse

L'objectif général de cette thèse est de mieux comprendre les processus de transduction mécanique aux échelles moléculaires, cellulaires et tissulaires en s'appuyant sur le développement de mécanorécepteurs modèles dont on cherchera à caractériser la réponse et les propriétés de filtrage à des stimuli mécaniques bien définis.

Comme nous l'avons dit plus haut dans la Section 1.3.2, le fonctionnement des mécanorécepteurs de mammifères repose sur l'existence de canaux ioniques mécanosensibles dans leur membrane plasmique.

Cependant, leurs propriétés d’ouverture restent encore mal comprises. En particulier, l’existence d’une contrainte mécanique seuil qui déclenche leur ouverture reste à établir, tout comme la relation entre une excitation dynamique et la distribution temporelle de leurs états “ouvert” et “fermé”. Pour le cas de la perception tactile, ce qui détermine la réponse fréquentielle des mécanorécepteurs à une stimulation mécanique vibratoire [39, 40], ainsi que leurs capacités d’adaptation lente ou rapide, n’est pas encore bien établi. De plus, des mesures et modélisations récentes [67] tendent à montrer que ce type de réponse serait dû au couplage entre la dynamique d’ouverture/fermeture des canaux mécanosensibles et la viscoélasticité du tissu environnant, qui déterminerait les propriétés de filtrage de ces récepteurs.

Pour tenter de répondre à ces différentes questions et avoir une meilleure compréhension des processus de mécanotransduction mis en jeu, l’approche souvent utilisée consiste à mesurer avec des techniques d’électrophysiologie de type “whole-cell” ou “patch-clamp” le courant ionique à travers les canaux mécanosensibles de mécanorécepteurs cultivés *in vitro* [68] et stimulés mécaniquement. La stimulation mécanique est généralement obtenue par indentation [69] avec une fine tige de verre ou par aspiration avec une micro-pipette, ou encore par étirement du substrat gélatiné sur lequel sont cultivés les mécanorécepteurs [70]. Elle est donc de fait localisée, relativement intrusive et susceptible de produire une réponse spatiale inhomogène d’un nombre inconnu de canaux mécanosensibles, ce qui en fait un mode d’excitation mal contrôlé. De plus, elle ne reproduit pas les conditions de stimulation qui existent *in vivo* où l’ensemble du tissu environnant transmet les contraintes mécaniques (ce qui pourrait vraisemblablement jouer un rôle important sur les propriétés de filtrage des mécanorécepteurs [68]). Enfin, les réponses rhéologiques/mécaniques des cellules sont connues pour être complexes et ne facilitent pas l’interprétation des mesures électrophysiologiques.

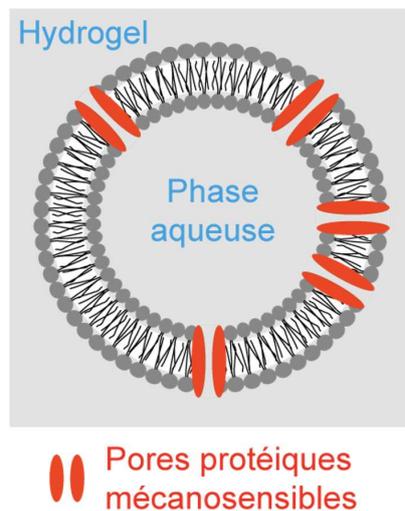


FIG. 1.10 Représentation schématique d’une vésicule décorée de pores mécanosensibles (rouge) piégée dans un hydrogel.

Pour contourner cette complexité inhérente aux systèmes cellulaires *in vitro* tout en ayant une excitation mécanique réaliste, nous avons choisi pour ce travail de thèse d’utiliser une approche *biomimétique*, à l’image de celle qui a été développée précédemment au Laboratoire Jean Perrin pour comprendre la mécanotransduction à l’échelle de l’organe tactile [37, 71, 72, 73, 12, 13]. L’idée maîtresse de mon travail a été de mettre au point des mécanorécepteurs artificiels dont le fonctionnement se rapproche de celui des mécanorécepteurs biologiques. L’un d’eux consiste en

une vésicule, ou plus exactement une pseudo-vésicule (puisque celle-ci possède, comme nous le verrons, un petit “chapeau” d’huile résiduelle), dont la membrane lipidique peut être fonctionnalisée avec des pores protéiques mécanosensibles ou non et qui est piégée dans un hydrogel qui mime l’environnement extracellulaire. Ce système a l’avantage de pouvoir être stimulé mécaniquement dans des conditions réalistes, analogues à celles qui existent lors de l’exploration entre un vrai doigt et une surface, en formant à la surface du gel un contact frottant sous charge normale et vitesse imposées. L’autre version de capteur artificiel que nous avons mis au point a consisté en une cavité sphérique (gazeuse ou liquide) noyée dans une matrice d’élastomère. Ce capteur, plus simple et stable dans le temps comparé à sa version “vésiculaire”, a permis de comprendre et modéliser comment les contraintes et les déformations s’exercent au niveau du mécanorécepteur et dans son environnement immédiat. Il a également été mis à profit pour étudier sa réponse en frottement contre des surfaces texturées modèles, permettant au passage une re-visite de l’effet empreintes avec un système différent [37, 71].

Le manuscrit de ce travail de thèse s’articule autour de trois chapitres principaux.

Dans le **Chapitre 2**, nous présentons le développement d’une nouvelle méthode pour produire des pseudo-vésicules dans un hydrogel. La méthode que nous avons mise au point a l’avantage d’être reproductible et ne nécessite que l’usage d’une simple micropipette. Elle permet également d’encapsuler au sein de la vésicule du matériel biologique (protéines) et chimique (fluorophores). Cela nous a permis de démontrer la possibilité d’insérer dans la membrane lipidique de la vésicule des protéines transmembranaires de type alpha-hémolysine qui forment de simples trous nanométriques ouverts en permanence. En imageant la perte de fluorescence de fluorophores initialement présents dans la vésicule, nous avons démontré notre capacité à fonctionnaliser la membrane lipidique de la pseudo-vésicule.

Fort de ce travail qui a permis de poser les premières briques essentielles pour le développement d’un mécanorécepteur entièrement fonctionnel, nous avons cherché à modéliser les contraintes et déformations membranaires du mécanorécepteur, lorsque la surface de la peau est indentée ou frottée. Pour cela nous avons utilisé des modèles de cavités enfouies dans un milieu élastique, d’un point de vue à la fois théorique et expérimental. En effet, pour s’affranchir de la complexité biologique et des contraintes de stabilité de notre mécanorécepteur artificiel, nous avons développé des systèmes biomimétiques purement mécaniques, faits d’une cavité sphérique (gazeuse ou liquide) noyée dans un élastomère (PDMS) et stimulé mécaniquement sous simple compression uniaxiale d’une part et en frottement contre des surfaces texturées d’autre part. L’ensemble de ces résultats sont présentés et discutés dans le **Chapitre 3**.

Le manuscrit se poursuit avec le **Chapitre 4** dans lequel nous présentons nos premiers essais pour se rapprocher du fonctionnement d’un mécanorécepteur réel. Pour cela, nous avons incorporé dans la pseudo-vésicule piégée dans un hydrogel le nanopore mécanosensible *MscL* qui provient de la bactérie *Escherichia coli* et lui permet de se prémunir contre les chocs osmotiques. Nous avons tiré parti de techniques de biologie synthétique (systèmes “cell free”) que j’ai notamment apprises dans le cadre d’un séjour aux Etats-Unis dans le groupe de Vincent Noireaux, à l’Université du Minnesota, pour exprimer *in vitro* cette protéine. Nous décrirons dans ce Chapitre les protocoles

que nous avons mis en place pour exprimer et incorporer des protéines mécanosensibles dans nos pseudo-vésicules et s'assurer de leur stabilité. Des mesures préliminaires de fuite de fluorophores à travers la membrane seront présentées.

Le manuscrit de thèse se termine par le **Chapitre 5** en guise de conclusion et nous y présentons les perspectives de ce travail pour les années futures.



# Chapitre 2

## Un mécanorécepteur biomimétique : la pseudo-vésicule

### 2.1 Introduction

#### 2.1.1 Un système modèle de cellule : la vésicule

##### 2.1.1.1 La membrane plasmique

La membrane plasmique délimite le milieu intracellulaire d'une cellule de son environnement. Cette membrane est principalement constituée de lipides, qui représentent environ la moitié de la masse membranaire. Les phospholipides ont une structure amphiphile grâce à une tête hydrophile et une queue hydrophobe, ce qui leur permet de s'auto-arranger en bicouches lipidiques formant la structure de base des parois et compartiments cellulaires. La membrane plasmique comporte également une quantité importante de protéines ancrées dans la bicouche, comme schématisé figure 2.1. La membrane plasmique est asymétrique, en effet on ne retrouve pas les mêmes types de lipides dans le feuillet interne et externe de la bicouche lipidique. Les glycolipides par exemple se trouvent toujours dans le feuillet externe de la membrane, à l'inverse des phospholipides à tête choline qui sont préférentiellement dans le feuillet interne (Fig2.1) [74]. Cette asymétrie de composition engendre une asymétrie des charges électriques. Cette répartition des charges est notamment nécessaire au fonctionnement de certaines protéines [75].

La membrane plasmique est une entité dynamique. En effet, les lipides sont mobiles et peuvent diffuser le long de la membrane. Le coefficient de diffusion latéral d'un lipide est de l'ordre de  $1 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$  dans une membrane plasmique [76]. Cependant les coefficients de diffusion varient localement sur les membranes cellulaires reconstituées à partir de mélanges de lipides, entre  $0,07 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$  et  $4,4 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ . Les protéines transmembranaires diffusent également. Le coefficient de diffusion de protéines transmembranaires est compris entre  $5 - 10 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$  dans la membrane plasmique des cellules [77] et autour de  $11,7 \pm 0,7 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$  dans des membranes artificielles [78]. Ces résultats nous montre que la présence de structures dans la membrane plasmique permet de moduler localement la diffusion de lipides et de protéines à la surface des cellules [79, 80].

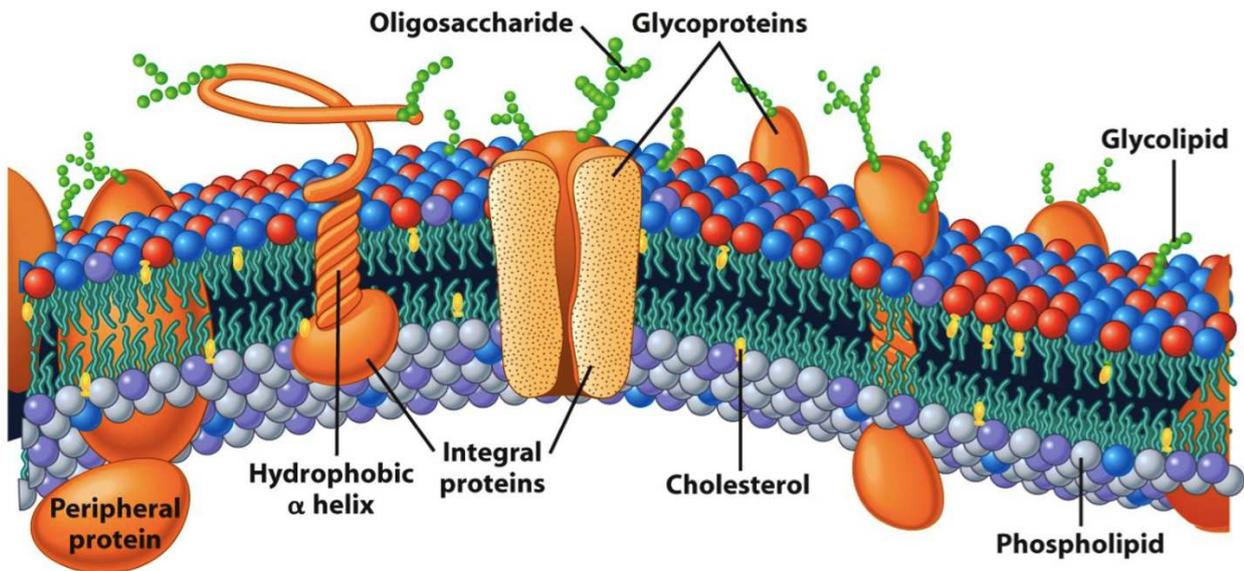


FIG. 2.1 Représentation schématique de la composition d'une membrane biologique. Différents types de protéines sont ancrés dans la membrane, contenant des phospholipides et du cholestérol. Les protéines peuvent être situées dans un seul feuillet, traverser la bicouche entière ou encore y former un pore. Reproduit de [81].

### 2.1.1.2 Membranes modèles

Afin d'étudier les propriétés des membranes dans un contexte simplifié, il est nécessaire de reconstituer *in vitro* des membranes modèles à partir d'un nombre limité de phospholipides purifiés. Nous allons à présent présenter les lipides qui sont les principaux constituant des membranes modèles que nous utiliserons par la suite. Les lipides phosphatidylcholines sont l'une des formes de lipides les plus répandues dans la nature [82, 83], comme par exemple le DOPC (1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine), qui est très utilisé pour la reconstitution de membranes modèles. DPhPC (1,2-diphytanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine) fait également partie de cette famille et est un lipide que nous utiliserons. Il a la particularité de former des structures lipidiques stables qui résistent à des contraintes mécaniques extérieures, des températures élevées (supérieures à 100°C) et à des courants électriques ce qui en font un bon candidat pour des mesures de mécanique et d'électrophysiologie [84, 85, 86, 87]. Ce sont des lipides globalement neutres, de forme zwitterionique : les têtes hydrophiles possèdent un groupe choline chargé positivement et un groupe phosphate chargé négativement [88]. Les phosphatidylglycerol comme DOPG (1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoglycerol) ne représentent que 1% en mole des phospholipides membranaires mais en sont un élément essentiel grâce à une charge nette négative sur leur tête polaire [82]. Ces propriétés ioniques permettent notamment d'inhiber les transferts de phosphatidylcholines entre les membranes et donc leurs fusions [89].

Le cholestérol provient d'une autre catégorie de lipides : les stéroïdes et il a une masse molaire deux fois plus petite que les lipides présentés précédemment. En raison de son petit volume et de ses fortes interactions hydrophobes avec les acides gras, le cholestérol augmente la densité et la rigidité de la membrane [90]. Il diminue également la fluidité membranaire de 10% à 20% [91, 92], ce qui entraîne une diminution de la mobilité des protéines transmembranaires de 20% [93].

Lorsque des lipides sont dans une solution aqueuse, ils peuvent spontanément créer des struc-

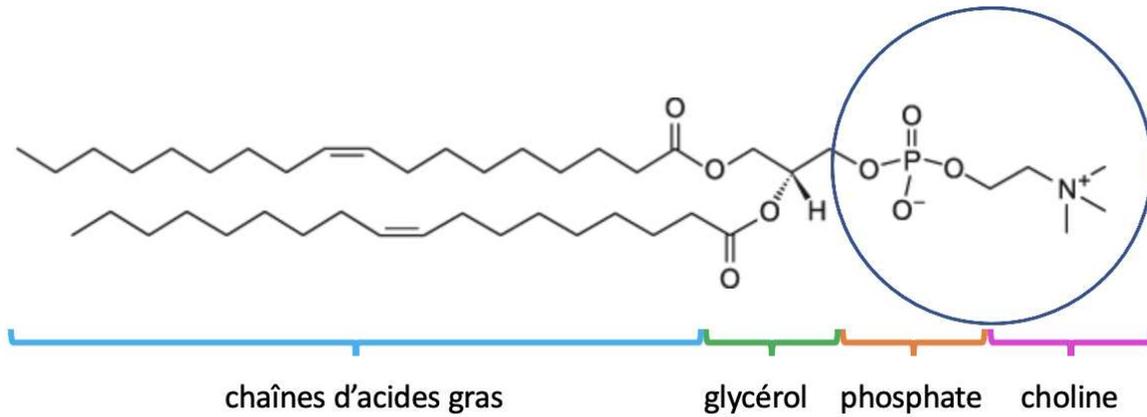


FIG. 2.2 Schéma d'un phospholipide (DOPC). La tête polaire est composée du phosphate et d'un groupement polaire : la choline ici (magenta). En bleu sont représentées les deux queues hydrophobes d'acides gras. Le cercle représente la tête hydrophile du lipide.

tures qui "protègent" les chaînes carbonées hydrophobes comme des micelles (Fig 2.3c), des liposomes (Fig 2.3d) ou des bicouches lipidiques planes (Fig 2.3e). Ces structures permettent de diminuer l'enthalpie libre du système et sont déterminées par la structure chimique des lipides selon la théorie de Israelachvili [94] qui établit un paramètre d'empilement  $\alpha$  suivant :

$$\alpha = \frac{V}{LS} \quad (2.1)$$

avec le volume  $V$  des chaînes carbonées de longueur  $L$  et  $S$  la surface de la tête polaire. Si  $\alpha$  est inférieur à 1 alors la structure privilégiée est la micelle. Si  $\alpha$  est supérieur à 1 alors une micelle inverse (les chaînes carbonées vers l'extérieur) est formée. Si  $\alpha$  est environ égal à 1 alors une bicouche lipidique est assemblée.

Les liposomes sont des bicouches lipidiques refermées sur elles-mêmes et sont utilisés très largement comme modèle de compartiment cellulaire. D'autres types de membranes modèles peuvent également mimer la compartimentation cellulaire mais dans une autre géométrie : il s'agit des *Droplet Interface Bilayers* ou DIBs (Fig. 2.4a,b), qui sont des bicouches planes séparant des gouttes aqueuses (Fig. 2.4c). Ces systèmes ont été utilisés au laboratoire Jean Perrin pour étudier les processus physiques liés à la communication intercellulaire [96] (Fig. 2.4d).

### 2.1.1.3 Liposomes et applications

Les liposomes, ou vésicules lipidiques, ont été produits pour la première fois en Angleterre en 1961 par A.D Bangham [97]. Ils sont classifiés selon trois grandes catégories de taille :

- Les SUVs (Small Unilamellar Vesicles) pour un diamètre compris entre 20 nm et 100 nm
- Les LUVs (Large Unilamellar Vesicles) pour un diamètre compris entre 100 nm et 1  $\mu$ m
- Les GUVs (Giant Unilamellar Vesicles) pour un diamètre supérieur à 1  $\mu$ m

Les vésicules lipidiques constituent un modèle cellulaire simplifié *in vitro*. Ces systèmes ont ainsi permis de reconstituer certaines fonctions biologiques dans une géométrie similaire à celle d'une cellule mais dans un contexte largement simplifié. Par exemple, différentes structures d'actine ont

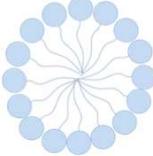
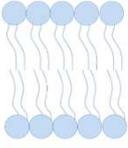
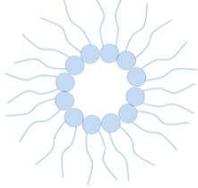
Lipides	V/l.S	Forme	Phase
Chaînes courtes Détergents Lysophospholipides	$< 1/3$	Cône 	Micelle 
Lipides à deux chaînes, tête polaire encombrante (PC, SM, PS, PI, PG, PA)	$\sim 1$	Cylindre 	Bicouche 
Tête polaire peu encombrante, chaînes insaturées (PE chaînes insaturées)	$> 1$	Cône inverse 	Micelle inverse 

FIG. 2.3 Assemblages des lipides en fonction du paramètre d'empilement  $\alpha = \frac{V}{LS}$  selon le modèle d'Israelachvili reproduit de [95].

été étudiées dans des liposomes [98, 99, 100], permettant d'étudier leur rôle spécifique dans certains processus tels que l'entrée de toxine dans les cellules [101]. Les liposomes peuvent également être manipulés afin de créer des zones de forte courbure [102], ce qui permet en retour d'étudier l'effet de la courbure sur la fonctionnalité de certaines protéines [103] ou sur des processus de fission membranaire [104]. Dans le même ordre d'idée, la reconstitution de protéines membranaires dans ces systèmes permet d'étudier leur fonctionnement dans un contexte simplifié et de s'affranchir de la complexité cellulaire [105]. Par exemple, le complexe ESCRT, impliqué dans la fission membranaire, a été étudié dans des membranes modèles [106, 107], ainsi que le complexe Snare, qui est quant à lui impliqué dans la fusion membranaire notamment lors de l'autophagie de cellules eucaryotes.

Les liposomes sont également d'un intérêt majeur dans le domaine de la recherche médicale et la R&D. L'encapsulation d'un agent actif dans un liposome permet en effet de préserver sa fonctionnalité et de le protéger des contraintes environnementales [108]. En médecine, les liposomes sont notamment utilisés pour encapsuler des agents de contraste en radiologie [109] ou un agent antigène en immunologie [110]. De même, dans l'industrie agro-alimentaire, les protéases utilisées pour l'affinage du fromage peuvent être protégées en les encapsulant dans des liposomes afin de maintenir leur activité et d'optimiser ce processus [111, 112, 113]. Enfin dans l'industrie cosmétique, l'utilisation de liposomes permet de protéger des molécules réactives et donc fragiles, telles que les anti-oxydants, pour maintenir leur activité jusqu'à leur action dermatologique [114].

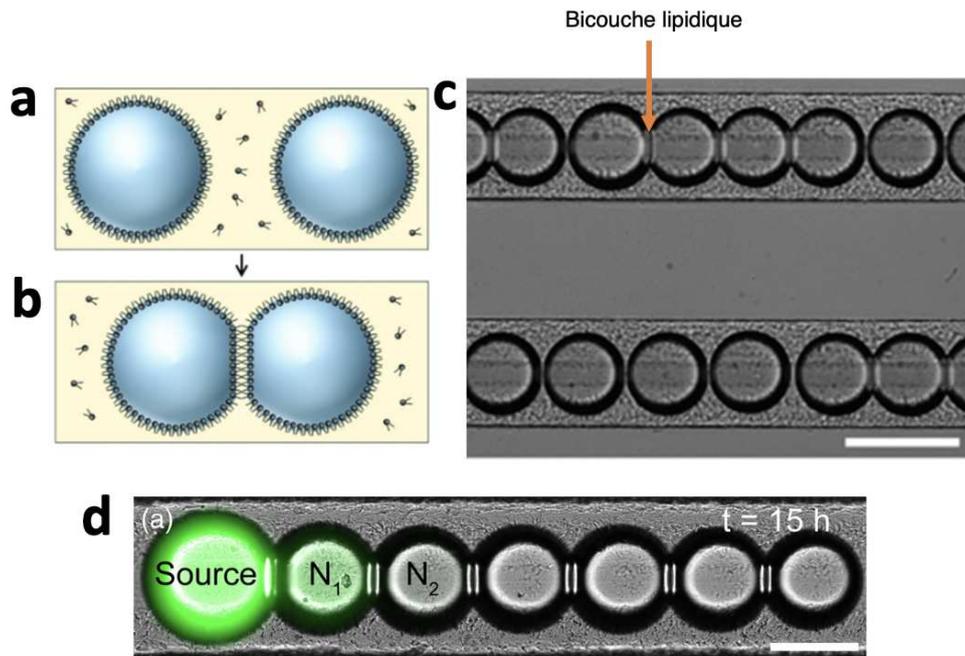


FIG. 2.4 a) Schéma d'une émulsion de gouttes aqueuses dans une phase organique contenant des phospholipides qui s'arrangent en monocouche autour de chaque goutte. b) Au contact entre les deux gouttes les lipides s'assemblent en bicouche lipidique et forment une DIB. c) Image au microscope d'un réseau 1D de DIBs. La barre d'échelle mesure  $200\ \mu\text{m}$ . d) Image en épifluorescence de la diffusion de carboxyfluorescéine dans un réseau de DIBs décorées par des canaux passifs transmembranaires. La barre d'échelle mesure  $100\ \mu\text{m}$ . Reproduit de [96].

## 2.1.2 Méthodes de formation de vésicules géantes (GUVs)

### 2.1.2.1 Méthodes d'hydratation et électroformation

Dans les méthodes traditionnelles d'hydratations, un film de lipides séchés est solubilisé dans un solvant aqueux ce qui mène à la formation spontanée de structures lipidiques. Comme la formation de ces structures n'est pas contrôlée, cette méthode mène à des solutions de vésicules très polydisperses et souvent multilamellaires [115, 116].

L'électroformation est l'une des méthodes de formation de vésicules lipidiques les plus communes. Elle fut inventé par Angelova et Dimitrov en 1986 [117] et permet de former des structures unilamellaires en contrôlant le gonflement des membranes sous l'action d'un champ électrique. Ainsi, des lipides, préalablement séchés sur deux lames conductrices d'oxyde d'indium-étain (ITO), sont réhydratés sous un champ alternatif (Fig. 2.5a) [118]. Des vésicules géantes apparaissent spontanément dans la solution de réhydratation (Fig. 2.5b), avec des tailles typiques comprises entre 10 et  $100\ \mu\text{m}$ .

Pour ces deux méthodes, la phase interne de la vésicule étant la même que la phase externe, une étape de rinçage ou de transfert est nécessaire pour différencier l'intérieur de l'extérieur et encapsuler une molécule d'intérêt. Ces étapes de lavage supplémentaires sont donc un inconvénient lorsque la molécule d'intérêt est disponible en faibles quantités, comme c'est le cas pour les protéines purifiées. De plus, l'électroformation n'est pas adaptée à l'utilisation de protéines fragiles qui

peuvent être endommagées sous l'action d'un champ électrique. Enfin, l'électroformation est difficilement réalisable dans des milieux concentrés en sels, nécessaires, par exemple, pour des mesures d'électrophysiologie. Cependant pour des proportions de lipides chargés négativement plus importante dans le mélange de lipide ( $\approx 15 \text{ mol}\%$ ) [119], il est possible d'électroformer des vésicules à des concentrations de sel physiologiques ( $\approx 100 \text{ mM KCl}$ ) ce qui permet de créer un modèle de vésicules biomimétiques plus proche des conditions physiologiques.

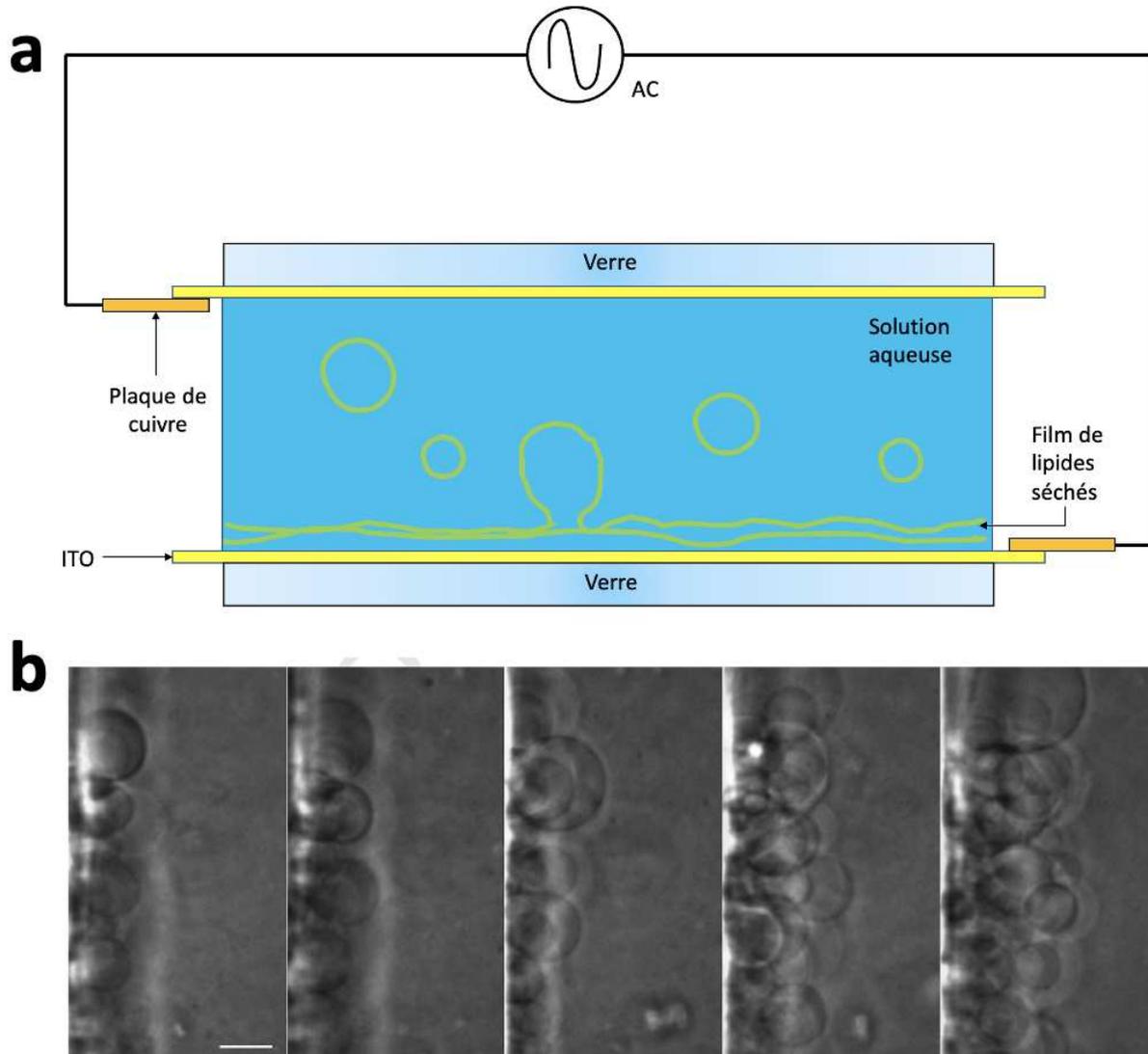


FIG. 2.5 a) Schéma d'un dispositif d'électroformation. Entre deux plaques d'ITO (jaune) un courant alternatif est appliqué. Des vésicules géantes de tailles dispersées apparaissent spontanément. b) Production de GUV au cours du temps. L'image de gauche est à  $t \approx 0$ , l'image de droite est à  $t = 30 \text{ minutes}$ . La barre d'échelle représente  $10 \mu\text{m}$ . Reproduit de [118].

### 2.1.2.2 Méthodes microfluidiques

Les méthodes microfluidiques permettent de produire une large quantité de vésicules de taille contrôlée et monodisperse [120]. Les puces microfluidiques étant formées dans un élastomère de

polydiméthylsiloxane (PDMS) transparent (Fig. 2.6a), elles permettent d'observer en temps réel par des techniques de microscopie classiques la formation de vésicules dans de telles géométries.

La formation de vésicules en microfluidique repose généralement sur deux étapes : une première étape lors de laquelle des gouttes d'eau sont formées dans un mélange d'huile et de lipides, puis une deuxième étape permettant de former une émulsion double eau/huile/eau. Pour former initialement des gouttes de taille contrôlée, un canal contenant une première phase aqueuse rencontre un ou deux canaux d'huile à une jonction T ou focalisée (Fig. 2.6b,c). Le flux de phase aqueuse est déstabilisé en gouttes par le flux d'huile arrivant des autres canaux. L'huile contenant des phospholipides, les gouttes formées sont stabilisées par une monocouche de lipides. Ces gouttes rencontrent ensuite une nouvelle jonction avec des canaux contenant une deuxième phase aqueuse afin de former une double émulsion. Cette deuxième étape permet donc l'encapsulation directe d'une phase aqueuse interne distincte de la phase aqueuse externe dans laquelle baignent les gouttes (Fig. 2.6d). Des méthodes physico-chimiques ont été développées pour enlever l'excès d'huile de la double émulsion par démouillage, formant ainsi une vésicule lipidique [121].

L'utilisation d'une puce microfluidique permet donc de produire une large quantité de vésicules lipidiques de tailles contrôlées avec une encapsulation directe d'une phase interne d'intérêt. Cependant la fabrication des puces microfluidiques requiert l'utilisation d'installations spécifiques, et la régulation des flux dans les canaux nécessite, en pratique, plusieurs dizaines de microlitres de solution.

### 2.1.2.3 Autres méthodes d'encapsulation

Une méthode présentée par Funakoshi et ses collaborateurs consiste à produire un jet à l'aide d'une buse microfluidique à travers une bicouche lipidique plane pour former des GUVs d'environ  $600\ \mu\text{m}$  [123]. L'encapsulation d'agents actifs est ici assurée par l'utilisation d'une phase interne (dans le jet) distincte de la phase externe (de l'autre côté de la membrane par rapport à la buse) (Fig. 2.7a). Cependant les contraintes de cisaillement étant importantes, certaines molécules biologiques fragiles comme les protéines peuvent être dégradées et perdre leurs fonctions pendant la formation de la vésicule.

Une autre méthode ne nécessitant que très peu de phase interne consiste à former manuellement une émulsion inverse de gouttes d'eau dans une huile contenant des phospholipides [124, 125]. Les gouttes d'eau ainsi formées sont stabilisées par une monocouche de phospholipides. Cette émulsion est ensuite versée dans un tube au dessus d'une deuxième phase aqueuse, permettant de former une deuxième monocouche de phospholipides à cette nouvelle interface plane eau/huile. Le tube est enfin centrifugé pour forcer les gouttes à traverser cette deuxième interface et ainsi former une bicouche lipidique autour de chaque goutte dans l'émulsion (Fig. 2.7b). Cette méthode permet de limiter les volumes de phase interne utilisés à quelques microlitres et préserve également également la fonctionnalité des molécules encapsulées grâce à une émulsification manuelle douce [126, 98].

## 2.1.3 Création d'un nouveau modèle membranaire

A travers ce chapitre nous allons présenter une nouvelle méthode de formation de vésicules ne nécessitant que peu de moyens techniques (seule une micropipette est requise), produisant des vésicules de taille contrôlée et permettant l'encapsulation directe de molécules d'intérêt avec de très

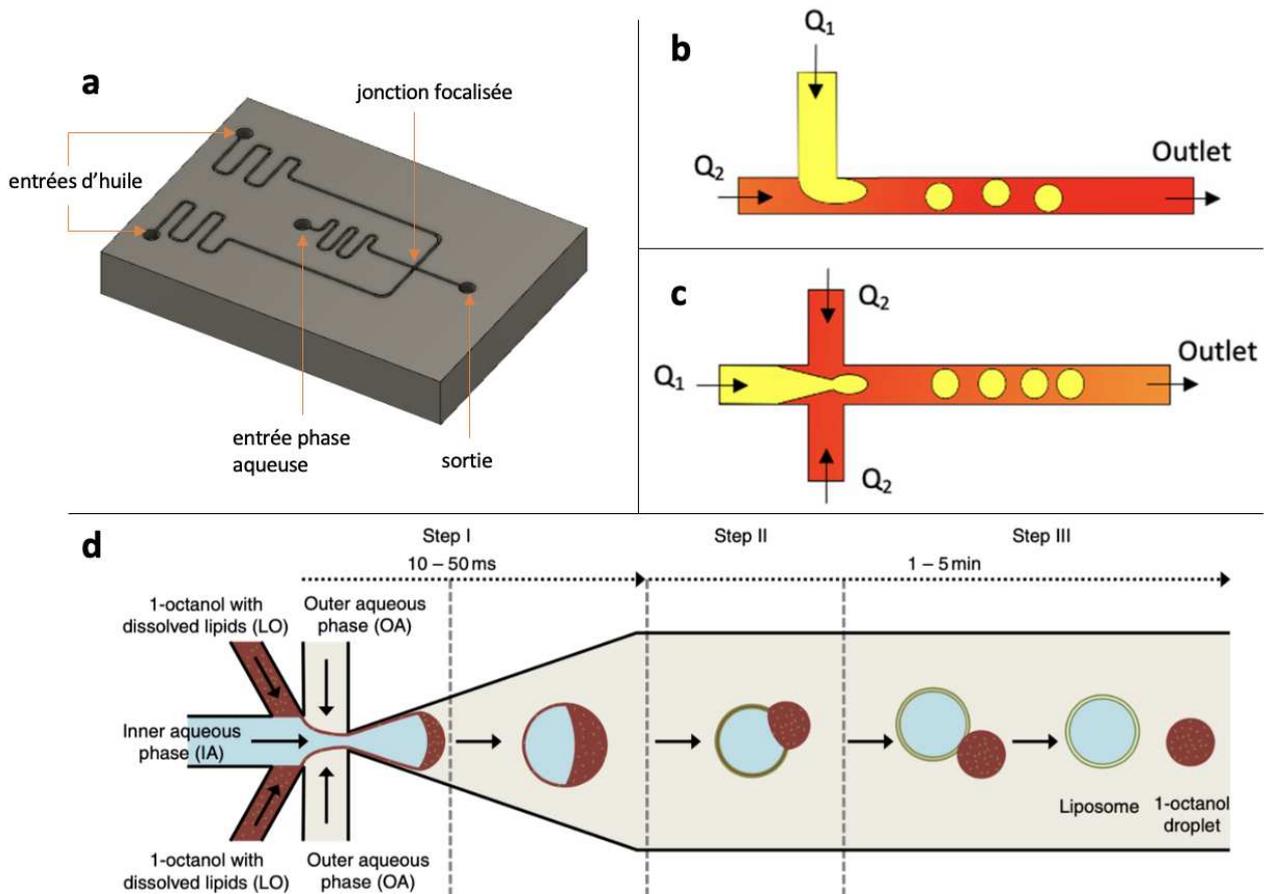


FIG. 2.6 a) Schéma d'une puce microfluidique avec deux entrées pour le solvant organique et une entrée pour la solution aqueuse. A la rencontre entre les trois canaux, nous avons une focalisation en flux comme décrite en (c). b) Schéma d'une jonction T,  $Q_1$  représente le flux de la solution aqueuse et  $Q_2$  représente le flux de la solution organique, reproduit de [122]. c) Schéma d'une focalisation en flux reproduit de [122]. d) Schéma d'un écoulement microfluidique reproduit de [121], en bleu une phase interne croît à travers un film de phase d'huile et de lipides (rouge) et est séparée par une phase externe (beige) grâce à une focalisation en flux. L'excès d'huile démouille ensuite grâce à la présence d'octanol et un liposome fait son apparition.

faibles volumes de solution interne.

Dans un second temps, nous montrerons comment nous avons pu fonctionnaliser la membrane de ces objets avec des protéines transmembranaires. Puis nous décrirons des expériences d'excitation mécanique sur la membrane des vésicules. En effet, dans le but de créer un modèle de mécanorécepteur, il est important que la vésicule formée soit excitable mécaniquement.

Enfin nous aborderons les limites de notre système en proposant de possibles améliorations.

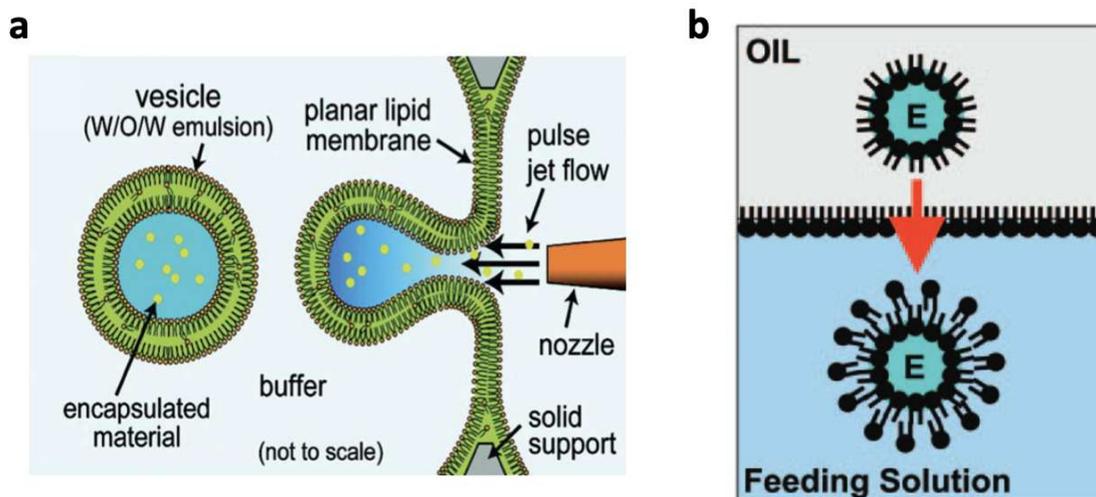


FIG. 2.7 Schémas de méthodes d'encapsulation dans des vésicules. a) La buse microfluidique envoie un jet de phase interne sur la bicouche lipidique plane et impose une contrainte mécanique à la membrane qui va se courber jusqu'à la formation d'une vésicule. Reproduit de [127]. b) L'émulsion de phase aqueuse et d'huile est ajoutée au-dessus de une solution autre solution aqueuse (feeding solution); les microgouttelettes sont stabilisées par une monocouche de phospholipides tandis qu'une autre monocouche se forme à l'interface de la solution biphasique. Les vésicules se forment après centrifugation à travers l'interface (la flèche indique le sens de la centrifugation). Schéma reproduit de [126]

## 2.2 La pseudo-vésicule en trois phases

### 2.2.1 Phase lipidique

Un soin tout particulier a été apporté à la composition de la phase lipidique. En effet il a été vu qu'un mélange de DOPC, de DPhPC, de DOPG et de Cholestérol permettait de stabiliser des bicouches lipidiques planes dans des géométries de type DIB [128]. C'est ce mélange que nous avons choisi d'utiliser dans nos expériences.

Les mélanges de lipides sont faits sous hotte et les lipides solubilisés dans du chloroforme sont manipulés avec des seringues Hamilton® en verre. La préparation lipidique est constitué de 4 mM de DOPC, 0,5 mM de DPhPC, 0,25 mM de DOPG et 0,25 mM de cholestérol. Ce mélange de lipides est ensuite séché dans un flacon en verre avec de l'azote puis scellé. Ce mélange peut alors être conservé à -20°C pendant plusieurs mois.

Avant utilisation, les lipides secs sont suspendus dans un mélange d'hexadécane et d'huile silicone AR20 1 :1 v/v. Ce ratio semble être le meilleur compromis entre un bon (hexadécane) et un mauvais solvant (huile silicone AR20) pour assurer la stabilité des vésicules [129]. En effet un bon solvant organique permet de solubiliser les lipides dans l'huile tandis qu'un mauvais solvant permet de favoriser la localisation des lipides aux interfaces eau/huile, ce qui est nécessaire à la formation d'une bicouche par la suite. Cette solution est placée dans un bain à ultrasons pendant 30 minutes. Une durée de conservation de trois jours semble correcte pour garder le maximum d'efficacité de notre mélange de lipides lors des expériences.

## 2.2.2 Phases aqueuses

### 2.2.2.1 Phase interne

La phase interne est composée de 400 *mM* de sucrose, 10 *mM* de Tris, 50 *mg/mL* de dextran et 20  $\mu$ *M* de carboxyfluoresceine. La présence de sucrose pouvant entraîner des contaminations bactériennes rapides, il est préconisé de ne garder la solution décongelée qu'un seul jour. Le pH de la solution est équilibré à 7.7 à l'aide d'un ph-mètre (Mettler Toledo).

### 2.2.2.2 Phase externe

La phase externe doit remplir deux critères. Tout d'abord son osmolarité doit équilibrer celle de la phase interne pour éviter les chocs osmotiques qui pourraient compromettre l'efficacité de l'encapsulation. De plus, elle doit permettre de localiser les vésicules produites dans un gel excitable mécaniquement. Dans ce but, elle est constituée de 3% d'agarose low melting, de 200 *mM* de chlorure de potassium (KCl) et de 10 *mM* de tris. Le pH de la solution est équilibré à 7.7. La solution gélifiée peut être gardée à température ambiante pendant plusieurs mois. Avant une expérience, elle est chauffée au micro-onde pour redevenir liquide et la solution est placée sur une plaque chauffante réglée à 50°C.

### 2.2.2.3 Équilibre osmotique

La pression osmotique de la phase interne a été mesurée à l'osmomètre et est de 600 *mOsm*. Pour assurer l'équilibre osmotique de notre système, il faut que l'osmolarité de la phase externe soit également égale à 600 *mOsm*. Malheureusement l'utilisation de l'osmomètre nécessite une solution en équilibre métastable liquide à -6,2°C. La phase externe étant composée d'agarose cela rend l'utilisation de l'osmomètre impossible dans ces conditions. Nous avons donc testé empiriquement l'osmolarité de la phase interne pour laquelle la vésicule formée était le plus stable. Il en ressort qu'une osmolarité de 383 *mosm* pour la phase externe avant l'ajout d'agarose permettait d'optimiser la stabilité.

## 2.3 Formation des pseudo-vésicules

Le système modèle est formé à l'aide d'une micropipette de 2  $\mu$ *L*. Dans un premier temps on aspire une quantité importante de phase aqueuse interne (quelques microlitres) puis 50 *nL* de phase lipidique (Fig. 2.8a,b). Nous avons donc dans notre micropipette un tronçon de phase interne (aqueuse) au-dessus d'un tronçon de phase lipidique, que l'on déplace dans de l'agarose liquide. En appuyant sur le piston de la micropipette, une goutte se forme au bout du cône (Fig. 2.8c). Si l'on continue d'appuyer sur le piston, une goutte de phase interne se loge dans la goutte de phase lipidique (Fig. 2.8d,e). Enfin en remontant la micropipette, la double émulsion qui vient d'être formée est détachée du cône sous l'effet des frottements visqueux de l'agarose.

Après quelques minutes, l'agarose gélifie et piège la double émulsion. Cette dernière voit sa phase lipidique crémer à son sommet et devient une pseudo-vésicule (Fig. 2.9), c'est-à-dire une vésicule avec un "chapeau" d'huile. Les pseudo-vésicules ainsi formées ont un diamètre de  $601 \pm 60 \mu$ *m* ( $N = 98$  pseudo-vésicules).

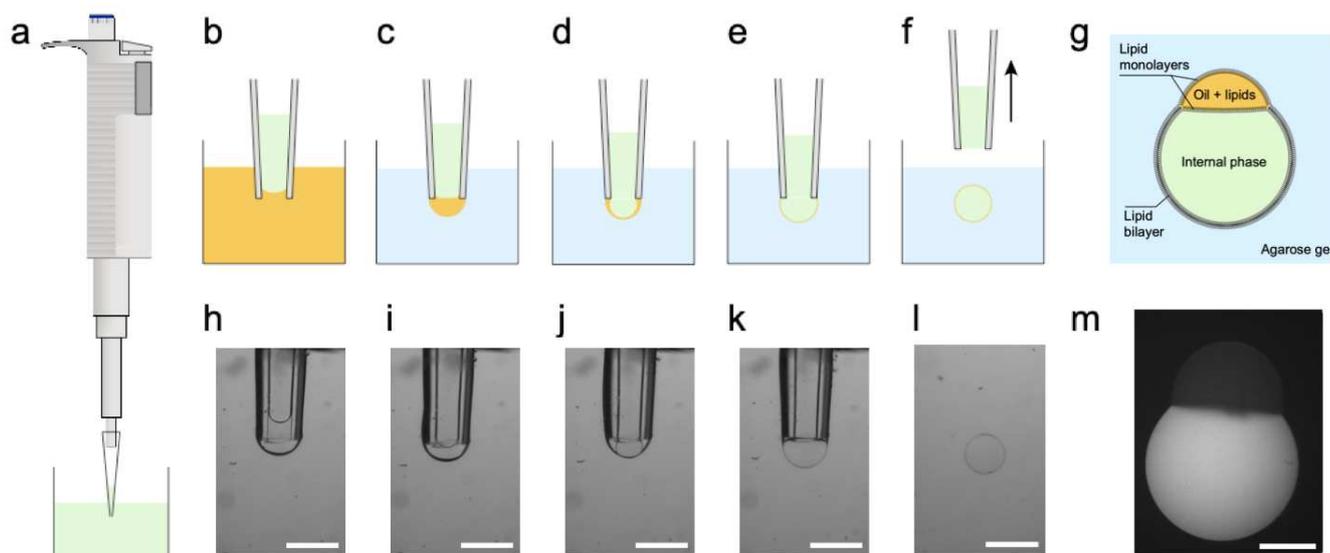


FIG. 2.8 a-f) Schéma de la méthode de production de la double émulsion. Les couleurs vert/orange/bleu représentent respectivement les phases interne/huile/externe. h-l) Les images en fond clair sont affichées à côté des schémas correspondants b-f). La barre mesure 500  $\mu\text{m}$  de long. l) Schéma de la pseudo-vésicule piégée dans le gel d'agarose. m) Image en fluorescence au microscope d'une pseudo-vésicule contenant de la carboxyfluorescéine piégée dans un gel d'agarose. La barre mesure 200  $\mu\text{m}$  de long

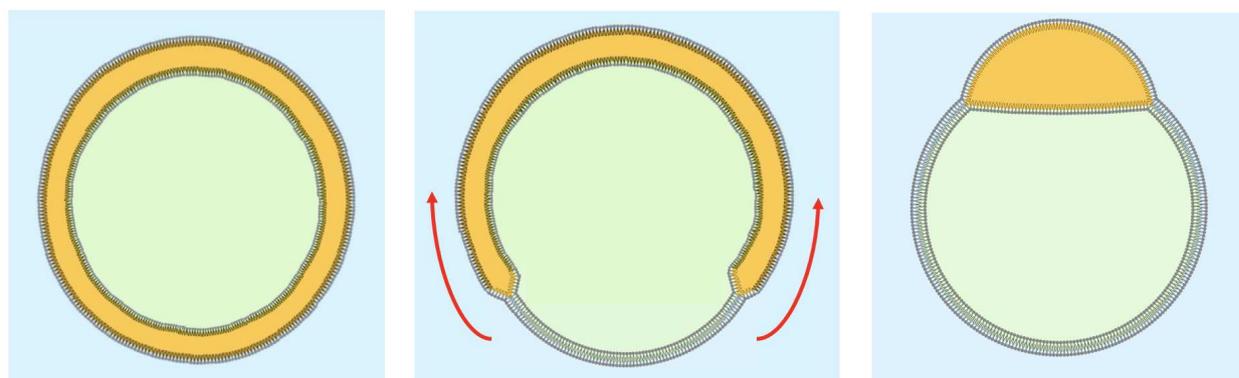


FIG. 2.9 Schéma du crémage de l'huile dans une pseudo-vésicule. A gauche une double émulsion vient d'être formée. Au milieu une bicouche lipidique est "zippée" vers le haut. A droite l'excès d'huile a fini de remonter et une pseudo-vésicule est formée.

## 2.4 Caractérisation et fonctionnalisation

### 2.4.1 Caractérisation de la membrane de la pseudo-vésicule

Nous cherchons ici à caractériser la fonctionnalité de la bicouche lipidique formée dans notre système de pseudo-vésicule.

La figure 2.10a représente une image de microscopie confocale d'une pseudo-vésicule piégée dans un gel d'agarose à 3%. La phase interne est marquée avec de la carboxyfluorescéine (vert),

l'huile est marquée avec du Nile Red (rouge). Les lipides ne sont pas fluorescents dans cette situation. L'absence d'un signal mesurable dans le canal rouge entre la phase interne et le gel d'agarose indique qualitativement qu'il n'y a pas de quantité significative d'huile dans la membrane de la pseudo-vésicule.

Dans une seconde expérience, un lipide fluorescent a été rajouté dans la composition lipidique : NBD-PC. Ce dernier représente 1 % de la masse totale de l'ensemble des lipides. L'huile est ici encore marqué au Nile Red. La Figure 2.10b présente une image de microscopie confocale d'une pseudo-vésicule ainsi marquée dans un gel d'agarose à 3 %. Cette image est composée de deux canaux : le premier est celui de l'huile marquée avec du Nile Red ; le second correspond aux lipides marqués (vert). L'addition des deux canaux donne la couleur jaune, visible dans le chapeau d'huile. Afin d'analyser la composition de la membrane, l'image de la pseudo-vésicule est découpée en anneaux de différents rayons  $r$  (en comptant depuis  $r = 0$  le centre de la pseudo-vésicule,  $r = R$  correspond au rayon de la pseudo-vésicule) en excluant la partie supérieure de la pseudo-vésicule contenant le chapeau d'huile (Fig. 2.10c). L'intensité dans ces arc de cercles est moyennée et tracée en fonction du rayon normalisé  $r/R$ . Ces intensités correspondent à une intensité radiale. Cette analyse est effectuée pour le canal d'huile (rouge) et le canal des lipides (vert) (Fig. 2.10d). Pour ce dernier, un pic d'intensité est détecté pour  $r/R = 1$ , c'est-à-dire au niveau du rayon de la pseudo-vésicule, donc de la membrane de cette dernière. En revanche aucun pic d'intensité n'est détecté pour le canal d'huile.

Grâce à ces deux expériences (Fig. 2.10a,b), nous pouvons en conclure que la partie inférieure de la pseudo-vésicule possède bien une bicouche lipidique dépourvue de quantités d'huile significatives.

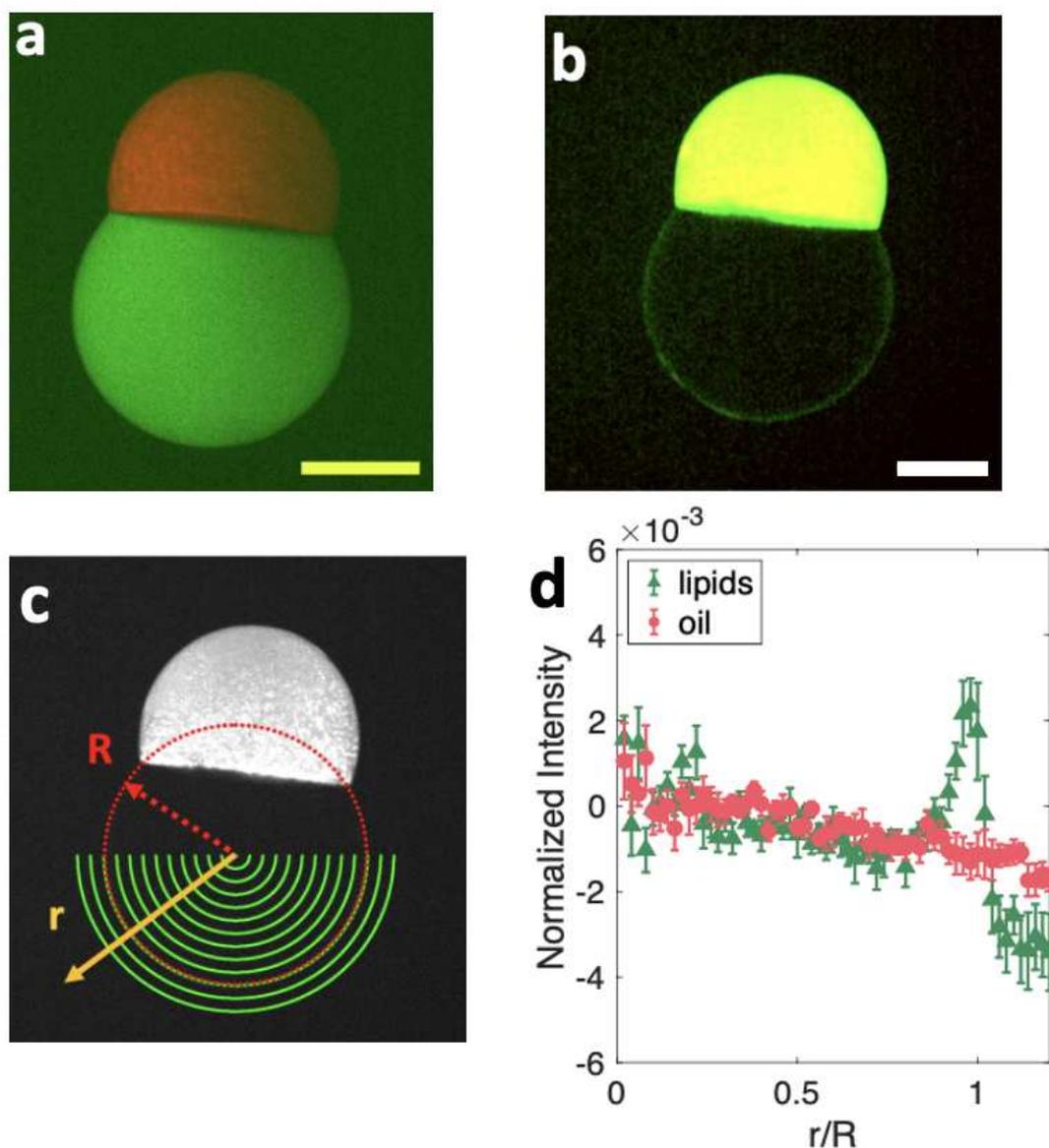


FIG. 2.10 a) Image composite en microscopie confocale d'une pseudo-vésicule piégée dans un gel d'agarose. La phase interne aqueuse contient de la carboxyfluorescéine (vert), tandis que la phase huileuse contient du Nile red (rouge). b) Image composite utilisant des lipides NBD-PC fluorescents (vert) et une huile contenant du Nile red (rouge). Couleur jaune = canaux rouge + vert. Pour plus de clarté, l'image a été lissée avec un filtre gaussien de rayon 2 pixels. Barres d'échelle =  $200 \mu\text{m}$ . c) Schéma de la procédure d'analyse d'image. Les intensités de fluorescence dans les canaux vert et rouge sont mesurées dans des demi-anneaux radiaux. d) Profil d'intensité de fluorescence radiale normalisé, moyenné sur  $N = 8$  pseudo-vésicules marquées comme en (b) de rayon moyen  $R = 316 \pm 24 \mu\text{m}$ . Les triangles verts (resp. disques rouges) montrent le canal des lipides fluorescents (resp. le canal de l'huile fluorescente). Les barres d'erreurs représentent l'erreur standard sur la moyenne.

## 2.4.2 Fonctionnalisation de la membrane

### 2.4.2.1 L'alpha-hémolysine : un pore passif

Après avoir montré que la membrane de la vésicule était dépourvue d'huile, nous prouvons ci-dessous que celle-ci est fonctionnalisable par des protéines transmembranaires.

Nous avons choisi l'alpha-hémolysine, qui est une toxine du staphylocoque doré formant un canal transmembranaire dans les bicouches lipidiques. En effet, le staphylocoque doré est une cellule pathogène qui a la particularité de provoquer des lésions dans les tissus grâce à cette toxine [130, 131], et de perforer la membrane des globules rouge, entraînant leur apoptose [132].

Les monomères de l'alpha-hémolysine sont composés de 293 acides aminés et s'heptamérisent lorsqu'ils sont introduits dans des membranes ou dans des solutions détergentes. C'est en s'heptamérisant dans la membrane qu'ils forment un pore passif (toujours ouvert) dont la structure a été révélée aux rayons X en 1996 [133]. Une fois insérée dans une bicouche lipidique, la protéine présente une forme de champignon, avec le capuchon pointant vers l'extérieur de la membrane de la cellule cible. Le rebord sur le feuillet externe et le canal sont insérés dans la membrane (Fig. 2.11a,b).

Une fois heptamérisé, le pore formé mesure 100 Å de long avec un pore de 26 Å de large dans le capuchon et 14 Å dans la partie la plus étroite du canal transmembranaire.

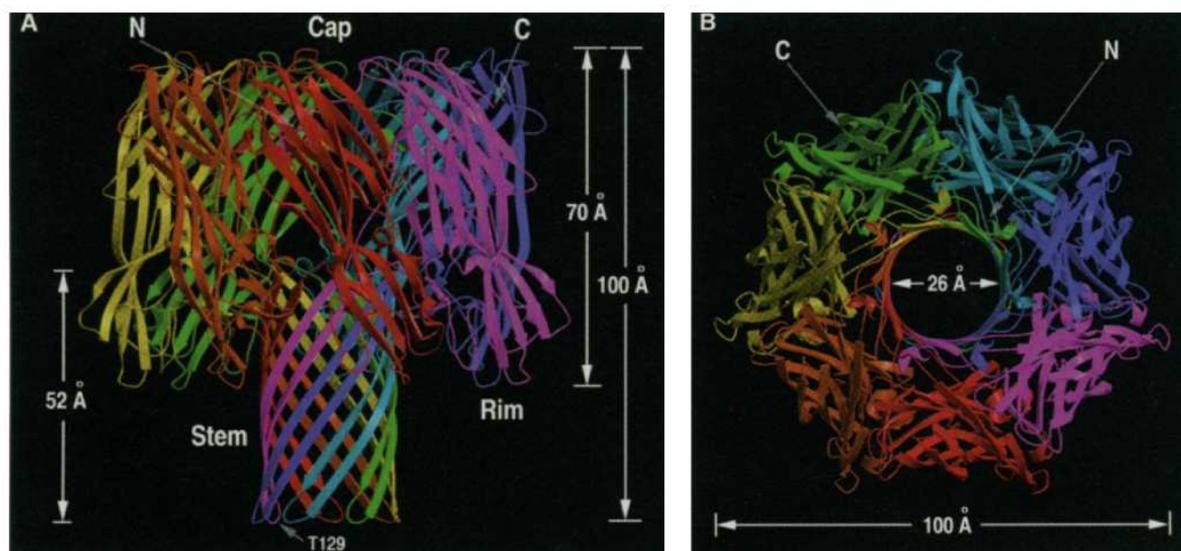


FIG. 2.11 (A) Vue latérale de l'hémolysine sous sa forme heptamérique. Les monomères sont représentés de couleurs différentes. Le canal s'insère entièrement dans la membrane cible et le capuchon reste à l'extérieur (B) Vue de dessus du capuchon de l'heptamère. Reproduit de [133].

### 2.4.2.2 Tension de surface

Pour fonctionnaliser la membrane des pseudo-vésicules, des monomères d'alpha-hémolysine sont directement incorporés dans la phase interne à une concentration finale de 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . L'alpha-hémolysine n'est pas introduite à l'extérieur, i.e. dans le gel d'agarose liquide chaud, afin d'éviter de la dégrader.

L'alpha-hémolysine est initialement dissoute et aliquotée dans de l'eau distillée à une concen-

tration de  $500 \mu\text{g}/\text{mL}$  puis conservée à  $-20^\circ\text{C}$  pendant plusieurs mois.

Lors de la préparation de la phase interne, un aliquot d'alpha-hémolysine est mélangé avec une phase interne deux fois plus concentrée dans les mêmes proportions volumiques puis complété avec de la phase interne "normale" pour arriver à une concentration de  $50 \mu\text{g}/\text{mL}$ . L'utilisation de phase interne deux fois plus concentrée permet de ne pas modifier l'osmolarité de la phase interne finale.

Suite à l'ajout de pores dans la phase interne, nous avons observé une déstabilisation des pseudo-vésicules ainsi que des changements de forme de la calotte d'huile. Nous avons donc souhaité mesurer l'influence de l'alpha-hémolysine sur les tensions de surface impliquées dans notre système. Grâce à un module d'extension du logiciel ImageJ [134], nous avons donc estimé la tension de surface des interfaces eau/huile impliquées dans notre système avec la technique de la goutte pendante. Pour cela, la tension de surface de gouttes de phase interne formées dans le mélange d'huile + lipides est mesurée pour différentes concentrations d'alpha-hémolysine.

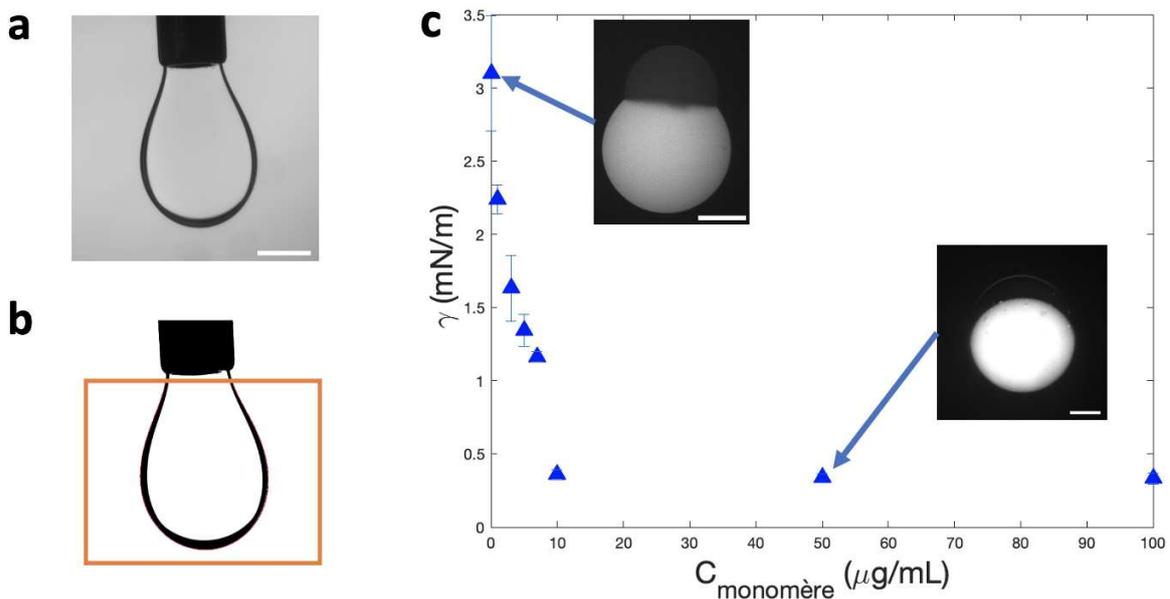


FIG. 2.12 a,b) Expérience de goutte pendante avec une gouttelette aqueuse (phase interne, avec une concentration d'alpha-hémolysine =  $0,1 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) baignant dans le mélange huile et lipides. En b), l'image a été binarisée et sa forme (limitée à la région du rectangle orange) est ajustée pour déterminer la tension superficielle, en utilisant le module d'extension d'ImageJ [134]. Barre d'échelle =  $500 \mu\text{m}$ . c) Tension superficielle en fonction de la concentration d'alpha-hémolysine. En insert : images typiques de pseudo-vésicules piégées dans un gel d'agarose, à  $[\alpha\text{HL}] = 0$  et  $[\alpha\text{HL}] = 50 \mu\text{g}/\text{mL}$ , comme indiqué par les flèches. Barre d'échelle =  $200 \mu\text{m}$ .

Sur la Figure (2.12c), la tension de surface  $\gamma$  diminue lorsque la concentration d'hémolysine augmente jusqu'à atteindre un plateau pour une concentration de monomères d'alpha-hémolysine égale à  $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ . La tension de surface est divisée par environ 8,5 entre la situation sans monomères d'alpha-hémolysine et une concentration supérieure à  $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ . Nous en concluons que les monomères d'alpha-hémolysine ont un effet tensioactif. L'ajout de l'alpha-hémolysine directement dans la phase interne fait donc chuter la tension de surface de la monocouche de lipides de la pseudo-vésicule. En effet, les monomères d'alpha-hémolysine vont s'insérer dans la monocouche

de lipides entre la phase interne et le chapeau d'huile (Fig. 2.13a) ce qui va diminuer la tension de surface de la pseudo-vésicule (Fig. 2.13b). Cet effet diminue drastiquement le taux de réussite de formation de pseudo-vésicules stables pour des concentrations d'alpha-hémolysine supérieures à  $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ , ce qui entrave l'utilisation de ce protocole pour insérer des nanopores dans la membrane de la pseudo-vésicule.

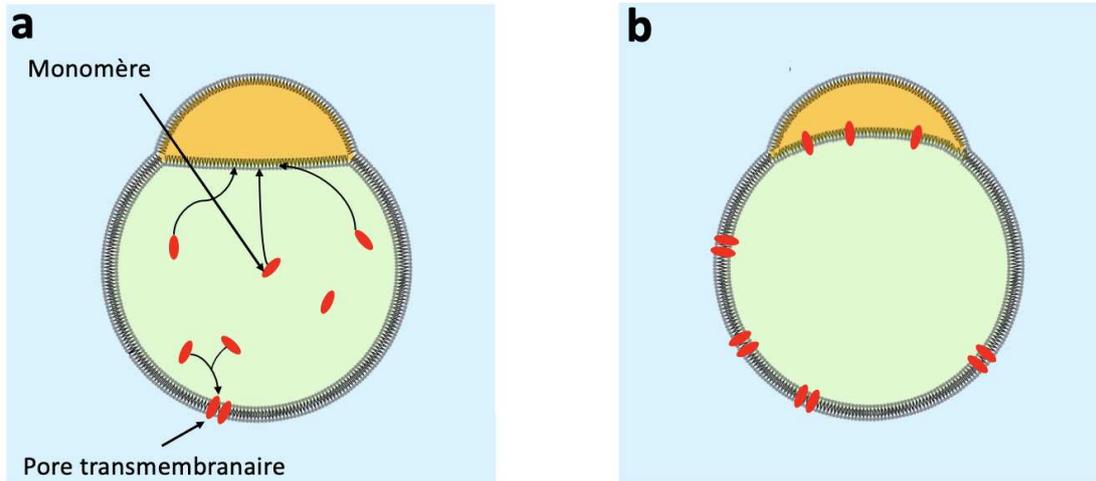


FIG. 2.13 a) Schéma d'une pseudo-vésicule contenant des monomères d'alpha-hémolysine (rouge). Les monomères fusionnent avec la monocouche de lipides de la pseudo-vésicule où ils s'heptamérisent avant de fusionner avec la bicouche lipidique. Par souci de clarté seul deux monomères sont représentés lors de l'heptamérisation de la protéine. b) Les monomères font chuter la tension de surface de la monocouche de lipides, ce qui induit un changement physique de la pseudo-vésicule et entrave la stabilité du système.

### 2.4.2.3 Insertion de pores dans des SUVs

Pour augmenter la stabilité des pseudo-vésicules, les monomères d'alpha-hémolysine sont insérés dans une solution contenant des SUVs (Small Unilamellar Vesicles). Les monomères vont s'heptamériser dans les SUVs, ce qui diminue la concentration en monomères libres dans la phase aqueuse et diminue donc la probabilité d'avoir des monomères d'alpha-hémolysine qui s'insèrent à l'interface eau/huile de la pseudo-vésicule.

Les SUVs sont formées avec un sonicateur à pointe de la marque Sonics Materials™. En pratique, la pointe baigne dans  $1 \text{ mL}$  de phase interne mélangé avec  $1,25 \text{ mg}$  du mélange de lipides secs. Le mélange est ensuite soniqué à un rythme de 15 secondes actives et 5 secondes de repos pendant 30 minutes avec une puissance de 20%. Cette solution de phase interne et de SUVs est ensuite mélangée avec une solution d'alpha-hémolysine pour arriver à une concentration finale d'alpha-hémolysine égale à  $50 \mu\text{g}/\text{mL}$ . Les monomères d'alpha-hémolysine s'heptamérisent alors dans les SUVs. Lorsque la pseudo-vésicule est formée, les SUVs peuvent fusionner avec la membrane de la pseudo-vésicule pour la décorer de pores tout en maintenant la stabilité du système (Fig. 2.14a).

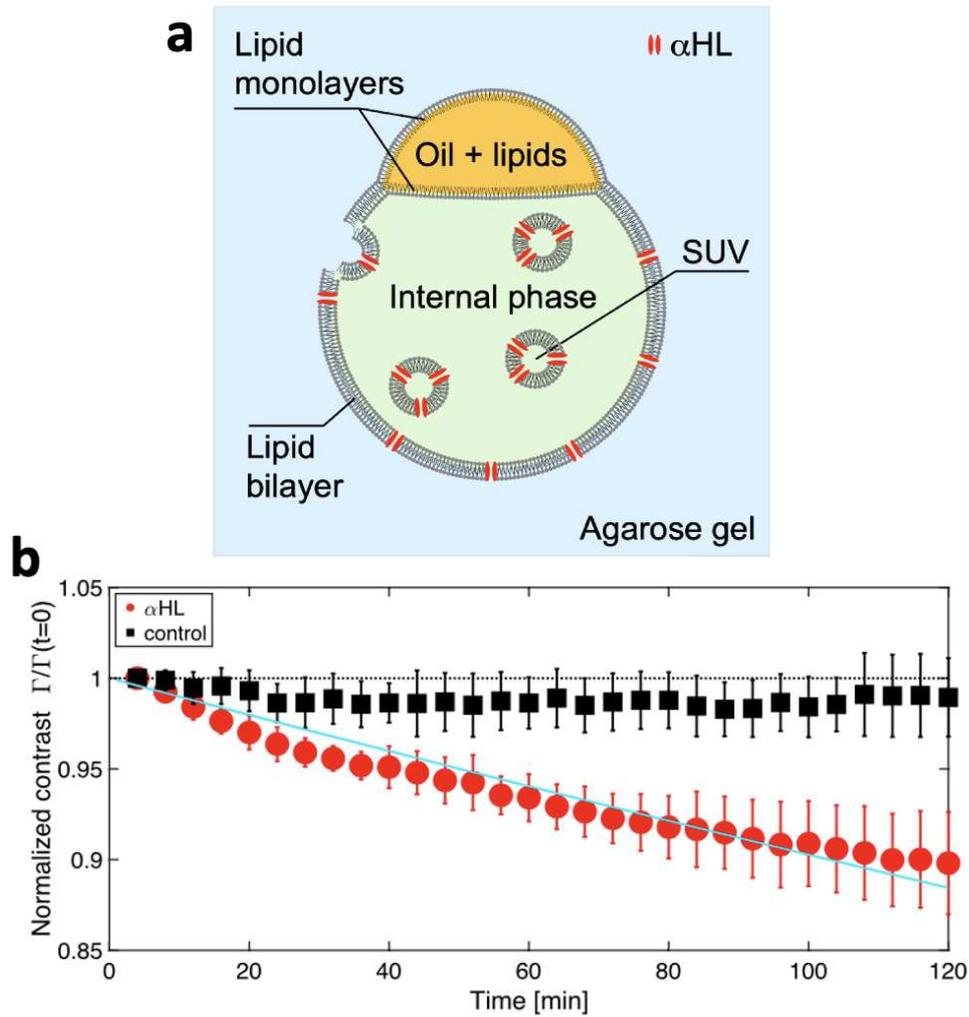


FIG. 2.14 a) Schéma de l'insertion de  $\alpha$ HL dans la membrane de la vésicule, à l'aide de SUVs chargées d' $\alpha$ HL. b) Evolution temporelle du contraste normalisé  $\Gamma(t)/\Gamma(t=0)$ , pour les pseudo-vésicules chargées en  $\alpha$ HL (disques rouges,  $N=5$ ) ou pour l'expérience contrôle sans  $\alpha$ HL (carrés noirs,  $N=5$ ). Les barres d'erreur sont les déviations standard sur ces 5 expériences

#### 2.4.2.4 Fuite de fluorescence et mesures de contraste

Nous vérifions ici que les pores sont bien fonctionnels une fois insérés dans la membrane de la pseudo-vésicule. Pour cela, une mesure de fuite de fluorescence est effectuée à travers la membrane d'une pseudo-vésicule contenant des pores d'alpha-hémolysine. Si la phase interne est fluorescente, par diffusion des molécules fluorescentes à travers ces pores passifs, l'intensité lumineuse dans la vésicule va décroître alors que l'intensité extérieure va augmenter. Ce qui nous amène à faire une mesure de contraste des pseudo-vésicules donnée par la formule suivante :

$$\text{Contraste} = \frac{I_{interne} - I_{externe}}{I_{interne} + I_{externe}} \quad (2.2)$$

où  $I_{interne}$  est l'intensité lumineuse à l'intérieur de la pseudo-vésicule et  $I_{externe}$  est l'intensité lumineuse à l'extérieur c'est-à-dire dans le gel d'agarose.

Nous avons tracé sur la figure 2.14b, le contraste normalisé pour des pseudo-vésicules décorées

de pores d'alpha-hémolysine (rouge) et des pseudo-vésicules sans pores (noir) mesuré pendant 2 heures. Nous observons que le contraste pour des pseudo-vésicules décorés de pores diminue de 10 % en 2 heures alors que le contraste pour des pseudo-vésicules sans pore reste constant. Nous en concluons que les pores d'alpha-hémolysine ont bien été insérés dans la membrane des pseudo-vésicules et donc que la membrane a bien été fonctionnalisée avec une protéine transmembranaire. Plus quantitativement, l'ajustement du contraste normalisé avec une exponentielle décroissante (ligne cyan de la figure 2.14b) donne un temps caractéristique de  $5,9 \pm 0,3 \cdot 10^4$  secondes [135]. Si la fuite de fluorescence est modélisée avec des théories de temps de premier passage, ce temps caractéristique devrait dépendre linéairement du volume de la vésicule [128, 135]. En tenant compte de la taille de nos vésicules, nos résultats sont en bon accord avec les valeurs rapportées dans la littérature [136, 128, 137].

## 2.5 Excitabilité du système

### 2.5.1 Dispositif expérimental d'excitation mécanique

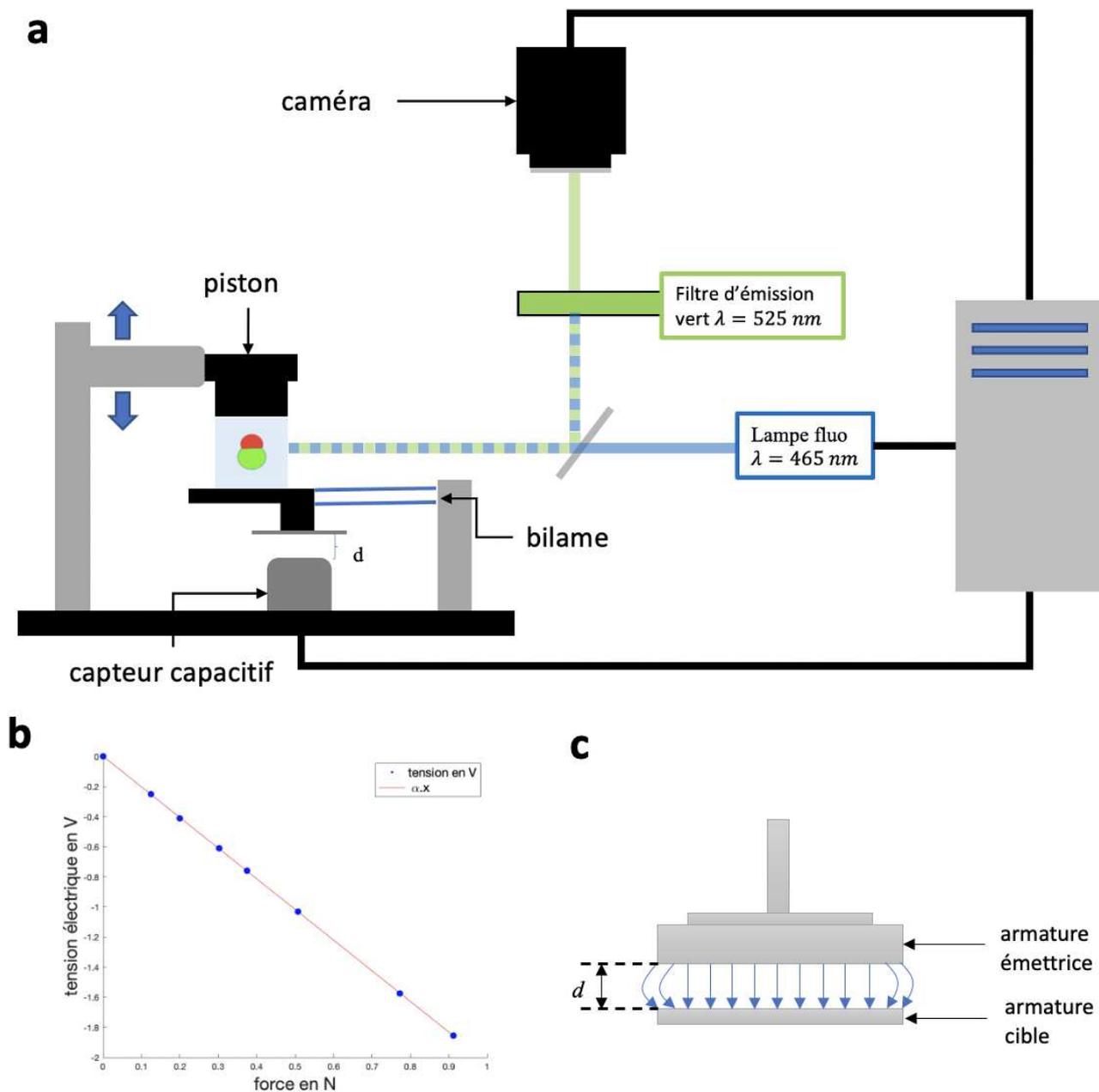


FIG. 2.15 a) Montage de déformation d'une pseudo-vésicule. La vésicule est piégée dans un gel d'agarose qui est excité mécaniquement par le piston. La distance entre le support du gel et le capteur capacitif change, ce qui, avec la raideur du bilame, permet de mesurer une force. Les mouvements du piston sont synchronisés avec l'illumination de la lampe fluorescente et l'acquisition d'images de la caméra. b) Calibration du capteur. Chaque symbole correspond à une masse donnée posée sur le porte échantillon. La ligne rouge est un ajustement linéaire de la forme  $U = \alpha F$  avec  $\alpha = -2,038 \pm 0,003 \text{ V/N}$ . c) Schéma d'un capteur capacitif.

Notre objectif étant de créer un système biomimétique d'un mécanorecepteur, l'une des premières interrogations est de savoir si une pseudo-vésicule est déformable sous excitation mécanique. Pour cela nous avons construit un montage d'excitation mécanique (Fig. 2.15a) composé d'un piston monté sur une platine motorisée sur l'axe vertical  $z$  qui vient comprimer la surface libre du gel. La platine motorisée est de la marque Newport, modèle SMC100. L'échantillon repose sur un support monté sur un bilame, dont la déflexion est mesurée par un capteur capacitif (MC 900, FOGALE). Pour chaque mouvement du piston, une lampe fluorescente (PRIOR, Lumen200) illumine l'échantillon pendant un temps donné et une caméra (FLIR, BLACKFLY S USB3) fait l'acquisition d'une image pendant le temps d'illumination. Le piston, la lampe fluorescente et la caméra sont contrôlés par ordinateur grâce à un programme informatique écrit sur Matlab.

Le capteur capacitif est composé de deux armatures conductrices séparées par une distance  $d$  (Fig. 2.15c). La capacité d'un condensateur est reliée à la distance entre les deux armatures par la formule suivante :

$$C = \epsilon_0 \epsilon_r \frac{A}{d} \quad (2.3)$$

où  $C$  est la capacité du condensateur,  $\epsilon_0$  est la permittivité du vide,  $\epsilon_r$  est la permittivité relative,  $A$  est la surface de l'armature et  $d$  est la distance entre les deux armatures. De plus la tension  $U$  est proportionnelle à la capacité d'un condensateur. Il en découle que la tension est inversement proportionnelle à la distance entre les armatures :

$$U \propto \frac{1}{d} \quad (2.4)$$

Ainsi lors d'une compression du gel la distance entre les deux armatures diminue et la tension mesurée par le capteur capacitif augmente. Afin d'éviter tout effet de bord, l'armature cible est beaucoup plus grande que l'armature émettrice.

Pour convertir la tension mesurée en force, une calibration a été effectuée : des poids de différentes masses ont été posés sur le porte échantillon. Pour chacune des masses une tension est mesurée et connaissant la masse, le poids  $mg$  est calculé. Il en résulte que la tension évolue linéairement en fonction de la force avec  $\alpha$  le facteur de conversion en  $V/N$  (Fig. 2.15b).

Pour simplifier la géométrie du système, une languette en plastique est placée à l'intérieur d'une cuve de spectroscopie UV-visible (Fig. 2.16a). Le gel est coulé en excès dans cette cuve de manière à avoir un dôme d'agarose au sommet de la cuve. Après formation d'une pseudo-vésicule, le dôme d'agarose gélifié est coupé au cutter de sorte à avoir une surface plane (Fig. 2.16b). Enfin la languette est retirée et laisse un espace libre pour permettre au gel de se déformer dans la cuve (Fig. 2.16c).

Il nous faut cependant noter que l'indentation réelle du gel,  $\delta$ , n'est pas simplement égale à celle du piston  $\Delta z$  (Fig. 2.17). En effet à cause de la déflexion du bilame vers le bas lors d'une excitation mécanique, l'indentation devient :

$$\delta = \Delta z - \Delta_{ressort} \quad (2.5)$$

où  $\Delta_{ressort}$  est le déplacement du porte échantillon dû à la déflexion du bilame (Fig. 2.17b).

$$\delta = \Delta z - \frac{F_{ressort}}{K} \quad (2.6)$$

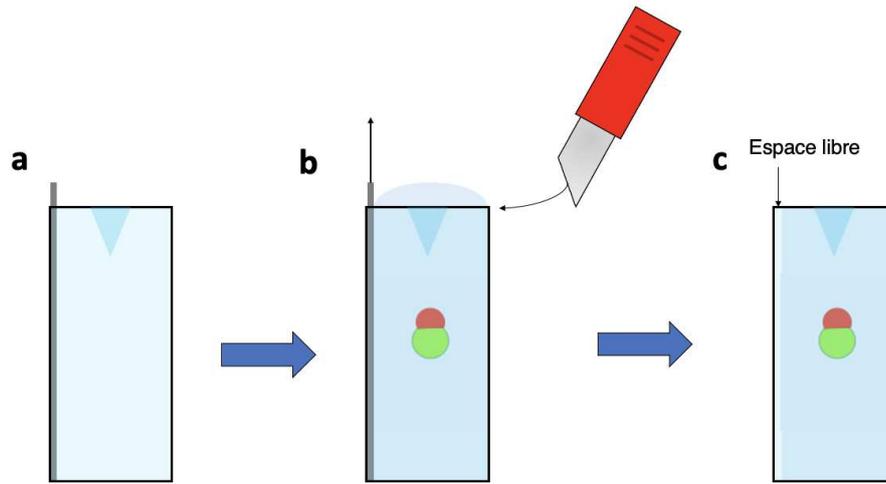


FIG. 2.16 a) Une languette est placée dans une cuve de spectroscopie UV-visible. b) Un gel est coulé dans la cuve jusqu'à avoir l'apparition un dôme d'agarose au sommet de la cuve. Une fois que le gel gélifie, le dôme est coupé au cutter. c) La languette est retirée et laisse un espace libre pour permettre au gel de se déformer dans la cuve.

Pour déterminer la constante de raideur  $K$ , nous avons indenté directement le porte échantillon qui est infiniment rigide, la valeur obtenue est égale à  $8705 \text{ N/m}$ .

## 2.5.2 Mesures de déformation

Pour les mesures de déformations l'indentation maximale a été imposée à  $1 \text{ mm}$  (Fig. 2.18a). Le piston étant plat et le gel d'agarose rectangulaire (Fig. 2.16), lors d'un contact entre le piston et le gel, la géométrie du système impose que la force  $F$  est égale à :

$$F = \sigma_{zz} S \quad (2.7)$$

où  $\sigma_{zz}$  est la contrainte mécanique de compression pure selon l'axe  $z$  et  $S$  la surface de contact entre le gel et le piston ici  $0,9 \text{ cm}^2$ . De plus la contrainte mécanique  $\sigma_{zz}$  est reliée linéairement à la déformation par la loi de Young :

$$\sigma_{zz} = E \epsilon_{zz} \quad (2.8)$$

où  $E$  est le module d'Young et  $\epsilon_{zz}$  est la déformation donnée par la formule suivante :

$$\epsilon_{zz} = \frac{\delta}{h_0} \quad (2.9)$$

avec  $\Delta z$  l'indentation et  $h_0$  la hauteur initiale du gel.

La force peut donc être relié linéairement à l'indentation :

$$F = \frac{ES}{h_0} \delta \quad (2.10)$$

D'après les mesures effectuées (Fig. 2.18b), une indentation de  $1 \text{ mm}$  dans un gel d'agarose correspond à une force de  $0,22 \text{ N}$ .

Sachant que le gel d'agarose a une géométrie rectangulaire avec une hauteur de  $43 \text{ mm}$ , la déformation maximale du gel est de  $2,3\%$ . De plus le module d'Young du gel d'agarose peut

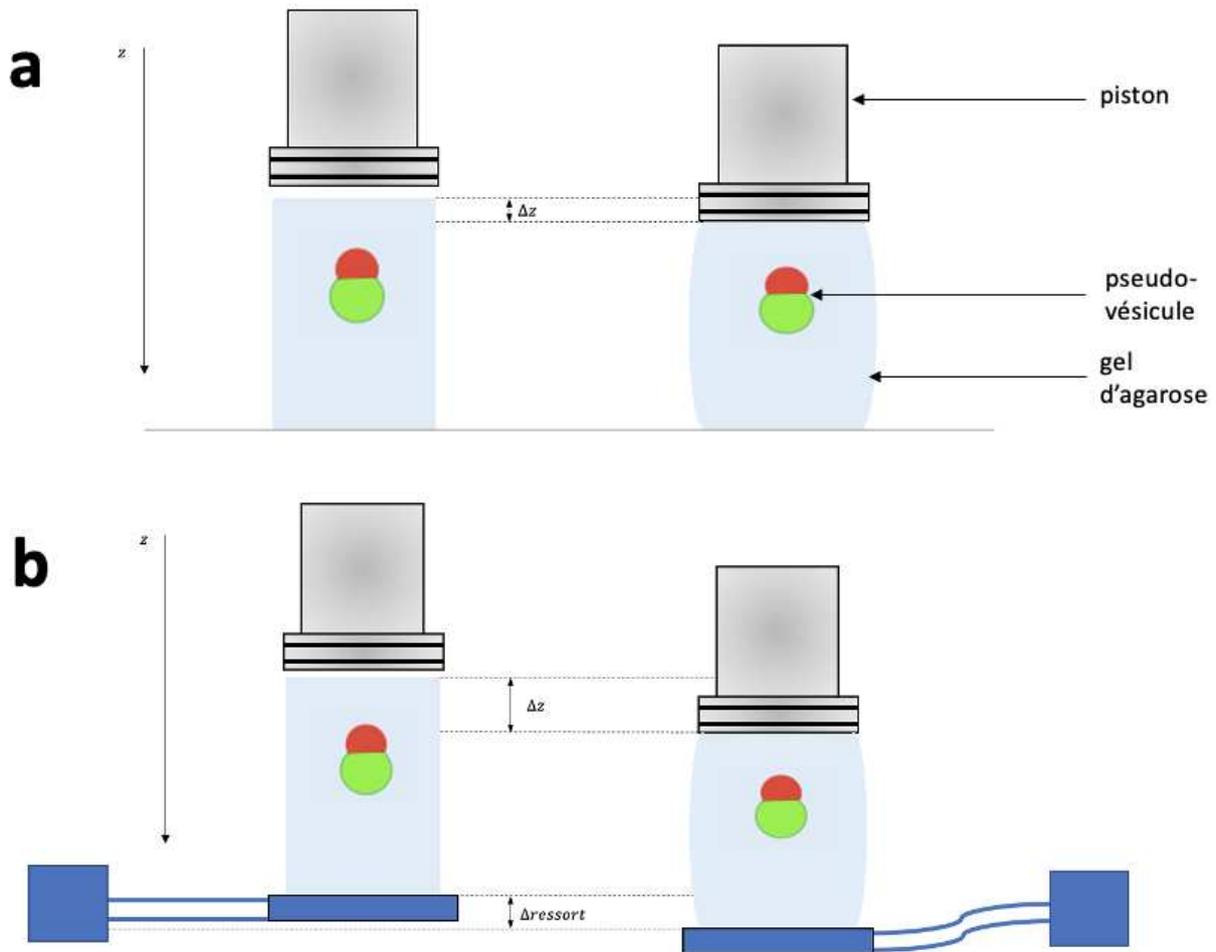


FIG. 2.17 a) Schéma d'un piston qui indente un gel contenant une pseudo-vésicule. A gauche, le gel d'agarose n'est pas excité mécaniquement contrairement à droite où le gel subit l'indentation du piston. Sur ce schéma,  $\Delta z$  représente l'indentation c'est-à-dire l'enfoncement du piston dans le gel. L'axe  $z$  est l'axe vertical. b) Schéma d'une indentation d'un piston sur un gel avec la présence d'un bilame (bleu), dont la déflexion induit une translation verticale, représentée par  $\Delta_{ressort}$ . De la même manière que dans (a), le schéma de gauche est au repos alors que celui de droite est excité mécaniquement. L'indentation réelle dans cette situation est donnée par l'équation indentation2.

être déterminé avec l'équation  $\sigma_{\epsilon}$ . Il correspond à la pente de (Fig. 2.18c) et est égal à  $1,029 \pm 0,012 \cdot 10^5 Pa$ , ce qui est une valeur proche de celles rapportées dans la littérature [138, 139].

De manière synchrone à l'excitation mécanique, une caméra prend des images d'une pseudo-vésicule piégée dans le gel (Fig. 2.19a). Ces images sont ensuite binarisées et la partie inférieure du contour (sans la calotte d'huile) est ajustée par une ellipse avec le demi grand axe  $a$  en bleu et le demi petit axe  $b$  en orange sur (Fig. 2.19b). L'évolution temporelle de ces axes sous une indentation de  $1 mm$  a permis de montrer qu'ils variaient de 10 % et donc que la pseudo-vésicule pouvait être déformée.

L'excentricité est un paramètre de l'ellipse sans unité et est égal à :

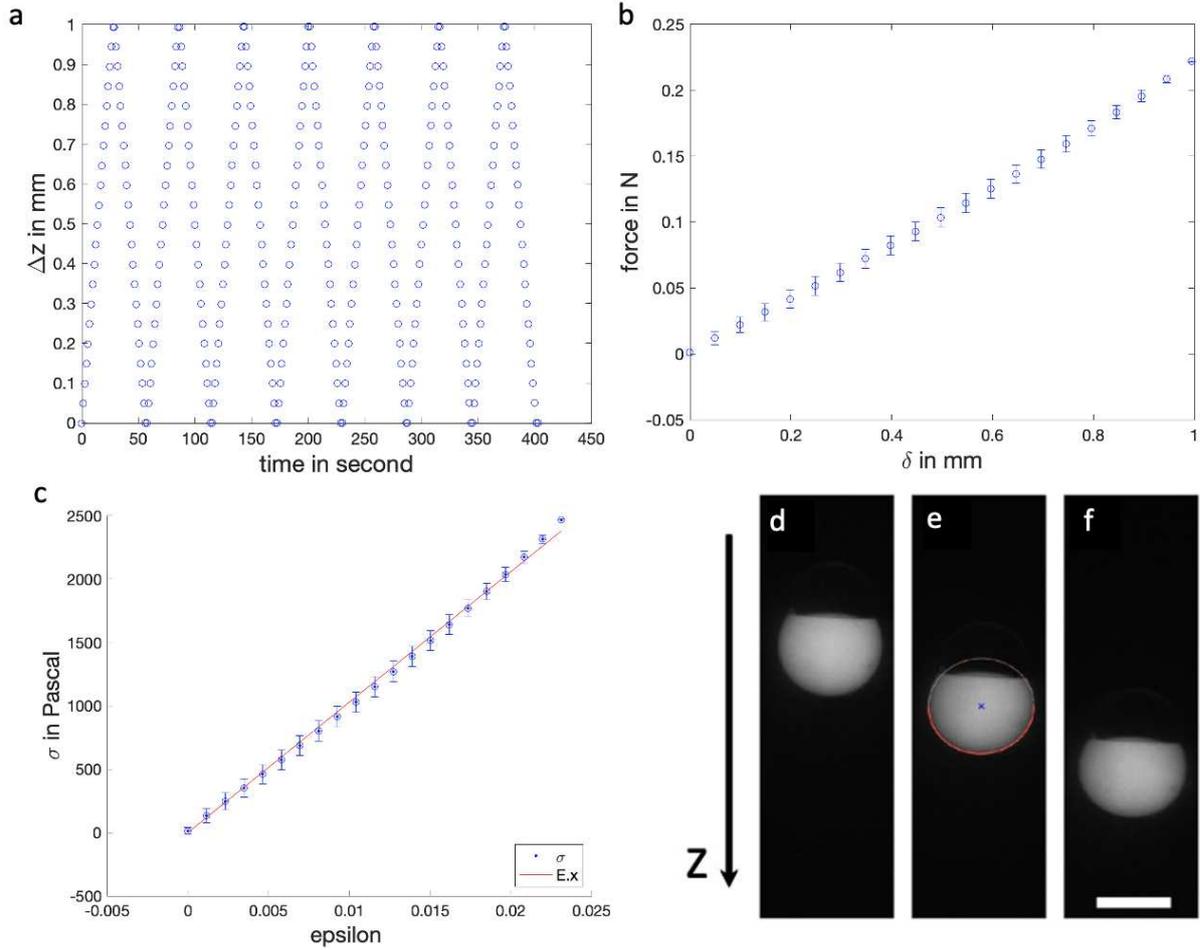


FIG. 2.18 a) Indentation du piston en fonction du temps de l'expérience. b) Force appliquée au système par le piston en Newton en fonction de l'indentation en millimètre. c) Contrainte mécanique appliquée au gel d'agarose en Pascal en fonction de la déformation. La ligne rouge est un ajustement linéaire de la forme  $\sigma_{zz} = E\epsilon_{zz}$  avec  $E = 1,029 \pm 0,012 \cdot 10^5$  Pa. d-f) Images de fluorescence au microscope d'une pseudo-vésicule non déformée ((d)  $Z=0$ ) ou déformée ( $Z=0,5$  et  $1$  mm respectivement (e,f)). La barre d'échelle mesure  $400 \mu\text{m}$ .

$$e = \sqrt{1 - \frac{b^2}{a^2}} \quad (2.11)$$

où  $e$  est l'excentricité,  $b$  est le demi petit axe et  $a$  le demi grand axe. Pour un cercle  $e$  vaut donc 0, tandis que si  $e = 1$  alors  $a = b$  et l'ellipse correspond à un ligne. C'est donc un paramètre qui peut être utilisé pour caractériser la déformation de nos vésicules.

Sur le graphe de la figure 2.19d, on note que l'excentricité est comprise entre 0,3 et 0,46. Même lorsque l'indentation est nulle, la pseudo-vésicule est donc déjà déformée (Fig. 2.19d). Cela peut être dû à la présence de ce "chapeau" d'huile ou à une contraction du gel d'agarose pendant sa gélification. En effet un gel d'agarose composé d'eau voit son volume diminuer de 5% au moment de la gélification [140].

Enfin la contrainte mécanique  $\sigma$  évolue linéairement avec l'excentricité  $e$  (Fig. 2.20). La contrainte appliquée permet donc de contrôler facilement la déformation de la pseudo-vésicule. Un ajustement

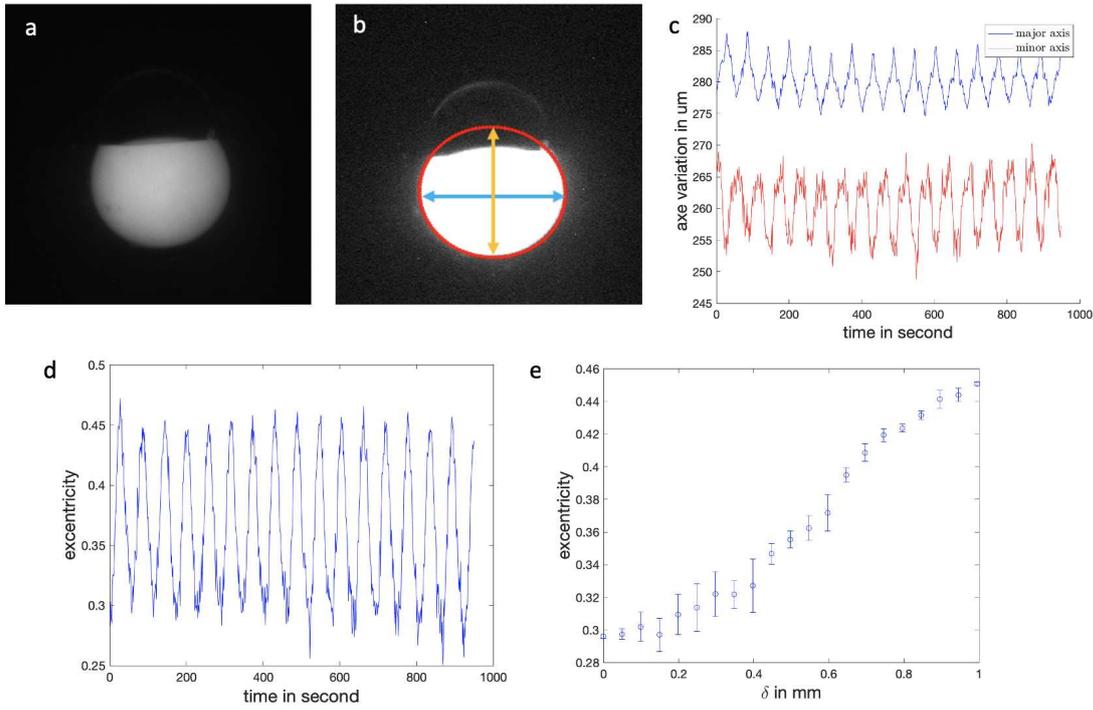


FIG. 2.19 a) Pseudo-vésicule piégée dans un gel d'agarose lors d'une excitation mécanique. b) Image binarisée d'une pseudo-vésicule dont la partie inférieure est ajustée par une ellipse (rouge). Le grand axe et le petit axe de l'ellipse ajustée sont représentés en bleu et orange, respectivement. c) Évolution du demi grand axe et du demi petit axe en fonction du temps durant une expérience d'excitation mécanique (indentation = 1mm). d-e) Excentricité au cours de l'indentation, pour les positions décrites sur la Fig. 2.18a.

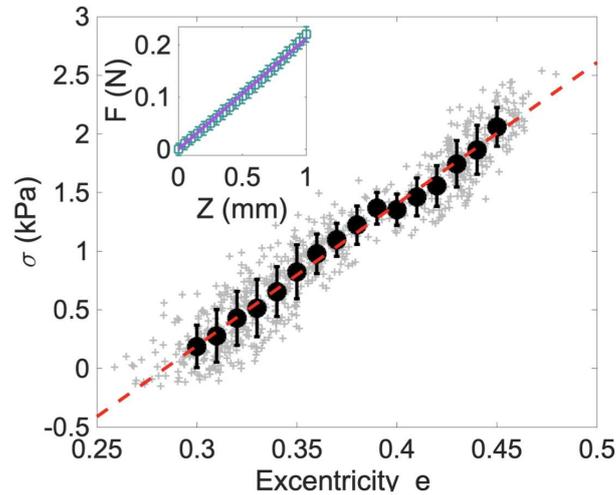


FIG. 2.20 Evolution de la contrainte mécanique  $\sigma$  en kPa en fonction de l'excentricité de la pseudo-vésicule. Les points en noirs représentent la moyenne des points gris pour une indentation  $\delta$  donnée.

linéaire donne  $\sigma = K_{gel}(e - e_0)/e_0$  où  $e_0$  est l'excentricité initiale,  $K_{gel}$  est un module de compression du gel et est égal à  $K_{gel} = 1,327 \pm 0,108 \cdot 10^4 Pa$  ce qui reste un résultat cohérent avec la littérature ( $6,0 \pm 1,0 \cdot 10^4 Pa$ ) [138, 139].

## 2.6 Limites du système et évolutions envisagées

L'une des limites de notre système est la présence d'une calotte d'huile. En effet, il a été vu que sa présence tendait à nuire à la stabilité du système lors de l'insertion de protéines membranaires. En effet, toute molécule pouvant s'insérer dans la monocouche de lipides à l'interface eau/huile peut en principe diminuer la tension de surface et déstabiliser le système. Bien que ce problème soit en partie résolu avec l'utilisation de SUVs, il est envisageable à l'avenir de se tourner vers des formulations permettant le démouillage spontané de la calotte d'huile [141, 121].

La présence de la calotte d'huile peut également avoir un effet sur la tension de la bicouche lipidique donnée par l'équation de Young-Dupré :

$$\gamma_b = \gamma_{ao} \cos(\theta_{ao}) + \gamma_{wo} \cos(\theta_{wo}) \quad (2.12)$$

où  $\gamma_b$ ,  $\gamma_{ao}$  et  $\gamma_{wo}$  sont respectivement les tensions de surface de la bicouche, de l'interface agarose/huile et de l'interface phase interne/huile, et  $\theta_{ao}$ ,  $\theta_{wo}$  les angles de contact définis sur la figure 2.21.

Pour treize clichés de huit pseudo-vésicules différentes, la tension de surface mesurée est de  $4,15 \pm 0,33 \text{ mN/m}$ , ce qui est très élevé comparé à des vésicules électroformées où la tension de surface est généralement de l'ordre de  $10^{-3} \text{ mN/m}$  [142] [143]. Cependant la valeur de tension de surface calculée est similaire aux valeurs mesurées dans des DIBs [144] [145]. Ces valeurs élevées de tension de surface sont vraisemblablement dues à la présence de la calotte d'huile qui tend la bicouche lipidique de part et d'autre de celle-ci.

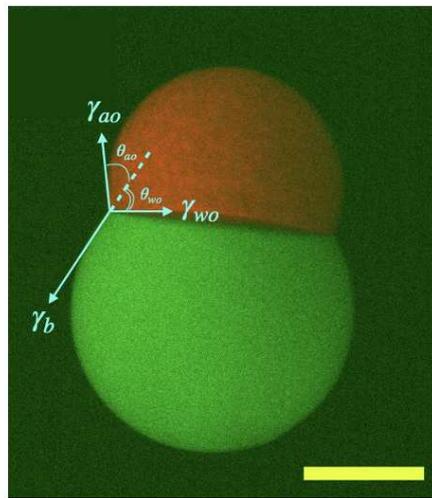


FIG. 2.21 Image composite au microscope confocal d'une pseudo-vésicule (huile marquée en rouge, phase aqueuse interne en vert) sur laquelle ont été tracés les angles de contact  $\theta_{ao} \approx 39^\circ$  et  $\theta_{wo} \approx 56^\circ$ . En utilisant l'équation de tension de surface, la tension de membrane  $\gamma_b$  peut être estimée. La barre d'échelle mesure  $200 \mu\text{m}$  de long.

La présence de traces d'huile dans la membrane pourrait également altérer la diffusion des lipides dans la membrane. Dans [146], Tom Robinson et ses collaborateurs ont comparé les coefficients de

diffusion des lipides pour des liposomes électroformés et des liposomes formés avec une méthode microfluidique, basée sur le démouillage d'une calotte d'huile, et contenant donc potentiellement des traces d'huile dans leur bicouche. Il en ressort que le coefficient de diffusion pour les liposomes électroformés est de  $4,5 \pm 1,6 \mu\text{m}^2/\text{s}$  et de  $5,7 \pm 0,4 \mu\text{m}^2/\text{s}$  pour un liposome formé avec une méthode microfluidique. Ce résultat indique que la potentielle présence d'huile résiduelle dans la bicouche n'a pas d'effet sur la diffusion des lipides dans la membrane.

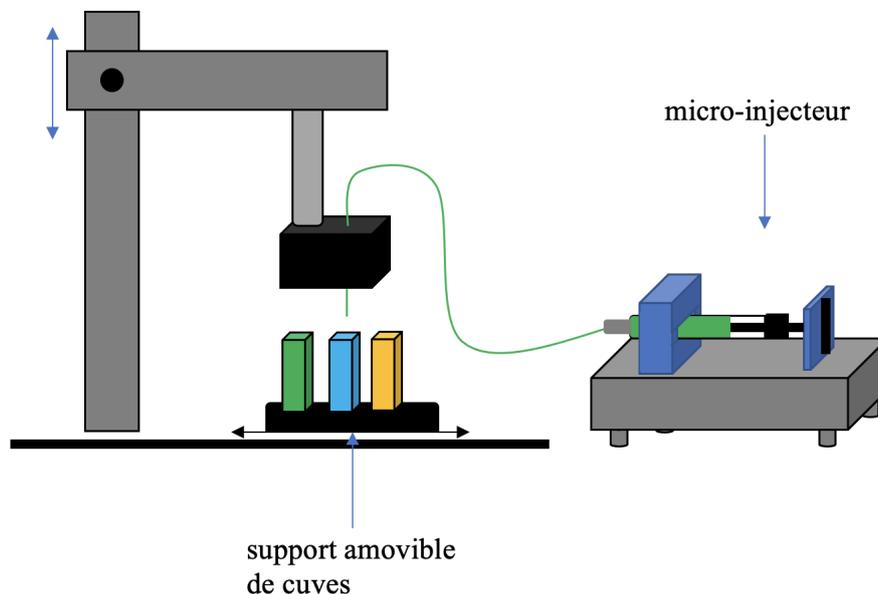


FIG. 2.22 Schéma de formation de pseudo-vésicules à l'aide d'un micro-injecteur. Les cuves verte, bleue et jaune représentent respectivement la phase interne, l'agarose et l'huile.

Un autre axe d'amélioration de notre système est de réduire la taille des pseudo-vésicules. Pour cela la micropipette peut être remplacée par un capillaire avec un embout plus fin qu'un cône de pipette (Fig. 2.22). Ce remplacement a permis de réduire la taille des pseudo-vésicules de 25 % en moyenne. En revanche la technique de formation perd en simplicité d'utilisation et en vitesse d'exécution. En effet avec une micropipette, une pseudo-vésicule est formé en quelques secondes contre quelques minutes avec un micro-injecteur.

## 2.7 Conclusion

A travers ce chapitre, nous avons présenté une méthode de formation de pseudo-vésicule simple et ne nécessitant que peu de matériel. De plus le système présenté est stable et reproductible (erreur relative sur la taille des vésicules de 10 %). Cependant la présence d'une calotte d'huile sur le sommet de la pseudo-vésicule mène à des tensions de surface assez hautes en comparaison aux tensions mesurées dans des vésicules électroformées. De plus la présence d'une monocouche de lipides entre la phase interne et la calotte d'huile limite l'utilisation de molécules pouvant faire office de surfactant, i.e. ayant des propriétés amphiphiles, comme par exemple les monomères d'alpha-hémolyse. En revanche la présence de SUVs dans la phase interne permet de contourner ce problème et d'avoir un système avec une membrane fonctionnalisable stable.

Enfin, la formation d'une pseudo-vésicule piégée dans un gel d'agarose facilite son imagerie et permet également d'effectuer des mesures d'excitation mécanique qui seront plus détaillées dans le chapitre suivant.



# Chapitre 3

## L'inclusion comme modèle mécanique du mécanorécepteur

### 3.1 Introduction

#### 3.1.1 Problématique

Dans le chapitre précédent, nous avons posé les premières briques pour fabriquer notre mécanorécepteur biomimétique, sous la forme d'une pseudo-vésicule piégée dans un gel d'agar, dont la membrane peut être fonctionnalisée par des nanopores protéiques transmembranaires. Nous avons également montré que cette vésicule pouvait être finement déformée par indentation du gel et que son excentricité, utilisée comme proxy de la déformation, augmentait linéairement avec la contrainte appliquée. Il nous semble légitime de nous demander s'il existe un modèle mécanique plus rigoureux pour décrire les déformations de ce mécanorécepteur biomimétique à des contraintes données. En particulier, il est pertinent de pouvoir estimer les contraintes exercées sur la membrane, avant d'y insérer des protéines mécanosensibles. Cette contrainte est-elle isotrope ? Quelle est la réponse dynamique de ce système à des contraintes dépendant du temps, comme par exemple lors de l'exploration tactile d'une surface rugueuse ?

Pour répondre à ces questions, nous développons dans ce chapitre un modèle d'inclusion pour décrire les propriétés mécaniques de notre mécanorécepteur. D'un point de vue mécanique, le problème sera posé comme celui d'une cavité liquide, sphérique, enfouie dans un milieu élastique semi-infini. Nous allons un cran plus loin dans l'approche biomimétique, en modélisant *expérimentalement* nos mécanorécepteurs artificiels par des gouttelettes aqueuses (ou gazeuses) noyées dans un élastomère, pour tester les modèles développés.

#### 3.1.2 Les inclusions comme capteurs de contraintes dans les tissus biologiques

De nombreux travaux de biophysique ont utilisé des inclusions liquides ou solides comme capteurs de contraintes dans les tissus. C'est le cas par exemple dans [147, 148] où les auteurs utilisent des micro-gouttelettes d'huile fluorescente injectées dans des tissus en développement, pour sonder les contraintes tissulaires lors de la morphogenèse. Ces gouttelettes, dont la taille est comparable à celle des cellules environnantes, peuvent être fonctionnalisées en surface par des protéines adhésives (intégrines ou cadhérines), ce qui permet de sonder comment les contraintes mécaniques du tissu en

dépendent. Physiquement parlant, les contraintes normales exercées par le tissu actif sont estimées en mesurant la courbure locale du contour de la goutte, puis en utilisant la loi de Laplace :

$$\sigma = \frac{2\gamma}{R} \quad (3.1)$$

où  $R$  est le rayon de courbure local et  $\gamma$  la tension de surface entre la goutte et le milieu environnant (approximé, en pratique, par le milieu de culture. . .). En utilisant cette méthode, les auteurs montrent par exemple que ces contraintes sont anisotropes, et dépendent de la présence des protéines adhésives.

Dans un autre registre, les auteurs de [149] utilisent une microsphère d'élastomère (du PDMS) comme micro-sonde de contrainte dans un agrégat cellulaire. Les auteurs calibrent dans un premier temps cette sonde lorsque l'agrégat est lui-même déformé par un indenteur monté sur un capteur de force, permettant une mesure de la contrainte macroscopique appliquée. Le modèle mécanique reliant la contrainte induite par le tissu et la déformation du capteur inclut un terme interfacial et une contribution élastique de l'agrégat, considéré comme un cylindre élastique. Les auteurs montrent ensuite la possibilité de mesurer les contraintes tissulaires d'un embryon de poisson Zèbre en mesurant ces déformations. Notons qu'ici, la mesure de la contrainte se fait à des échelles plus grandes que la taille de la sonde, dont on mesure une déformation moyenne, en un point. L'anisotropie des contraintes locales qui avait été observée dans les travaux décrits plus haut [147, 148], n'est, par construction du modèle, pas mesurable ici.

### 3.1.3 Mécanique d'une inclusion dans un milieu élastique

D'un point de vue plus physique et mécanique, le problème d'une inclusion ("vide", gazeuse, liquide ou solide) dans un milieu élastique a intéressé de nombreux chercheurs et ingénieurs en sciences des matériaux, du fait de la variété des situations dans lesquelles on le rencontre. Par exemple :

- En géophysique des roches, des bulles de gaz, capturées par la lave basaltique en fusion, sont parfois retrouvées emprisonnées dans la roche [150]. Il a été constaté que souvent, des fractures de la roche étaient présentes dans le plan équatorial de l'inclusion gazeuse [151, 152], (Fig.3.1A). Cette observation frappante a motivé d'intenses travaux de modélisation dans le domaine.
- En science des matériaux, les matériaux composites dopés par des ensembles de cavités solides, liquides ou gazeuses ont des propriétés mécaniques, acoustiques et thermiques remarquables. C'est le domaine des méta-matériaux qui a été très étudié dans la littérature [153].

De nombreuses approches théoriques ont été proposées pour modéliser contraintes et déformations au sein et à l'extérieur de l'inclusion. Une des plus originales et célèbres est dû à John D. Eshelby en 1957 [154]. L'idée clé de la méthode d'Eshelby est de représenter le problème de l'inclusion comme une superposition de deux corps élastiques, la matrice hôte d'une part et un volume du même matériau qui lui a été retiré, sorte "d'anti-cavité", d'autre part. La déformation de cette anti-cavité (appelée *déformation propre*) peut être reliée à celle de la matrice par le tenseur d'Eshelby [155]. Le calcul des composantes de ce tenseur, par la méthode des fonctions de Green, permet de déterminer les champs des contraintes et des déformations dans le matériau hôte causées

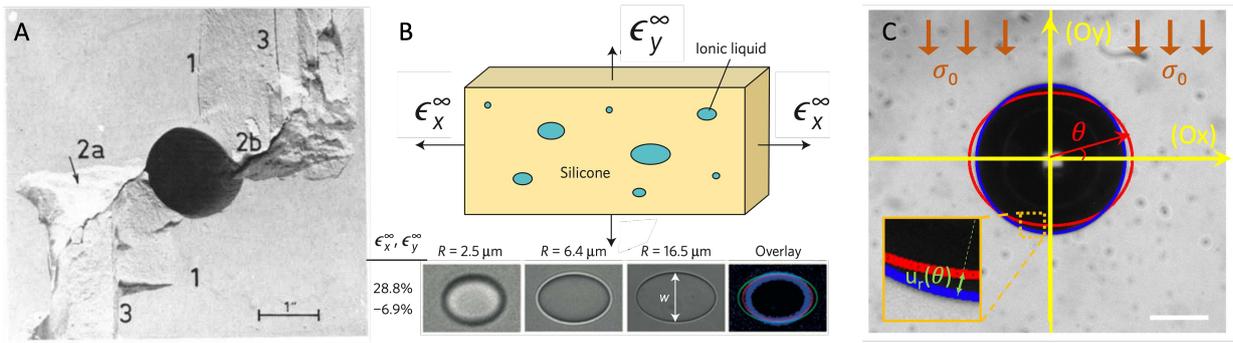


FIG. 3.1 A) Extrait de [152]. Image d'un bloc de plâtre contenant une cavité d'air, sous compression. On notera la présence de fracture dans le plan équatorial de la cavité. Barre d'échelle 1 inch = 2.54 cm. B) Extrait de [157]. En haut schéma d'un gel de silicone contenant des cavités liquides, sous déformation bi-axiale. En bas, image de microscopie en champ clair de cavités liquides de différentes tailles dans une matrice subissant la même déformation macroscopique. La dernière colonne montre la superposition de contours des cavités obtenus, montrant que les grandes cavités se déforment plus que les petites. C) Image au microscope d'une cavité d'air enfouie dans une matrice de PMDS, produite au laboratoire. La ligne bleue représente le contour de la cavité sans contrainte mécanique extérieure appliquée. Est superposé à l'image un schéma montrant la définition des axes, de l'angle  $\theta$ . La ligne rouge représente la prédiction théorique du modèle circulaire 2D d'une cavité soumise à une contrainte mécanique  $\sigma_0 = 250$  kPa. La barre d'échelle représente 200  $\mu\text{m}$ . En insert, zoom sur une portion du bord de la cavité pour définir le déplacement radial  $u_r(\theta)$ .

par des inclusions, dans des géométries sphériques et ellipsoïdales. Résultat remarquable, lorsque le matériau n'est pas soumis à des contraintes extérieures, les contraintes et les déformations au bord de la cavité sont uniformes.

Lorsque le matériau hôte est soumis à des contraintes extérieures, comme une compression uniaxiale – cas considéré dans ce manuscrit – les approches théoriques adoptent souvent le formalisme des fonctions de contraintes d'Airy<sup>1</sup>, dans des géométries 2D. Des approches analogues, quoiqu'encore plus ardues calculatoirement, permettent de traiter le cas d'une inclusion sphérique à 3D [150, 156]. Ces modèles 2D et 3D, que nous esquisserons plus loin, permettent de prédire la distribution des contraintes et des déformations autour de l'inclusion ainsi que les seuils de fracture et leur localisation équatoriale.

### 3.1.4 L'inclusion liquide et les contributions interfaciales

Dans le cas d'une inclusion liquide, on peut légitimement se demander si et comment la dissipation visqueuse du fluide, ainsi que sa tension interfaciale avec la matrice hôte, doivent être prise en compte pour calculer les déformations de la cavité. Concernant la contribution interfaciale, la question est par exemple traitée par [157], dans laquelle les auteurs étudient la déformation de

1. "Airy stress function" en anglais.

micro-gouttelettes liquides incluses dans une matrice élastique (Fig.3.1B). Ils montrent que la prise en compte des effet interfaciaux intervient lorsque la taille  $L$  des gouttelettes devient petite devant la longueur élasto-capillaire  $\mathcal{L}_{ec}$

$$\mathcal{L}_{ec} = \frac{\gamma}{E} \quad (3.2)$$

où  $\gamma$  est la tension de surface de la gouttelette avec la matrice et  $E$  est le module d'Young. Ce ratio élasto-capillaire donne la transition entre une déformation dominée par des effets de tension de surface ( $L \ll \mathcal{L}_{ec}$ ) et une déformation obtenu dans le cadre d'un modèle purement élastique ( $L \gg \mathcal{L}_{ec}$ ), le modèle de cavité vide, évoqué plus haut. Dans le cas d'un mécanorécepteur dans la peau, le module d'Young est de l'ordre de  $E = 10^5 - 10^6$  Pa, et la tension de surface typique des cellules, estimée par des méthodes d'extrusion en micropipette [158] est de l'ordre de  $\gamma = 0.1mN.m^{-1}$ . La valeur de la longueur élasto-capillaire est donc autours de  $\mathcal{L}_{ec} \approx 1nm$ , bien inférieure à la taille des mécanorécepteurs présentés dans le premier chapitre de ce manuscrit ( $L \sim 10 - 100\mu m$ ). La déformation d'un mécanorécepteur est donc principalement régie par l'élasticité environnante et doit être modélisée par des modèles de type Eshelby. Dans le cas de notre pseudo-vésicule, dont la taille est encore plus grande ( $L \sim 500\mu m$ ), cela apparaît d'autant plus légitime.

## 3.2 Déformations d'une cavité circulaire ou sphérique sous compression uniaxiale

### 3.2.1 Cavité circulaire 2D

Le cas d'une inclusion circulaire à deux dimension est souvent traité par la méthode des fonction de contraintes d'Airy. De manière un peu analogue à la définition du potentiel des vitesses utilisé en hydrodynamique, il s'agit de postuler l'existence d'un potentiel  $\Phi$  dont dérivent les contraintes  $\sigma$  [159] :

$$\sigma_x = \frac{\partial^2 \Phi}{\partial x^2} \quad (3.3)$$

$$\sigma_y = \frac{\partial^2 \Phi}{\partial y^2} \quad (3.4)$$

$$\sigma_{xy} = -\frac{\partial^2 \Phi}{\partial x \partial y} \quad (3.5)$$

En imposant les conditions de compatibilité des déformations [159], on peut montrer que  $\Phi$  est une fonction bi-harmonique, qui vérifie :

$$\nabla^4 \Phi = 0 \quad (3.6)$$

Des formes pour la fonction  $\Phi$ , devant vérifier l'équation bi-harmonique, sont alors proposées selon le problème considéré. Pour un matériau homogène (sans cavité) subissant une compression uniaxiale selon (-Oy, voir Fig.3.1C), on écrira par exemple  $\Phi = -\sigma_0 y^2/2$ , qui conduit à  $\sigma_y = -\sigma_0$  et  $\sigma_x = \sigma_{xy} = 0$ , d'après les équations 3.3,3.4 et 3.5. En coordonnées polaires avec  $\theta$  l'angle entre (Ox) et (OM), M étant un point quelconque dans le matériau, on obtient :

$$\Phi = -\frac{\sigma_0 r^2}{2} \sin^2(\theta) \quad (3.7)$$

$$\Phi = -\frac{\sigma_0 r^2}{2} (1 - \cos(2\theta)) \quad (3.8)$$

Comment cette forme de  $\Phi$  sera-t-elle modifiée si le matériau 2D contient un trou circulaire de rayon  $R$ ? Une approche possible est de proposer que le potentiel  $\Phi$  garde une forme proche de celle de l'équation 3.8, sans cavité :

$$\Phi = f_1(r) + f_2(r) (1 - \cos(2\theta)) \quad (3.9)$$

En respectant son caractère bi-harmonique, on peut alors déterminer  $f_1$  et  $f_2$ , et en déduire les contraintes qui s'écrivent :

$$\sigma_r = -\frac{\sigma_0}{2} \left[ \left(1 - \frac{R^2}{r^2}\right) + \left(1 - 4\frac{R^2}{r^2} + 3\frac{R^4}{r^4}\right) \cos(2\theta) \right] \quad (3.10)$$

$$\sigma_\theta = -\frac{\sigma_0}{2} \left[ \left(1 + \frac{R^2}{r^2}\right) + \left(1 + \frac{3R^4}{r^4}\right) \cos(2\theta) \right] \quad (3.11)$$

Si l'on s'intéresse aux contraintes mécaniques qui s'exercent sur le bord de cavité ( $r = R$ ), celles-ci s'écrivent :

$$\sigma_r = 0 \quad (3.12)$$

$$\sigma_\theta = -\sigma_0 (1 - 2 \cos(2\theta)) \quad (3.13)$$

La déformation du bord de cavité se déduit en utilisant la loi de Hooke inverse

$$\epsilon_\theta = \frac{1}{E} (\sigma_\theta - \nu \sigma_r) \quad (3.14)$$

où  $\nu$  est le coefficient de Poisson. Expérimentalement, nous mesurerons uniquement le déplacement radial des points du bord de cavité,  $u_r(\theta) \approx R\epsilon_\theta$ . En combinant les équations précédentes, lorsque  $r = R$  nous obtenons pour ce modèle 2D :

$$u_r \approx \frac{-\sigma_0 \cdot R}{E} (1 - 2 \cos(2\theta)) \quad (3.15)$$

La forme prédite d'une cavité déformée est schématisée sur la Figure 3.1C. L'équation 3.15 indique que le maximum de  $u_r$  est obtenu pour  $\theta = \pi/2$  [ $\pi$ ], lorsque le cosinus est égal à  $-1$ . À l'inverse pour  $\theta = \frac{\pi}{6}$  [ $\pi$ ],  $u_r$  est nul. Enfin, pour  $\theta = 0$  [ $\pi$ ],  $u_r$  est négatif. Ce modèle prédit que la contrainte mécanique au bord de la cavité est anisotrope, et effectivement maximale et compressive dans le plan équatorial de la cavité, ce qui explique la localisation des fractures, observées par exemple sur la Fig. 3.1A. Aux pôles, la contrainte est extensionnelle.

### 3.2.2 Cavité sphérique 3D

Le cas d'une cavité sphérique sous compression uniaxiale est traité dans [150, 156, 151]. Nous ne détaillerons pas le calcul ici, mais il consiste à décomposer le problème en 3 sous-problèmes qui correspondent aux directions principales des contraintes, et à chercher des solutions qui vérifient les conditions aux limites infiniment loin de la cavité ( $\sigma_{zz} \rightarrow \sigma_0$ , toutes les autres contraintes

sont nulles). Les auteurs obtiennent (attention, nous avons choisi ici de compter toujours  $\theta$  selon (Ox,OM), contrairement à [156, 151] qui utilisent l'angle " $\varphi$ " compté depuis l'axe (Oz) en coordonnées sphériques) :

$$\sigma_{\theta\theta} = \frac{-3\sigma_0}{2(7-5\nu)} \cdot [(5\nu-4) - 5\cos(2\theta)] \quad (3.16)$$

$$u_r(\theta) \approx \frac{-3\sigma_0 R}{2E(7-5\nu)} \cdot [(5\nu-4) - 5\cos(2\theta)] \quad (3.17)$$

où  $\nu$  est le coefficient de Poisson. Notons que comme dans le cas 2D, la contrainte et le déplacement sont maximales et compressives à l'équateur et à l'inverse, minimales et extensionnelles aux pôles.

### 3.3 Modélisation expérimentale : la cavité tactile

Les équations 3.12 et 3.15 permettent de prédire les contraintes et les champs de déplacement d'une cavité noyée dans une matrice élastique. Nous comparerons dans ce qui suit les déformations de notre pseudo-vésicules noyée dans un gel d'agar à ces modèles de cavité. Nous avons également souhaité développer un *modèle expérimental* pour tester ces modèles, sous la forme d'une inclusion sphérique, gazeuse ou liquide, enfouie dans un élastomère de Polydiméthylsiloxane (PDMS). Ce système, comme nous le détaillons ci-dessous est plus simple à produire que nos pseudo-vésicules d'un point de vue physico-chimique, et permet aussi de s'affranchir des problèmes de stabilité des systèmes membranaires, dans le temps et sous contrainte mécanique.

#### 3.3.1 Comment inclure une bulle/gouttelette unique dans un élastomère ?

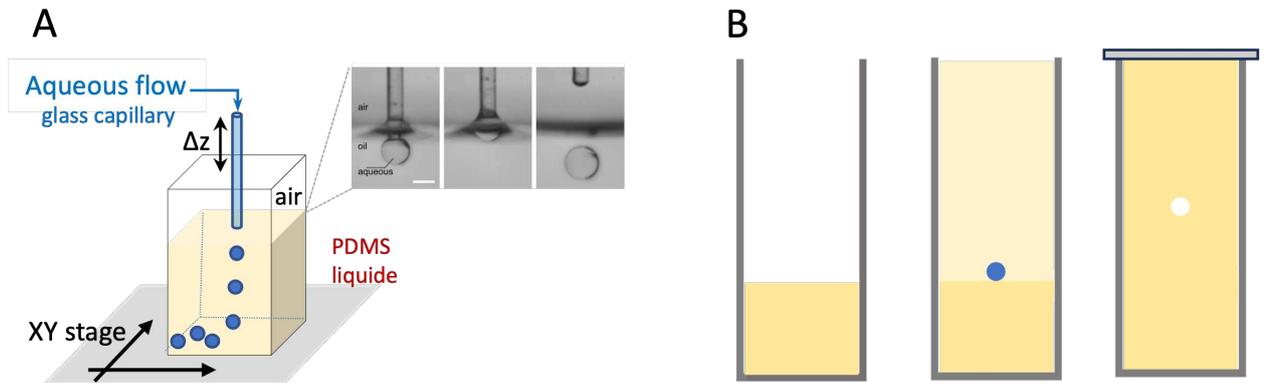


FIG. 3.2 A) Schéma de principe de l'imprimante à gouttelette utilisée pour produire des gouttes aqueuses dans du PDMS liquide. En insert, extrait de [160], vue de côté du détachement d'une goutte aqueuse dans un bain d'huile, par l'instabilité du piège capillaire. La barre d'échelle fait 300  $\mu\text{m}$  de long. B) Schéma de principe du moulage d'une cavité incluse dans une cuve parallélépipédique.

##### 3.3.1.1 Fabrication de la matrice de PDMS

La matrice élastique qui contient la cavité est faite de PDMS, qui est un élastomère optiquement transparent qui garde un caractère élastique pour des déformations de plusieurs pourcents. Son

utilisation a fait ses preuves dans l'équipe pour mimer les propriétés élastiques de la peau de notre doigt [37], ou les déflexions de papilles filiformes impliquées dans la perception de textures en bouche [13]. En pratique, pour le fabriquer, on prélève 20 mL de PDMS Sylgard 184 (Dow Corning) liquide auquel on ajoute 10 % en masse d'agent réticulant. Cette solution est placée dans un tube Falcon et mélangée énergiquement à l'aide d'une spatule pendant environ 5 minutes puis placée dans une centrifugeuse à 3000 tours par minute pendant 15 minutes. Pour limiter au maximum la formation de bulles parasites lors de la réticulation du PDMS, la solution est mise sous une cloche à vide<sup>2</sup>, typiquement pendant 2h, jusqu'à ce que la cadence de formation des bulles soit faible ( $\sim 1/\text{min}$ ).

### 3.3.1.2 Fabrication d'une cavité gazeuse

Notre première intention était de fabriquer une cavité *liquide* en incluant une gouttelette aqueuse dans la matrice de PDMS, non réticulée. La réalité physique a contrarié notre projet, puisque nous avons constaté que lors de la réticulation du PDMS, les gouttelettes aqueuses s'évaporaient, laissant à la place une cavité gazeuse remplie d'air. Ceci est dû à la perméabilité bien documentée du PDMS aux gaz [161], et donc ici à la vapeur d'eau émanant de la cavité aqueuse. Nous avons malgré tout utilisé ces cavités gazeuses, les forces interfaciales étant faibles aux grandes tailles considérées.

En pratique, afin d'obtenir des cavités dans la matrice de PDMS, des gouttes d'eau d'environ  $600 \mu\text{m}$  de diamètre sont imprimées dans du PDMS liquide, c'est à dire non réticulé, à l'aide d'une "imprimante à micro-gouttelette" développée au laboratoire [160]. Brièvement, de l'eau distillée est mélangée avec du bleu de méthylène (une pointe de spatule) pour que les gouttes aqueuses soient visibles dans le PDMS transparent. Cette solution est aspirée avec une seringue de 1 mL (Terumo) puis placée dans un pousse-seringue (KDS scientific) qui impose un débit constant  $Q = 10 \mu\text{L}/\text{min}$ . L'embout de la seringue est relié à un capillaire de  $100 \mu\text{m}$  de diamètre interne. L'extrémité de ce capillaire est attachée à un pot vibrant qui impose un déplacement périodique vertical selon l'axe (Oz), d'amplitude  $\Delta z \approx 2\text{mm}$ , à une fréquence de 1 Hz. L'extrémité du capillaire est positionnée au dessus d'une petite boîte de Petri contenant du PDMS liquide, de telle sorte que cette extrémité franchisse périodiquement l'interface PDMS/air (voir Fig 3.2A). Le principe de l'impression est le suivant [160] : sous l'action du pousse-seringue, une gouttelette se forme à l'extrémité du capillaire dans le PDMS liquide (Fig 3.2A, insert), puis, lorsque le capillaire est retiré, la goutte se détache par effet capillaire<sup>3</sup> et sédimente dans le PDMS. La boîte de Petri contenant le PDMS est elle-même montée sur une platine motorisée XY, ce qui permet de contrôler la position des gouttelettes produites dans le plan, à chaque oscillation du pot vibrant. Ces gouttelettes sont ensuite utilisées comme précurseurs de la cavité gazeuse, suivant la méthode de moulage que nous décrivons plus bas.

### 3.3.1.3 Fabrication d'une cavité liquide

Pour fabriquer une cavité liquide dans le PDMS, nous avons utilisé une solution aqueuse mélangée à du glycérol (50% vol/vol). Dans ce cas, nous avons constaté que le liquide contenu dans la

2. On peut ajouter un barreau magnétique au mélange dont l'agitation va favoriser la nucléation des bulles.

3. Qualitativement, la tension de surface PDMS/eau est plus petite que celle de l'interface eau/air, et la goutte "préfère" rester dans le PDMS en se détachant.

matrice de PDMS ne s'évaporait pas à la réticulation. Ceci est manifeste si l'on inclut un fluorophore dans le liquide (carboxyfluorescéine à quelque dizaines de  $\mu\text{M}$  par exemple). Le fluorophore est toujours visible et homogènement réparti dans la goutte si l'on observe la cavité en microscopie de fluorescence, après réticulation.

### 3.3.1.4 Moulage en cuve parallélépipédique

Une fois la fabrication du PDMS et des gouttes achevées, le moulage peut débuter. Celui-ci a lieu en deux temps (voir Fig 3.2B). Dans un premier temps, on verse environ 500  $\mu\text{L}$  de PDMS liquide dans une cuve parallélépipédique (comme utilisée au Chapitre 2). Cette dernière est placée dans une étuve à  $65^\circ\text{C}$  pendant environ une heure pour réticulation. Cette étape permet de créer un fond élastique, pour éviter que la future cavité ne se loge trop près des bords de la cuve. Dans un second temps, une goutte d'eau dans du PDMS liquide, issue de notre impression, est versée au dessus du PDMS ayant déjà réticulé dans la cuve. Du PDMS liquide est alors de nouveau introduit dans la cuve, à ras bord. Afin d'obtenir une surface plane, une lame en Plexiglas est plaqué contre la cuve en veillant à ne pas créer de bulles d'air pendant la manipulation. La cuve est alors placée dans l'étuve à  $65^\circ\text{C}$  pendant plusieurs heures.

A l'issue de ce processus,

- Si la goutte est purement aqueuse, son évaporation conduit à une cavité gazeuse, dont la position est légèrement plus haute que sa gouttelette précurseure. Nous n'avons pas étudié en détail le mouvement de la gouttelette durant cette évaporation, et la position finale de la cavité n'est pas très contrôlée. Ceci étant, les contraintes de compression uniaxiale sont uniformes (aux effets de bord près) et la position de la cavité dans la cuve n'est donc pas une variable cruciale dans ce problème.
- Si la goutte contient du glycérol, celle-ci ne s'évapore pas pendant la réticulation. D'autre part, étant plus dense que le PDMS liquide, elle sédimente et reste donc au contact du matelas de PDMS solide pré-réticulé. La position de la cavité liquide est donc ici déterminée par celle de la gouttelette précurseure.

## 3.3.2 Expériences de compression uniaxiale : résultats

### 3.3.2.1 Mesure des contraintes et des déformations

Une fois le moulage effectué, le bloc de PDMS contenant la cavité est extrait de la cuve et placé sur le dispositif de compression mécanique et d'imagerie présenté au Chapitre 2. La force normale appliquée  $F$  par le piston de section  $S = 1 \text{ cm}^2$  permet de calculer la contrainte appliquée :

$$\sigma_0 = \frac{F}{S} \quad (3.18)$$

Concrètement, la manipulation consiste à appliquer des incréments d'indentation du piston, à mesurer la force normale associée et à prendre une image de la cavité. Pour chaque force appliquée (entre 0 et 2N typiquement) le programme d'analyse d'images développé au Chapitre 2 nous permet de déterminer le centroïde de la cavité et son contour, en coordonnées polaires,  $r(\theta, F)$ . On en déduit le champ de déplacement radial du bord de cavité (voir l'insert de la Fig.3.1C) :

$$u_r(\theta, F) = r(\theta, F) - R(\theta, F = 0) \quad (3.19)$$

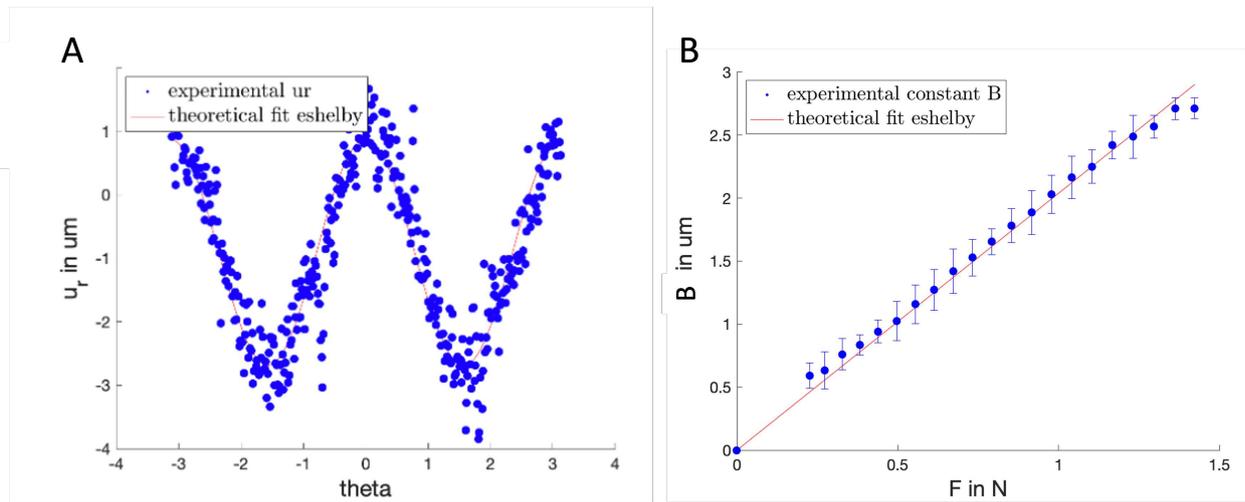


FIG. 3.3 A) Déplacement radial du contours de la cavité  $u_r$  en fonction de l'angle  $\theta$  pour une cavité gazeuse, sous une force normale de 0.85 N. B) Le préfacteur  $B$  en fonction de la force normale. La ligne rouge est un fit linéaire de pente  $K=2.0 \mu\text{m}/\text{N}$ .

où  $R(\theta, F=0) \approx R$  est le rayon de la cavité non-déformée, pour lequel nous acceptons une (légère) anisotropie issue des imperfections de moulage. Ce contour est la forme initiale de la cavité et servira de référence pour le calcul du déplacement  $u_r$ .

### 3.3.2.2 Ajustement par des modèles de cavité

Nous avons vu dans la section 3.1.4 que la déformation de la cavité était dominée par l'élasticité de la matrice hôte. Les modèles de cavités circulaires et sphériques esquissés dans la section prédisent le déplacement  $u_r$  sous compression uniaxiale. D'après les équations 3.15 et 3.17, on cherchera à ajuster nos données expérimentales par une équation de la forme :

$$u_r(\theta) = A + B \cos(2\theta) \quad (3.20)$$

Le facteur  $B$  est l'amplitude du cosinus et traduit l'anisotropie de la déformation de la cavité là où le paramètre  $A$  caractérise son déplacement global, isotrope. Quelque soit le modèle considéré (2D ou 3D), on s'attend à ce que ces deux grandeurs augmentent linéairement avec la contrainte  $\sigma_0$  appliquée

$$A \sim B \sim \frac{\sigma_0 R}{E} \quad (3.21)$$

Notons au passage que pour le modèle 3D, on s'attend à une dépendance de  $A(\nu)$  et  $B(\nu)$  avec le coefficient de Poisson  $\nu$  (voir Eq. 3.17), au contraire du modèle 2D.

Nous présentons sur la Figure 3.3 les résultats obtenus pour une cavité gazeuse ( $567 \mu\text{m}$  de diamètre) contenue dans un bloc de PDMS de hauteur 25 mm. Le déplacement radial du contours de la cavité est tracé en fonction de l'angle  $\theta$  pour une force  $F = 0.85 \text{ N}$ . L'ajustement des données par l'équation 3.20 est bon. Notons que pour  $F < 0.2 \text{ N}$ , la mesure du déplacement est trop bruitée et les valeurs de  $A$  et  $B$  ne sont pas significativement différentes du bruit de mesure ( $\sim 0.2 \mu\text{m}$ ), raison pour laquelle nous ne les représentons pas sur ce graphe. A basse force, il semble plus efficace d'ajuster la cavité en entier par une ellipse et d'étudier les variations du petit et grand axe, comme

nous le ferons plus bas.

Sur la Figure 3.3B, nous avons tracé l'évolution de  $B$  en fonction de la force normale  $F$ . Comme attendu, une relation linéaire est observée expérimentalement,  $B = K.F$  avec  $K=2.0 \pm 0.1 \mu\text{m}/\text{N}$ . Le modèle 2D prédit, si l'on prend  $E=2.7 \text{ MPa}$  comme dans [13] une valeur  $K_{2D} = 2R/SE = 2.1 \mu\text{m}/\text{N}$ . Pour le modèle 3D, on obtient, avec la même valeur de  $E$  et en prenant  $\nu=1/2$  (solide incompressible) une valeur  $K_{3D} = 1.8 \mu\text{m}/\text{N}$ . Ces deux modèles semblent donc correctement décrire la déformation de la cavité sous compression uniaxiale.

Nous avons répété ces expériences pour des cavités liquides (eau+glycérol) dans du PDMS et pour nos pseudo-vésicules dans un gel d'agarose. Sur la Figure 3.4A, nous représentons en échelle log-log les variations du coefficient  $B$  en fonction de la force appliquée, pour l'ensemble de ces systèmes. Nous observons que les différentes courbes ont la même pente, proche de 1 c'est-à-dire de la linéarité, mais sont dispersées verticalement. Si nous renormalisons ces courbes en traçant  $B/R$  en fonction de  $\sigma_0/E$  (voir Fig. 3.4B), les courbes sont moins dispersées et proche de la droite identité,  $y = x$ . Nous en concluons que le modèle d'inclusion vide décrit bien la déformation de nos cavités dans tous ces différents systèmes. Les effets du liquide contenant (le cas échéant) la cavité ne semblent pas jouer un rôle significatif. La présence du chapeau d'huile dans nos pseudo-vésicules non plus, puisque les résultats qui en découlent s'alignent bien sur la droite maîtresse.

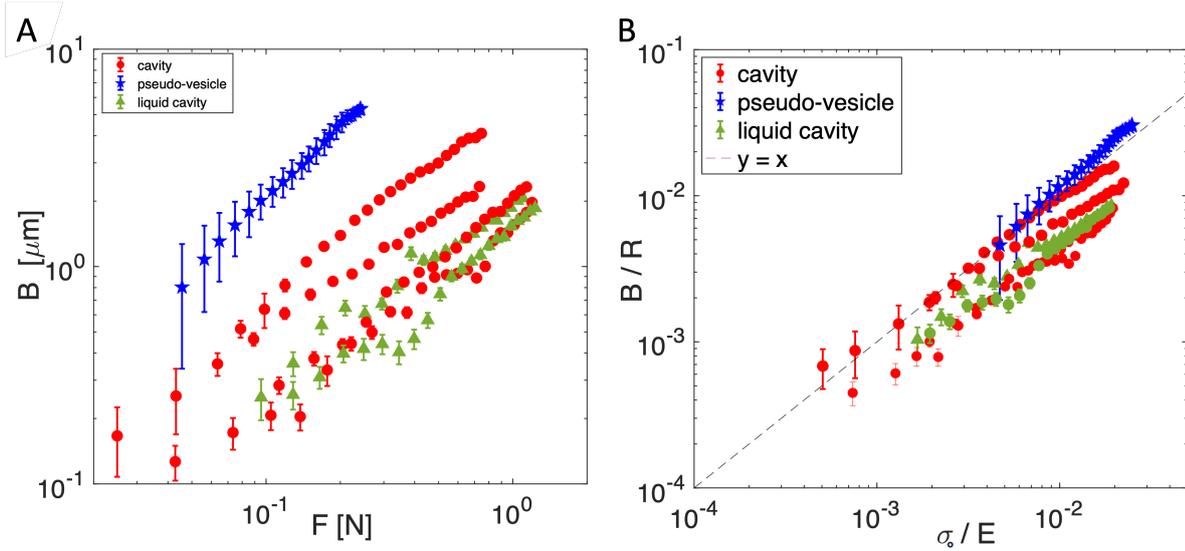


FIG. 3.4 A) Graphique en log-log du coefficient  $B$  pour des cavités liquides contenant du glycérol (magenta), des cavités gazeuses (rouge) et des pseudo-vésicules (bleu) en fonction de la force normale appliquée sur le gel. B) Graphique en log-log du coefficient  $B$  en fonction de la contrainte renormalisée,  $\sigma_0/E$ . La droite est l'identité,  $y = x$ .

### 3.3.3 Discussion

Si les modèles mécaniques d'inclusion sont assez ardues d'un point de vue calculatoire, leur résidu physique est en fait, somme toute assez trivial. Il pourrait se déduire d'une simple analyse dimensionnelle. L'échelle typique de longueur du problème étant  $R$  et l'échelle de contrainte  $E$ , la déformation typique de notre cavité est  $\epsilon = B/R$  et la contrainte adimensionnée,  $\sigma_0/E$ . Le rescaling opéré sur la Figure 3.4 s'écrit donc :

$$\epsilon \sim \sigma_0/E = \epsilon_{gel} \quad (3.22)$$

c'est la loi de Hooke! Sans grande surprise, on trouve que l'échelle de déformation de la cavité est simplement celle du gel. Le véritable apport de ces modèles réside en fait dans leur prédiction de l'anisotropie de la déformation et des contraintes en bord de cavité. Ces modèles obtiennent une contrainte en bord de cavité compressive à l'équateur, extensionnelle aux pôles et nulle à  $\theta = \pi/6$ . Si l'on revient à la question biologique initiale, cela laisse penser que *selon leur position angulaire sur la membrane, les pores protéiques mécanosensibles n'auront pas la même probabilité d'ouverture*. Même si nos dispositifs de mesure ne nous permettront pas ici de tester cette prédiction, une question biologique en découle naturellement :

*La densité de protéines mécanosensible dans la membrane des mécanorécepteurs est-elle isotrope ? L'Evolution a-t-elle favorisé une répartition anisotrope (aux pôles et pas à l'équateur ?) qui maximise la sensibilité tactile ?*

Nous laissons bien évidemment ces questions en suspens, mais une dernière question importante, plus pragmatique, demeure : *dans notre système biomimétique, les contraintes appliquées suffiront-elles à ouvrir des pores mécanosensibles ?*

Si les modèles de cavité semblent bien décrire la déformation de notre mécanorécepteur artificiel, nous n'avons pas de mesure locale des contraintes membranaires à confronter à ces modèles. . . Dans le système biologique et biomimétique, les contraintes doivent dépendre de l'élasticité de la bicouche lipidique et de son couplage avec l'environnement intra et extra-cellulaire. Le modèle de cavité vide, qui prédit notamment une contrainte normale  $\sigma_r$  nulle au bord de la cavité, nous paraît incomplet pour s'appliquer tel quel au problème biologique.

Le plus prudent nous semble d'accepter seulement la prédiction pour la déformation de la vésicule, que nous avons vérifié expérimentalement, pour calculer l'incrément d'aire  $\Delta S$  induit par une indentation du gel. Ensuite, connaissant le module élastique d'expansion de la bicouche  $K_a$ , on peut calculer la perturbation  $\Delta\gamma$  que cela cause à la tension membranaire[162] :

$$\Delta\gamma = K_a \frac{\Delta S}{S} \quad (3.23)$$

Si l'on s'intéresse à un petit élément de surface  $S = R^2\Delta\Omega$  aux pôles de la pseudo vésicule au repos ( $\Delta\Omega$  étant un élément d'angle solide), il devient, sous l'action de la compression  $S' = (1 + u_r(\pi/2))^2 R^2\Delta\Omega$ . En utilisant l'équation 3.15 on obtient, au premier ordre en  $\sigma_0/E$

$$\frac{\Delta S}{S} \approx 6 \left( \frac{\sigma_0}{E} \right)^2 \quad (3.24)$$

Expérimentalement, dans notre système biomimétique, nous appliquons des contraintes de quelques kiloPascals. Cela conduit à des valeurs de  $\frac{\Delta S}{S}$  de l'ordre de quelques pourcents.

Les valeurs des modules élastiques d'expansion  $K_a$  des bicouches lipidiques dépendent de la nature des lipides. Pour une bicouche de DOPC (composant principal de notre mix lipidique, voir Chapitre 2), les valeurs de la littérature [163] sont autour de 250 mN/m. L'incrément de tension membranaire créé par la compression du gel devrait donc être de quelques mN/m, à laquelle on se doit d'ajouter la tension de membrane à l'équilibre,  $\gamma_0 \approx 4\text{mN/m}$  (voir Ch.2). Ces valeurs couvrent les seuils d'ouverture des pores protéiques mécanosensibles ( $\sim 1$  à  $10$  mN/m [162, 66]), tels que mesurés sur des protéoliposomes par des expériences de microaspiration en pipette, couplées à des mesures électrophysiologiques. Notre système biomimétique devrait donc pouvoir être utilisé pour ouvrir

des pores mécanosensibles. Cet effort sera l'objet du Chapitre 4.

---

***Note pour le lecteur** – Le lecteur plus avide de Biophysique que de Mécanique pourra interrompre la lecture de ce Chapitre ici et passer directement au Chapitre 4 où nous présentons nos premières tentatives pour inclure des protéines mécanosensibles dans la membrane des pseudo-vésicules, par des méthodes de Biologie synthétique. La suite de ce Chapitre 3 sera en effet, plus mécanique : nous y étudions la réponse dynamique d'une cavité lorsqu'un "doigt artificiel" la contenant est frotté contre une surface texturée. Ces approches ne seront pas ici développées avec le système de pseudo-vésicules, mais sur les cavités gazeuses dans du PDMS. Ce qui suit est le fruit du travail de plusieurs étudiants de Master en stage au laboratoire, que j'ai co-encadrés, nommément Alexandre Pantel (M2), Widad Mesbahi (M1) et Mélio Drillet (M1).*

---

## 3.4 Réponse dynamique d'une cavité en frottement sur une surface texturée

### 3.4.1 Système et méthodes de mesure

#### 3.4.1.1 Un doigt artificiel cylindrique

Dans la partie précédente, nous avons étudié la déformation d'une cavité en compression uniaxiale, dans un contact plan-plan. L'extrémité du doigt humain est cependant courbée, ce qui induit une aire de contact finie entre la peau et le substrat, et des contraintes cutanées non uniformes spatialement. Pour prendre en compte ces aspects, nous avons opté pour une matrice élastique de PDMS en forme de demi-cylindre<sup>4</sup> (mimant le doigt) dans laquelle est incluse une cavité gazeuse (mimant toujours notre mécanorécepteur).

Le PDMS et les cavités sont fabriqués comme dans les parties 3.3.1.1 et 3.3.1.2. Notons que pour certaines expériences nous avons utilisé un PMDS plus mou en mélangeant du Sylgard 184 et du Sylgard 527 (50/50) [164].

La partie moulage est essentiellement identique, mais notons que cette fois les contraintes locales dans un contact cylindre/plan dépendent de la position verticale et latérale de la cavité. La contrainte normale  $\sigma_y$  dans un contact de Hertz cylindre/plan s'écrit[165] :

$$\sigma_y = \frac{\sigma_0}{\sqrt{1 + \frac{y^2}{e^2}}} \quad (3.25)$$

où  $y$  est la profondeur de la cavité sous le contact et  $e$  est l'épaisseur du contact et  $\sigma_0$  est la contrainte normale maximale, au niveau de la surface ( $y=0$ ), donnée par l'équation suivante :

$$\sigma_0 = \frac{2F_n}{\pi eL} \quad (3.26)$$

Le contrôle de la position verticale de la cavité est donc plus important ici que dans une compression uniaxiale où  $\sigma_y$  est constant. Pour contrôler la profondeur de la cavité dans le doigt artificiel,

---

4. et non une sphère, le cylindre permettant d'imager plus facilement la cavité à travers sa face plane.

0,2 mL de PDMS sont versés dans un moule en forme de demi-cylindre concave en Plexiglas d'un diamètre  $2R_c = 2,1\text{ cm}$  et d'une longueur  $L = 1\text{ cm}$  puis placé dans une étuve à  $65^\circ\text{C}$  pendant 30 minutes (voir Fig. 3.5). Après réticulation du polymère, du PDMS liquide est de nouveau versé dans le moule jusqu'à ce que ce dernier soit rempli de PDMS. Une gouttelette aqueuse est placée dans le moule au niveau du fond réticulé, comme précédemment. Afin d'obtenir une surface plane, une lame en Plexiglas est plaquée contre le moule en veillant à ne pas créer de bulles d'air pendant la manipulation. Le dispositif est placé à l'étuve à  $65^\circ\text{C}$ , l'apex du cylindre orienté vers le haut pendant quelques heures pour faire réticuler le PDMS. L'eau de la goutte s'évapore et tend à monter vers l'apex du cylindre. Le fond solide de la première étape permet de limiter son ascension. *In fine*, on dispose d'une cavité d'air dans le demi-cylindre de PDMS, à une distance d'1 à 2 mm de l'apex. Enfin, le demi-cylindre est démoulé avec précaution en utilisant un scalpel et de l'isopropanol pour faciliter son décollage des parois de Plexiglas. Pour les expériences, le demi-cylindre est collé sur une plaque de verre au plasma à oxygène sous hotte, en ayant préalablement pris soin de ne laisser aucune impureté sur la surface plane grâce à l'utilisation de scotch.

Notons enfin que pour certaines expériences, nous avons souhaité décorer la surface du doigt "d'empreintes digitales". En pratique, nous avons micro-usiné (microfraise Minitech) des rainures linéaires (période spatiale  $\lambda=254\ \mu\text{m}$ , largeur  $127\ \mu\text{m}$ , profondeur  $50\ \mu\text{m}$ ) dans une piscine rectangulaire ( $500\ \mu\text{m}$  de profondeur, 1 cm de large). Après le démoulage de PDMS, une fine bandelette décorée d'empreintes est obtenue, que nous pouvons attacher à la surface du doigt par adhésion, après traitement au plasma.

De manière alternative, nous avons également (ultérieurement) gravé des empreintes *directement* sur la face interne du moule hémicylindrique, en le positionnant sur un 4<sup>e</sup> axe qui permet une rotation de la pièce. Les dimensions/période des empreintes sont les mêmes. L'intérêt de cette dernière méthode est de pouvoir positionner la cavité plus proche de l'apex du cylindre.

### 3.4.1.2 Montage tribologique

Les expériences de frottement ont été effectuées au laboratoire de Sciences et Ingénierie de la Matière Molle (SIMM, ESPCI/SU/CNRS, Paris) en collaboration avec Antoine Chateauminois. Le schéma du montage expérimental tribologique que nous avons utilisé est représenté sur la Fig. 3.6. Brièvement, celui-ci comporte les éléments suivants :

- L'échantillon est monté sur une platine de tilt. Celle-ci permet de régler le parallélisme entre la génératrice du cylindre et la surface sondée.
- La platine de tilt est montée sur un actionneur qui permet d'imposer la position verticale (selon (Oy)) de l'échantillon, *ou bien* la force normale imposée (0-10 N).
- Le porte-échantillon est également connecté à un capteur de frottement à jauge de contrainte (0-50 N).
- La surface sondée (des marches de hauteurs contrôlées, ou des surfaces rugueuses, voir plus bas) sont attachées à une platine mobile qui permet de les déplacer à vitesse constante (typiquement  $v= 0.02$  à  $0.2\text{ mm/s}$ ).
- Le cylindre est éclairé en transmission par une source LED. Une première caméra (*caméra 1*) permet, grâce à un miroir de renvoi, de visualiser le contact par le dessous, pour régler le tilt, et de mesurer la largeur du contact.

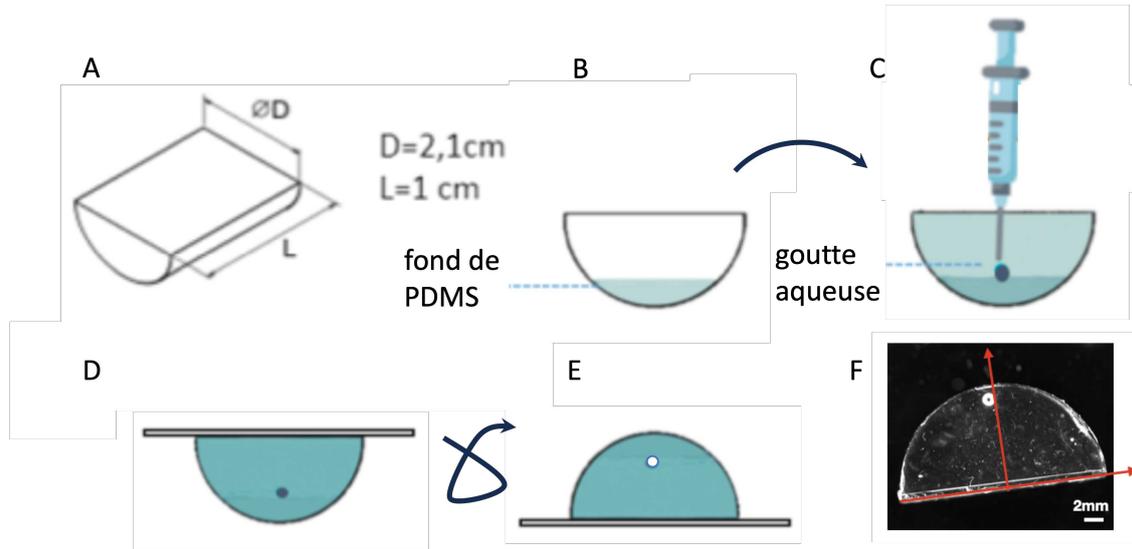


FIG. 3.5 Schéma du moulage du demi-cylindre de PDMS. A) Schéma et dimensions du moule hémicylindrique. B) Un fond de PDMS est pré-réticulé pour contraindre la position de la cavité. C) La gouttelette aqueuse est introduite dans le moule. D) Une lame de Plexiglas vient fermer le moule, qui est retourné E) pour la réticulation. F) Image au microscope du demi-cylindre démoulé. La position de la cavité est à 7.7 mm de la base et fait un angle de 1.3° avec la normale. Sa taille est de 1.1 mm de diamètre.

- Une seconde caméra (*caméra 2*), latérale, permet d'imager le cylindre par sa face plane, pour enregistrer les images de la cavité lors du frottement (fréquence d'acquisition 16.5 Hz, caméra équipée d'un objectif Navitar de grandissement 9,2).

### 3.4.2 Réponse statique dans le cas du contact cylindre plan

#### 3.4.2.1 Contact de Hertz

Le contact de notre doigt artificiel contre la surface sondée est un contact cylindre/plan. Le modèle de Hertz [165] prédit la variation de l'épaisseur du contact  $e$  en fonction de la force normale  $F_n$  :

$$e = 4\sqrt{\frac{F_n R_c}{\pi E L}} \quad (3.27)$$

où  $R_c=1$  cm le rayon du demi-cylindre,  $L=1$  cm sa longueur et  $E$  le module d'Young du PDMS et où le coefficient de poisson est égal à 0,5. Nous avons représenté sur la Fig. 3.7 la variation de  $e$  mesurée en fonction de  $F_n$ , pour un doigt lisse en PDMS Sylgard 184. L'ajustement des données expérimentales par l'équation 3.27 est satisfaisant et conduit à un module d'Young  $E = 2,9$  MPa, une valeur en accord avec les mesures de la littérature [71]. L'accord entre l'ajustement et les données est moins bon à petites forces, ceci étant probablement dû à des effets adhésifs, que nous négligeons ici. Notons enfin que pour les cylindres en PDMS plus mou (Sylgard 184/527) une valeur de  $E = 1.6 \pm 0.1$  MPa est obtenue (non montré), indépendamment de la présence ou non d'empreintes digitales.

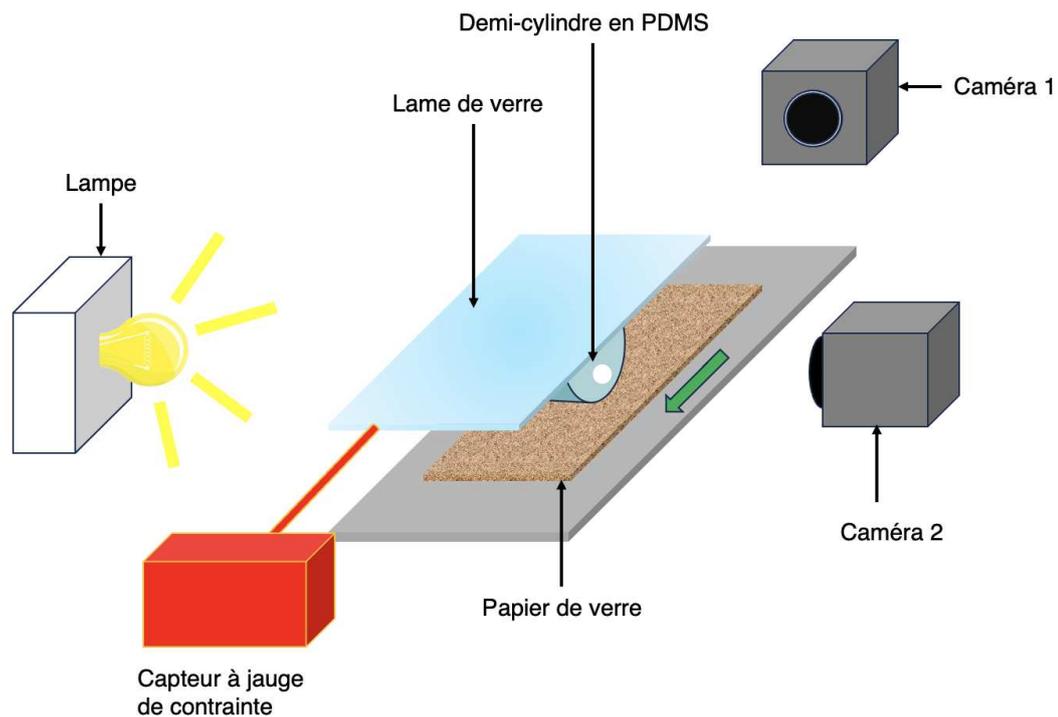


FIG. 3.6 Schéma du dispositif expérimental utilisé au laboratoire SIMM. La flèche verre donne la direction du déplacement du porte-échantillon (papier de verre).

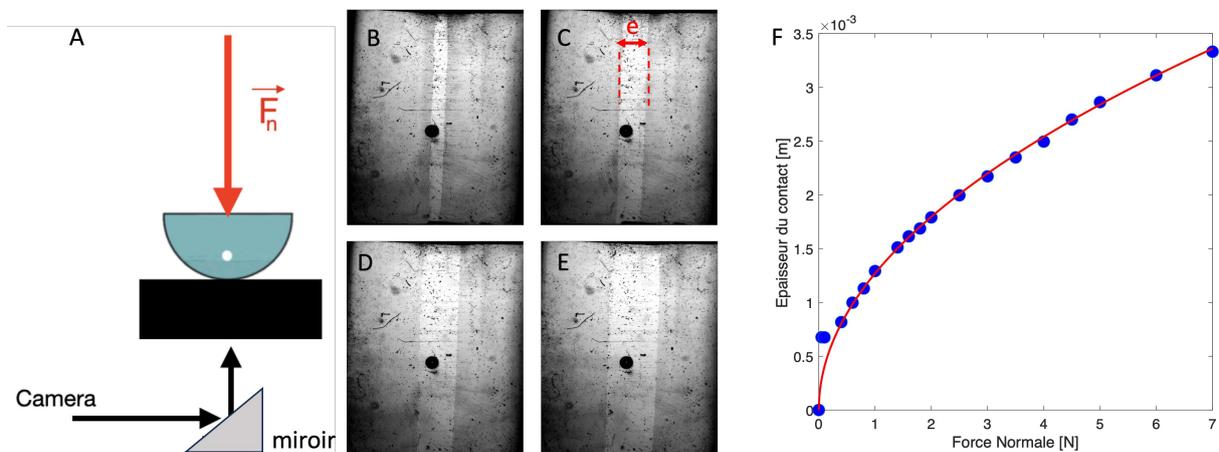


FIG. 3.7 Épaisseur de contact entre le demi-cylindre et la surface en fonction de la force normale.

### 3.4.2.2 Déformation de la cavité dans un contact cylindre/plan

Pour ces mêmes expériences d'indentation statiques, nous avons mesuré avec la caméra latérale la déformation de la cavité en fonction de la force normale appliquée. Nous avons vu plus haut, que pour une compression uniaxiale, le déplacement du bord de la cavité s'écrit sous la forme suivante  $u_r = A + B \cdot \cos(2\theta)$  avec un coefficient  $B \sim \frac{\sigma \cdot R}{E}$ . Dans le cas présent, la contrainte selon  $y$  n'est plus uniforme. En combinant les équations 3.25 et 3.26 dans 3.27, on obtient :

$$B = \frac{2R}{\pi eEL} \cdot \frac{1}{\sqrt{1 + \frac{y^2}{e^2}}} F_n \approx \sqrt{\frac{F_n}{4\pi EL}} \sqrt{\frac{R}{R_c}} \quad (3.28)$$

dans la limite  $y \ll e$ , ce qui est approximativement le cas ici. Expérimentalement, l'ajustement du déplacement  $u_r$  par l'équation 3.21 reste bon. Nos valeurs de  $B$  sont reportées sur la Figure 3.8. Nous observons une dépendance quasi-linéaire de  $B$  avec  $F_n$  et non une relation en racine carrée, comme attendu. Une légère inflexion de la courbe est observée à grande force, il serait probablement nécessaire de répéter ces expériences dans cette gamme de forces, pour laquelle la taille du contact  $e$  devient grande devant la taille de la cavité  $R$ . Enfin, une modélisation plus spécifique du problème de la déformation de la cavité dans un contact de Hertz apparaît nécessaire.

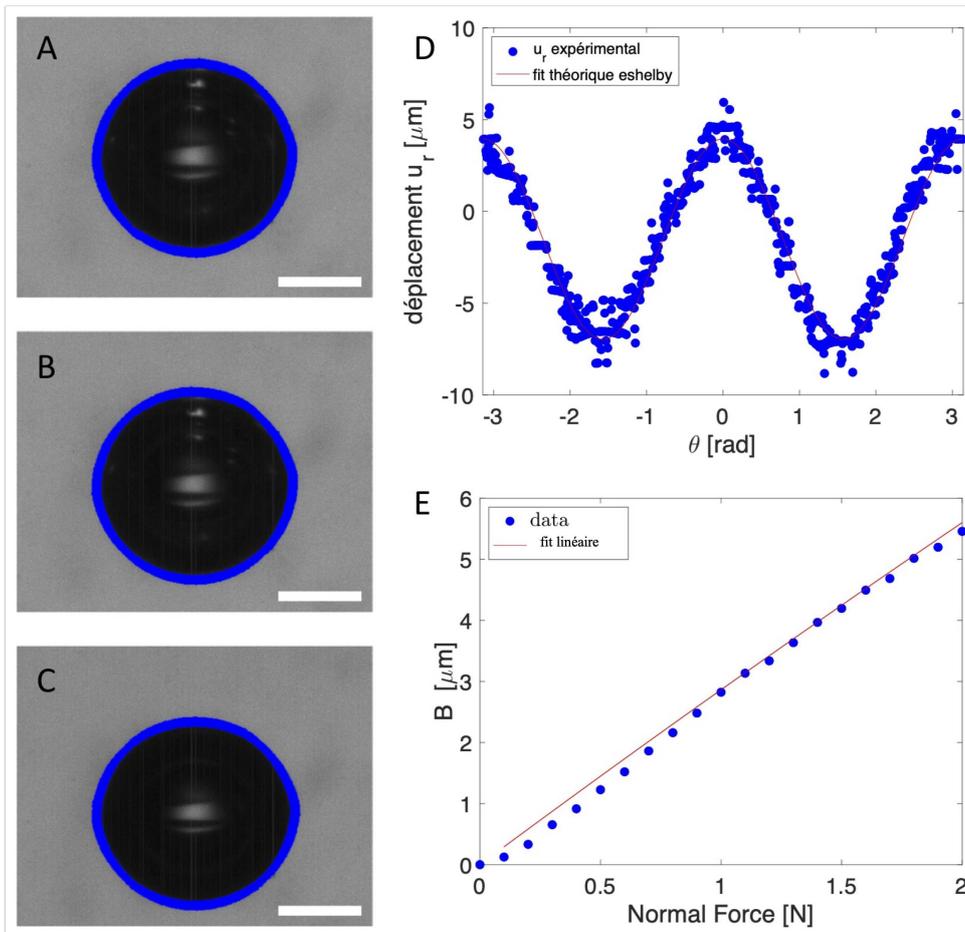


FIG. 3.8 Déformation statique de la cavité. (A) à (C) Images de la cavité pour une force normale de 0.2 N, 0.6 N et 2 N respectivement. Échelle : 200  $\mu\text{m}$ . (D) Déplacement  $u_r$  en fonction de l'angle  $\theta$ . (E) Constante  $B$  en fonction de la force normale. En rouge : fit linéaire.

### 3.4.3 Réponse dynamique en frottement

Nous avons cherché à déterminer dans ce qui suit la réponse de la cavité lorsqu'elle est frottée contre une surface texturée. L'approche est ici essentiellement expérimentale : quelles sont les fluctuations de forme et de position de la cavité lorsque le doigt explore une texture à vitesse constante ? Peut-on discriminer différentes rugosités en comparant ces fluctuations ? Y a-t-il un

effet des empreintes digitale à cette échelle locale ?

Pour répondre à ces questions, nous avons effectué deux séries d'expériences : la première consiste à mesurer ces fluctuations lorsque la cavité glisse sur une "texture élémentaire" constituée d'une marche de hauteur contrôlée. La seconde série s'intéresse au frottement contre des surfaces rugueuses réelles, des papiers de verre de différentes granulosités.

Pour analyser ces expériences, nous avons laissé de côté le modèle de déformation (Eq. 3.21), qui n'a pas été validé pour un contact statique. Lors d'un glissement, en plus de contraintes normales, des contraintes tangentielles de frottement vont s'appliquer sur la cavité. Nous n'attendons donc pas à ce que la forme de la cavité soit décrite par ces modèles valables en compression uniaxiale. La déformation dynamique (et même statique) d'une cavité sous l'effet d'un frottement solide contre la matrice hôte n'est pas traitée dans la littérature, à notre connaissance. A l'heure où nous écrivons ces lignes, nous n'avons pas à disposition un modèle théorique pour prédire ces déformations et l'on peut anticiper un travail théorique conséquent. Ainsi, pour quantifier la forme de la cavité, nous avons, en pratique, ajusté sa forme par une ellipse, dont nous avons mesuré les coordonnées du centroïde  $x$  et  $y$ , ainsi que le grand/petit axe  $a$  et  $b$ , respectivement. Quantifier les fluctuations de forme par un ajustement elliptique permet aussi d'augmenter la quantité d'information prise en compte dans l'analyse d'image (en  $R^2$ ) par rapport à une mesure de contour (en  $R$ ).

### 3.4.3.1 Frottement contre des marches de hauteur contrôlées

Nous avons étudié le frottement du doigt artificiel contre des substrats micro-usinés (Fig. 3.9A1-A3). Le processus se déroule en 4 phases : premièrement, le doigt artificiel est mis en contact avec le substrat avec une force normale donnée. A cette force correspond une position verticale de l'échantillon *que nous gardons fixe dans toute l'expérience*. Dans un second temps, le substrat est mis en mouvement à vitesse constante,  $v$ . Après une période de charge, le doigt entre en glissement stationnaire (Fig. 3.9A1). La force de frottement mesurée est constante (position  $u = vt < 2$  mm sur la Fig. 3.9C1). Le bord latéral du doigt rencontre alors la marche (Fig. 3.9A2), c'est la troisième phase du processus. Comme la position verticale du doigt est gardée constante, le passage de la marche induit une augmentation de l'indentation, et donc de la force normale ( $4 < u < 8$  mm sur la Fig. 3.9C2). Lors du passage de la marche, la cavité se déforme (voir les images prise au moment de la déformation maximale pour différentes marches sur les Figs. 3.9B1-B3). Enfin, dans l'état final, le doigt est en glissement stationnaire sur la partie supérieure de la marche.

Lorsque la surface du doigt est décorée d'empreintes digitales, on observe deux effets : premièrement, la force de frottement (en bas et en haut de marche) est en module plus faible que pour l'expérience faite avec un doigt lisse. Deuxièmement, lors du passage de la marche, la force de frottement s'accompagne de modulations, dont la période spatiale est celle des empreintes  $\lambda$ .

Nous avons systématiquement analysé les images de la cavité, pour en extraire les coordonnées du centroïde et sa déformation. Par souci de simplicité, nous présentons ci-dessous les résultats pour les observables dont les variations sont les plus significatives, la position verticale  $y$  du centroïde et le grand axe  $a$ . Les données sont tracées en fonction du déplacement du substrat  $v(t - t_0)$ , où  $t_0$  est l'instant où la position de la marche coïncide verticalement avec le centre de la cavité.

Nous avons représenté sur la Figure 3.10 les variations de  $y$  et  $a$  en fonction du déplacement. Nos mesures montrent que pour les gammes de vitesse choisies leurs variations sont quasi-statiques,

puisque des courbes obtenues à différentes vitesses (0.02 et 0.1 mm/s) se surperposent parfaitement

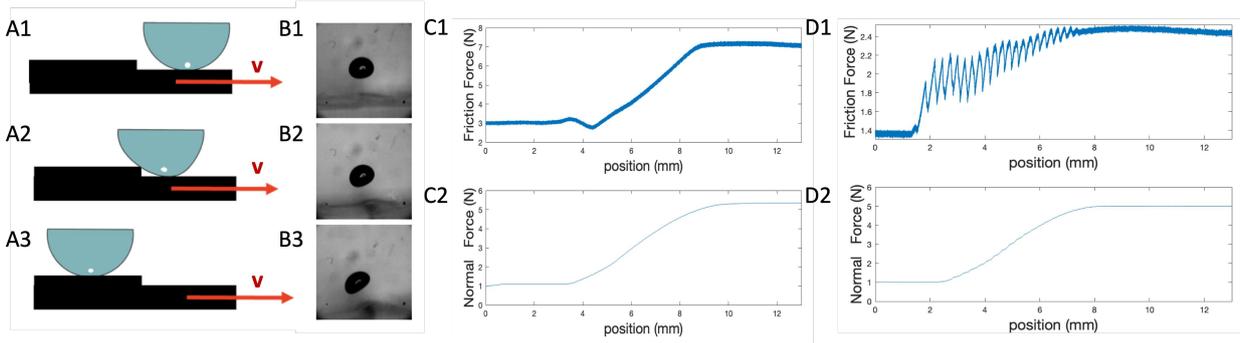


FIG. 3.9 A1-A3) Schémas du frottement du doigt artificiel contre une marche. B1-B3) Images de la cavité (diamètre 1.1 mm, ici la gouttelette a été faite avec une seringue) aux instants de déformation maximale, pour des marches de hauteurs  $h=100, 200$  et  $500 \mu\text{m}$ , respectivement. C1-C2) Force de frottement et force normale en fonction du déplacement  $u = vt$  lors du passage d'une marche  $h=500 \mu\text{m}$ , avec  $v = 0.1 \text{ mm/s}$ . D1-D2) Même graphes pour un doigt décoré d'empreintes digitales.

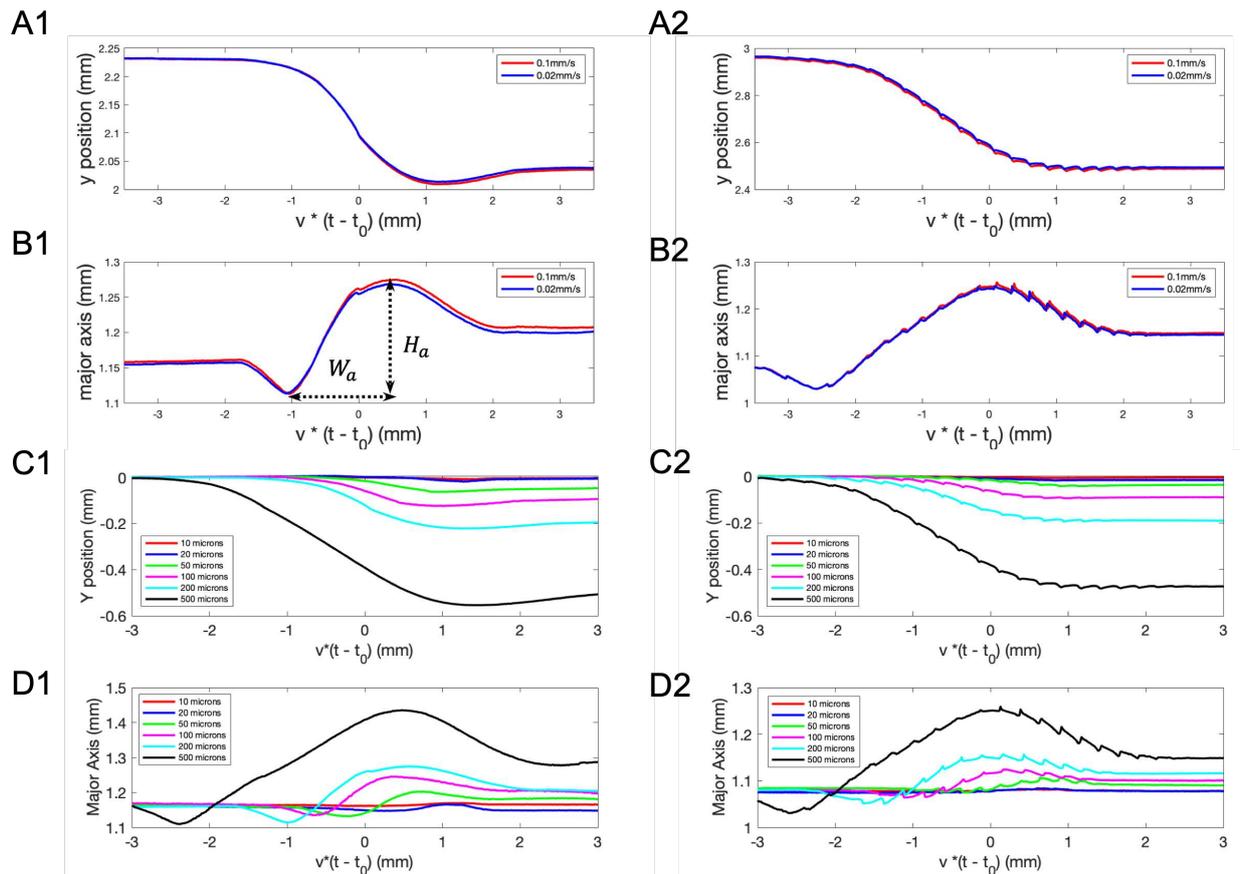


FIG. 3.10 A1) (resp. B1) Coordonnée  $y$  du centroïde (resp. du grand axe  $a$ ) en fonction du déplacement. Les deux courbes correspondent à deux vitesses différentes. Les flèches pointillées indiquent comment  $H_a$  et  $W_a$  sont mesurés. C1) (resp. D1) Variation de  $y$  (resp.  $a$ ) en fonction du déplacement pour des marches de différentes hauteur, ( $F_n = 1\text{N}$ ,  $v=0.1 \text{ mm/s}$ ). A2-D2) Même tracés, mais pour un doigt décoré d'empreintes digitales.

(voir Figure 3.10A-B) quand elles sont tracées en fonction de  $v(t - t_0)$ . Il n'y a pas d'effet de la vitesse sur la dynamique et la déformation de la cavité. A part cela, les variations de  $y$  et  $a$  ont la même forme typique, quelque soit  $h$ . Lorsque le doigt rencontre le bord de la marche, la cavité remonte ( $y$  est compté vers le bas) puis atteint un nouvel état stationnaire. Le grand axe  $a$  a une variation plus complexe : initialement "écrasée" ( $a_i > 2R$ ) lors du glissement stationnaire, la cavité se détend ( $a$  diminue jusqu'à  $a_{min}$ ) lorsque le doigt rencontre le bord de la marche. Le contact du doigt sur la surface inférieure de la marche se défait au profit d'un pivot d'une partie plus latérale du doigt sur le bord de la marche. Ensuite, le doigt "escalade" la marche (Fig. 3.9A2) et la déformation augmente, atteignant un maximum ( $a_{max}$ ). Il est vraisemblable que ce pic corresponde à un nouveau seuil de frottement statique, qui doit être franchi pour parvenir au glissement sur la partie supérieure de la marche. Le processus se finit par le glissement stationnaire en haut de marche. De ces graphes, nous extrayons l'amplitude typique  $H_a = a_{max} - a_{min}$  et la distance typique  $W_a$  correspondante. Nous traçons ces grandeurs sur la Figure 3.11.

L'amplitude  $H_a$  de la perturbation induite par le passage de la marche croît de manière monotone avec la hauteur de la marche  $h$ . La largeur de l'événement  $W_a$  croît également. De manière intéressante, si l'on renormalise  $W_a$  par la largeur du contact final  $e_f$ , la courbe est quasiment plate en fonction de  $h$ . Cela suggère que le processus est dominé par un renouvellement du contact, au passage de la marche. On notera également que les grandeurs  $W_a$  et  $H_a$  semblent permettre de discriminer les différentes hauteurs de marche. Des mesures supplémentaires sont en cours pour collecter plus de statistiques sur ces données.

Notons enfin que pour ce qui est du doigt décoré d'empreintes, la même phénoménologie globale est observée, mais, comme pour la force de frottement macroscopique, des modulations à la période spatiale  $\lambda$  s'ajoutent aux enveloppes des courbes (Fig. 3.10A2-D2). C'est une première observation de l'effet empreinte à l'échelle de notre mécanorécepteur. Ces modulations semblent correspondre, sur les films, à des accrochages successifs des bords des empreintes sur le coin de la marche, à la manière d'une roue crantée. Nous n'avons malheureusement pas accès avec notre

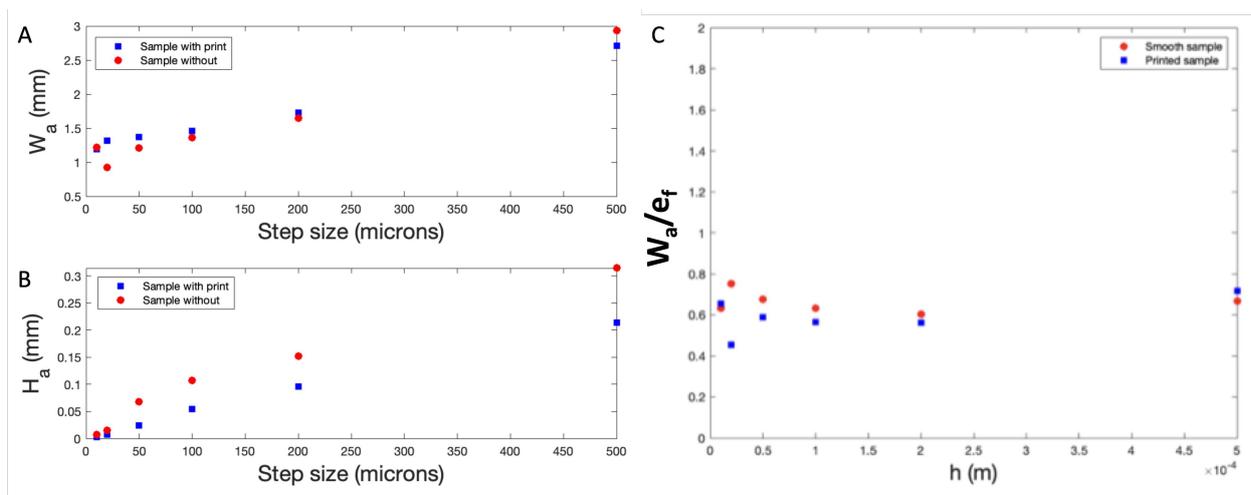


FIG. 3.11 A) Evolution de la distance typique  $W_a$  de perturbation de  $a$  lors du franchissement de la marche, en fonction de la hauteur  $h$ . B) Evolution de l'amplitude typique  $H_a$  de la perturbation. C) Même graphe que A) mais avec une distance  $W_a$  normalisée par l'épaisseur  $e_f$  finale du contact.

système d'imagerie à une visualisation exploitable de l'interaction empreintes/marche. Finalement, les amplitudes/distance typiques  $H_a$  et  $W_a$  ne diffèrent pas fortement de leur analogues obtenus sans empreintes.

### 3.4.3.2 Frottement contre des surfaces réelles de rugosité statistique

Nous avons également mené une série d'expériences en frottement sur des surfaces rugueuses "réelles", des papiers de verre de deux rugosités différentes. Nous avons considéré le papier de verre commercial de grade P180 (taille de grain typique  $82 \mu\text{m}$ , "rugosité+") et le P1000 (taille de grain  $18 \mu\text{m}$ , "rugosité-"). Les expériences sont menées à force normale constante ( $F_n = 0.1\text{N}$  à  $2\text{N}$ ) à deux vitesses différentes. La même analyse d'image est opérée, mais cette fois nous présenterons aussi la coordonnée  $x$  du centroïde dans ce qui suit. Nous avons estimé le bruit de mesure en faisant des expériences hors contact et en faisant défiler la texture sous le doigt. Nous obtenons un bruit typique de  $\zeta_a^0 = 0.05 \mu\text{m}$  pour  $a$  et de  $\zeta_{x,y}^0 = 1 \mu\text{m}$  pour  $x$  et  $y$ , probablement à cause des vibrations mécaniques induites par le mouvement de la platine motorisée. Nous avons représenté sur la Figure 3.12A-B les traces temporelles typiques obtenues pour  $y$  et  $a$ , lors d'un glissement contre une surface texturée. Des ces graphes nous extrayons l'écart type des fluctuations,  $\zeta_x$ ,  $\zeta_y$  et  $\zeta_a$  que nous reportons en fonction de la force normale sur la Figure 3.12C-E, pour deux vitesses différentes et les deux rugosités sondées. Ici aussi, nos résultats sont quasi-statiques et ne dépendent pas de la vitesse de glissement. Pour le substrat le moins rugueux,  $\sigma_y$  ne se distingue pas du bruit de mesure  $\zeta_{x,y}^0$  sur la gamme de force sondée, à la différence du substrat plus rugueux pour lequel les fluctuations sont triplées (Fig. 3.12D). En ce qui concerne la coordonnée  $x$  et le grand axe, les fluctuations augmentent avec la force. Pour le grand axe  $a$  cette augmentation est approximativement linéaire avec la force normale (Fig. 3.12E) et la pente dépend de la rugosité sondée. Il est clairement possible de discriminer les deux textures en analysant ces fluctuations de forme pour des forces supérieures à  $0.5 \text{ N}$ .

### 3.4.3.3 L'effet empreinte à l'échelle d'un mécanorécepteur

Lorsque la surface du doigt est décorée d'empreintes, les variations temporelles de  $x$ ,  $y$  et  $a$  montrent des sur-modulations, à la fréquence  $v/\lambda$  (voir Fig. 3.13). Cette fréquence est manifeste si l'on regarde la transformée de Fourier du signal. Sur la Figure 3.13C, nous avons représenté le spectre de puissance de  $y(t)$ , que l'on nomme  $PS_y(f)$ . Celui-ci est calculé en prenant le module carré de la transformée de Fourier numérique du signal, et normalisé de telle sorte que  $\int PS_y(f)df = \sigma_y^2$ . Ce spectre présente un pic à la fréquence fondamentale  $f$  dont la valeur dépend de la vitesse de glissement (insert Fig. 3.13C). Si l'on trace les spectres issus d'expériences à différentes vitesses en fonction de la fréquence renormalisée  $f\lambda/v$ , les courbes se rassemblent et la fréquence fondamentale est effectivement proche de 1. Sur la Figure 3.13D, nous avons tracé la fréquence fondamentale  $f_0$  en fonction de la vitesse. On observe une relation linéaire dont la pente permet d'extraire  $\lambda_{PS} = 280 \mu\text{m}$ , proche de la valeur attendue des empreintes,  $\lambda = 254 \mu\text{m}$ .

Nous avons donc ici une manifestation expérimentale de l'effet empreinte à l'échelle du mécanorécepteur. Si les modulations des contraintes locales sous-cutanées avaient été mise en évidence par des travaux antérieurs dans l'équipe [37], nous montrons ici qu'elles se traduisent aussi par des modulations de la forme des parois de la cavité. Extrapolant au problème biologique, on peut anticiper

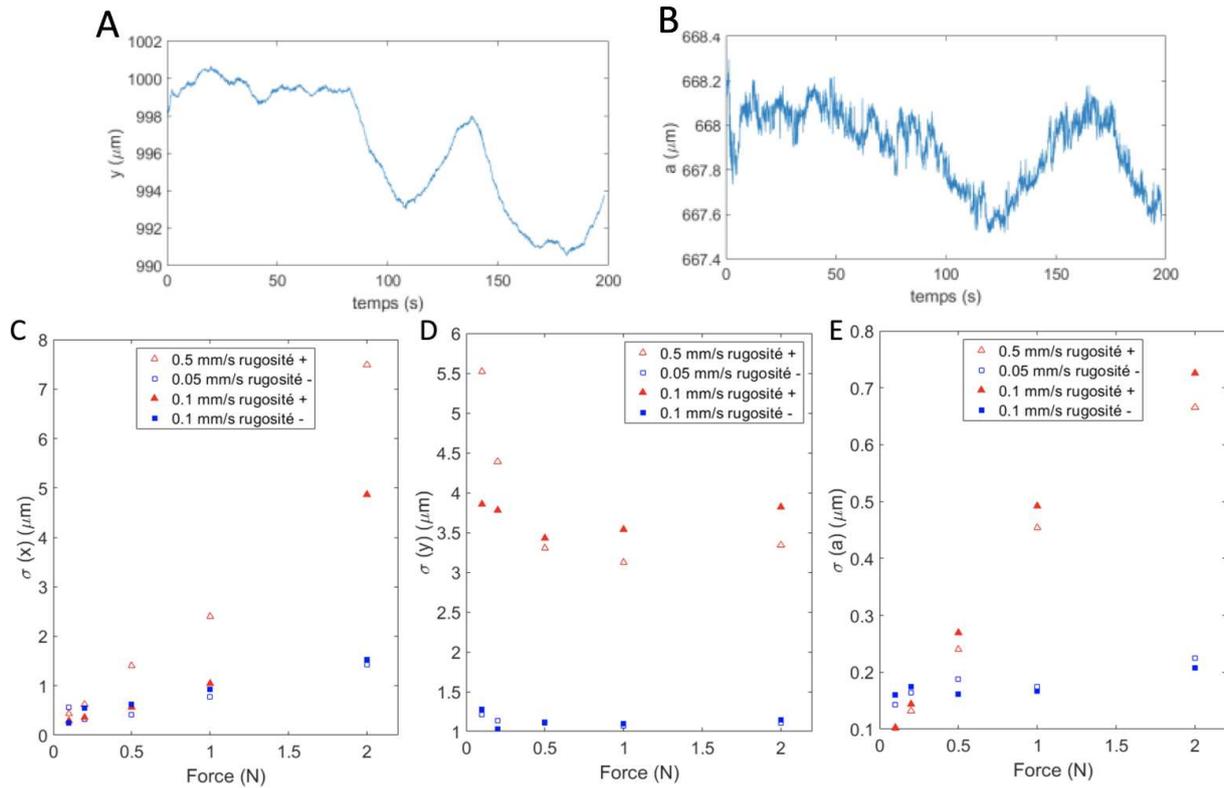


FIG. 3.12 Graphiques montrant la variation au cours du temps de la position et de la déformation de la cavité pour une force de 0.5 N et une vitesse de 0.05 mm/s (papier p180). A) Evolution temporelle de la position  $y$  et B) du grand axe  $a$ . C-E) Ecart type des fluctuations de  $x$ ,  $y$  et  $a$  en fonction de la force normale, pour les 2 rugosités, et pour deux vitesses différentes.

que les contraintes membranaires des mécanorécepteurs du doigt humain fluctuent temporellement à la fréquence  $v/\lambda$ .

Comment l'amplitude de ces modulations dépend-elle de la rugosité sondée ? Nous avons tracé sur la Figure 3.14A l'évolution de la position  $x$  (à laquelle sa moyenne temporelle a été soustraite) en fonction du temps, pour deux rugosités différentes et la même force normale. Clairement, l'amplitude des modulations est plus importante pour le substrat le plus rugueux. Ceci se retrouve, en regardant l'amplitude du pic du spectre de  $x(t)$ , à la fréquence fondamentale,  $PS_x(f_0)$ , que nous traçons sur la Figure 3.14B. Sur toute la gamme de force sondée, les valeurs mesurées augmentent linéairement avec la force normale imposée et la pente est environ un ordre de grandeur supérieur pour la rugosité la plus forte. Pour les autres observables ( $y$  et  $a$ ) cet effet n'est pas significatif (Figs. 3.14C et D).

### 3.5 Conclusion

Dans ce chapitre nous avons développé des modèles théoriques et expérimentaux d'inclusion dans un milieu élastique pour décrire les déformations d'un mécanorécepteur noyé sous la peau. Les modèles de cavité gazeuse semblent bien décrire la déformation de notre pseudo-vésicule dans un gel en compression pure. Cette déformation est anisotrope, extensionnelle aux pôles et com-

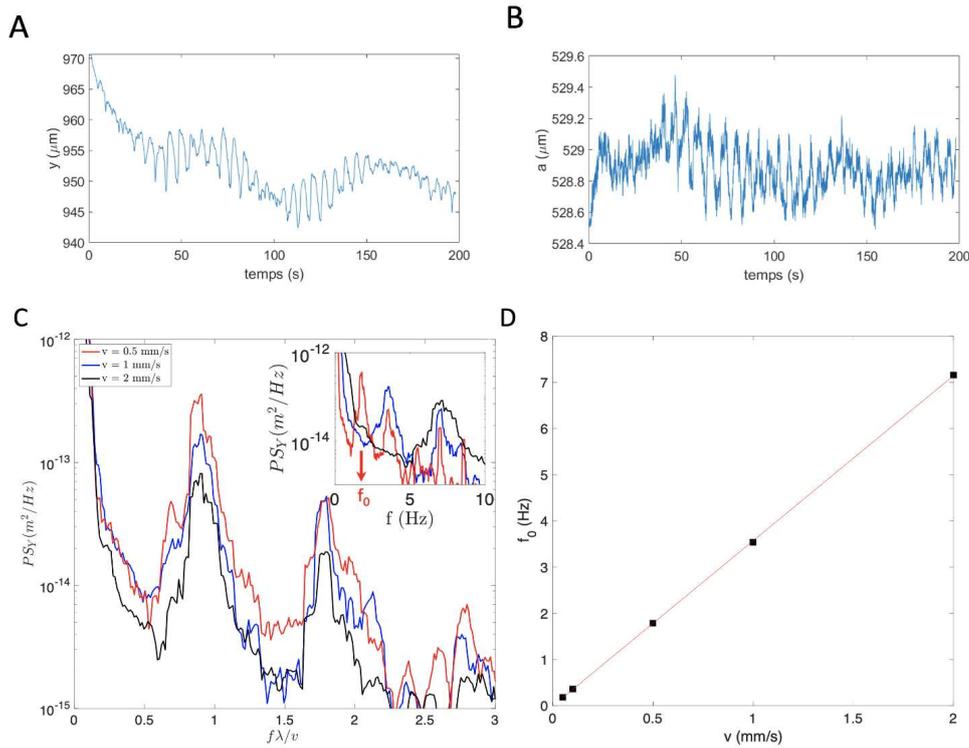


FIG. 3.13 Graphiques montrant la variation de la position de la cavité  $y$  au cours du temps A) et de sa déformation B), pour un doigt décoré d'empreintes digitales. C) Spectre de puissance du signal  $y(t)$ , en fonction de la fréquence  $f$  (insert) ou de la fréquence renormalisée  $\lambda f/v$  (panel principal). Les différentes couleurs correspondent à 3 vitesses différentes. D) Fréquence fondamentale  $f_0$  en fonction de la vitesse. La ligne rouge est un ajustement linéaire de pente  $3.57 \text{ mm}^{-1}$ .

pressive à l'équateur. En calculant l'incrément d'aire induit par cette déformation, nous avons pu estimer les contraintes membranaires et s'assurer que leur ordre de grandeur est compatible avec les seuils d'ouverture observés des protéines mécanosensibles. Nous avons poursuivi notre étude en étudiant la réponse dynamique d'un doigt artificiel cylindrique comportant une cavité gazeuse, en frottement contre des surfaces texturées. Si ces résultats sont encore préliminaires, ils nous semblent engageants : les fluctuations de position et de forme permettent de discriminer des textures, pour des différences de rugosité de l'ordre de quelques dizaines de microns. Nous avons également mis en évidence l'effet empreinte à l'échelle du mécanorécepteur artificiel : lorsque le doigt est décoré d'empreintes, les positions et déformations de la cavité sont modulées à la période spatiale des empreintes. L'amplitude de ces fluctuations semble augmenter avec la rugosité, et ces résultats appellent à des études systématiques plus poussées.

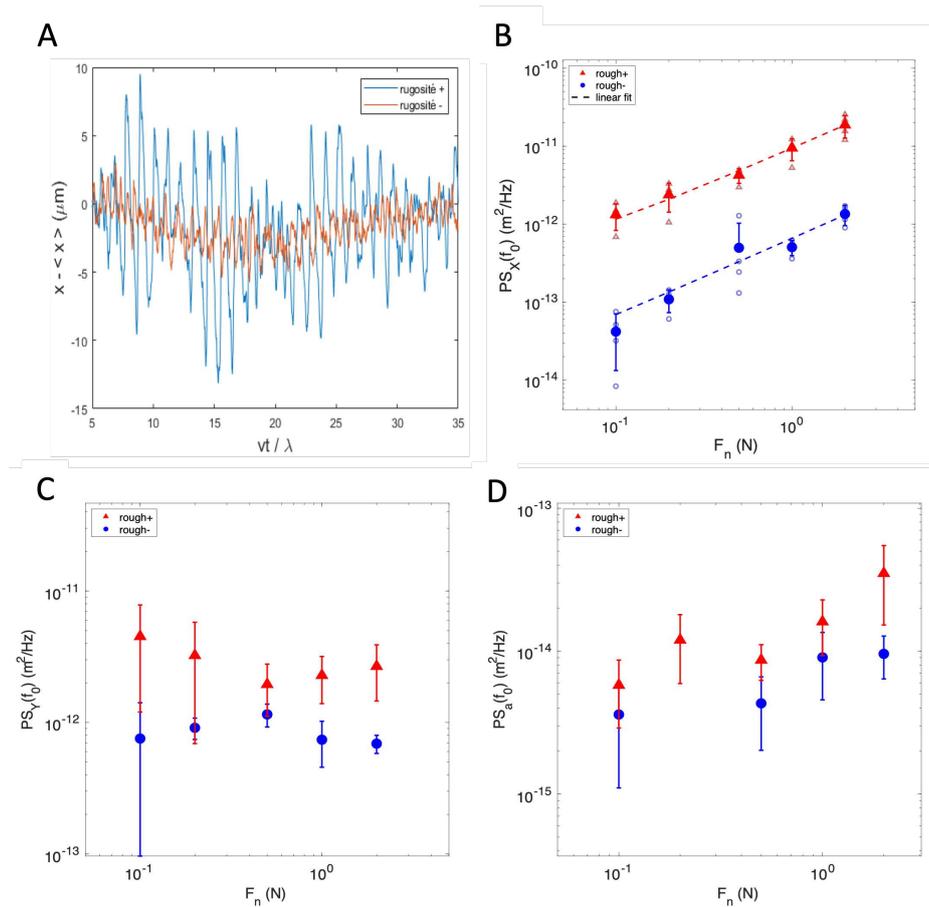


FIG. 3.14 A) Trace temporelle de  $x(vt/\lambda)$  à laquelle sa moyenne est soustraite, pour 2 rugosités différentes,  $F_n = 1\text{N}$  et  $v = 0.05\text{mm/s}$ . B-D) Amplitude du pic du spectre de  $x$  (B),  $y$  (C) et  $a$  (D), en fonction de la force normale appliquée sur le cylindre, pour les deux rugosités. Sur B) les lignes pointillés sont des ajustements linéaires.



# Chapitre 4

## Vers un système biomimétique mécano-sensible

Dans le Chapitre 2, nous avons présenté une méthode simple et reproductible de formation de vésicule. Nous avons notamment démontré que la membrane de ce système était fonctionnalisable avec une protéine transmembranaire (l'alpha-hémolysine). Dans ce chapitre, nous nous concentrons sur la mise en oeuvre d'une pseudo-vésicule décorée d'un pore mécanosensible, afin d'obtenir un mécanorécepteur biomimétique dont nous caractériserons à terme les propriétés mécaniques. Pour cela, nous utiliserons le pore protéique *MscL* largement utilisé dans des systèmes artificiels [166, 162]. Contrairement à l'alpha-hémolysine, ce pore n'est pas soluble en phase aqueuse et a besoin d'être constamment maintenu dans un environnement membranaire pour maintenir sa fonctionnalité. *MscL* n'est donc pas disponible commercialement et sa purification est complexe. Pour surmonter ces problèmes, nous nous sommes tournés vers des techniques de biologie synthétique que nous présentons dans ce chapitre. En effet, les méthodes d'expression *in vitro* permettent de synthétiser des protéines dans des environnements conçus pour assurer leur fonctionnalité. Les premiers résultats d'insertion de *MscL* seront montrés à la fin de ce chapitre.

### 4.1 *MscL* : une protéine mécanosensible bactérienne

*MscL*, pour *Large-conductance mechanosensitive channel*, est une protéine mécanosensible identifiée pour la première fois en 1984 dans la bactérie intestinale *Escherichia coli* et devient la première protéine mécanosensible identifiée chez une bactérie [167, 168]. Sa structure cristalline a été révélée en 1998 avec une résolution de 3,5 Å [169]. C'est un pore pentamérique, c'est-à-dire composé de cinq sous-unités. Son poids moléculaire environ égal à 80 kDa est bien plus petit que celui des protéines *Piezo*, qui forment des trimères d'environ 1,2 millions de dalton. Cette différence notable de taille explique pourquoi les outils de biologie synthétique n'ont pas à ce jour permis de synthétiser des pores *Piezo* fonctionnels.

Chaque sous-unité du pore *MscL* est composée de 151 acides aminés formant deux hélices transmembranaires TM1 et TM2. L'hélice TM2 forme la couronne externe et est en contact avec les lipides. L'hélice TM1 forme la couronne interne et définit la taille du pore. Ces deux hélices sont reliées par une boucle périplasmique [170]. Cette dernière agit comme un ressort qui maintient la protéine *MscL* dans un état fermé et permet la transmission de la tension membranaire entre

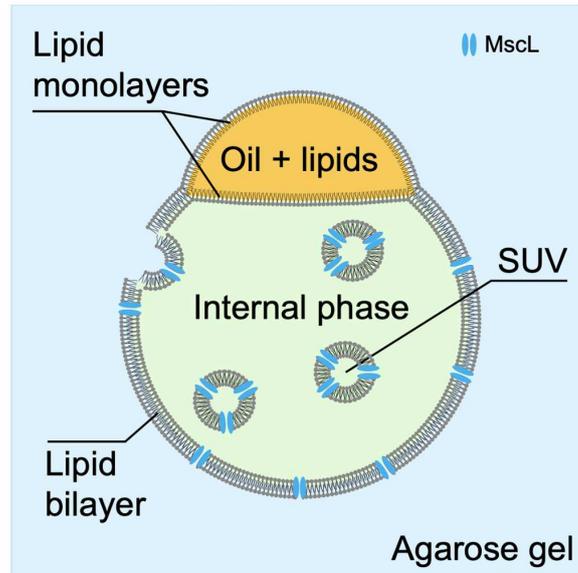


FIG. 4.1 Schéma d'un mécanorécepteur artificiel. Comme dans le chapitre précédent, nous proposons d'insérer préalablement les pores protéiques dans des SUVs afin de garantir la stabilité de la pseudo-vésicule.

les hélices TM1 et TM2. A l'état fermé, le pore mécanosensible mesure 85 Å de long et 50 Å de diamètre pour la partie transmembranaire et 18 Å de diamètre pour la partie cytoplasmique. Sous excitation mécanique, *i.e.* lorsque la tension membranaire est suffisante, le pore s'ouvre pour révéler un canal de 25 Å de diamètre, ce qui est 45 % plus grand que le pore formé par l'alpha-hémolysine. Le seuil d'ouverture de la protéine *MscL* est égal à  $12 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$  [171, 172]. Cependant, des mutants ont été créés pour abaisser cette valeur. C'est notamment le cas du mutant *MscL-G22S* qui possède un seuil d'ouverture plus faible, de  $4,5 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$ , ce qui est proche du seuil d'ouverture mesuré chez *Piezo1* [66]. Un autre mutant, *MscL-G22E*, est quant à lui toujours ouvert [173].

*MscL* a une conductance élevée (3,6 nS dans 200 mM de KCl et 40 mM de  $\text{MgCl}_2$ ) et est non-sélectif [175]. Des expériences de type "patch clamp" ont permis de déterminer quatre états intermédiaires entre l'état ouvert et fermé [176, 175]. Ces états ont des conductances égales à 22 %, 45 %, 70 % et 93 % de la conductance du pore totalement ouvert.

## 4.2 Méthodes de synthèse de protéines *in vitro*

Comme mentionné en introduction de ce chapitre, pour créer un mécanorécepteur artificiel, la protéine mécanosensible *MscL* est synthétisée directement dans une solution contenant des SUVs puis implémentée dans notre système de pseudo-vésicule *via* deux méthodes de biologie synthétique. La première, appelée *TxTL* pour *Transcription-Translation*, a été utilisée lors d'un séjour dans l'équipe de Vincent Noireaux à l'Université de Minneapolis. La seconde méthode, appelée PURE, est un kit commercial que nous avons utilisé au Laboratoire Jean Perrin à Paris.

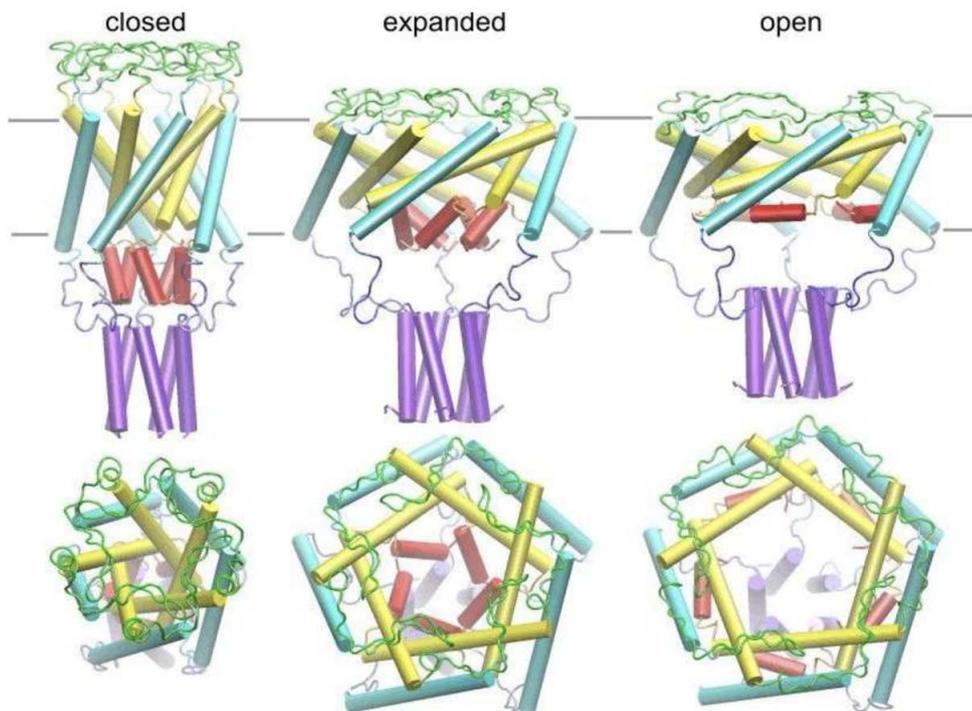


FIG. 4.2 Structure de la protéine mécanosensible *MscL*. De gauche à droite, la tension dans la membrane augmente. Nous avons donc l'état fermé à gauche, intermédiaire au milieu et ouvert à droite. Figure reproduite de [174].

#### 4.2.1 Présentation de deux modèles de synthèse de protéines *in vitro* : *TxTL* et *PURE*

Les systèmes d'expression *in vitro* doivent contenir toute la machinerie nécessaire à la synthèse de protéines dans les cellules : l'ADN, introduit par l'utilisateur, code pour la protéine d'intérêt ; les facteurs de transcription reconnaissent ensuite le début du gène sur lequel l'ARN polymérase devra s'accrocher ; celle-ci transforme l'ADN en ARN messenger ; les ARN de transfert reconnaissent des codons de cet ARN messenger pour les traduire en acides aminés ; enfin les ribosomes assurent l'assemblage en structures secondaires de cette série d'acides aminés pour former des protéines fonctionnelles. Cette cascade de processus consomme de l'énergie, qui doit être apportée au système, notamment sous la forme d'ATP.

Dans ce contexte, la méthode *TxTL* est un système d'expression de protéine *in vitro* qui a été utilisé pour la première fois par Vincent Noireaux pour synthétiser la protéine transmembranaire alpha-hemolysine dans des liposomes [126]. La réaction *TxTL* est composée d'un extrait cellulaire issu de la bactérie *Escherichia coli* : les bactéries sont lysées par choc osmotique puis la solution obtenue est purifiée afin de ne garder que les éléments utiles à la transcription d'un plasmide (des éléments comme les morceaux de membranes et d'ADN sont retirés) : elle contient l'ARN polymérase, les facteurs de transcription, les ARN de transfert et les ribosomes issus de la bactérie. Elle représente un tiers du volume final de la réaction *TxTL* [177] et sa composition exacte est inconnue, avec une variabilité inhérente à son origine biologique. Afin de compléter la machinerie de synthèse protéique, le gène d'intérêt est ajouté à ce mélange et la réaction *TxTL* est supplémentée en acides aminés, en énergie, sous la forme d'un *energy mix* qui est une solution de cofacteurs comme des donneurs de phosphate (ATP, GTP, 3PGA,...), et avec d'autres éléments qui permettent

d'optimiser la réaction, tels que des ions K-Glu et Mg-Glu (le glutamate (Glu) étant un contre ion non toxique), des sucres maltodextrine et ribose, et enfin du PEG8000. Le PEG8000 est ici un agent dit de *crowding* dont il a été montré empiriquement que sa présence augmentait le rendement de la réaction. Son effet est étudié plus en détail dans la section 4.3.3.1.

Le système d'expression *PURE* est une seconde méthode utilisée pour synthétiser des protéines *in vitro*. Dans ce cas, tous les éléments de la machinerie cellulaire sont purifiés un à un puis réassemblés avec une stoechiométrie donnée permettant d'optimiser la synthèse protéique. Cette méthode fournit donc un milieu contrôlé et reproductible. Il est commercial et est en pratique composé de deux solutions nommées A et B qu'il faut mélanger avec le plasmide d'intérêt. Il est donc plus simple à utiliser qu'une réaction de *TxTL* mais a une vitesse de traduction égale à 0,5 acide aminé par seconde [160] alors que le système *TxTL* a une vitesse de traduction plus grande, de 4 acides aminés par seconde [178]. A noter qu'*in vivo* cette vitesse est d'environ 10 acides aminés par seconde [179].

## 4.3 Design, amplification et purification d'un plasmide

En amont de toutes ces réactions, un élément central reste la conception du gène associé à la protéine d'intérêt. Nous présentons ci-dessous le choix de leur structure ainsi que les méthodes utilisées pour les synthétiser, les purifier et les analyser.

### 4.3.1 Choix du plasmide et amplification

Un plasmide est un ADN double brin circulaire d'environ une centaine de paires de bases. Afin d'en obtenir de grandes quantités, les plasmides peuvent être insérés dans une bactérie où ils seront amplifiés grâce à la prolifération de la souche bactérienne. Dans notre cas, la bactérie utilisée est *Escherichia coli* et le plasmide d'intérêt est une construction fluorescente de *MscL* : *MscL-GFP*. Les plasmides sont constitués de plusieurs parties (Fig. 4.3), la première est l'origine de répllication (ORI pour *Origin of replication*). Elle est essentielle pour maintenir et répliquer le plasmide au sein de l'hôte. En effet, un plasmide non répliqué et inutile est perdu au fil des générations de bactéries. Pour rendre le plasmide utile, une partie résistante à un antibiotique est également ajoutée, rendant le plasmide nécessaire à la survie de la bactérie dans un milieu de culture contenant l'antibiotique et permettant de sélectionner les bactéries contenant le plasmide. La séquence promotrice est une région proche du gène d'intérêt où l'ARN polymérase se lie et commence la transcription. Enfin, il existe également plusieurs régions non traduites (*Untranslated Regions* ou UTR).

Dans le cas d'un gène codant pour une protéine toxique pour la bactérie hôte, cette stratégie n'est pas adaptée. C'est le cas pour les mutants *MscL-G22S* et *MscL-G22E*. En effet, ces pores étant ouverts à plus bas seuil, voire ouverts tout le temps pour G22E, leur expression peut être toxique pour *Escherichia coli*. Ces gènes sont donc construits sur une géométrie linéaire et amplifiés par PCR.

Nous détaillons ci-dessous les techniques de culture bactérienne et de PCR adaptées à chacun de ces cas.

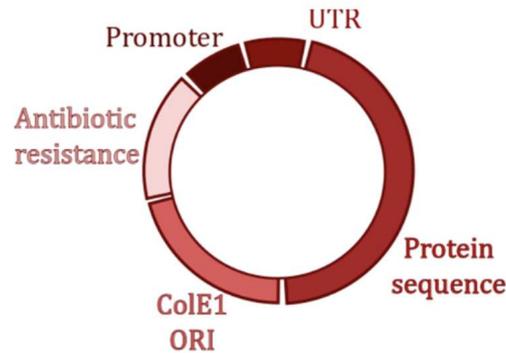


FIG. 4.3 Schéma d'un plasmide représentant les différentes unités fonctionnelles : le promoteur, la région non traduite (UTR), la séquence codant pour la protéine elle-même, l'origine de répllication et le gène codant pour la résistance aux antibiotiques.

#### 4.3.1.1 Culture bactérienne

La culture bactérienne se fait sous hotte à flux laminaire pour être en condition stérile. Dans un premier temps 20 mL de milieu de culture LB (bouillon lysogène) contenant 1 % d'agarose et de l'ampiciline à 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  est coulé dans une boîte de Petri. Après gélification de l'agar, nous étalons notre souche bactérienne (décongelée à partir d'une solution stock conservée à  $-80^{\circ}\text{C}$ ) avec une anse d'inoculation ou "cell spreader" stérile. Le but de cette action est d'arriver à former des colonies isolées de bactéries. La boîte de Petri est ensuite retournée pour éviter que des gouttes de condensation tombent sur l'échantillon et soient une source de contamination, puis est placée toute une nuit à  $37^{\circ}\text{C}$  pour incubation. Le lendemain, une colonie isolée est prélevée et introduite en culture liquide (4 mL de LB contenant de l'ampiciline à 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), puis l'échantillon est placé à  $37^{\circ}\text{C}$  sous agitation pour toute une nuit. Cette étape va permettre à la colonie bactérienne ayant le même code génétique de se développer.

#### 4.3.1.2 Purification du plasmide d'intérêt

La purification d'un plasmide à partir d'une culture bactérienne se fait à l'aide d'un kit miniprep qui consiste à effectuer une lyse des bactéries, puis à précipiter le plasmide, le laver, avant de le resolubiliser avec un éluant.

Nous vérifions ensuite la taille du plasmide obtenu par électrophorèse. Pour cela, nous déposons le plasmide ainsi qu'une échelle de paires de bases sur un gel que l'on laisse migrer pendant vingt minutes à 100 V. Ce gel permet de vérifier que nous n'avons aucune bande parasite dans notre solution.

Enfin la concentration est estimée au NanoDrop. Nous avons obtenu des concentrations de plasmides comprises entre 30 et 50  $\text{ng}.\mu\text{L}^{-1}$ .

### 4.3.2 Amplification et purification d'un plasmide linéaire par PCR

Dans le cas de plasmides linéaires, comme ceux codant pour la protéine *MscL-G22E* qui est un pore transmembranaire toujours ouvert, l'amplification se fait par PCR (Polymerase Chain Reactions) (voir annexe A). Après vérification de leur taille sur gel (Fig. 4.4) et purification nous avons obtenu le plasmide codant pour *MscL-G22E* à  $123 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$  et celui codant pour *MscL-G22S* à  $94,5 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ .

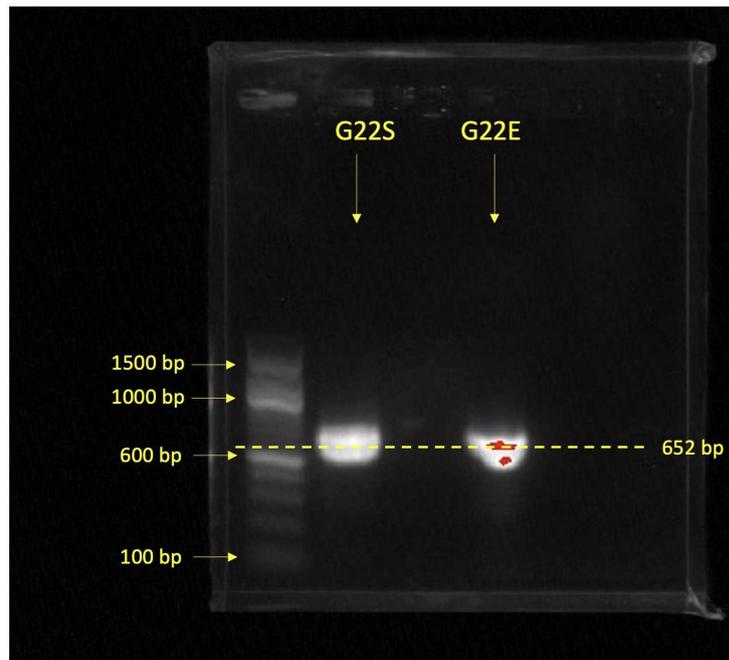


FIG. 4.4 Gel d'électrophorèse des mutants G22S et G22E de la protéine *MscL*.

### 4.3.3 Synthèse de la protéine MscL

#### 4.3.3.1 Protocole et résultats pour la méthode *TxTL*

La protéine *MscL* doit être synthétisée à proximité d'un bicouche lipidique afin de pouvoir s'y replier correctement et être fonctionnelle. Toute les techniques de biologie synthétique décrites ci-dessous doivent donc être mises en oeuvre en présence de structures lipidiques, telles que des SUVs.

Les SUVs utilisées avec *TxTL* ont été réalisées de la façon suivante : 9,6 mg de lipides contenant 75% de lipides Egg-PC et 25% de lipides PEG2000-PE sont séchés puis réhydratés dans  $120 \mu\text{L}$  d'une solution de ribose  $600 \text{ mM}$  et de maldodextrine  $500 \text{ mM}$  et vortexés pendant 30s. La solution est ensuite soniquée dans un bain à ultrasons à  $47^\circ\text{C}$  pendant 50 minutes. La solution résultante est extrudée 13 fois à  $47^\circ\text{C}$  à travers un filtre de  $400 \text{ nm}$  à une vitesse de  $2 \text{ mL}/\text{min}$ . La solution de SUVs est ramenée à température ambiante pendant 60 secondes, puis centrifugée brièvement pour en retirer les bulles et est enfin aliquotée dans des Eppendorfs de  $20 \mu\text{L}$ . Chaque aliquot contient des SUVs à  $80 \text{ mg}/\text{mL}$  et est conservé à  $-85^\circ\text{C}$ .

La solution d'expression *in vitro* est ensuite assemblée avec les proportions suivantes :  $30 \mu\text{L}$  d'extrait cellulaire,  $2,7 \mu\text{L}$  de K-Glu à  $3 \text{ M}$  (concentration finale  $90 \text{ mM}$ ),  $2 \mu\text{L}$  de Mg-Glu à  $200 \text{ mM}$  (concentration finale  $2 - 4 \text{ mM}$ ),  $5 \mu\text{L}$  d'énergie mix, de  $1,5$  à  $3 \text{ mM}$  d'acides aminés,  $2,5 \mu\text{M}$  du

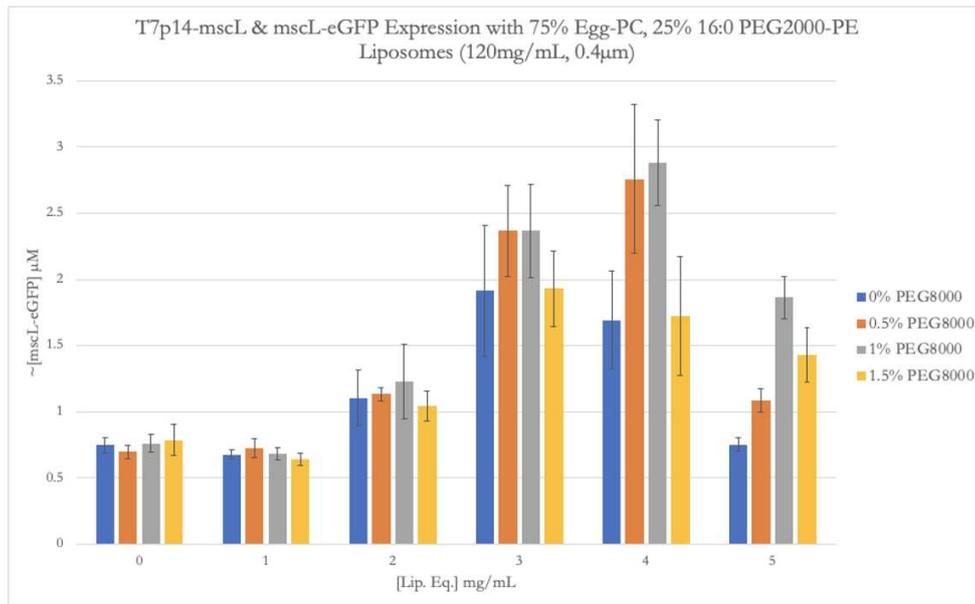


FIG. 4.5 Histogramme de l'expression de *MscL-GFP* en fonction de la concentration de SUVs et de PEG8000.

plasmide d'intérêt (*MscL-GFP* ici),  $5 \mu\text{L}$  de solution de SUVs à différentes concentrations, une quantité variable de PEG8000, volume complété à  $90 \mu\text{L}$  avec de l'eau MilliQ. La réaction de *TxTL* est ensuite incubée à  $29^\circ\text{C}$  pendant 18h.

Ce processus est parallélisé avec une machine Echo650 de labcyte, ce qui nous a permis d'étudier le rôle du PEG et de la concentration de SUVs sur l'efficacité de la réaction en mesurant la quantité finale de protéine produite (Fig. 4.5). Nous observons que la quantité de protéine synthétisée augmente avec la concentration de SUVs jusqu'à une quantité optimale de SUVs de  $4 \text{ mg/mL}$ . A cette concentration, la présence de PEG8000 à des concentrations de 0,5 ou 1 % semble également optimiser la synthèse de la protéine *MscL-GFP*. Grâce à la parallélisation des expériences, de nombreuses conditions peuvent être explorées et ce sont ces observations croisées qui sont utilisées empiriquement pour choisir les conditions optimales d'expression dans le système *TxTL*.

#### 4.3.3.2 Protocole et résultats pour la méthode *PURE*

Pour réaliser une synthèse de protéine, nous avons utilisé un kit PUREXPRESS® selon le protocole suivant :  $10 \mu\text{L}$  du composé A et  $7,5 \mu\text{L}$  du composé B sont assemblés avec  $200 \text{ ng}$  du plasmide d'intérêt dans une solution de  $30 \mu\text{L}$  complétée avec de l'eau MilliQ. En l'absence de SUVs, l'expression de la protéine *MscL* est très faible (voir la ligne noire de la Fig. 4.6b), en accord avec Kamat *et.al* [181] (Fig. 4.6c) qui ont démontré que plus la concentration de vésicules lipidiques était importante, plus le rendement de l'expression de *MscL* était favorisé. Comme pour les expériences réalisées en *TxTL*, nous avons donc mesuré la cinétique d'expression de la protéine *MscL-GFP* en fonction de la quantité de membrane disponible en solution. Pour cela nous avons ajouté des SUVs au milieu réactionnel dans des quantités variables, les SUVs ayant été synthétisées de la façon suivante :  $240 \mu\text{L}$  de lipides DOPC à  $25 \text{ mg/mL}$  sont séchés sous vide pendant plusieurs heures puis resolubilisés dans  $200 \mu\text{L}$  d'un tampon aqueux composé de  $50 \text{ mM}$  d'Hepes,  $100 \text{ mM}$  de KCl et  $10 \text{ mM}$  de  $\text{MgCl}_2$  [182] afin d'arriver à une concentration en lipides de  $30 \text{ g/L}$  ou  $37,5 \text{ mM}$ .

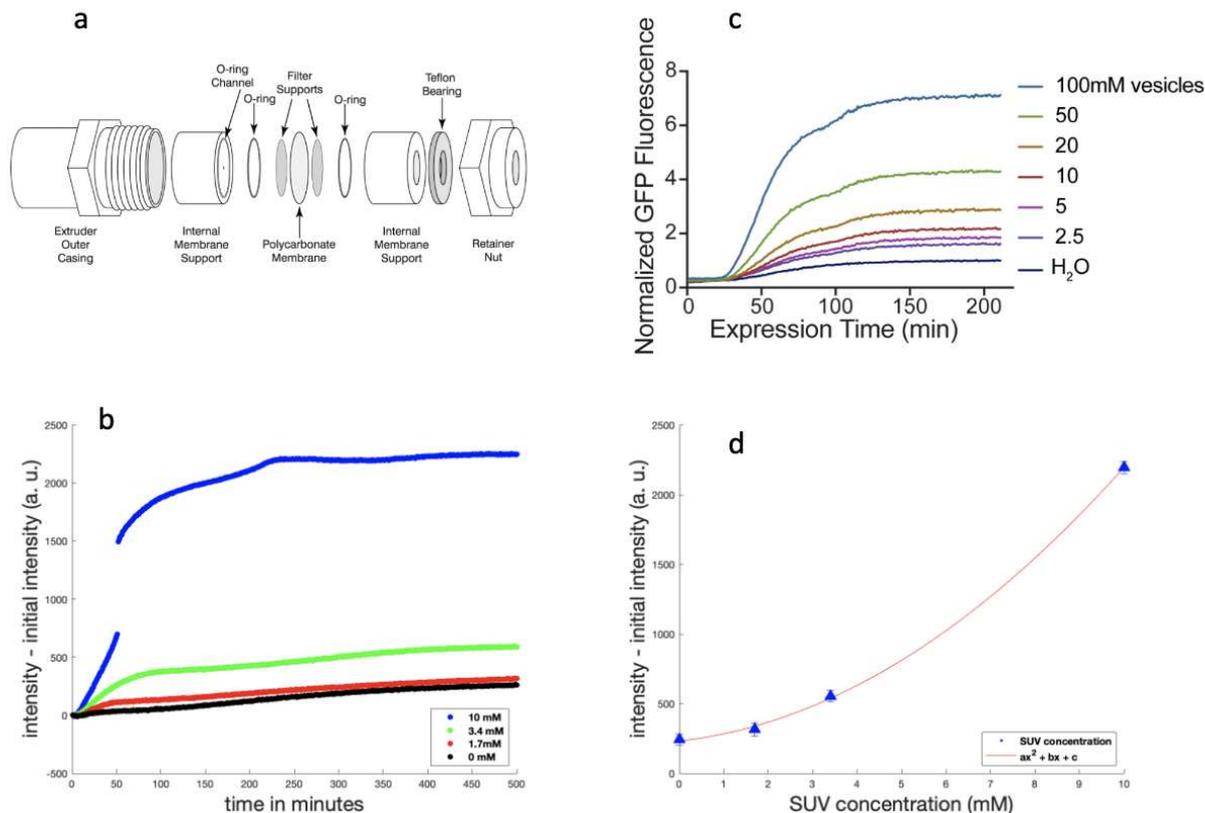


FIG. 4.6 a) Montage d'extrusion : deux seringues Hamilton® pour gaz en verre sont utilisées. Le montage se présente sous la forme d'un empilement d'éléments comme un pré-filtre (filter support) qui stoppe les plus grosses particules (poussières) et protège le filtre nanométrique (polycarbonate membrane) décoré de pores de 100nm, ce qui correspondra à la taille des SUVs après extrusion. reproduit de [180]. b) Expression de MscL-GFP en fonction du temps à 37°C. c) Expression de MscL-GFP en fonction du temps reproduit de [181]. d) Expression moyenne de MscL-GFP pour  $t > 200$  minutes en fonction de la concentration de SUV.

Après une brève agitation au vortex pour que tous les lipides se détachent de la paroi en verre, nous procédons à dix extrusions manuelles à travers des pores de 100 nm pour obtenir des SUVs de la même taille (Fig. 4.6a).

Nous avons ensuite quantifié l'expression de *MscL-GFP* en fonction de la concentration en SUVs dans notre système en suivant l'expression par fluorimétrie. Avec des SUVs de DOPC, nous retrouvons un résultat similaire (Fig. 4.6b). L'augmentation de l'expression de la protéine *MscL-GFP* suit une loi polynomiale (Fig. 4.6d). Suite à ce résultat, nous avons toujours réalisé nos expressions par *PURE* en présence de 10 mM de SUVs, selon le protocole suivant : 10  $\mu$ L du composé A, 7,5  $\mu$ L du composé B, 8  $\mu$ L de la solution de SUVs pour arriver à une concentration finale 10 mM et 200 ng du plasmide d'intérêt sont mélangés dans une solution 30  $\mu$ L complétée avec de l'eau distillée. La solution est ensuite placée dans un fluorimètre à 37°C pendant 13 heures et à 4°C jusqu'à l'expérience.

C'est ce protocole qui sera utilisé par la suite pour réaliser les mécanorécepteurs artificiels.

## 4.4 La pseudo-vésicule mécanosensible

### 4.4.1 Stabilité

Il a été vu dans le Chapitre 2 que l'équilibre osmotique était un facteur critique pour la stabilité des pseudo-vésicules. Pour estimer l'osmolarité du PUREXPRESS®, nous nous sommes référés à l'article de Ueda *et. al* [182] qui détaille précisément les composants du milieu réactionnel de type PURE. En faisant l'hypothèse d'une contribution linéaire de tous les termes du milieu, nous calculons une osmolarité égale à 850 *mosm*. Les osmolarités des solutions de SUVs et de plasmides ont été mesurées à l'osmomètre et valent respectivement 250 *mosm* et 3200 *mosm*. En prenant en compte la proportion du volume de chaque solution dans le mélange final, on calcule l'osmolarité de cette nouvelle phase interne qui vaut alors 1042 *mosm* contre 600 *mosm* pour la phase interne dans le Chapitre 2. Comme l'osmolarité a augmenté de 70 %, il faut également augmenter l'osmolarité de la phase externe pour ne pas rompre l'équilibre osmotique des pseudo-vésicules.

Il a été vu que l'osmolarité de la phase externe sans agarose était égale à  $\varphi_{ext}^{sans\ agar} = 383\ mosm$  pour équilibrer la situation où  $\varphi_{interne} = 600\ mosm$ . On peut donc estimer la contribution osmotique de l'agar  $\Delta_{agar}$  pour une solution à 3% d'agarose :

$$\Delta_{agar} = \varphi_{interne} - \varphi_{ext}^{sans\ agar} = 217\ mosm \quad (4.1)$$

Comme l'osmolarité de la phase externe doit être égale à celle de la phase interne contenant du PURE  $\varphi_{interne}^{PURE}$ , du glucose est ajouté dans la phase externe pour rééquilibrer les pressions osmotiques :

$$\varphi_{glucose} = \varphi_{interne}^{PURE} - \varphi_{ext}^{sans\ agar} - \Delta_{agar} = 443\ mosm \quad (4.2)$$

Il faut donc environ 450 *mM* de glucose dans la phase externe, ce qui correspond à 8,1 *g* de poudre dans 100 *mL* de phase externe.

### 4.4.2 Premiers résultats

L'utilisation de carboxyfluorescéine peut être compliquée car celle-ci subit du photoblanchiment notable lors de longues expositions. Or les expériences de stimulation mécanique d'un mécanorécepteur artificiel vont nécessiter des expériences plus longues afin d'explorer les réponses en fréquence et en amplitude de notre système. Nous avons donc anticipé ces problèmes en nous tournant vers un nouveau fluorophore : la calcéine.

La calcéine est un fluorophore qui a la particularité d'avoir une intensité de fluorescence qui augmente linéairement avec la concentration jusqu'à 2 *mM*, puis qui diminue jusqu'à être quasiment nulle à partir d'une concentration supérieure à 40 *mM* (Fig. 4.7) [183]. Son photoblanchiment est également plus faible que celui de la carboxyfluorescéine. La calcéine a largement été utilisée dans des systèmes membranaires artificiels dont la membrane était décorée de la protéine *MscL* ou de ses mutants [184, 185, 186]. C'est pour cette raison que nous avons fait le choix d'utiliser ce fluorophore pour mesurer la fuite de fluorescence à travers une membrane décorée du pore transmembranaire toujours ouvert *MscL-G22E*.

Dans des pseudo-vésicules décorées de pores *MscL-G22E* et chargées à 2 *mM* de calcéine (Fig. 4.8b), l'intensité à l'intérieur des pseudo-vésicules est mesurée pendant 70 minutes (Fig.

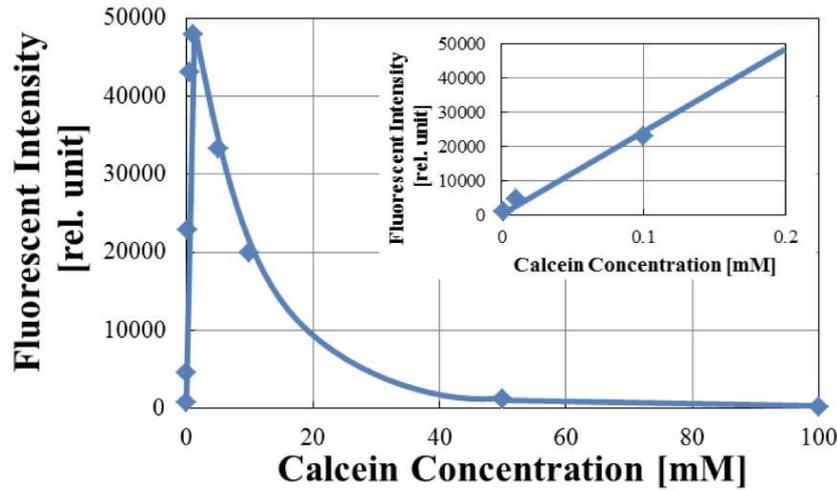


FIG. 4.7 Évolution de l'intensité de fluorescence en fonction de la concentration de calcéine. Reproduit de [183].

4.8a). Nous observons une diminution de la fluorescence de 13 % pour les vésicules décorées de pores *MscL-G22E* et une fluorescence stable pour les pseudo-vésicules contrôles (avec le même mélange PURE et SUVs, mais sans *MscL-G22E*). Cette perte de fluorescence, bien que significative, est assez faible par rapport aux valeurs observées dans des DIBs où la fluorescence diminuait de 80 % en 30 minutes [187]. Malgré cette dynamique lente, nous concluons que nous avons réussi à insérer *MscL-G22E* dans la membrane des pseudo-vésicules.

Nous avons également tenté de mesurer une fuite de fluorescence à travers des membranes fonctionnalisées avec le pore mécanosensible *MscL-G22S* (mutant à bas seuil d'ouverture) sous contrainte mécanique. Nous avons pour cela appliqué une force de 0,3 N à une fréquence d'excitation de  $2 \cdot 10^{-2} \text{ Hz}$  (Fig. 4.8c). Malheureusement à ce jour nous n'avons pas mesuré de diminution de la fluorescence dans des pseudo-vésicules décorées de la protéine *MscL-G22S*. Cela peut être dû à une fréquence d'excitation trop faible, permettant aux lipides d'être recrutés de nouveau dans la membrane et d'y relaxer la tension [188]. En effet pour atteindre la contrainte maximum, le montage de déformation met trois minutes. Cependant il a été montré qu'en moins d'une minute, les lipides recrutés dans la membrane diminuaient la tension de 80 % [188].

## 4.5 Conclusion

A travers ce chapitre, nous avons présenté deux méthodes de biologie synthétique (*TxTL* et *PURE*) qui nous ont permis de synthétiser les protéines *MscL-GFP* et *MscL-G22E*. Nous avons également démontré la fonctionnalisation de la membrane des pseudo-vésicules avec le pore transmembranaire *MscL-G22E*. Cependant, nous n'avons pas réussi à démontrer l'incorporation d'une protéine mécanosensible fonctionnelle comme *MscL-G22S* dans notre système. Nous discuterons les possibles améliorations du système pour surmonter ce problème dans le dernier chapitre.

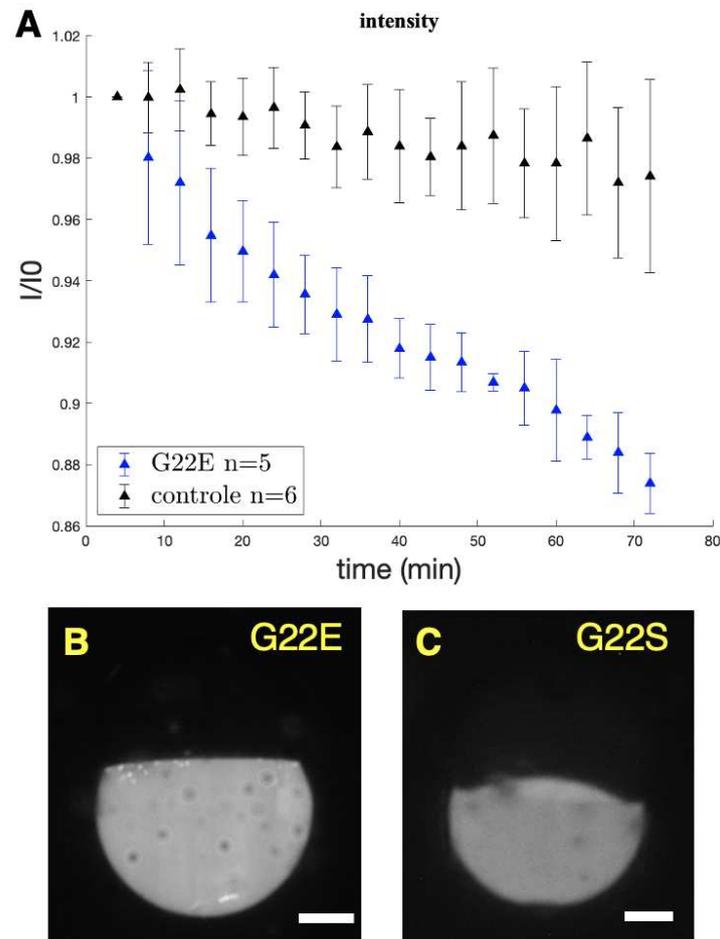


FIG. 4.8 a) Évolution temporelle de l'intensité à l'intérieur des pseudo-vésicules, normalisée par l'intensité initiale, pour les pseudo-vésicules décorées de la protéine *MscL-G22E* (triangles bleus,  $N=5$ ) ou pour l'expérience contrôle sans *MscL-G22E* (triangles noirs,  $N=6$ ). Les barres d'erreur sont les déviations standard sur  $N$  expériences. b) Pseudo-vésicule décorée de nanopores *MscL-G22E* piégée dans un gel d'agarose. La barre d'échelle représente  $150\ \mu\text{m}$ . c) Pseudo-vésicule décorée de nanopores *MscL-G22S* piégée dans un gel d'agarose. La barre d'échelle représente  $100\ \mu\text{m}$ .



# Chapitre 5

## Conclusion et perspectives

### 5.1 Conclusion

Dans ce manuscrit, nous avons présenté nos résultats sur la *fabrication*, la *fonctionnalisation* et la *mécanotransduction* d'un mécanorécepteur artificiel : une pseudo-vésicule enfouie dans un hydrogel dont la membrane est décorée de nanopores mécanosensibles.

Nous avons mis au point une méthode simple et originale pour fabriquer un mécanorécepteur artificiel qui repose uniquement sur l'utilisation d'une micropipette usuelle. Etant très simple, cette méthode devrait pouvoir s'exporter facilement dans d'autres laboratoires et à d'autres systèmes d'étude. Contrairement aux méthodes traditionnelles de formation des liposomes (électroformation et microfluidique), notre méthode ne consomme que peu de volume de phase encapsulée, ce qui est un atout certain si l'on utilise des produits biochimiques précieux ou coûteux. De plus, la pseudo-vésicule est localisée et figée dans un hydrogel ce qui facilite son observation au microscope. Enfin, nous avons montré que la pseudo-vésicule est finement déformable par une simple indentation de la surface du gel, jusqu'à des déformations de quelques pourcents. Ce mode de déformation, qui agit sur toute la surface du mécanorécepteur, contraste avec les méthodes utilisant des micro-pipettes/micro-indenteurs pour déformer localement la membrane. Elle nous semble plus fidèle aux déformations induites lors d'une exploration tactile et permettent, en principe, d'explorer le couplage du mécanorécepteur avec l'environnement extra-cellulaire.

Nous avons également prouvé qu'il était possible de fonctionnaliser la membrane de notre système avec des protéines transmembranaires à l'aide de protocoles que nous avons mis au point et dont l'un des éléments clé consiste à pré-insérer ces protéines dans des petits liposomes (SUVs), avant de les utiliser comme phase interne de nos pseudos-vésicules. La bonne fonctionnalité de la protéine transmembranaire *alpha-hemolysine*, simple nano trou (non mécanosensible) dont on peut se procurer les monomères en poudre dans commerce, a été mise en évidence par des mesures de fuite de fluorescence à travers la membrane. Pour insérer des protéines mécanosensibles de la famille *MscL*, nous avons dû en revanche utiliser des outils de biologie synthétique, pour les exprimer dans des SUVs. La bonne fonctionnalité de la protéine *MscL-G22E* (mutant ouvert sans contrainte mécanique) a aussi été mise en évidence par des mesures de fuite de fluorophores.

Nos efforts se sont par ailleurs concentrés sur la mécanotransduction d'un point de vue *purement mécanique*, en analysant les déformations du mécanorécepteur en tant que système mécanique. Nous avons choisi de modéliser un mécanorécepteur enfoui dans la peau par une inclusion dans un milieu élastique. Cette approche, inédite, s'est révélée fructueuse, puisque nous avons montré que la déformation de notre mécanorécepteur artificiel sous compression uniaxiale était bien décrite par des modèles mécaniques de cavité. Nous avons au passage montré que ces déformations étaient comparables à celles de simples cavités gazeuses ou liquides piégées dans un milieu purement élastique. De manière intéressante, ces modèles prédisent une anisotropie des contraintes membranaires et cela questionne les conséquences biologiques d'une telle anisotropie sur le fonctionnement des mécanorécepteurs. Nous nous sommes également intéressés à la réponse dynamique de ces cavités lors du frottement de l'extrémité du doigt contre une surface rugueuse. Nous avons montré, dans un cadre simplifié - purement mécanique - que les fluctuations de la forme d'une cavité permettaient de discriminer des textures. Nous avons également mis en évidence, pour la première fois, l'effet des empreintes à l'échelle de la membrane. Si l'extrémité du doigt est décorée d'empreintes, la forme du mécanorécepteur fluctue au cours du déplacement avec la même période spatiale que celle des empreintes, avec une amplitude qui dépend de la rugosité sondée.

## 5.2 Perspectives

Nos premiers essais pour insérer une protéine véritablement mécanosensible dans la membrane *MscL-G22S* (un mutant de *MscL* à faible seuil d'ouverture) ont fourni des résultats mitigés. Si nos efforts ont permis d'obtenir un système expérimental stable, nous n'avons pas à ce jour pu observer de fuite significative à travers la membrane sous l'effet d'une excitation mécanique. Le temps nous a malheureusement manqué, et des expériences sont en cours pour y parvenir, alors même que je me dois de conclure ce manuscrit. . .

L'activation par une contrainte mécanique du pore *MscL* inséré dans nos pseudo-vésicules, nous paraît donc logiquement comme la perspective principale pour parachever ce travail et plusieurs pistes sont à l'étude.

La contrainte mécanique appliquée sur la membrane est-elle suffisante ? Si nos estimations de tension membranaire données au Chapitre 3 tendent à répondre par l'affirmative, il est tentant, dans un premier temps, d'augmenter la force appliquée sur l'hydrogel afin d'augmenter la tension dans la membrane et donc d'augmenter la probabilité d'ouverture de la protéine. Nos premières expériences, cependant, ont montré que la pseudo-vésicule avait tendance à tourner sur elle-même si la force normale exercée dépassait 0,3 N. Ceci semble indiquer une certaine fluidité du couplage entre la pseudo-vésicule et l'hydrogel externe. Une solution possible serait d'augmenter le couplage de la membrane avec l'hydrogel, en insérant par exemple des lipides biotinylés tout en dopant le gel d'agar avec de la streptavidine. Ceci devrait nous permettre d'induire une adhésion spécifique entre le mécanorécepteur et son environnement et de coupler de manière plus forte la vésicule avec le gel.

Une seconde piste consiste à activer l'ouverture de la protéine *MscL* en se souvenant de son rôle

biologique natif qui est la réponse à un choc osmotique. Liu *et. al* ont par exemple montré qu'il était possible d'activer, *via* un choc osmotique, l'ouverture de *MscL* inclus dans des liposomes [189]. Suivant cette voie, il semble réaliste d'activer l'ouverture du pore en ajoutant une solution avec une osmolarité plus faible dans l'hydrogel pour réaliser un choc hypo-osmotique.

Une troisième piste concerne la présence de la calotte d'huile au sommet de la pseudo-vésicule. . . Cette calotte est un réservoir quasi-infini de lipides qui tend, à la limite thermodynamique, à relaxer la tension dans la membrane lors d'une excitation mécanique sur des temps longs, vers sa valeur d'équilibre, la tension de surface de la bicouche. Pour remédier à ce problème, une indentation plus rapide permettrait de ne pas laisser le temps aux lipides de la calotte de s'insérer dans la membrane. Les temps typiques d'insertion des lipides à la membrane ( $\sim 10$  min) sont en effet trop proches des périodes d'excitation mécanique que permet notre système expérimental ( $\sim$  min). Le développement d'un système d'excitation mécanique plus vélocité est envisageable expérimentalement. Enfin, il paraît légitime de vouloir s'affranchir tout simplement de la présence de cette calotte huileuse. Dans les méthodes microfluidiques, de telles approches ont été mises en place [121], dont on pourrait ici s'inspirer, en forçant par exemple le démouillage de la calotte d'huile chimiquement, en incluant de l'octanol dans la phase huile pour augmenter la tension de surface eau/huile. Le problème expérimental principal que nous anticipons provient ici de l'hydrogel (l'agarose) dont nous ne contrôlons pas finement la cinétique de réticulation. Une fois réticulé, la calotte huileuse est piégée dans le gel et son démouillage est impossible à induire. Il s'agirait donc de produire ces pseudo-vésicules en phase liquide, dans un premier temps, puis d'attendre le démouillage de l'huile avant de réticuler le gel, en utilisant par exemple un gel photo-réticulable. Des premiers essais au laboratoire ont montré que notre méthode de formation pouvait être envisagée avec une phase externe liquide, mais que ces derniers ne produisaient pas, pour l'instant, des vésicules stables dans le temps, probablement du fait de la déstabilisation membranaire lors de la sédimentation rapide des vésicules produites. D'autres essais ont montré qu'il était possible de former ces pseudo-vésicules dans des gels photo-réticulables (PEG-DA) [190]. Un travail expérimental physico-chimique conséquent reste à accomplir pour explorer cette voie.

Enfin, à plus long terme, l'utilisation de la protéine mécanosensible *Piezo1* dans nos pseudo-vésicules est une perspective enviable. Ces protéines ne peuvent pas, à l'heure actuelle, être exprimées avec les outils de la biologie synthétique, notamment du fait de leur relative grande taille. Il s'agirait plutôt de les obtenir - *via* une collaboration adéquate - par purification, comme cela a déjà été fait dans la littérature [60]. Au-delà de l'intérêt fondamental de l'étude de ces protéines en Biologie, il serait aussi possible, de façon plus pragmatique d'activer chimiquement l'ouverture de *Piezo1* à l'aide d'agonistes comme *Yoda1*.



# Annexe A

## Réalisation d'une PCR q5

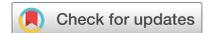
Pour réaliser une PCR, nous devons d'abord choisir les amorces, ou primers, de la réaction. Ces derniers sont de petits morceaux d'ADN d'environ une dizaine de nucléotides : une amorce en amont ou 5' et une en aval dite 3'. Lors de la phase d'hybridation de la PCR, ces amorces vont se lier au brin complémentaire du plasmide et permettre d'initier la polymérisation de l'ADN grâce à l'ADN polymérase. Dans les faits pour construire ces deux amorces dans le cas du plasmide MscL-G22S (Fig A.1), on prend les vingt premiers nucléotides pour l'amorce en amont c'est-à-dire "AAGCTTCACC ATCAGCCAGA" et on prend le complémentaire des vingt derniers nucléotides pour l'amorce en aval c'est-à-dire "AAGCTTCAGT GAGCGAGGAA"

```
1 AAGCTTCACC ATCAGCCAGA AAACCGCGCG AAATTAATAC GACTCACTAT AGGGAGACCA
61 CAACGGTTTC CCTGCTAGCA ATAATTTTGT TTAAC TTAA GAAGGAGATA TACCAATGAG
121 CATTATTA AAA GAATTCGCG AATTTGCGAT GCGCGGGAAC GTGGTGGATT TGGCGGTGTC
181 TGTCATTATC GGTGCGGCAT TCGGGAAGAT TGCTCTTCA CTGTTGCCG ATATCATCAT
241 GCCTCCTCTG GGCTTATTAA TTGGCGGGAT CGATTTTAAA CAGTTTGCTG TCACGCTACG
301 CGATGCGCAG GGGGATATCC CTGCTGTTGT GATGCATTAC GGTGTCTTCA TTCAAAACGT
361 CTTTGATTTT CTGATTGTGG CCTTTGCCAT CTTTATGGCG ATTAAGCTAA TCAACAACT
421 GAATCGGAAA AAAGAAGAAC CAGCAGCCGC ACCTGCACCA ACTAAAGAAG AAGTATTACT
481 GACAGAAATT CGTGATTTGC TGAAAGAGCA GAATAACCGC TCTTAACTCG AGGCTGCTGC
541 CACCGCTGAG CAATAACTAG CATAACCCCT TGGGGCCTCT AAACGGGTCT TGAGGGGTTT
601 TTTGCTGAAA GGAGGA ACTA TAGTCGACCC GCTTCCTCGC TCACTGAAGC TT
```

FIG. A.1 Séquence d'un plasmide mutant G22S de la protéine MscL

De l'ADN polymérase q5 à 500 nM, 0,5  $\mu$ M de chaque amorce et environ 2 ng d'ADN dans 200  $\mu$ L d'eau "Nuclease-Free" est utilisé pour réaliser notre PCR. Cette dernière est réalisée selon le protocole q5 (New England Biolabs) couramment utilisé en laboratoire avec pour température d'hybridation des amorces 64°C et pour durée d'élongation 25 secondes. Un gel d'extraction est ensuite coulé. Ce dernier est composé 1% d'agarose dans un tampon TAE et d'un agent intercalant. On laisse migrer l'ADN pendant environ trente minutes à 75 V. Le gel est ensuite révélé aux UV, on découpe la bande d'ADN voulu au scalpel et on utilise un kit de purification sur gel. Si lors du test au nanodrop les valeurs des rapport de A260/A280 et A260/A230 ne sont pas bonnes, c'est-à-dire qui ne sont pas respectivement compris entre [1,7 ; 2] et [2 ; 2,2] alors notre échantillon est impur donc il faut recommencer la purification du plasmide ou lancer une nouvelle culture de bactérie. Une fois le test du NanoDrop validé, nous faisons un gel de vérification pour confirmer la présence du plasmide. Ce dernier test passé, la solution contenant le plasmide est conservé au congélateur à

-20°C.



OPEN

# A simple method to make, trap and deform a vesicle in a gel

Pierre Tapie, Alexis M. Prevost, Lorraine Montel, Léa-Laetitia Pontani<sup>✉</sup> & Elie Wandersman<sup>✉</sup>

We present a simple method to produce giant lipid pseudo-vesicles (vesicles with an oily cap on the top), trapped in an agarose gel. The method can be implemented using only a regular micropipette and relies on the formation of a water/oil/water double droplet in liquid agarose. We characterize the produced vesicle with fluorescence imaging and establish the presence and integrity of the lipid bilayer by the successful insertion of  $\alpha$ -Hemolysin transmembrane proteins. Finally, we show that the vesicle can be easily mechanically deformed, non-intrusively, by indenting the surface of the gel.

Vesicles have been widely used to mimic cellular compartmentalization and reproduce *in vitro* specific biological functions with bottom-up approaches<sup>1,2</sup>. In many recent studies, the focus was put on the encapsulation of complex biological reactions inside the vesicles, in order to express proteins<sup>3</sup> or genes<sup>4</sup>, or to reconstitute and study the protein filaments of the cytoskeleton, such as the actin cortex<sup>5</sup> or microtubule asters<sup>6</sup>. Many other works aim to mimic the cell membrane properties, as for instance membrane fusion<sup>7-9</sup>, or cell communication, via the insertion of transmembrane proteins in liposomes. In particular, mechanosensitive channels<sup>10,11</sup> have been inserted in the membrane of liposomes, allowing in turn to measure their conductance under mechanical stress.

The production of vesicles usually relies on either hydration methods or inverted emulsion templates. Hydration methods rely on the swelling of dried lipid films in an aqueous buffer<sup>12,13</sup>. They are relatively simple to operate but yield polydisperse vesicle sizes and a relatively non homogeneous encapsulation efficiency<sup>14-16</sup>. The production rate of unilamellar vesicles can be improved by using electric fields (electroformation methods<sup>17</sup>) but fragile proteins can be damaged by the applied fields<sup>18,19</sup> and the technique is also limited to buffers with low ionic concentrations. Inverted emulsion templates, on the other hand, are based on the forced passage of a water-in-oil emulsion droplets through a water/oil interface<sup>5,20</sup>. This method can be developed in microfluidic chips<sup>21-24</sup>, yielding monodisperse vesicle sizes, that are limited by the microfluidic channel dimensions.

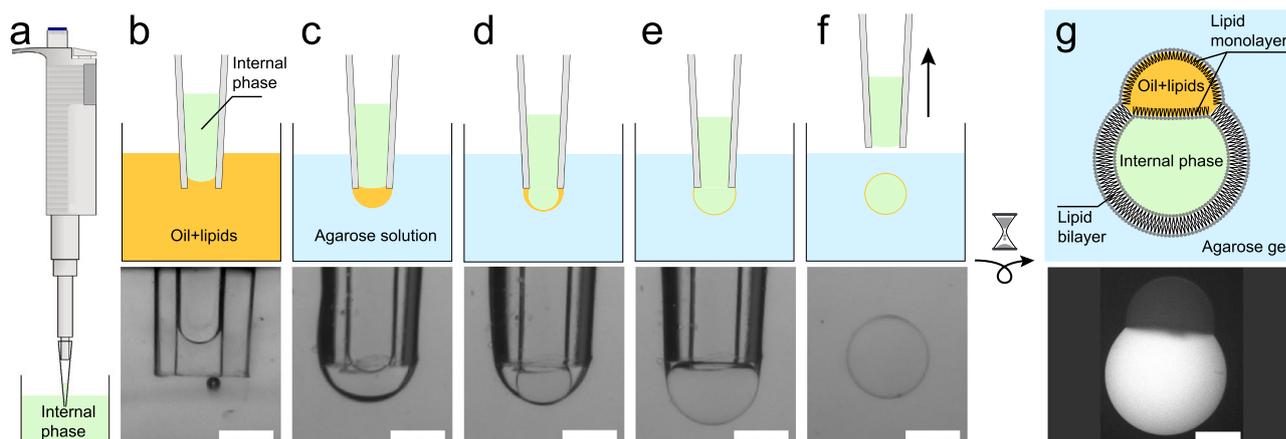
In both methods (hydration or emulsions), the resulting vesicles are dispersed in the outer medium, which requires additional steps to handle or transfer them in different environments (micropipettes<sup>25</sup>, optical trapping<sup>26</sup>, etc). These extra steps, relying on specific technical skills, make it difficult to replicate many experiments and collect large statistics on the systems properties. In particular, in order to study mechanotransduction processes, it is required to mechanically stimulate the vesicles. In practice, this has typically been achieved with local membrane deformations (pipette suction<sup>27</sup>, fluid flows<sup>28,29</sup>, AFM<sup>30,31</sup>). However, these methods do not reproduce faithfully the nature of mechanical perturbations in tissues. In addition, they overlook the mechanical coupling between cells and their biological visco-elastic environment.

We propose here a new technique, that provides a versatile platform for the straightforward production of biomimetic pseudo-vesicles (a vesicle with an oily cap on top), but also allows for their trapping and non-intrusive mechanical excitation.

## Pseudo-vesicle formation

The vesicles are produced from a water in lipid-containing oil droplet configuration, that is formed in a liquid, warm, agarose solution (details on the chemicals can be found in the “Methods” section). We first draw a small volume (about 500 nL) of the internal aqueous phase (Fig. 1a), using a 2.5  $\mu$ L micropipette (Eppendorf). Second, we move the pipette into the oil/lipids container and suck about 50 nL of it (Fig. 1b), by turning the adjustment wheel of the micropipette while the tip is immersed in the oil. The pipette tip thus contains an oil/water sandwich. Last, we move the pipette into the warm agarose solution (temperature  $T \approx 38^\circ\text{C}$ , see details in the “Methods” section) where we expel the oil/water sandwich by turning backward the adjustment wheel of the micropipette. During this expulsion phase, the oil phase first grows into a droplet in the liquid agarose (Fig. 1c), followed by the aqueous phase that grows inside of it (Fig. 1d,e). Finally, we move up the pipette rapidly in the air, which detaches the double droplet from the tip due to viscous friction from the agarose solution (Fig. 1f).

Sorbonne Université, CNRS, Institut de Biologie Paris-Seine (IBPS), Laboratoire Jean Perrin (LJP), 4 place Jussieu, 75005 Paris, France. ✉email: lea-laetitia.pontani@sorbonne-universite.fr; elie.wandersman@sorbonne-universite.fr



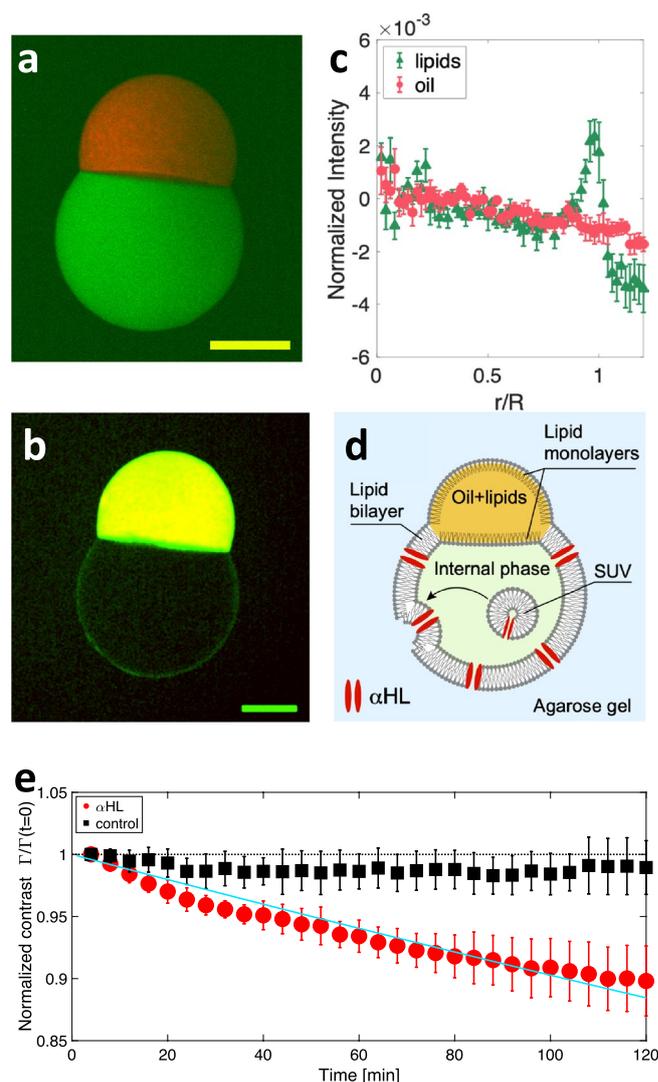
**Figure 1.** (a–f) (upper row) Sketch of the double emulsion production method. Green/orange/blue colors stand for internal/oil/external phases, respectively. (bottom row) Bright field images. Scale bars = 500  $\mu\text{m}$ . The produced double emulsion droplet in (f) sediments in the liquid agarose and eventually gets trapped as the agarose gels. Simultaneously, the surrounding oil shell creams at the top of the droplet and a lipid bilayer is zipped on the lower part. A few minutes later, the pseudo-vesicle has been formed and is trapped in the gel, as sketched in (g). Bottom panel: Fluorescence macroscopic image of a pseudo-vesicle loaded with carboxyfluorescein trapped in an agarose gel. Scale bar = 200  $\mu\text{m}$ .

Immediately after its formation, the inner water droplet is thus surrounded by an oil layer containing phospholipids. These lipids therefore redistribute at both oil/water interfaces, with their hydrophilic heads turned towards the inner water phase on one side and towards the agarose solution on the other side. While the agarose solution cools down, the double droplet slowly sediments in the agarose solution and eventually gets trapped in the formed gel. During this cooling process, the oil layer of the double droplet creams under gravity to form an oil cap, while the lipids stabilizing the former oil/water interfaces zip up a lipid bilayer on the lower part of the droplet (Fig. 1g). The double droplet becomes a pseudo-vesicle. This simple micro-pipette method yields pseudo-vesicles with a diameter of  $601 \pm 58 \mu\text{m}$  ( $N = 98$ ). Smaller sizes can be obtained using smaller tips and a micro-injector (see “Methods” section). The production rate of the method is around 5 pseudo-vesicles per minute and the rate of success is overall about 30%. Once trapped in the gel, the pseudo-vesicle is stable for several hours and can be kept overnight if the gel-containing cuvette is sealed to prevent evaporation. Moreover, being trapped in the gel, pseudo-vesicles can easily be observed with a microscope, as in<sup>32</sup>.

## Membrane characterisation and functionalization

**Fluorescence imaging.** To characterize the pseudo-vesicle and probe the existence of a lipid bilayer, we first used fluorescent markers dispersed in both the internal aqueous phase (carboxyfluorescein, emission wavelength  $\lambda_c = 525 \text{ nm}$ , green, see “Methods” section) and the oil phase (Nile red, emission wavelength  $\lambda_n = 636 \text{ nm}$ , red). The pseudo-vesicle is produced in the agarose gel as described above, and further imaged using a confocal microscope, with a 4x objective. The fluorescence images from both the green and red channels are recorded (see Fig. 2a), showing that the fluorescent water phase is efficiently encapsulated in the pseudo-vesicle. Secondly, we added green fluorescent lipids (NBD-PC, 1wt%) to the lipid mixture present in the oil phase labelled with Nile Red. A composite image obtained by confocal microscopy is shown on Fig. 2b. On Fig. 2c, we plot for each channel the normalized radial intensity profiles  $(I(r) - I(0))/I_{\text{cap}} + I(0)$ , where  $I_{\text{cap}}$  is the intensity in the oil cap in a given channel. These profiles reveal a significant increase of the fluorescent signal arising from the lipids at the boundary between the inner aqueous phase and the outer agarose gel. On the contrary there is no detectable fluorescence signal arising from the oil phase, indicating that there is not a measurable layer of oil in the bilayer, at the confocal microscope spatial resolution and in the limit of our fluorescence imaging sensitivity. Altogether, our results confirm that the inner phase is efficiently encapsulated in a lipid bilayer devoid of significant amounts of oil. This doesn't rule out the presence of oil traces at submicrometer length scales in the bilayer, as evidenced in emulsion template formed vesicles<sup>33</sup>. However, it was shown in<sup>34</sup> that such oil residues in the membrane did not impair significantly the mechanical properties nor the functionality of the membrane. The membrane tension  $\gamma_b$  can be estimated from the contact angles of the oil cap with the aqueous and agar phases (see *Supplementary Information*) and yields  $\gamma_b = 4.15 \pm 0.33 \text{ mN/m}$  (obtained from 13 images on  $N=8$  pseudo-vesicles), which is much larger than values usually reported in electroformed lipid vesicles<sup>35,36</sup>,  $\gamma_b \sim 10^{-3} \text{ mN/m}$ . On the contrary, our membrane tension value compares well with those obtained in Droplet Interface Bilayers (DIBs) which are planar lipid bilayers obtained by putting in contact two aqueous droplets bathing in an oil+lipid mixture (see for instance<sup>37–39</sup>). In DIBs, there is also water/oil interfaces surrounding the lipid bilayer. The high  $\gamma_b$  value we measure in our pseudo-vesicle is thus, as in DIBs, presumably due to the presence of the oil cap which pins and stretches the bilayer on both sides.

**Nanopores insertion.** To further probe the presence of a lipid bilayer and its functionality, we inserted  $\alpha$ -Hemolysin ( $\alpha\text{HL}$ ) transmembrane proteins in the lipid bilayer.  $\alpha\text{HL}$  is an heptameric nanopore<sup>40</sup> through which



**Figure 2.** (a) Composite confocal microscopy image of a pseudo-vesicle trapped in an agarose gel. The internal phase contains carboxyfluorescein (green), while the oil phase contains Nile Red (red). (b) Composite image obtained by adding 1wt% fluorescent NBD-PC in the lipid mixture (green) and an oil containing Nile Red (red). Yellow color = red + green channels. For clarity, the image has been smoothed with a 2 pixel radius Gaussian filter. Scale bars = 200  $\mu$ m. (c) Normalized radial fluorescence intensity profile, averaged over  $N=8$  pseudo-vesicles labelled as in (b). The green triangles (*resp.* red disks) show the fluorescent lipids channel (*resp.* fluorescent oil channel). Error bars are SE of data.  $R = 316 \pm 24 \mu$ m is the average pseudo-vesicle size. (d) Sketch of  $\alpha$ HL insertion in the pseudo-vesicle membrane, using  $\alpha$ HL loaded SUV. (e) Time evolution of the normalized contrast  $\Gamma(t)/\Gamma(t=0)$ , for  $\alpha$ HL loaded pseudo-vesicles (red disks,  $N=5$ ) and control experiments without  $\alpha$ HL (black squares,  $N=5$ ). Error bars are SD of data. The solid line is an exponential fit of the data  $\Gamma(t)/\Gamma(t=0) = e^{-t/\tau} \approx 1 - t/\tau$ , with  $\tau = 5.9 \pm 0.3 \cdot 10^4$ s.

carboxyfluorescein molecules can diffuse<sup>41</sup>. Practically, we found that the direct dissolution of  $\alpha$ HL monomers in the internal aqueous phase was decreasing the pseudo-vesicle stability, due to a nanopore induced modification of the oil/water surface tension (See Supplementary Information). We therefore used Small Unilamellar Vesicles (SUV) containing  $\alpha$ HL nanopores, primarily prepared (see “Methods” section) and dispersed in the fluorescent aqueous internal phase loaded with carboxyfluorescein. The pseudo-vesicle is then formed as described above, allowing for the SUVs contained in the inner phase to fuse with the bilayer, as previously shown in<sup>42</sup>. This fusion allows in turn the insertion of functional transmembrane channels into the lipid bilayer<sup>43,44</sup>,  $\alpha$ HL in our case (Fig. 2d). Under an epifluorescence microscope, we imaged the carboxyfluorescein leakage across the pseudo-vesicle by acquiring one image every 4 minutes, for two hours. We performed control experiments using on the one hand SUVs devoid of  $\alpha$ HL nanopores, and on the other hand pseudo-vesicles prepared without SUVs nor  $\alpha$ HL. Using image analysis, we measured the average intensity inside (*resp.* outside) the pseudo-vesicle  $I_{in}$  (*resp.*  $I_{out}$ ) from which we determine the fluorescence intensity contrast  $\Gamma = (I_{in} - I_{out})/(I_{in} + I_{out})$ . The time variation of the normalized contrast  $\Gamma(t)/\Gamma(t=0)$  is presented on Fig. 2e. Clearly, the normalized contrast decreases over time for pseudo-vesicles containing  $\alpha$ HL whereas it remains constant for  $\alpha$ HL-free pseudo-vesicles. This

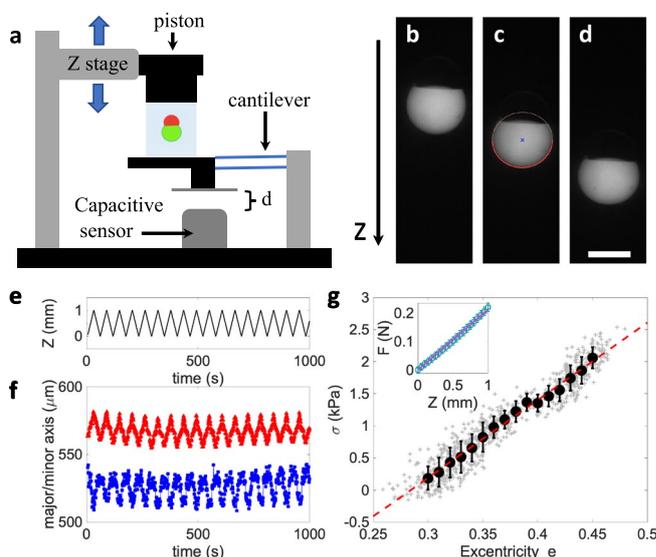
establishes that the lipid bilayer can be functionalized with a transmembrane protein. More quantitatively, fitting the normalized contrast with an exponential decay (solid line on Fig. 2e), we obtain a characteristic release time of  $5.9 \pm 0.3 \cdot 10^4$  s. This timescale is expected to scale with the volume of the vesicle<sup>45</sup>. Taking into account our large vesicle size, our results are in good agreement with values reported in the literature<sup>34,45,46</sup>.

### Mechanical excitation

Since the pseudo-vesicle is trapped within the bulk of the agarose gel, it can be deformed by indenting the surface of the gel (Fig. 3a). We compress the surface of the gel with a square piston (surface  $S=1$  cm<sup>2</sup>) mounted on a motorized z-translation stage (indentation amplitude,  $\Delta z = 1$  mm, Fig. 3b–e), while measuring the applied normal force  $F$  (“Methods” section). With our fluorescence macroscope, we image a pseudo-vesicle containing carboxyfluorescein, as the pseudo-vesicle is cyclically deformed (Fig. 3b–d). Using image analysis, we fit an ellipse to the pseudo-vesicle shape (excluding the oil cap from the analysis, Fig. 3c). The time variation of the long  $a$  and short  $b$  axis of the ellipse are plotted on Fig. 3f, from which we compute the ellipse’s eccentricity  $e = \sqrt{1 - b^2/a^2}$ . The variation of eccentricity,  $\Delta e = e(F \neq 0) - e(F = 0)$  can be used as a proxy for strain. On Fig. 3g, we plot the compressive stress  $\sigma = F/S$  as a function of  $e$ . A linear relationship is observed,  $\sigma = K_e \Delta e$ , with an effective compression modulus of the pseudo-vesicle  $K_e = 12.1 \pm 0.6$  kPa. The value of  $K_e$  is well distinct from the gel’s compression modulus  $K_{gel} \approx 85$  kPa (see inset of Fig. 3g). In addition, we performed complementary experiments (see Supplementary Information) showing that the presence of the oil cap was not affecting the pseudo-vesicle deformation. Our method thus offer a easy-to-use platform to study lipid bilayer mechanics or mechanotransduction processes.

### Conclusion

Overall our approach constitutes a very simple method to produce and trap pseudo-vesicles within a gel, which is easy to set up and inexpensive. On the one hand, the method only requires small volumes of encapsulated phase ( $\sim 1$   $\mu$ L of sample), in contrast with usual microfluidic techniques<sup>21</sup> which usually require hundreds of microliters of solutions in order to obtain stable flows. On the other hand, it is based on gentle manipulation, thus avoiding any protein denaturation which can be caused by the application of electric fields<sup>18,19</sup> as in electroformation techniques. It makes it of special interest for the use of valuable and delicate biological samples. Note, however, that the estimated value of the membrane tension in our system is much larger than values usually reported on electroformed vesicles, presumably due to the presence of the oil cap which pins and stretches the bilayer on both sides. This effect should be taken into consideration for further applications of the method. Last, because the pseudo-vesicles are trapped in a gel, they are easily localized and do not require post-production handling, in contrast with emulsion template methods. The pseudo-vesicles can also be easily deformed by indenting the gel



**Figure 3.** (a) Sketch of the mechanical excitation setup. (b–d) Macroscopic fluorescence images of pseudo-vesicles either relaxed ((b)  $Z=0$ ) or deformed ( $Z=0.5$  and  $1$  mm in (c,d), respectively). In (c) the red line is the fit of the contour of the lower part of the pseudo-vesicle with an ellipse. Scale bar =  $400$   $\mu$ m. (e) Piston position  $Z(t)$ . (f) Major (red) and minor (blue) axes of the fitted ellipse as a function of time, for a  $1000$  s long cyclic indentation. (g) Compressive stress  $\sigma$  as a function of the ellipse’s eccentricity  $e$ . Grey crosses correspond to all data points from (f), black circles are averages within bins of eccentricity  $\delta e = 0.01$ . Error bars are SD of the data. The red dotted line is a linear fit to the data. Inset: Normal force as a function of the piston indentation. The line is a linear fit  $F = \kappa z$ , from which the gel compression modulus can be deduced,  $K_{gel} = \kappa H/S$ , with  $H$  the height of the gel.

surface, allowing to finely tune both the stress amplitude and frequency. Finally, the pseudo-vesicles are embedded in a viscoelastic gel which better mimics the mechanical properties of biological tissues.

## Methods section

**Chemicals.** Unless specified, all chemicals were purchased from Sigma Aldrich, Merck inc.

*Internal/external aqueous phase.* The internal aqueous phase of the double droplet contains 10 mM Tris buffer (pH=7.5), 400 mM sucrose, and 100 mg/mL Dextran ( $M_w=40.10^3$  g/mol). For fluorescent pseudo-vesicles, we added 20  $\mu$ M of carboxyfluorescein to this buffer. The osmolarity of the internal phase, measured with a Löser TYP6 osmometer is about 600 mOsm.

The external phase is made of a 3 wt% low gelling temperature Agarose, dissolved in a buffer containing 10 mM Tris (pH=7.5) and 200 mM potassium chloride. Prior to agarose addition we adjust the osmolarity to 380 mosm. Agarose is then dissolved in the buffer on a hot plate and the resulting solution is maintained in a liquid form at 85°C.

*Oil phase containing the phospholipids.* The oil phase is a 50/50 wt/wt mixture of Hexadecan and Silicon oil AR20 in which dried lipids are dissolved. The lipid mixture is the one described in<sup>45</sup> to mimic the bacterial membrane composition and maximize its stability in droplet interface bilayer geometries. It consists of 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DOPC, 81.1 wt%), 1,2-diphytanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DPhPC, 10.8 wt%), 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phospho-(1'-rac-glycerol) (sodium salt) (DOPG, 5.4 wt%) and cholesterol (2.7 wt%). Note that such a high concentration of DOPC prevents the formation of lipid domains both in the bilayer<sup>47,48</sup> and at the oil/water interface<sup>49</sup>. In practice, we prepare a solution of 7.4 mg of this lipid mixture dissolved in chloroform. The lipids are then dried under nitrogen and kept under inert atmosphere in a 2 mL vial at -20°C for several weeks. Immediately before use, we add 2 mL of the oil phase to yield a total lipid concentration of 3.7 mg/mL, and place the vial in an ultrasonic bath for 30 minutes at 30 °C. This oil/lipid mixture can then be used for a few days.

For confocal imaging, we labelled separately the oil phase and the phospholipids. The oil phase is labelled with Nile Red with the following procedure: a small amount of solid Nile Red (typically the tip of a spatula) is dissolved in 300  $\mu$ L of acetone. 5 mL of silicone oil is then poured onto the acetone and stirred overnight at room temperature in order to transfer the Nile Red dye into the oil phase while evaporating all traces of solvent.

For the labelling of the lipid bilayer, fluorescent lipids were incorporated in the lipid mix following the above-mentioned procedure. We use 1-Myristoyl-2-[12-[(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino]dodecanoyl]-sn-Glycero-3-Phosphocholine or NBD-PC lipids that are excited at 480 nm, allowing us to image simultaneously the oil phase labelled with Nile Red and the lipid bilayer labelled with NBD-PC. In that case the final lipid concentrations in the mix yield: 80.3wt% DOPC, 10.7wt% DPhPC, 2.7wt% Cholesterol, 5.4wt% DOPG, 1wt% NBD-PC.

*SUV preparation.* The above-mentioned lipid mixture (total lipid mass 1.25 mg) is dried under nitrogen in a test tube and left to dry further in a vacuum chamber overnight. The next day, 1 mL of the internal aqueous phase is added to the lipid film and the solution is placed in a probe sonicator for 30 minutes using on/off cycles of 15/5 seconds, respectively.

*Preparation of  $\alpha$ HL solutions and integration in SUV.*  $\alpha$ HL monomers are prepared in the internal aqueous buffer at a concentration of 250  $\mu$ g/mL. In order to obtain SUV decorated with  $\alpha$ HL nanopores, 30  $\mu$ L of this  $\alpha$ HL solution was added to 120  $\mu$ L of the SUV solution, yielding a final pore monomer concentration of 50  $\mu$ g/mL. The resulting mix is incubated at room temperature for about an hour and used as the inner phase of the pseudo-vesicles.

**Vesicle formation and mechanical excitation.** The oil/aqueous phase sandwich is made following the steps described in the main text. The warm agarose solution is poured into a spectrophotometer cuvette (dimensions 10x10x40 mm<sup>3</sup>). Temperature of the agarose is measured with a temperature thermocouple (USB-TC01, National Instrument). When the temperature reaches about 38 °C, the double droplet is formed. The system is left to cool down to room temperature for about 15 minutes, so that the agarose gels around the pseudo-vesicle. Note that the method can in principle be used in liquid (agarose-free) environments, which would allow to use oil-cap removal techniques as described in<sup>22-24</sup>. In our first trials, however, the high sedimentation velocities of the produced droplets (that were large, and significantly denser than the outer phase) were destabilizing the pseudo-vesicles during their formation. Reducing the pseudo-vesicle size (using a smaller injection tip diameter), adjusting the density of the inner phase or increasing the external phase viscosity will lower the sedimentation speed of the produced double droplet and sounds like a promising route to obtain stable pseudo-vesicles in liquid environments.

For mechanical excitation experiments in agarose, a thin rectangular sheet of Plexiglas (width 1 mm) is added on one side of the cuvette to cover its wall, prior to liquid agarose pouring. As the agarose is gelling, this sheet is carefully removed, leaving an empty space between the agarose gel and the cuvette wall. Indeed, due to Poisson effect, a lateral expansion of the gel occurs as it is vertically compressed. This empty space is required to allow for this lateral expansion and a proper elastic deformation of the gel.

The cuvette is placed and fixed on the device displayed in Fig. 3a. The piston has been 3D printed to fit the cuvette size and a thin Plexiglas sheet is glued to the piston face indenting the agarose surface. The piston is mounted on a translation stage controlled by a Newport LTA-HL linear actuator (Z resolution of 1  $\mu$ m). As

the piston indents the gel, it deflects the set of two planar cantilevers attached to the base of the sample holder. A capacitive sensor measures the deflection of the cantilevers. Knowing the stiffness of these cantilever (from previous calibration) we deduce the applied normal force  $F$  (the measurement noise on  $F$  is 1 mN).

The first step of the indentation experiments consists in determining the gel surface position. To this end, the  $Z$  position of the piston is lowered by steps of 0.1 mm, while measuring the normal force. As the force reaches 5 mN the ramp is stopped and this  $Z$  position is taken as the origin for  $Z$  coordinates.

Subsequently, we impose a cyclic deformation of the gels, by indenting the gel, from this surface position, by a value  $\Delta Z$ , by steps of 100  $\mu\text{m}$ . At each step, the force is measured. The pseudo-vesicle is imaged at each indentation step (using a pulse of blue light, duration 500 ms) with a Leica Macroscope and a Pointgrey camera (BFLY-U3-23S6C-C).

**Smaller pseudo-vesicle production.** To reach smaller pseudo-vesicle sizes, we use a smaller injection tip. In practice we use a Polyurethan tubing (Phymep) with an outer diameter of 240  $\mu\text{m}$  and an inner diameter of 130  $\mu\text{m}$ . The tubing is connected to a 50  $\mu\text{L}$  syringe (Hamilton), mounted on a home-made micro-injector. The pseudo-vesicles are produced in agarose gel with the fluorescent inner buffer and imaged through epifluorescence. We determine their sizes using image analysis and find an average diameter  $D = 410 \pm 45 \mu\text{m}$  ( $N=6$ ). In principle, smaller sizes could be obtained by using a smaller injection tip. The only experimental difficulty will consist in forming the oil/water sandwich. The use of a commercial micro-injector will be required.

### Data availability

All data generated or analyzed during this study are included in this published article and its supplementary information files. Correspondence and requests for raw data and materials should be addressed to E.W. or L.-L.P.

Received: 13 July 2022; Accepted: 21 March 2023

Published online: 02 April 2023

### References

- Wang, X. *et al.* Versatile phospholipid assemblies for functional synthetic cells and artificial tissues. *Adv. Mater.* **33**, 1 (2021).
- Jeong, S., Nguyen, H. T., Kim, C. H., Ly, M. N. & Shin, K. Toward artificial cells: novel advances in energy conversion and cellular motility. *Adv. Funct. Mater.* **30**, 1907182 (2020).
- Noireaux, V. & Libchaber, A. A vesicle bioreactor as a step toward an artificial cell assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101**, 17669 (2004).
- Niederholtmeyer, H., Chagga, C. & Devaraj, N. K. Communication and quorum sensing in non-living mimics of eukaryotic cells. *Nat. Commun.* **9**, 1 (2018).
- Pontani, L.-L. *et al.* Reconstitution of an actin cortex inside a liposome. *Biophys. J.* **96**, 192 (2009).
- Gavriljuk, K. *et al.* A self-organized synthetic morphogenic liposome responds with shape changes to local light cues. *Nat. Commun.* **12**(1), 1548 (2021).
- Chan, Y.-H.M., van Lengerich, B. & Boxer, S. G. Lipid-anchored DNA mediates vesicle fusion as observed by lipid and content mixing. *Biointerphases* **3**, FA17 (2008).
- Chan, Y.-H.M., van Lengerich, B. & Boxer, S. G. Effects of linker sequences on vesicle fusion mediated by lipid-anchored DNA oligonucleotides. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **106**, 979 (2009).
- Heuvingh, J., Pincet, F. & Cribier, S. Hemifusion and fusion of giant vesicles induced by reduction of inter-membrane distance. *Eur. Phys. J. E* **14**, 269 (2004).
- Garamella, J. *et al.* An Adaptive Synthetic Cell Based on Mechanosensing, Biosensing, and Inducible Gene Circuits. *ACS Synth. Biol.* **8**, 1913 (2019).
- Hindley, J. W. *et al.* Building a synthetic mechanosensitive signaling pathway in compartmentalized artificial cells. *PNAS* **116**, 16711 (2019).
- Bangham, A. D. & Horne, R. Negative staining of phospholipids and their structural modification by surface-active agents as observed in the electron microscope. *J. Mol. Biol.* **8**, 660 (1964).
- Stein, H., Spindler, S., Bonakdar, N., Wang, C. & Sandoghdar, V. Production of isolated giant unilamellar vesicles under high salt concentrations. *Front. Physiol.* **8**, 63 (2017).
- Dominak, L. M. & Keating, C. D. Polymer encapsulation within giant lipid vesicles. *Langmuir* **23**, 7148 (2007).
- Dominak, L. M. & Keating, C. D. Macromolecular crowding improves polymer encapsulation within giant lipid vesicles. *Langmuir* **24**, 13565 (2008).
- Blanken, D., van Nies, P. & Danelon, C. Quantitative imaging of gene-expressing liposomes reveals rare favorable phenotypes. *Phys. Biol.* **16**, 045002 (2019).
- Angelova, M. I. & Dimitrov, D. S. Liposome electroformation. *Faraday Discuss. Chem. Soc.* **81**, 303 (1986).
- Chen, W. Electroconformational denaturation of membrane proteins. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1066**, 92 (2006).
- Freedman, K. J., Haq, S. R., Edel, J. B., Jemth, P. & Kim, M. J. Single molecule unfolding and stretching of protein domains inside a solid-state nanopore by electric field. *Sci. Rep.* **3**, 1 (2013).
- Pautot, S., Frisken, B. J. & Weitz, D. Production of unilamellar vesicles using an inverted emulsion. *Langmuir* **19**, 2870 (2003).
- Li, W. *et al.* Microfluidic fabrication of microparticles for biomedical applications. *Chem. Soc. Rev.* **47**, 5646 (2018).
- Deshpande, S. & Dekker, C. On-chip microfluidic production of cell-sized liposomes. *Nat. Protoc.* **13**, 856 (2018).
- Deshpande, S., Caspi, Y., Meijering, A. E. & Dekker, C. Octanol-assisted liposome assembly on chip. *Nat. Commun.* **7**, 1 (2016).
- Krafft, D. *et al.* Compartments for synthetic cells: osmotically assisted separation of oil from double emulsions in a microfluidic chip. *ChemBioChem* **20**, 2604 (2019).
- Evans, E. & Needham, D. Physical properties of surfactant bilayer membranes: Thermal transitions, elasticity, rigidity, cohesion and colloidal interactions. *J. Phys. Chem.* **91**, 4219 (1987).
- Kulin, S. *et al.* Optical manipulation and fusion of liposomes as microreactors. *Langmuir* **19**, 8206 (2003).
- Garten, M. *et al.* Whole-GUV patch-clamping. *PNAS* **114**, 328 (2017).
- Robinson, T. Microfluidic handling and analysis of giant vesicles for use as artificial cells: A review. *Adv. Biosyst.* **3**, 1800318 (2019).
- Deschamps, J. *et al.* Dynamics of a vesicle in general flow. *PNAS* **106**, 11444 (2009).
- Schäfer, E. *et al.* Mechanical response of adherent giant liposomes to indentation with a conical AFM-tip. *Soft Matter* **11**, 4487 (2015).
- Lin, Y. C. *et al.* Force-induced conformational changes in Piezo1. *Nature* **573**, 230 (2019).

32. Lira, R. B., Steinkühler, J., Knorr, R. L., Dimova, R. & Riske, K. A. Posing for a picture: Vesicle immobilization in agarose gel. *Sci. Rep.* **6**, 1 (2016).
33. Campillo, C. *et al.* Unexpected membrane dynamics unveiled by membrane nanotube extrusion. *Biophys. J.* **104**, 1248 (2013).
34. Van de Cauter, L. *et al.* Optimized cDICE for efficient reconstitution of biological systems in giant unilamellar vesicles. *ACS Synth. Biol.* **10**, 1690 (2021).
35. Hochmuth, F., Shao, J.-Y., Dai, J. & Sheetz, M. P. Deformation and flow of membrane into tethers extracted from neuronal growth cones. *Biophys. J.* **70**, 358 (1996).
36. Rädler, J. O., Feder, T. J., Strey, H. H. & Sackmann, E. Fluctuation analysis of tension-controlled undulation forces between giant vesicles and solid substrates. *Phys. Rev. E* **51**, 4526 (1995).
37. Stephenson, E. B., Korner, J. L. & Elvira, K. S. Challenges and opportunities in achieving the full potential of droplet interface bilayers. *Nat. Chem.* **14**, 862 (2022).
38. Taylor, G. J., Venkatesan, G. A., Collier, C. P. & Sarles, S. A. Direct in situ measurement of specific capacitance, monolayer tension, and bilayer tension in a droplet interface bilayer. *Soft Matter* **11**, 7592 (2015).
39. Huang, Y., Chandran Suja, V., Amirthalingam, L. & Fuller, G. G. Influence of salt on the formation and separation of droplet interface bilayers. *Phys. Fluids* **34**, 067107 (2022).
40. Gouaux, J. E. *et al.* Subunit stoichiometry of staphylococcal alpha-hemolysin in crystals and on membranes: A heptameric transmembrane pore. *PNAS* **91**, 12828 (1994).
41. Valet, M. *et al.* Diffusion through nanopores in connected lipid bilayer networks. *PRL* **123**, 088101 (2019).
42. Lira, R. B., Robinson, T., Dimova, R. & Riske, K. A. Highly efficient protein-free membrane fusion: A giant vesicle study. *Biophys. J.* **116**, 79 (2019).
43. Barriga, H. M. *et al.* Droplet interface bilayer reconstitution and activity measurement of the mechanosensitive channel of large conductance from *Escherichia coli*. *J. R. Soc. Interface* **11**, 20140404 (2014).
44. Garten, M., Aimon, S., Bassereau, P. & Toombes, G. E. Reconstitution of a transmembrane protein, the voltage-gated ion channel, KvAP, into giant unilamellar vesicles for microscopy and patch clamp studies. *JoVE (J. Vis. Exp.)*, e52281 (2015).
45. Dupin, A. & Simmel, F. C. Signalling and differentiation in emulsion-based multi-compartmentalized in vitro gene circuits. *Nat. Chem.* **11**, 32 (2019).
46. Lu, L., Schertzer, J. W. & Chiarot, P. R. Continuous microfluidic fabrication of synthetic asymmetric vesicles. *Lab Chip* **15**, 3591 (2015).
47. Veatch, S. L. & Keller, S. L. Separation of liquid phases in giant vesicles of ternary mixtures of phospholipids and cholesterol. *Biophys. J.* **85**, 3074 (2003).
48. Sorre, B. *et al.* Curvature-driven lipid sorting needs proximity to a demixing point and is aided by proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **106**, 5622 (2009).
49. Pontani, L.-L., Haase, M. F., Raczkowska, I. & Bruijic, J. Immiscible lipids control the morphology of patchy emulsions. *Soft Matter* **9**, 7150 (2013).

## Acknowledgements

The authors thank Mathieu Letrou and Sophie Cribier for their valuable help with SUV preparation. EW acknowledges financial support from Emergence Sorbonne University, LLP acknowledges support from Agence Nationale de la Recherche (BOAT, ANR-17-CE30-0001) and from Emergence(s) Ville de Paris.

## Author contributions

E.W. and L.L.P. conceived the project and the experiments, analyzed the results, and wrote the paper, P.T. collected the experimental data, analyzed the results and reviewed the manuscript. L.M. participated in collecting the experimental data, analyzed the results and reviewed the manuscript. A.P. participated in the experimental setup development, analyzed the results and reviewed the manuscript.

## Competing interests

The authors declare no competing interests.

## Additional information

**Supplementary Information** The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41598-023-31996-9>.

**Correspondence** and requests for materials should be addressed to L.-L.P. or E.W.

**Reprints and permissions information** is available at [www.nature.com/reprints](http://www.nature.com/reprints).

**Publisher's note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2023



# Bibliographie

- [1] M. MAY ; *Sensation and perception* (Infobase Publishing) (2009). 1
- [2] R. S. JOHANSSON & A. B. VALLBO ; “Tactile sensibility in the human hand : relative and absolute densities of four types of mechanoreceptive units in glabrous skin.” *The Journal of physiology* **286**, pp. 283–300 (1979). 1
- [3] R. S. JOHANSSON & Å. B. VALLBO ; “Tactile sensory coding in the glabrous skin of the human hand” ; *Trends in neurosciences* **6**, pp. 27–32 (1983). 1, 4
- [4] A. B. VALLBO, R. S. JOHANSSON *et al.* ; “Properties of cutaneous mechanoreceptors in the human hand related to touch sensation” ; *Hum neurobiol* **3**, pp. 3–14 (1984). 1
- [5] S.-i. IWASAKI ; “Evolution of the structure and function of the vertebrate tongue” ; *Journal of anatomy* **201**, pp. 1–13 (2002). 2
- [6] H. RANC, C. SERVAIS, P.-F. CHAUVY, S. DEBAUD & S. MISCHLER ; “Effect of surface structure on frictional behaviour of a tongue/palate tribological system” ; *Tribology International* **39**, pp. 1518–1526 (2006). 2
- [7] R. L. DOTY ; *Handbook of olfaction and gustation* (John Wiley & Sons) (2015). 2
- [8] A. KULLAA-MIKKONEN, M. HYNYNEN & P. HYVÖNEN ; “Filiform papillae of human, rat and swine tongue” ; *Cells Tissues Organs* **130**, pp. 280–284 (1987). 2
- [9] M. MANABE, H. W. LIM, M. WINZER & C. A. LOOMIS ; “Architectural organization of filiform papillae in normal and black hairy tongue epithelium : dissection of differentiation pathways in a complex human epithelium according to their patterns of keratin expression” ; *Archives of dermatology* **135**, pp. 177–181 (1999). 2
- [10] A. M. KHAN, S. ALI, R. V. JAMEELA, M. MUHAMOOD & M. F. HAQH ; “Impact of fungiform papillae count on taste perception and different methods of taste assessment and their clinical applications : a comprehensive review” ; *Sultan Qaboos University Medical Journal* **19**, p. e184 (2019). 2
- [11] E. LAUGA, C. J. PIPE & B. LE RÉVÉREND ; “Sensing in the mouth : a model for filiform papillae as strain amplifiers” ; *Frontiers in Physics* **4**, p. 35 (2016). 2
- [12] J.-B. THOMAZO, J. CONTRERAS PASTENES, C. J. PIPE, B. LE RÉVÉREND, E. WANDERSMAN & A. M. PREVOST ; “Probing in-mouth texture perception with a biomimetic tongue” ; *Journal of the Royal Society Interface* **16**, p. 20190362 (2019). 2, 15
- [13] J.-B. THOMAZO, B. LE RÉVÉREND, L.-L. PONTANI, A. M. PREVOST & E. WANDERSMAN ; “A bending fluctuation-based mechanism for particle detection by ciliated structures” ; *Proceedings of the National Academy of Sciences* **118**, p. e2020402118 (2021). 2, 15, 53, 56

- [14] Y. MOAYEDI, L. F. DUENAS-BIANCHI & E. A. LUMPKIN; “Somatosensory innervation of the oral mucosa of adult and aging mice”; *Scientific reports* **8**, p. 9975 (2018). 2
- [15] S. B. VINCENT; *The Functions of the Vibrissae in the Behavior of the White Rat...*; volume 1 (University of Chicago) (1912). 2
- [16] G. E. CARVELL & D. J. SIMONS; “Biometric analyses of vibrissal tactile discrimination in the rat”; *Journal of Neuroscience* **10**, pp. 2638–2648 (1990). 2
- [17] M. A. NEIMARK, M. L. ANDERMANN, J. J. HOPFIELD & C. I. MOORE; “Vibrissa resonance as a transduction mechanism for tactile encoding”; *Journal of Neuroscience* **23**, pp. 6499–6509 (2003). 2
- [18] J. WOLFE, D. N. HILL, S. PAHLAVAN, P. J. DREW, D. KLEINFELD & D. E. FELDMAN; “Texture coding in the rat whisker system : slip-stick versus differential resonance”; *PLoS biology* **6**, p. e215 (2008). 2
- [19] I. DARIAN-SMITH; “Thermal sensibility”; *Handbook of physiology : The nervous system* pp. 879–913 (1984). 3
- [20] S. J. BOLANOWSKI JR, G. A. GESCHEIDER, R. T. VERRILLO & C. M. CHECKOSKY; “Four channels mediate the mechanical aspects of touch”; *The Journal of the Acoustical society of America* **84**, pp. 1680–1694 (1988). 4, 5
- [21] M. KNIBESTÖL & Å. B. VALLBO; “Single unit analysis of mechanoreceptor activity from the human glabrous skin”; *Acta Physiologica Scandinavica* **80**, pp. 178–195 (1970). 4
- [22] R. JOHANSSON; “Skin mechanoreceptors in the human hand : receptive field characteristics”; in “Sensory functions of the skin in primates,” pp. 159–170 (Elsevier) (1976). 5
- [23] R. S. JOHANSSON; “Tactile sensibility in the human hand : receptive field characteristics of mechanoreceptive units in the glabrous skin area.” *The Journal of physiology* **281**, pp. 101–125 (1978). 5
- [24] M. KNIBESTÖL; “Stimulus-response functions of slowly adapting mechanoreceptors in the human glabrous skin area.” *the Journal of Physiology* **245**, pp. 63–80 (1975). 5
- [25] R. S. JOHANSSON, U. LANDSTRO, R. LUNDSTRO *et al.*; “Responses of mechanoreceptive afferent units in the glabrous skin of the human hand to sinusoidal skin displacements”; *Brain research* **244**, pp. 17–25 (1982). 5
- [26] M. A. MUNIAK, S. RAY, S. S. HSIAO, J. F. DAMMANN & S. J. BENSMAIA; “The neural coding of stimulus intensity : linking the population response of mechanoreceptive afferents with psychophysical behavior”; *Journal of Neuroscience* **27**, pp. 11687–11699 (2007). 5
- [27] A. HANDLER & D. D. GINTY; “The mechanosensory neurons of touch and their mechanisms of activation”; *Nature Reviews Neuroscience* **22**, pp. 521–537 (2021). 5
- [28] E. D. ADRIAN; “The basis of sensation.” (1928). 6
- [29] D. KATZ *et al.*; “Der aufbau der tastwelt”; (1925). 6
- [30] M. HOLLINS & S. R. RISNER; “Evidence for the duplex theory of tactile texture perception”; *Perception & psychophysics* **62**, pp. 695–705 (2000). 6, 7
- [31] C. E. CONNOR, S. S. HSIAO, J. R. PHILLIPS & K. O. JOHNSON; “Tactile roughness : neural codes that account for psychophysical magnitude estimates”; *Journal of Neuroscience* **10**, pp. 3823–3836 (1990). 7

- [32] S. BENSMAÏA & M. HOLLINS; “Pacian representations of fine surface texture”; Perception & psychophysics **67**, pp. 842–854 (2005). 7
- [33] R. S. JOHANSSON & I. BIRZNIKES; “First spikes in ensembles of human tactile afferents code complex spatial fingertip events”; Nature neuroscience **7**, pp. 170–177 (2004). 7
- [34] R. S. JOHANSSON, R. N. LEMON & G. WESTLING; “Time-varying enhancement of human cortical excitability mediated by cutaneous inputs during precision grip.” The Journal of physiology **481**, pp. 761–775 (1994). 7
- [35] R. S. JOHANSSON & J. R. FLANAGAN; “Coding and use of tactile signals from the fingertips in object manipulation tasks”; Nature Reviews Neuroscience **10**, pp. 345–359 (2009). 7, 8
- [36] R. S. JOHANSSON & J. R. FLANAGAN; “Tactile Sensory Control of Object Manipulation in Humans, The senses, a comprehensive reference : somatosensation”; (2008). 8
- [37] J. SCHEIBERT, S. LEURENT, A. PREVOST & G. DEBRÉGEAS; “The role of fingerprints in the coding of tactile information probed with a biomimetic sensor”; Science **323**, pp. 1503–1506 (2009). 9, 15, 16, 53, 66
- [38] L. R. MANFREDI, A. T. BAKER, D. O. ELIAS, J. F. DAMMANN III, M. C. ZIELINSKI, V. S. POLASHOCK & S. J. BENSMAIA; “The effect of surface wave propagation on neural responses to vibration in primate glabrous skin”; PloS one **7**, p. e31203 (2012). 10
- [39] P. DELMAS, J. HAO & L. RODAT-DESPOIX; “Molecular mechanisms of mechanotransduction in mammalian sensory neurons”; Nature Reviews Neuroscience **12**, pp. 139–153 (2011). 11, 15
- [40] S. S. RANADE, R. SYEDA & A. PATAPOUTIAN; “Mechanically activated ion channels”; Neuron **87**, pp. 1162–1179 (2015). 11, 15
- [41] S. L. GEFFENEY & M. B. GOODMAN; “How we feel : ion channel partnerships that detect mechanical inputs and give rise to touch and pain perception”; Neuron **74**, pp. 609–619 (2012). 11
- [42] Q. ZHAO, H. ZHOU, S. CHI, Y. WANG, J. WANG, J. GENG, K. WU, W. LIU, T. ZHANG, M.-Q. DONG *et al.*; “Structure and mechanogating mechanism of the Piezo1 channel”; Nature **554**, pp. 487–492 (2018). 11, 12
- [43] L. WANG, H. ZHOU, M. ZHANG, W. LIU, T. DENG, Q. ZHAO, Y. LI, J. LEI, X. LI & B. XIAO; “Structure and mechanogating of the mammalian tactile channel PIEZO2”; Nature **573**, pp. 225–229 (2019). 11, 12
- [44] B. COSTE, J. MATHUR, M. SCHMIDT, T. J. EARLEY, S. RANADE, M. J. PETRUS, A. E. DUBIN & A. PATAPOUTIAN; “Piezo1 and Piezo2 are essential components of distinct mechanically activated cation channels”; Science **330**, pp. 55–60 (2010). 11
- [45] B. COSTE, B. XIAO, J. S. SANTOS, R. SYEDA, J. GRANDL, K. S. SPENCER, S. E. KIM, M. SCHMIDT, J. MATHUR, A. E. DUBIN *et al.*; “Piezo proteins are pore-forming subunits of mechanically activated channels”; Nature **483**, pp. 176–181 (2012). 12
- [46] J. GE, W. LI, Q. ZHAO, N. LI, M. CHEN, P. ZHI, R. LI, N. GAO, B. XIAO & M. YANG; “Architecture of the mammalian mechanosensitive Piezo1 channel”; Nature **527**, pp. 64–69 (2015). 12

- [47] P. BLOUNT, S. I. SUKHAREV, P. C. MOE, S. K. NAGLE & C. KUNG; “Towards an understanding of the structural and functional properties of MscL, a mechanosensitive channel in bacteria”; *Biology of the Cell* **87**, pp. 1–8 (1996). 12
- [48] S.-H. WOO, S. RANADE, A. D. WEYER, A. E. DUBIN, Y. BABA, Z. QIU, M. PETRUS, T. MIYAMOTO, K. REDDY, E. A. LUMPKIN *et al.*; “Piezo2 is required for Merkel-cell mechanotransduction”; *Nature* **509**, pp. 622–626 (2014). 12, 13
- [49] J. LI, B. HOU, S. TUMOVA, K. MURAKI, A. BRUNS, M. J. LUDLOW, A. SEDO, A. J. HYMAN, L. MCKEOWN, R. S. YOUNG *et al.*; “Piezo1 integration of vascular architecture with physiological force”; *Nature* **515**, pp. 279–282 (2014). 12
- [50] S. M. CAHALAN, V. LUKACS, S. S. RANADE, S. CHIEN, M. BANDELL & A. PATAPOUTIAN; “Piezo1 links mechanical forces to red blood cell volume”; *elife* **4**, p. e07370 (2015). 12
- [51] S. S. RANADE, Z. QIU, S.-H. WOO, S. S. HUR, S. E. MURTHY, S. M. CAHALAN, J. XU, J. MATHUR, M. BANDELL, B. COSTE *et al.*; “Piezo1, a mechanically activated ion channel, is required for vascular development in mice”; *Proceedings of the National Academy of Sciences* **111**, pp. 10347–10352 (2014). 12
- [52] K. NONOMURA, V. LUKACS, D. T. SWEET, L. M. GODDARD, A. KANIE, T. WHITWAM, S. S. RANADE, T. FUJIMORI, M. L. KAHN & A. PATAPOUTIAN; “Mechanically activated ion channel PIEZO1 is required for lymphatic valve formation”; *Proceedings of the National Academy of Sciences* **115**, pp. 12817–12822 (2018). 12
- [53] R. Z. HILL, M. C. LOUD, A. E. DUBIN, B. PEET & A. PATAPOUTIAN; “PIEZO1 transduces mechanical itch in mice”; *Nature* **607**, pp. 104–110 (2022). 12
- [54] S. S. RANADE, S.-H. WOO, A. E. DUBIN, R. A. MOSHOURAB, C. WETZEL, M. PETRUS, J. MATHUR, V. BÉGAY, B. COSTE, J. MAINQUIST *et al.*; “Piezo2 is the major transducer of mechanical forces for touch sensation in mice”; *Nature* **516**, pp. 121–125 (2014). 12
- [55] S.-H. WOO, V. LUKACS, J. C. DE NOOIJ, D. ZAYTSEVA, C. R. CRIDDLE, A. FRANCISCO, T. M. JESSELL, K. A. WILKINSON & A. PATAPOUTIAN; “Piezo2 is the principal mechanotransduction channel for proprioception”; *Nature neuroscience* **18**, pp. 1756–1762 (2015). 12
- [56] J. TENG, S. LOUKIN, A. ANISHKIN & C. KUNG; “The force-from-lipid (FFL) principle of mechanosensitivity, at large and in elements”; *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology* **467**, pp. 27–37 (2015). 13
- [57] P. DELMAS, T. PARPAITE & B. COSTE; “PIEZO channels and newcomers in the mammalian mechanosensitive ion channel family”; *Neuron* (2022). 14
- [58] H. BAYLEY, B. CRONIN, A. HERON, M. A. HOLDEN, W. L. HWANG, R. SYEDA, J. THOMPSON & M. WALLACE; “Droplet interface bilayers”; *Molecular BioSystems* **4**, pp. 1191–1208 (2008). 13
- [59] R. SYEDA, M. N. FLORENDO, C. D. COX, J. M. KEFAUVER, J. S. SANTOS, B. MARTINAC & A. PATAPOUTIAN; “Piezo1 channels are inherently mechanosensitive”; *Cell reports* **17**, pp. 1739–1746 (2016). 13
- [60] O. B. JAGGERS, P. RIDONE, B. MARTINAC & M. A. BAKER; “Fluorescence microscopy of piezo1 in droplet hydrogel bilayers”; *Channels* **13**, pp. 102–109 (2019). 13, 85

- [61] X. YANG, C. LIN, X. CHEN, S. LI, X. LI & B. XIAO; “Structure deformation and curvature sensing of PIEZO1 in lipid membranes”; *Nature* **604**, pp. 377–383 (2022). 13
- [62] R. SYEDA, J. XU, A. E. DUBIN, B. COSTE, J. MATHUR, T. HUYNH, J. MATZEN, J. LAO, D. C. TULLY, I. H. ENGELS *et al.*; “Chemical activation of the mechanotransduction channel Piezo1”; *Elife* **4**, p. e07369 (2015). 14
- [63] S. A. U. SHINGE, D. ZHANG, A. U. DIN, F. YU & Y. NIE; “Emerging Piezo1 signaling in inflammation and atherosclerosis; a potential therapeutic target”; *International Journal of Biological Sciences* **18**, p. 923 (2022). 14
- [64] E. L. EVANS, K. CUTHBERTSON, N. ENDESH, B. RODE, N. M. BLYTHE, A. J. HYMAN, S. J. HALL, H. J. GAUNT, M. J. LUDLOW, R. FOSTER *et al.*; “Yoda1 analogue (D ooku1) which antagonizes Y oda1-evoked activation of P iezo1 and aortic relaxation”; *British journal of pharmacology* **175**, pp. 1744–1759 (2018). 14
- [65] J. QU, H.-F. ZONG, Y. SHAN, S.-C. ZHANG, W.-P. GUAN, Y. YANG & H.-L. ZHAO; “Piezo1 suppression reduces demyelination after intracerebral hemorrhage”; *Neural Regeneration Research* **18**, p. 1750 (2023). 14
- [66] C. D. COX, C. BAE, L. ZIEGLER, S. HARTLEY, V. NIKOLOVA-KRSTEVSKI, P. R. ROHDE, C.-A. NG, F. SACHS, P. A. GOTTLIEB & B. MARTINAC; “Removal of the mechanoprotective influence of the cytoskeleton reveals PIEZO1 is gated by bilayer tension”; *Nature communications* **7**, p. 10366 (2016). 14, 57, 72
- [67] A. SANZENI, S. KATTA, B. PETZOLD, B. L. PRUITT, M. B. GOODMAN & M. VERGASSOLA; “Somatosensory neurons integrate the geometry of skin deformation and mechanotransduction channels to shape touch sensing”; *Elife* **8**, p. e43226 (2019). 15
- [68] S. MAKSIMOVIC, M. NAKATANI, Y. BABA, A. M. NELSON, K. L. MARSHALL, S. A. WELLNITZ, P. FIROZI, S.-H. WOO, S. RANADE, A. PATAPOUTIAN *et al.*; “Epidermal Merkel cells are mechanosensory cells that tune mammalian touch receptors”; *Nature* **509**, pp. 617–621 (2014). 15
- [69] G. C. MCCARTER, D. B. REICHLING & J. D. LEVINE; “Mechanical transduction by rat dorsal root ganglion neurons in vitro”; *Neuroscience letters* **273**, pp. 179–182 (1999). 15
- [70] C.-M. CHENG, Y.-W. LIN, R. M. BELLIN, R. L. STEWARD JR, Y.-R. CHENG, P. R. LEDUC & C.-C. CHEN; “Probing localized neural mechanotransduction through surface-modified elastomeric matrices and electrophysiology”; *nature protocols* **5**, pp. 714–724 (2010). 15
- [71] E. WANDERSMAN, R. CANDELIER, G. DEBRÉGEAS & A. PREVOST; “Texture-induced modulations of friction force : the fingerprint effect”; *Physical review letters* **107**, p. 164301 (2011). 15, 16, 60
- [72] L. N. CLAVERIE; *Une approche biomimétique de la perception tactile chez les rongeurs*; Ph.D. thesis; Université Pierre et Marie Curie-Paris VI (2016). 15
- [73] J.-B. THOMAZO; *Perception de la texture en bouche : une approche biomimétique*; Ph.D. thesis; Sorbonne université (2019). 15
- [74] P. F. DEVAUX & R. MORRIS; “Transmembrane asymmetry and lateral domains in biological membranes”; *Traffic* **5**, pp. 241–246 (2004). 19

- [75] A. C. NEWTON; “Interaction of proteins with lipid headgroups : lessons from protein kinase C”; Annual review of biophysics and biomolecular structure **22**, pp. 1–25 (1993). 19
- [76] A. BOUR; *Influence de la composition lipidique sur la résistance de membranes biomimétiques au stress oxydant*; Ph.D. thesis; Sorbonne université (2018). 19
- [77] K. RITCHIE, R. IINO, T. FUJIWARA, K. MURASE & A. KUSUMI; “The fence and picket structure of the plasma membrane of live cells as revealed by single molecule techniques”; Molecular membrane biology **20**, pp. 13–18 (2003). 19
- [78] S. RAMADURAI, A. HOLT, V. KRASNIKOV, G. VAN DEN BOGAART, J. A. KILLIAN & B. POOLMAN; “Lateral diffusion of membrane proteins”; Journal of the American Chemical Society **131**, pp. 12650–12656 (2009). 19
- [79] M. J. SAXTON & K. JACOBSON; “Single-particle tracking : applications to membrane dynamics”; Annual review of biophysics and biomolecular structure **26**, pp. 373–399 (1997). 19
- [80] M. LÖWE, M. KALACHEVA, A. J. BOERSMA & A. KEDROV; “The more the merrier : effects of macromolecular crowding on the structure and dynamics of biological membranes”; The FEBS Journal **287**, pp. 5039–5067 (2020). 19
- [81] G. KARP; *Cell and molecular biology : concepts and experiments* (John Wiley & Sons) (2009). 20
- [82] T. ZECH, C. S. EJSING, K. GAUS, B. DE WET, A. SHEVCHENKO, K. SIMONS & T. HARDER; “Accumulation of raft lipids in T-cell plasma membrane domains engaged in TCR signalling”; The EMBO journal **28**, pp. 466–476 (2009). 20
- [83] W. SZLASA, I. ZENDRAN, A. ZALESIŃSKA, M. TAREK & J. KULBACKA; “Lipid composition of the cancer cell membrane”; Journal of bioenergetics and biomembranes **52**, pp. 321–342 (2020). 20
- [84] M. ALLEN-BENTON, H. E. FINDLAY & P. J. BOOTH; “Probing membrane protein properties using droplet interface bilayers”; Experimental Biology and Medicine **244**, pp. 709–720 (2019). 20
- [85] D. J. DIEUDONNÉ, P. A. GURNEV, A. L. ROGOZEA, B. D. RAY & H. I. PETRACHE; “Physical Properties of the Lipid Diphytanoyl Phosphatidylcholine (DPhPc) used for Ion Channel Measurements”; Biophysical Journal **98**, pp. 667a–668a (2010). 20
- [86] H. LINDSEY, N. PETERSEN & S. I. CHAN; “Physicochemical characterization of 1, 2-diphytanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine in model membrane systems”; Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes **555**, pp. 147–167 (1979). 20
- [87] M. ANDERSSON, J. JACKMAN, D. WILSON, P. JARVOLL, V. ALFREDSSON, G. OKEYO & R. DURAN; “Vesicle and bilayer formation of diphytanoylphosphatidylcholine (DPhPC) and diphytanoylphosphatidylethanolamine (DPhPE) mixtures and their bilayers’ electrical stability”; Colloids and Surfaces B : Biointerfaces **82**, pp. 550–561 (2011). 20
- [88] P. L. YEAGLE; *The membranes of cells* (Academic Press) (2016). 20
- [89] R. H. LUMB, A. D. KLOOSTERMAN, K. W. WIRTZ & L. L. VAN DEENEN; “Some properties of phospholipid exchange proteins from rat liver”; European Journal of Biochemistry **69**, pp. 15–22 (1976). 20

- [90] R. S. GRACIA, N. BEZLYEPKINA, R. L. KNORR, R. LIPOWSKY & R. DIMOVA; “Effect of cholesterol on the rigidity of saturated and unsaturated membranes : fluctuation and electro-deformation analysis of giant vesicles”; *Soft Matter* **6**, pp. 1472–1482 (2010). 20
- [91] I. LEVITAN & M. A. AYEE; “Paradoxical impact of cholesterol on lipid packing and cell stiffness”; *Frontiers in Bioscience-Landmark* **21**, pp. 1245–1259 (2016). 20
- [92] M. YU, R. B. LIRA, K. A. RISKE, R. DIMOVA & H. LIN; “Ellipsoidal relaxation of deformed vesicles”; *Physical review letters* **115**, p. 128303 (2015). 20
- [93] J. KWIK, S. BOYLE, D. FOOKSMAN, L. MARGOLIS, M. P. SHEETZ & M. EDIDIN; “Membrane cholesterol, lateral mobility, and the phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate-dependent organization of cell actin”; *Proceedings of the National Academy of Sciences* **100**, pp. 13964–13969 (2003). 20
- [94] J. ISRAELACHVILI, S. MARČELJA & R. G. HORN; “Physical principles of membrane organization”; *Quarterly reviews of biophysics* **13**, pp. 121–200 (1980). 21
- [95] P. GEHAN; *Étude des mécanismes de translocation du peptide vecteur Pénétratine sur membranes modèles formées à l’interface de gouttes*; Ph.D. thesis; Sorbonne université (2021). 22
- [96] M. VALET, L.-L. PONTANI, R. VOITURIEZ, E. WANDERSMAN & A. M. PREVOST; “Diffusion through nanopores in connected lipid bilayer networks”; *Physical review letters* **123**, p. 088101 (2019). 21, 23
- [97] A. BANGHAM; “A correlation between surface charge and coagulant action of phospholipids”; *Nature* **192**, pp. 1197–1198 (1961). 21
- [98] L.-L. PONTANI, J. VAN DER GUCHT, G. SALBREUX, J. HEUVINGH, J.-F. JOANNY & C. SYKES; “Reconstitution of an actin cortex inside a liposome”; *Biophysical journal* **96**, pp. 192–198 (2009). 22, 25
- [99] J. LEMIÈRE, K. CARVALHO & C. SYKES; “Cell-sized liposomes that mimic cell motility and the cell cortex”; in “*Methods in cell biology*,” , volume 128pp. 271–285 (Elsevier) (2015). 22
- [100] R. LOPES DOS SANTOS & C. CAMPILLO; “Studying actin-induced cell shape changes using Giant Unilamellar Vesicles and reconstituted actin networks”; *Biochemical Society Transactions* **50**, pp. 1527–1539 (2022). 22
- [101] W. RÖMER, L.-L. PONTANI, B. SORRE, C. RENTERO, L. BERLAND, V. CHAMBON, C. LAMAZE, P. BASSEREAU, C. SYKES, K. GAUS *et al.*; “Actin dynamics drive membrane reorganization and scission in clathrin-independent endocytosis”; *Cell* **140**, pp. 540–553 (2010). 22
- [102] P. BASSEREAU, B. SORRE & A. LÉVY; “Bending lipid membranes : experiments after W. Helfrich’s model”; *Advances in colloid and interface science* **208**, pp. 47–57 (2014). 22
- [103] V. K. BHATIA, N. S. HATZAKIS & D. STAMOU; “A unifying mechanism accounts for sensing of membrane curvature by BAR domains, amphipathic helices and membrane-anchored proteins”; in “*Seminars in cell & developmental biology*,” , volume 21pp. 381–390 (Elsevier) (2010). 22

- [104] A. ROUX, D. CUVELIER, P. NASSOY, J. PROST, P. BASSEREAU & B. GOUD ; “Role of curvature and phase transition in lipid sorting and fission of membrane tubules” ; The EMBO journal **24**, pp. 1537–1545 (2005). 22
- [105] T. J. LAGNY & P. BASSEREAU ; “Bioinspired membrane-based systems for a physical approach of cell organization and dynamics : usefulness and limitations” ; Interface focus **5**, p. 20150038 (2015). 22
- [106] A. J. JIMENEZ, P. MAIURI, J. LAFAURIE-JANVORE, S. DIVOUX, M. PIEL & F. PEREZ ; “ESCRT machinery is required for plasma membrane repair” ; Science **343**, p. 1247136 (2014). 22
- [107] J. H. HURLEY ; “The ESCRT complexes” ; Critical reviews in biochemistry and molecular biology **45**, pp. 463–487 (2010). 22
- [108] B. MAHERANI, E. ARAB-TEHRANY, M. R. MOZAFARI, C. GAIANI & M. LINDER ; “Liposomes : a review of manufacturing techniques and targeting strategies” ; Current nanoscience **7**, pp. 436–452 (2011). 22
- [109] J. ZHANG, Y. YUAN, M. GAO, Z. HAN, C. CHU, Y. LI, P. C. VAN ZIJL, M. YING, J. W. BULTE & G. LIU ; “Carbon dots as a new class of diamagnetic chemical exchange saturation transfer (diaCEST) MRI contrast agents” ; Angewandte Chemie International Edition **58**, pp. 9871–9875 (2019). 22
- [110] E. YUBA ; “Liposome-based immunity-inducing systems for cancer immunotherapy” ; Molecular immunology **98**, pp. 8–12 (2018). 22
- [111] A. MOHAMMADI, S. M. JAFARI, A. S. MAHOONAK & M. GHORBANI ; “Liposomal/nanoliposomal encapsulation of food-relevant enzymes and their application in the food industry” ; Food and Bioprocess Technology **14**, pp. 23–38 (2021). 22
- [112] B. A. LAW & J. S. KING ; “Use of liposomes for proteinase addition to Cheddar cheese” ; Journal of Dairy Research **52**, pp. 183–188 (1985). 22
- [113] T. SUBRAMANI & H. GANAPATHYSWAMY ; “An overview of liposomal nano-encapsulation techniques and its applications in food and nutraceutical” ; Journal of food science and technology **57**, pp. 3545–3555 (2020). 22
- [114] P. U. GIACOMONI ; “Advancement in skin aging : the future cosmeceuticals” ; Clinics in dermatology **26**, pp. 364–366 (2008). 22
- [115] A. D. BANGHAM, M. M. STANDISH & J. C. WATKINS ; “Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids” ; Journal of molecular biology **13**, pp. 238–IN27 (1965). 23
- [116] A. D. BANGHAM & R. HORNE ; “Negative staining of phospholipids and their structural modification by surface-active agents as observed in the electron microscope” ; Journal of molecular biology **8**, pp. 660–IN10 (1964). 23
- [117] M. I. ANGELOVA & D. S. DIMITROV ; “Liposome electroformation” ; Faraday discussions of the Chemical Society **81**, pp. 303–311 (1986). 23
- [118] P. MÉLÉARD, L. A. BAGATOLLI & T. POTT ; “Giant unilamellar vesicle electroformation : From lipid mixtures to native membranes under physiological conditions” ; Methods in enzymology **465**, pp. 161–176 (2009). 23, 24

- [119] K.-i. AKASHI, H. MIYATA, H. ITOH & K. KINOSITA JR; “Preparation of giant liposomes in physiological conditions and their characterization under an optical microscope”; *Biophysical journal* **71**, pp. 3242–3250 (1996). 24
- [120] A. JAHN, W. N. VREELAND, D. L. DEVOE, L. E. LOCASCIO & M. GAITAN; “Microfluidic directed formation of liposomes of controlled size”; *Langmuir* **23**, pp. 6289–6293 (2007). 24
- [121] S. DESHPANDE, Y. CASPI, A. E. MEIJERING & C. DEKKER; “Octanol-assisted liposome assembly on chip”; *Nature communications* **7**, p. 10447 (2016). 25, 26, 43, 85
- [122] B. G. CARVALHO, B. T. CECCATO, M. MICHELON, S. W. HAN & L. G. DE LA TORRE; “Advanced microfluidic technologies for lipid nano-microsystems from synthesis to biological application”; *Pharmaceutics* **14**, p. 141 (2022). 26
- [123] K. FUNAKOSHI, H. SUZUKI & S. TAKEUCHI; “Formation of giant lipid vesiclelike compartments from a planar lipid membrane by a pulsed jet flow”; *Journal of the American chemical society* **129**, pp. 12608–12609 (2007). 25
- [124] S. PAUTOT, B. J. FRISKEN & D. WEITZ; “Production of unilamellar vesicles using an inverted emulsion”; *Langmuir* **19**, pp. 2870–2879 (2003). 25
- [125] Y.-C. TAN, K. HETTIARACHCHI, M. SIU, Y.-R. PAN & A. P. LEE; “Controlled microfluidic encapsulation of cells, proteins, and microbeads in lipid vesicles”; *Journal of the American Chemical Society* **128**, pp. 5656–5658 (2006). 25
- [126] V. NOIREAUX & A. LIBCHABER; “A vesicle bioreactor as a step toward an artificial cell assembly”; *Proceedings of the National Academy of Sciences* **101**, pp. 17669–17674 (2004). 25, 27, 73
- [127] D. VAN SWAAY & A. DEMELLO; “Microfluidic methods for forming liposomes”; *Lab on a Chip* **13**, pp. 752–767 (2013). 27
- [128] A. DUPIN & F. C. SIMMEL; “Signalling and differentiation in emulsion-based multi-compartmentalized in vitro gene circuits”; *Nature chemistry* **11**, pp. 32–39 (2019). 27, 36
- [129] N. TAMADDONI, G. TAYLOR, T. HEPBURN, S. M. KILBEY & S. A. SARLES; “Reversible, voltage-activated formation of biomimetic membranes between triblock copolymer-coated aqueous droplets in good solvents”; *Soft Matter* **12**, pp. 5096–5109 (2016). 27
- [130] M. M. DINGES, P. M. ORWIN & P. M. SCHLIEVERT; “Exotoxins of *Staphylococcus aureus*”; *Clinical microbiology reviews* **13**, pp. 16–34 (2000). 32
- [131] T. J. FOSTER; “*Staphylococcus aureus*”; *Molecular Medical Microbiology* pp. 839–888 (2002). 32
- [132] G. PRÉVOST, M. Y. TAWK, G. ZIMMERMANN-MEISSE, J. ALOUF, D. LADANT & M. POPPOFF; “The staphylococcal alpha-toxin and leukotoxins”; *The Comprehensive Sourcebook of Bacterial Protein Toxins*, 4th edn. Amsterdam, Netherlands pp. 739–72 (2015). 32
- [133] L. SONG, M. R. HOBAUGH, C. SHUSTAK, S. CHELEY, H. BAYLEY & J. E. GOUAUX; “Structure of staphylococcal  $\alpha$ -hemolysin, a heptameric transmembrane pore”; *Science* **274**, pp. 1859–1865 (1996). 32
- [134] A. DAERR & A. MOGNE; “Pendent\_Drop : An ImageJ Plugin to Measure the Surface Tension from an Image of a Pendent Drop”; *Journal of open research software* **4** (2016). 33

- [135] E. LEBÈGUE, C. FARRE, C. JOSE, J. SAULNIER, F. LAGARDE, Y. CHEVALIER, C. CHAIX & N. JAFFREZIC-RENAULT ; “Responsive polydiacetylene vesicles for biosensing microorganisms” ; *Sensors* **18**, p. 599 (2018). 36
- [136] L. VAN DE CAUTER, F. FANALISTA, L. VAN BUREN, N. DE FRANCESCHI, E. GODINO, S. BOUW, C. DANELON, C. DEKKER, G. H. KOENDERINK & K. A. GANZINGER ; “Optimized cDICE for efficient reconstitution of biological systems in giant unilamellar vesicles” ; *ACS Synthetic Biology* **10**, pp. 1690–1702 (2021). 36
- [137] L. LU, J. W. SCHERTZER & P. R. CHIAROT ; “Continuous microfluidic fabrication of synthetic asymmetric vesicles” ; *Lab on a chip* **15**, pp. 3591–3599 (2015). 36
- [138] K. ROSS & M. SCANLON ; “Analysis of the elastic modulus of agar gel by indentation” ; *Journal of texture studies* **30**, pp. 17–27 (1999). 40, 42
- [139] B. MAO, A. BENTALEB, F. LOUERAT, T. DIVOUX & P. SNABRE ; “Heat-induced aging of agar solutions : Impact on the structural and mechanical properties of agar gels” ; *Food Hydrocolloids* **64**, pp. 59–69 (2017). 40, 42
- [140] A. HAYASHI & T. KANZAKI ; “Swelling of agarose gel and its related changes” ; *Food Hydrocolloids* **1**, pp. 317–325 (1987). 41
- [141] D. F. DO NASCIMENTO, L. R. ARRIAGA, M. EGGERSDORFER, R. ZIBLAT, M. d. F. V. MARQUES, F. REYNAUD, S. A. KOEHLER & D. A. WEITZ ; “Microfluidic fabrication of Pluronic vesicles with controlled permeability” ; *Langmuir* **32**, pp. 5350–5355 (2016). 43
- [142] F. HOCHMUTH, J.-Y. SHAO, J. DAI & M. P. SHEETZ ; “Deformation and flow of membrane into tethers extracted from neuronal growth cones” ; *Biophysical journal* **70**, pp. 358–369 (1996). 43
- [143] J. O. RÄDLER, T. J. FEDER, H. H. STREY & E. SACKMANN ; “Fluctuation analysis of tension-controlled undulation forces between giant vesicles and solid substrates” ; *Physical Review E* **51**, p. 4526 (1995). 43
- [144] Y. HUANG, V. CHANDRAN SUJA, L. AMIRTHALINGAM & G. G. FULLER ; “Influence of salt on the formation and separation of droplet interface bilayers” ; *Physics of Fluids* **34**, p. 067107 (2022). 43
- [145] G. J. TAYLOR, G. A. VENKATESAN, C. P. COLLIER & S. A. SARLES ; “Direct in situ measurement of specific capacitance, monolayer tension, and bilayer tension in a droplet interface bilayer” ; *Soft matter* **11**, pp. 7592–7605 (2015). 43
- [146] N. YANDRAPALLI, J. PETIT, O. BÄUMCHEN & T. ROBINSON ; “Surfactant-free production of biomimetic giant unilamellar vesicles using PDMS-based microfluidics” ; *Communications Chemistry* **4**, p. 100 (2021). 43
- [147] O. CAMPÀS, T. MAMMOTO, S. HASSO, R. A. SPERLING, D. O’CONNELL, A. G. BISCHOF, R. MAAS, D. A. WEITZ, L. MAHADEVAN & D. E. INGBER ; “Quantifying cell-generated mechanical forces within living embryonic tissues” ; *Nature methods* **11**, pp. 183–189 (2014). 47, 48
- [148] A. MONGERA, P. ROWGHANIAN, H. J. GUSTAFSON, E. SHELTON, D. A. KEALHOFER, E. K. CARN, F. SERWANE, A. A. LUCIO, J. GIAMMONA & O. CAMPÀS ; “A fluid-to-solid jamming

- transition underlies vertebrate body axis elongation”; *Nature* **561**, pp. 401–405 (2018). 47, 48
- [149] A. SOUCHAUD, A. BOUTILLON, G. CHARRON, A. ASNACIOS, C. NOÛS, N. B. DAVID, F. GRANER & F. GALLET; “Live 3D imaging and mapping of shear stresses within tissues using incompressible elastic beads”; *Development* **149**, p. dev199765 (2022). 48
- [150] J. C. JAEGER, N. G. COOK & R. ZIMMERMAN; *Fundamentals of rock mechanics* (John Wiley & Sons) (2009). 48, 49, 51
- [151] T. DAVIS, D. HEALY, A. BUBECK & R. WALKER; “Stress concentrations around voids in three dimensions : The roots of failure”; *Journal of Structural Geology* **102**, pp. 193–207 (2017). 48, 51, 52
- [152] E. LAJTAI; “A theoretical and experimental evaluation of the Griffith theory of brittle fracture”; *Tectonophysics* **11**, pp. 129–156 (1971). 48, 49
- [153] A. O. KRUSHYNSKA, M. MINIACI, F. BOSIA & N. M. PUGNO; “Coupling local resonance with Bragg band gaps in single-phase mechanical metamaterials”; *Extreme Mechanics Letters* **12**, pp. 30–36 (2017). 48
- [154] J. D. ESHELBY; “The determination of the elastic field of an ellipsoidal inclusion, and related problems”; *Proceedings of the royal society of London. Series A. Mathematical and physical sciences* **241**, pp. 376–396 (1957). 48
- [155] C. WEINBERGER, W. CAI & D. BARNETT; “Lecture notes—elasticity of microscopic structures”; ME340—Stanford University (2005). 48
- [156] I. SOKOLNIKOFF; “Mathematical Theory of Elasticity, McGraw-Hill Book Company”; Inc., New York/London (1956). 49, 51, 52
- [157] R. W. STYLE, R. BOLTYANSKIY, B. ALLEN, K. E. JENSEN, H. P. FOOTE, J. S. WETTCLAUFER & E. R. DUFRESNE; “Stiffening solids with liquid inclusions”; *Nature Physics* **11**, pp. 82–87 (2015). 49
- [158] J. DAI, H. P. TING-BEALL & M. P. SHEETZ; “The secretion-coupled endocytosis correlates with membrane tension changes in RBL 2H3 cells”; *The Journal of general physiology* **110**, pp. 1–10 (1997). 50
- [159] M. FAGAN & M. POSTEMA; *Introduction to stress and strain analysis* (The University of Hull) (2007). 50
- [160] M. VALET; *Transport properties in biomimetic tissues*; Ph.D. thesis; Sorbonne université (2019). 52, 53, 74
- [161] G. FIRPO, E. ANGELI, L. REPETTO & U. VALBUSA; “Permeability thickness dependence of polydimethylsiloxane (PDMS) membranes”; *Journal of Membrane Science* **481**, pp. 1–8 (2015). 53
- [162] J. S. NAJEM, M. D. DUNLAP, I. D. ROWE, E. C. FREEMAN, J. W. GRANT, S. SUKHAREV & D. J. LEO; “Activation of bacterial channel MscL in mechanically stimulated droplet interface bilayers”; *Scientific reports* **5**, p. 13726 (2015). 57, 71
- [163] A. S. REDDY, D. T. WARSHAVIAK & M. CHACHISVILIS; “Effect of membrane tension on the physical properties of DOPC lipid bilayer membrane”; *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* **1818**, pp. 2271–2281 (2012). 57

- [164] R. N. PALCHESKO, L. ZHANG, Y. SUN & A. W. FEINBERG ; “Development of polydimethylsiloxane substrates with tunable elastic modulus to study cell mechanobiology in muscle and nerve” ; PloS one **7**, p. e51499 (2012). 58
- [165] K. L. JOHNSON & K. L. JOHNSON ; *Contact mechanics* (Cambridge university press) (1987). 58, 60
- [166] K. R. ROSHOLM, M. A. BAKER, P. RIDONE, Y. NAKAYAMA, P. R. ROHDE, L. G. CUELLO, L. K. LEE & B. MARTINAC ; “Activation of the mechanosensitive ion channel MscL by mechanical stimulation of supported Droplet-Hydrogel bilayers” ; Scientific reports **7**, p. 45180 (2017). 71
- [167] B. J. LANE & C. PLIOTAS ; “Approaches for the modulation of mechanosensitive MscL channel pores” ; Frontiers in Chemistry **11** (2023). 71
- [168] B. MARTINAC, M. BUECHNER, A. H. DELCOUR, J. ADLER & C. KUNG ; “Pressure-sensitive ion channel in Escherichia coli.” Proceedings of the National Academy of Sciences **84**, pp. 2297–2301 (1987). 71
- [169] G. CHANG, R. H. SPENCER, A. T. LEE, M. T. BARCLAY & D. C. REES ; “Structure of the MscL homolog from Mycobacterium tuberculosis : a gated mechanosensitive ion channel” ; Science **282**, pp. 2220–2226 (1998). 71
- [170] J. WANG & P. BLOUNT ; “Feeling the tension : the bacterial mechanosensitive channel of large conductance as a model system and drug target” ; Current Opinion in Physiology **31**, p. 100627 (2023). 71
- [171] T. NOMURA, C. G. CRANFIELD, E. DEPLAZES, D. M. OWEN, A. MACMILLAN, A. R. BATTLE, M. CONSTANTINE, M. SOKABE & B. MARTINAC ; “Differential effects of lipids and lyso-lipids on the mechanosensitivity of the mechanosensitive channels MscL and MscS” ; Proceedings of the National Academy of Sciences **109**, pp. 8770–8775 (2012). 72
- [172] J. HEUREAUX, D. CHEN, V. L. MURRAY, C. X. DENG & A. P. LIU ; “Activation of a bacterial mechanosensitive channel in mammalian cells by cytoskeletal stress” ; Cellular and molecular bioengineering **7**, pp. 307–319 (2014). 72
- [173] L. M. LEE & A. P. LIU ; “A microfluidic pipette array for mechanophenotyping of cancer cells and mechanical gating of mechanosensitive channels” ; Lab on a Chip **15**, pp. 264–273 (2015). 72
- [174] G. DEBRET ; *Etude par modélisation moléculaire des propriétés mécaniques d’un système membranaire : le canal mécanosensible MscL au sein de bicouches lipidiques modèles* ; Ph.D. thesis ; Université Paris-Diderot-Paris VII (2007). 73
- [175] S. I. SUKHAREV, W. J. SIGURDSON, C. KUNG & F. SACHS ; “Energetic and spatial parameters for gating of the bacterial large conductance mechanosensitive channel, MscL” ; The Journal of general physiology **113**, pp. 525–540 (1999). 72
- [176] C.-S. CHIANG, A. ANISHKIN & S. SUKHAREV ; “Gating of the large mechanosensitive channel in situ : estimation of the spatial scale of the transition from channel population responses” ; Biophysical journal **86**, pp. 2846–2861 (2004). 72

- [177] D. GARENNE, S. THOMPSON, A. BRISSON, A. KHAKIMZHAN & V. NOIREAUX; “The all-E. coliTXTL toolbox 3.0 : new capabilities of a cell-free synthetic biology platform”; *Synthetic Biology* **6**, p. ysab017 (2021). 73
- [178] E. KARZBRUN, J. SHIN, R. H. BAR-ZIV & V. NOIREAUX; “Coarse-grained dynamics of protein synthesis in a cell-free system”; *Physical review letters* **106**, p. 048104 (2011). 74
- [179] U. VOGEL, M. SØRENSEN, S. PEDERSEN, K. F. JENSEN & M. KILSTRUP; “Decreasing transcription elongation rate in Escherichia coli exposed to amino acid starvation”; *Molecular microbiology* **6**, pp. 2191–2200 (1992). 74
- [180] . 78
- [181] M. L. JACOBS, M. A. BOYD & N. P. KAMAT; “Diblock copolymers enhance folding of a mechanosensitive membrane protein during cell-free expression”; *Proceedings of the national academy of sciences* **116**, pp. 4031–4036 (2019). 77, 78
- [182] Y. KURUMA & T. UEDA; “The PURE system for the cell-free synthesis of membrane proteins”; *Nature protocols* **10**, pp. 1328–1344 (2015). 77, 79
- [183] R. IMAMURA, N. MURATA, T. SHIMANOUCI, K. YAMASHITA, M. FUKUZAWA & M. NODA; “A label-free fluorescent array sensor utilizing liposome encapsulating calcein for discriminating target proteins by principal component analysis”; *Sensors* **17**, p. 1630 (2017). 79, 80
- [184] A. M. POWL, J. M. EAST & A. G. LEE; “Anionic phospholipids affect the rate and extent of flux through the mechanosensitive channel of large conductance MscL”; *Biochemistry* **47**, pp. 4317–4328 (2008). 79
- [185] L.-M. YANG, R. WRAY, J. PARKER, D. WILSON, R. S. DURAN & P. BLOUNT; “Three routes to modulate the pore size of the MscL channel/nanovalve”; *ACS nano* **6**, pp. 1134–1141 (2012). 79
- [186] J. W. HINDLEY, D. G. ZHELEVA, Y. ELANI, K. CHARALAMBOUS, L. M. BARTER, P. J. BOOTH, C. L. BEVAN, R. V. LAW & O. CES; “Building a synthetic mechanosensitive signaling pathway in compartmentalized artificial cells”; *Proceedings of the National Academy of Sciences* **116**, pp. 16711–16716 (2019). 79
- [187] H. M. BARRIGA, P. BOOTH, S. HAYLOCK, R. BAZIN, R. H. TEMPLER & O. CES; “Droplet interface bilayer reconstitution and activity measurement of the mechanosensitive channel of large conductance from Escherichia coli”; *Journal of the Royal Society Interface* **11**, p. 20140404 (2014). 80
- [188] E. LOISEAU; *Approche biomimétique de la vaso-occlusion dans la drépanocytose : production de vésicules et microfluidique*; Ph.D. thesis; Université Montpellier II-Sciences et Techniques du Languedoc (2011). 80
- [189] J. GARAMELLA, S. MAJUMDER, A. P. LIU & V. NOIREAUX; “An adaptive synthetic cell based on mechanosensing, biosensing, and inducible gene circuits”; *ACS Synthetic Biology* **8**, pp. 1913–1920 (2019). 85
- [190] V. HAGEL, T. HARASZTI & H. BOEHM; “Diffusion and interaction in PEG-DA hydrogels”; *Biointerphases* **8** (2013). 85