Thèse présentée pour obtenir le grade de
Docteur de l'Université Louis Pasteur
Strasbourg I

Discipline : physique

# Etalement de vésicules bioadhésives sur des tapis d'ADN

Présentée par

Marie-Laure Hisette

Soutenue publiquement le 21 septembre 2007

Membres du jury :

| | |
|---|---|
| *Directeur de thèse* : | **M. Carlos Marques** |
| | Directeur de recherches, ICS, Strasbourg |
| *Rapporteur interne* : | **M. Stefan Haacke** |
| | Professeur ULP, IPCMS, Strasbourg |
| *Rapporteur externe* : | **M. Pierre Nassoy** |
| | Chargé de recherches, HDR, Institut Curie, Paris |
| *Rapporteur externe* : | **M. Thomas Duke** |
| | Professeur, Cavendish Laboratory, Cambridge |
| *Examinateur :* | **Mme Rumiana Dimova** |
| | Directrice de recherches, MPI, Gölm-Potsdam |
| *Membre-invité :* | **M. André Schröder** |
| | Chargé de recherches, ICS, Strasbourg |

# Sommaire

**AVANT-PROPOS** ..... **6**

**INTRODUCTION** ..... **8**

**1 MEMBRANES CELLULAIRES ET MEMBRANES MODELES** ..... **9**

1.1 Composition des membranes cellulaires ..... 9

1.2 Les membranes modèles ..... 12

1.3 Méthodes de fabrication de vésicules ..... 14

1.4 Domaines d'application industrielle ..... 15

1.4.1 Applications cosmétiques ..... 15

1.4.2 Applications pharmaceutiques ..... 15

1.5 Propriétés mécaniques des membranes ..... 16

1.6 Adhésion de membranes ..... 21

1.6.1 Les mécanismes de l'adhésion cellulaire ..... 21

1.6.2 Adhésion de vésicules ..... 26

**2 L'ADN, UN POLYMERE MODELE POUR LES PHYSICIENS** ..... **31**

2.1 Structure de la molécule d'ADN ..... 31

2.2 Greffage d'un polymère sur une surface ..... 33

2.3 Confinement d'un polymère entre deux surfaces ..... 36

2.4 Techniques d'étirement de molécules d'ADN ..... 37

2.4.1 Peignage moléculaire, étirement par rotation et soufflage d'air ..... 37

2.4.2 Molécules d'ADN dans des écoulements ..... 38

**3 INTERACTION POLYMERE-MEMBRANE : DEFORMATION D'UNE MEMBRANE PAR UN POLYMERE GREFFE SUR UNE PAROI** ..... **44**

3.1 Description du système ..... 44

3.2 Les différents régimes de confinement pour le polymère ..... 45

**MATERIEL ET TECHNIQUES EXPERIMENTALES** ..... **48**

**1 LES MATERIAUX UTILISES** ..... **49**

1.1 La colle moléculaire ..... 49

1.2 Les molécules d'ADN "collantes" ... 50
1.3 Les vésicules adhésives ... 51

**2 PROTOCOLES EXPERIMENTAUX ... 53**
2.1 Préparation des vésicules par électroformation ... 53
2.1.1 Sensibilité des vésicules à la pression osmotique ... 53
2.1.2 Méthode de fabrication ... 54
2.2 Fonctionnalisation de surfaces de verre avec de la streptavidine ... 55
2.2.1 Solutions tampon ... 55
2.2.2 Préparation de surfaces silanisées ... 55
2.2.3 Fonctionnalisation avec la streptavidine ... 56
2.3 Préparation et greffage de molécules d'ADN ... 56
2.3.1 Préparation de l'ADN ... 57
2.3.2 Purification de l'ADN ... 57
2.3.3 Greffage d'ADN sur une surface streptavidinée ... 59

**3 TECHNIQUES D'OBSERVATION ... 59**
3.1 RICM ... 59
3.1.1 Principe de fonctionnement ... 59
3.1.2 Méthodes d'analyses de données ... 63
3.2 Microscopie de fluorescence ... 66
3.2.1 La fluorescence ... 66
3.2.2 Principe de fonctionnement ... 67
3.2.3 Méthode d'analyse des données ... 69
3.3 Système RICM-fluorescence simultanés ... 71

**ÉTIREMENT DE MOLECULES D'ADN INDUIT PAR L'ETALEMENT DE VESICULES PHOSPHOLIPIDIQUES ... 74**

**1 CONFIGURATION APRES ETALEMENT ... 76**
1.1 Distribution spatiale et orientation des molécules d'ADN ... 79
1.2 Degré de repliement ... 84

**2 DYNAMIQUE D'ETALEMENT ET D'ETIREMENT ... 86**

**3 CONCLUSION ... 94**

**ANNEXE ... 95**
L'écoulement de Poiseuille à une dimension ... 95
Ecoulement entre deux surfaces planes : le marteau de Poiseuille ... 96
Sphère approchant d'une surface plane ... 97

**DEFORMATION D'UNE MEMBRANE DE PHOSPHOLIPIDES PAR UNE MOLECULE D'ADN UNIQUE ..... 99**

**1 DESCRIPTION DU SYSTEME ..... 101**

1.1 Rappel de la configuration expérimentale ..... 101

1.2 Techniques et méthodes utilisées ..... 101

**2 RESULTATS EXPERIMENTAUX ..... 102**

2.1 Déformation de la paroi de vésicules géantes par des molécules d'ADN ..... 102

2.2 Analyse des bulles ..... 105

2.3 Les fluctuations des molécules d'ADN ..... 110

**3 CONCLUSION ..... 111**

**CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES ..... 118**

# Avant-propos

L'auto-assemblage de phospholipides en solution conduit à de nombreuses structures : lamellaires, cylindriques, sphériques ... Parmi les assemblages planaires, les vésicules présentent un intérêt particulier. En effet, ces capsules constituent non seulement des systèmes modèle simples des parois cellulaires, mais elles possèdent aussi de nombreux domaines d'applications en pharmacologie, en cosmétique ou encore dans l'industrie alimentaire.

Pour le physicien ou le physico chimiste travaillant sur des systèmes mous d'intérêt biologique, les vésicules de phospholipides s'imposent comme le système de choix lorsqu'il s'agit de comprendre certains mécanismes cellulaires comme l'adhésion. L'adhésion cellulaire est un phénomène complexe, d'une importance majeure pour la cellule, quelle que soit sa nature. Elle est en effet impliquée dans la plupart de ses activités : prolifération, migration, différenciation, … Par ailleurs, l'optimisation des cultures cellulaires ou le contrôle des interactions entre implants et tissus requiert la maîtrise de l'étalement de cellules sur des matériaux biocompatibles.

Les mécanismes physiques mis en jeu au cours de l'adhésion d'une paroi cellulaire sur un substrat bio-fonctionnalisé ont fait l'objet d'études récentes, mais ne sont pas encore bien compris. En particulier, les surfaces de nature biologique possèdent souvent de nombreuses espèces macromoléculaires qui peuvent jouer un rôle promoteur ou au contraire de prévention de l'adhésion. Nous avons choisi d'étudier plus particulièrement l'adhésion de vésicules géantes de phospholipides sur des surfaces fonctionnalisées, comportant une faible densité de molécules d'ADN greffées. La taille importante des vésicules géantes, jusqu`à 100 $\mu$m, permet le suivi direct des événements adhésifs par les différentes techniques de microscopie optique. L'intercalation de molécules fluorescentes dans le double brin de l'ADN permet de les visualiser également sous microscope. Nous observons et quantifions les déformations des membranes et des molécules d'ADN lors de leurs interactions pendant l'adhésion.

Notre étude présente à la fois un intérêt fondamental et pratique. En effet, les déformations induites par un polymère sur une membrane autoassemblée n'ont jamais été expérimentalement mises en évidence, malgré les très nombreux travaux théoriques consacrés au sujet. Par ailleurs la compréhension des mécanismes de contact intime entre l'ADN et les membranes de phospholipides présente un intérêt certain pour la transfection.

Le premier chapitre de ce manuscrit fait le point sur l'état de l'art dans le domaine. Nous y présentons les différents systèmes d'intérêt pour notre travail : les membranes et leurs mécanismes d'adhésion, les molécules d'ADN greffées, leur comportement en situation

de confinement ou sous écoulement. Enfin, nous rappelons quelques éléments théoriques de l'interaction entre un polymère et une membrane.

Après cette introduction, nous décrirons dans un second chapitre les techniques de microscopie par contraste interférentiel en réflexion et de microscopie de fluorescence. Nous décrirons également un nouveau montage expérimental, jusqu'à présent unique, que nous avons mis en place et qui combine ces deux techniques. Nous expliquerons ensuite les différentes méthodes utilisées pour l'analyse des données.

Le troisième chapitre sera consacré à l'étude du comportement de molécules d'ADN au voisinage d'une membrane en adhésion. Nous verrons que l'étalement de la membrane, ainsi que l'écoulement d'eau qu'elle induit, sont à l'origine d'un étirement radial des molécules d'ADN greffées sous la zone d'adhésion de la vésicule. Nous nous attacherons à comprendre l'origine physique précise de cet étirement.

Le chapitre quatre traitera de la déformation de la membrane induite par la pression exercée par une molécule d’ADN confinée dans la région d’adhésion. Cette pression est suffisante pour induire des déformations mesurables par interférométrie optique. Nous comparerons ces observations expérimentales aux modèles théoriques.

Finalement, dans les conclusions, nous résumerons les résultats les plus marquants de notre travail et discuterons les nouvelles perspectives qu’il ouvre.

# *Chapitre 1*

# *Introduction*

# 1 Membranes cellulaires et membranes modèles

## 1.1 Composition des membranes cellulaires

Les cellules peuvent être vues comme des micro usines entourées d'une membrane dont le rôle est de marquer une frontière entre les constituants de la cellule et son environnement (1). Les membranes cellulaires ont pour éléments de base des lipides (2). Ce sont des tensioactifs, c'est-à-dire des molécules amphiphiles qui possèdent une région hydrophile, ou tête polaire, et une région hydrophobe, ou queue apolaire (3, 4). Les lipides majoritaires dans les membranes cellulaires animales sont les phospholipides. Ils possèdent une tête polaire et deux queues apolaires (figure 1.1), ce qui leur confère un caractère tensioactif (1, 2).

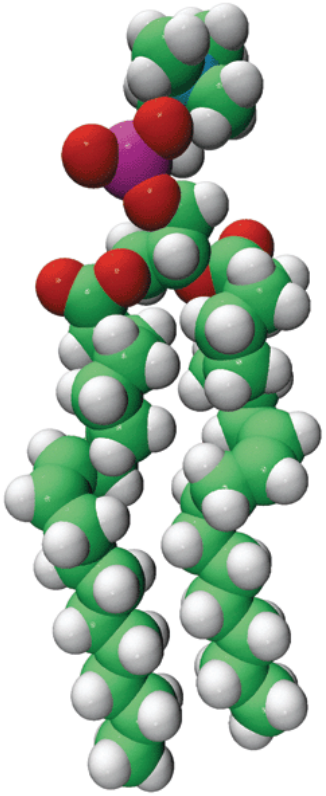


**Figure 1.1 : Structure d'un phospholipide (1,2-Dioleoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphocholine).**

Dans une solution aqueuse en contact avec l'air, les molécules tensioactives se disposent en monocouche à l'interface eau-air, induisant une diminution de la tension de surface. Le phénomène de tensioactivité s'explique en considérant que la partie hydrophobe perturbe le réseau des liaisons-hydrogène de l'eau environnante (5). Des simulations de dynamique moléculaire suggèrent dans ce sens que les molécules d'eau voisines se réarrangent pour former un réseau plus structuré autour de la partie hydrophobe, diminuant ainsi l'entropie du système (6). Le contact entre partie hydrophobe et eau est donc

particulièrement défavorable. A faible concentration, les molécules forment à l'interface eau-air un gaz à deux dimensions. Au-dessus d'une concentration limite, des structures minimisant l'aire de l'interface eau-partie hydrophobe se forment spontanément dans le volume.

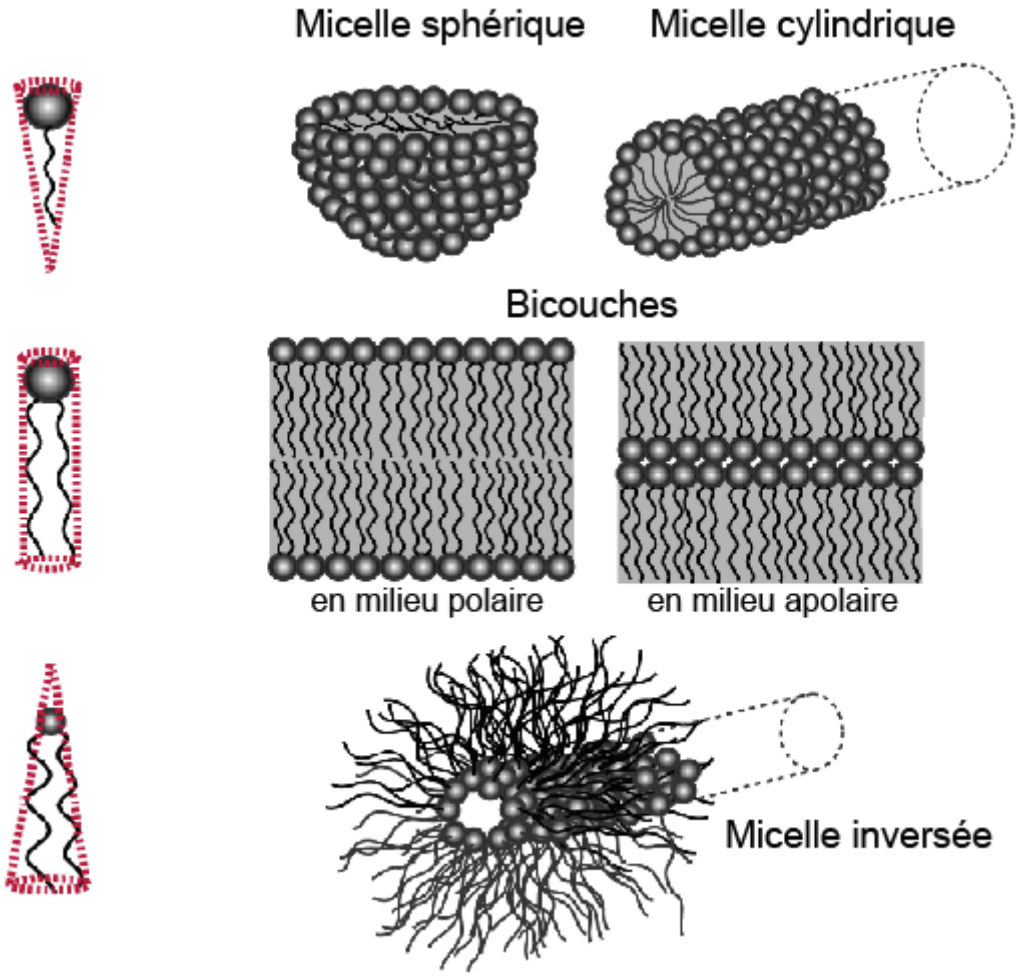



**Figure 1.2 : Assemblage de molécules amphiphiles en présence d'eau**

En volume, il existe trois assemblages de base des molécules amphiphiles : bicouche, micelle sphérique et micelle cylindrique (7). La géométrie de la molécule tensioactive est à l'origine de la préférence pour un type d'assemblage. Lorsque la forme du tensioactif est conique, on obtient des micelles sphériques ou cylindriques, ou encore des micelles inversées, selon que la base du cône est formée par la tête ou la queue apolaire (figure 1.2). Lorsque les molécules sont cylindriques, comme c'est le cas pour les phospholipides, elle s'associent en bicouches (figure 1.3).

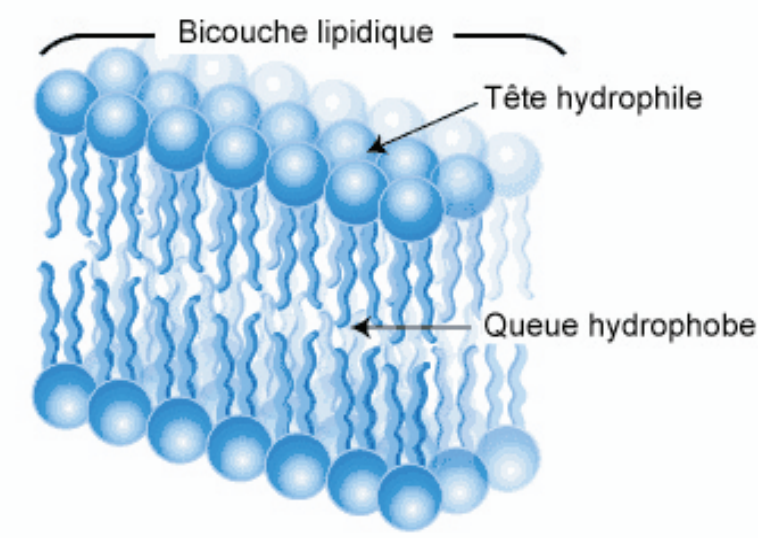



**Figure 1.3 : Bicouche de phospholipides**

Les membranes cellulaires contiennent également des protéines (figure 1.4). Le rôle principal des lipides est structurel, alors que celui des protéines est le plus souvent fonctionnel (1). Ces protéines peuvent être intégrées ou périphériques. Les lipides constituant une membrane cellulaire peuvent s'associer en domaines appelés également "rafts", qui présentent des propriétés physiques particulières, notamment en terme de fluidité, notion importante dont nous reparlerons ultérieurement. Les protéines transmembranaires se répartissent dans ces domaines suivant leur nature chimique.

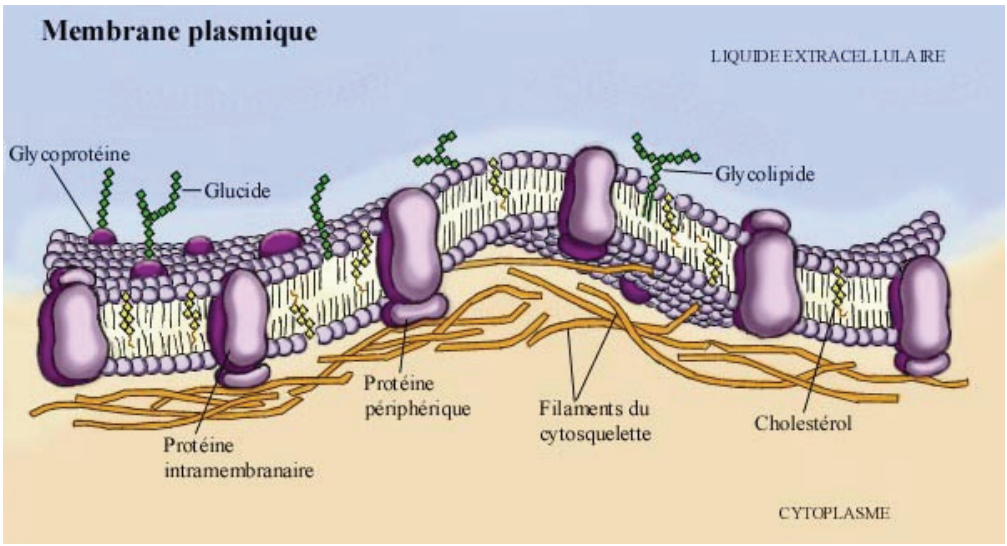



**Figure 1.4 : la membrane cellulaire**

En dehors de la couche protéo-lipidique que nous venons de décrire, qui est le lieu des échanges entre milieu extracellulaire et milieu intracellulaire, deux autres régions sont à noter. La première est le glycocalyx, couche de quelques nanomètres d'épaisseur recouvrant la bicouche protéo-lipidique. Le glycocalyx préserve la membrane de toute adhésion non spécifique aux surfaces biologiques. Nous en reparlerons dans la section 1.6.1, lorsque nous

aborderons les mécanismes de l'adhésion cellulaire. Le cytosquelette constitue la troisième région de la membrane. C'est une structure interne à laquelle est connectée la bicouche. Le cytosquelette maintient la forme de la cellule et lui permet de se déplacer. Contrairement au squelette osseux, c'est une structure dynamique qui se réorganise lorsque la cellule change de forme ou se divise.

## 1.2 Les membranes modèles

Les lipides peuvent être synthétisés en laboratoire ou extraits des membranes cellulaires ; on les utilise pour fabriquer des membranes modèles. Nous avons vu que les phospholipides s'associent naturellement en bicouche à cause de leur forme cylindrique. Les bicouches ont tendance à se refermer sur elles-mêmes pour éviter la présence de bords, trop coûteux en énergie. Ces capsules fermées sont appelés vésicules ou liposomes (figure 1.5). Les molécules d'eau et les petits solutés hydrophiles peuvent diffuser au travers de la bicouche, alors que le passage de macromolécules est plus difficile. Certains solutés hydrophobes peuvent au contraire pénétrer la bicouche et rester piégés en son milieu (2).

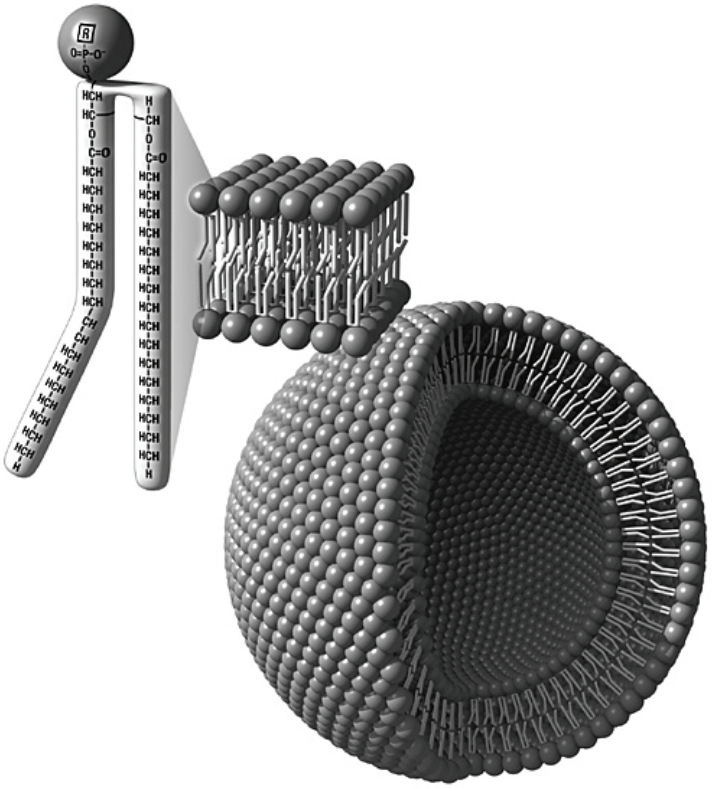


**Figure 1.5 : De gauche à droite : phospholipide, bicouche lipidique et vésicule**

Les propriétés physiques d'une membrane de phospholipides dépendent de la nature des phospholipides qui la composent. Notamment, dans le cas d'une membrane modèle composée d'un seul type de phospholipide, la membrane peut être en phase cristalline, en phase gel, ou en phase fluide. La température est le paramètre qui contrôle les transitions de

phase. Les températures de transition dépendent quant à elles de la structure chimique du phospholipide. En phase cristalline, la bicouche est figée : aucune diffusion dans le plan de la membrane n'est possible. En phase gel et en phase fluide, la diffusion des espèces dans le plan de la membrane est caractérisée par le coefficient de diffusion.

Au-dessus de la température de transition, les lipides sont en phase fluide (coefficient de diffusion : $10^{-11}$-$10^{-12}$ m²/s) (8), en-dessous ils sont en phase gel (coefficient de diffusion cent fois plus faible : $10^{-13}$-$10^{-14}$ m²/s). Dans nos expériences, nous utiliserons essentiellement un phospholipide appelé DOPC (1,2-Dioleoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphocholine), qui est en phase fluide à température ambiante (température de transition : -22°C). Sa structure est représentée sur la figure 1.1.

Les propriétés des membranes comportant plusieurs lipides sont plus complexes ; c'est le cas notamment des membranes cellulaires. Une membrane comportant des lipides présentant des différences importantes de température de transition peut présenter une structuration en domaines, appelés aussi des « rafts », les compositions relatives des phospholipides variant d'un domaine à l'autre. Ces rafts sont soupçonnés de jouer un rôle central dans le fonctionnement des membranes cellulaires, et sont l'objet de recherches actives dans les membranes modèles également (9, 10).

Si les lipides peuvent diffuser librement à l'intérieur d'une monocouche de la membrane cellulaire, ils migrent très rarement d'une monocouche à l'autre (processus appelé flip-flop). Le temps caractéristique d'un tel évènement est de l'ordre de la dizaine d'heures, sauf au voisinage d'une température de transition de phase (11, 12).

Les structures auto-assemblées en solution sont dépourvues de tension de surface, car elles se trouvent à leur minimum d'énergie. Une membrane que l'on imaginerait par la pensée flottant librement en solution aurait donc une tension nulle. Néanmoins, dans les conditions réelles, les membranes des vésicules se referment sur elles-mêmes. Les fluctuations induites par l'agitation thermique déforment la membrane et imposent une tension faible mais mesurable, de l'ordre de $10^{-9}$ à $10^{-6}$ N.m$^{-1}$.

Les liposomes sont très utiles pour étudier les propriétés des membranes, et ainsi progresser dans la compréhension de certains mécanismes cellulaires (13). L'avantage de leur utilisation réside dans la possibilité de moduler les conditions expérimentales pour mettre en évidence l'influence de certains facteurs sur les propriétés membranaires. On peut notamment faire varier la composition lipidique, la température, le pH, introduire des protéines dans la membrane (14-17), …

Il importe cependant de rester vigilant avant d'extrapoler aux membranes biologiques les résultats obtenus avec des vésicules. Ces dernières ne miment pas parfaitement la complexité des structures membranaires. De plus, les membranes biologiques sont entourées par des milieux complexes et différents de part et d'autre, alors que les liposomes

sont généralement dans une solution tampon de contenu ionique déterminé mais homogène. Toutefois, les liposomes constituent de bons modèles pour étudier ce qui se déroule au niveau membranaire lors de différents processus tels que l'adhésion (18, 19).

## 1.3 Méthodes de fabrication de vésicules

Les liposomes sont facilement produits en laboratoire. Leur taille peut être contrôlée par le choix de leur composition chimique et de la méthode de préparation. On les classe en quatre catégories : vésicules multilamellaires, ou MLV, assemblages de lipides en multicouches fermées et séparées entre elles par une couche d'eau, de diamètre allant de 100 nm à quelques micromètres ; petites vésicules unilamellaires (SUV) jusqu'à 200 nm de diamètre ; vésicules unilamellaires de grande taille (LUV), de 200 nm à quelques micromètres et vésicules géantes unilamellaires (GUV), de quelques micromètres à parfois une fraction de millimètre. C'est cette dernière catégorie de vésicules, visibles au microscope optique, qui a fait l'objet de nos recherches.

La méthode la plus simple pour préparer des vésicules consiste à évaporer le solvant organique dans lequel sont dissous les lipides, puis à les remettre en suspension dans un solvant aqueux (13). C'est ainsi qu'ils ont été fabriqués par Bangham, qui le premier en a produit volontairement (20, 21). Cette opération doit se dérouler dans des conditions de température dépendant de la nature du ou des lipides choisis. En effet, les vésicules se forment bien plus aisément lorsque les lipides sont en phase fluide. Dans un milieu aqueux, le film lipidique s'hydrate et les phospholipides s'associent en bicouches, qui se referment en emprisonnant du solvant. Des bicouches peuvent enfermer d'autres bicouches de plus petite taille. Ainsi, lors de cette préparation, des vésicules multilamellaires se constituent en bicouches lipides concentriques séparées les unes des autres par des couches d'eau lorsque les phospholipides sont zwitterioniques. Les phospholipides chargés mènent à des LUV.

Un traitement physique doit être appliqué aux MLV pour les transformer en vésicules de taille homogène, formées d'une seule bicouche lipidique entourant un milieu aqueux. Pour obtenir des vésicules de petite taille (50 nm), on expose une suspension de vésicules multilamellaires aux ultrasons. Pour préparer des vésicules de grande taille (0,1 à 1 µm), on soumet la solution de vésicules multilamellaires à des cycles de congélation/décongélation à l'azote liquide (-196°C) (22), ce qui fragilise la membrane et permet de reconstruire des liposomes unilamellaires. Une méthode plus efficace est l'extrusion (23-25) : une solution de MLV est passée sous pression à de multiples reprises à travers une membrane poreuse, ce qui conduit à la formation de LUV d'une taille proche du diamètre du pore.

Une autre méthode permet de faire pousser par fusion des vésicules géantes à partir d'un film multi-lamellaire : l'électroformation (26-28), par application d'un champ électrique alternatif. Cette technique sera détaillée dans le chapitre 2 "Matériels et méthodes".

## 1.4 Domaines d'application industrielle

### 1.4.1 Applications cosmétiques

De nombreuses substances utilisées en cosmétologie (antioxydants, collagène, etc…) sont en général appliquées localement sous forme d'émulsion huileuse ou de solution alcoolique. L'huile et l'alcool peuvent endommager la peau en cas d'application prolongée. L'encapsulation dans des liposomes permet de contourner ce problème (13, 29, 30). Le produit diffuse passivement et de manière continue au travers des bicouches des liposomes. Ceux-ci peuvent également fusionner avec les cellules de la peau, libérer le principe actif dans la cellule et ainsi augmenter son efficacité.

### 1.4.2 Applications pharmaceutiques

Les vésicules peuvent véhiculer des médicaments dans l'organisme (13). Suivant la nature du médicament, sa localisation au niveau du liposome est différente. Si le médicament est hydrosoluble, il est encapsulé dans le volume intraliposomal. S'il est hydrophobe, il est dissous dans la phase lipidique (31, 32). Enfin, s'il est amphiphile, le composé est localisé au niveau de l'interface tête polaire/queue hydrophobe des phospholipides(31, 33). Dans les trois cas, les liposomes peuvent être injectés dans l'organisme (34). Un progrès récent dans l'utilisation de liposomes pour le traitement de maladies a été rendu possible par la mise au point de liposomes 'furtifs'. Ces liposomes sont entourés d'une barrière protectrice de polymère, en général du polyéthylèneglycol (PEG), qui leur permet de rester invisible vis-à-vis du système immunitaire. Ils peuvent ainsi circuler plusieurs jours dans l'organisme, et atteindre les zones à traiter.

Une fois injectés dans l'organisme, les liposomes peuvent fusionner avec les membranes cellulaires ou être endocytés (35). L'endocytose a lieu quand une partie de la membrane entoure complètement une particule ou une grosse molécule et la fait pénétrer de l'extérieur vers l'intérieur d'une cellule. Le principe actif est alors délivré dans la cellule. La firme Theralipids Inc. a créé, en 1996, un liposome pouvant fusionner avec les parois bactériennes. Ces liposomes, qui peuvent être administrés directement par inhalation, favorisent de façon marquée la pénétration de l'agent antimicrobien dans les organismes et améliorent l'efficacité de celui-ci en prolongeant sa durée de vie.

La substance active peut aussi être libérée lentement et de manière continue par la vésicule sans qu'il y ait pénétration des liposomes dans les cellules. Ainsi, la morphine, composé amphiphile, peut être encapsulée dans des liposomes multilamellaires (31).

## 1.5 Propriétés mécaniques des membranes

Les liposomes sont des systèmes physico-chimiques du domaine colloïdal, leur taille étant comprise entre quelques nanomètres et plusieurs dizaines de micromètres. Par conséquent, les forces d'agitation thermique jouent un grand rôle dans la diffusion et la dispersion de ces objets, ainsi que dans la détermination de leur forme. C'est donc en physique et en physico-chimie que l'on retrouve les études du comportement de bicouches fluides en solution. Cette discipline, la "physique des membranes", constitue un domaine de recherches très actif, particulièrement en ce qui concerne le comportement dynamique des membranes. Ces recherches s'articulent autour de l'objet "membrane", caractérisé par certaines propriétés élastiques, à partir desquelles il s'agit de prédire et de caractériser le comportement individuel et collectif des objets et structures formés par les bicouches auto-assemblées. Notons que ces objets peuvent aussi être décorés par d'autres espèces tensioactives ou macromoléculaires.

Les questions posées sur les membranes en physique ont aussi trouvé un écho important en mathématiques, où la géométrie différentielle ou la topologie d'objets bidimensionnels possédant une élasticité de courbure constituent des domaines importants de recherche. Remarquons aussi que la nature colloïdale des vésicules en fait des systèmes modèles pour étudier entre autres les problèmes physico-chimiques d'agrégation de particules, de sédimentation, de mesure de forces électrostatiques ou de dispersion. Nous allons dans un premier temps donner quelques éléments de description mécanique locale des membranes. Dans un second temps, nous montrerons que ces notions permettent de déterminer les formes d'équilibres de vésicules.

Une bicouche lipidique, de quelques nanomètres d'épaisseur, est très fine à l'échelle d'une vésicule géante, et même d'une SUV. Il est donc possible de modéliser une membrane lipidique par une surface sans épaisseur. Dans l'espace usuel à trois dimensions, un plan est un objet de courbure nulle, et une sphère un objet de courbure constante. Une « selle de cheval » possède au contraire des courbures positives et négatives. La déformation des surfaces conduit à des valeurs de la courbure dépendantes de la position sur la surface. En chaque point $M$ de la surface, on considère un plan, perpendiculaire en $M$ au plan tangent à la surface (figure 1.6). L'intersection de ce plan avec la surface forme une courbe, à laquelle est associée une courbure $\rho$, au point M dans la direction du plan :

$\rho = 1/R$ avec $R$ le rayon de courbure. Si on fait tourner ce plan autour de la normale, on obtient une infinité de courbes et donc de courbures au point M, associées à chaque direction du plan.

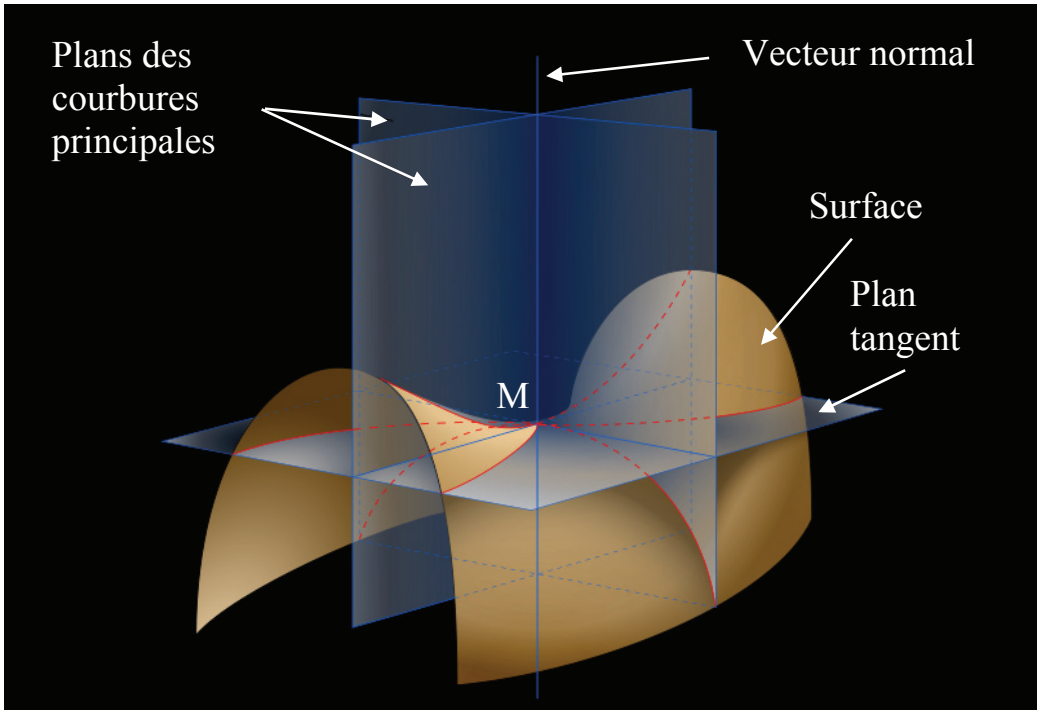



**Figure 1.6 : Selle de cheval**

Lors d'un tour complet autour de la normale, on trouve une courbure minimale et une courbure maximale. Ces valeurs sont appelées les courbures principales $\rho_1$ et $\rho_2$. En général, elles sont différentes et, dans ce cas, les plans correspondant aux deux courbures principales sont perpendiculaires entre eux. A partir des courbures principales, on peut calculer la courbure moyenne $H = 1/2(\rho_1 + \rho_2)$ et la courbure gaussienne $K = \rho_1 \rho_2$.

L'énergie de courbure d'une surface peut s'écrire, à l'ordre quadratique des courbures, comme :

$$F_{courb} = \frac{\kappa}{2}\int (2H - 2H_0)^2 + \bar{\kappa}\int K dS \qquad (1.1)$$

où $\kappa$ et $\bar{\kappa}$ sont respectivement le module de rigidité de courbure et le module de courbure gaussienne. $H_0$ est la courbure moyenne spontanée, normalement absente des membranes symétriques. Cette forme est connue sous le nom d'énergie de Canham-Helfrich.

Pour les déformations à topologie constante, le théorème de Gauss-Bonnet assure que $\int KdS$ reste inchangé. Par ailleurs, dans la limite des faibles déformations de la surface

*h(x,y)*, la courbure moyenne s'écrit *2H* = Δ*h(x,y)*, où Δ est l'opérateur laplacien. L'énergie de courbure s'écrit donc dans le cas des petites déformations à topologie constante :

$$F_{courb} = \frac{\kappa}{2}\int \left(\Delta h(x,y)\right)^2 dS \qquad (1.2)$$

En réalité, on trouve une grande variété de formes et de topologies dans les systèmes membranaires. La vésicule peut prendre des formes assez éloignées de la forme sphérique. D'autres objets fermés peuvent aussi être observés : tores, bretzels, et bien d'autres. Souvent aussi, plusieurs objets séparés par une distance plus ou moins importante sont connectés entre eux par de minces "fils", des cylindres de membranes établissant un passage par exemple entre deux vésicules. En outre, de nombreux paramètres extérieurs peuvent être responsables d'une modification de la forme des vésicules :

- des modifications de température, de pression, des phénomènes d'adhésion, ou la réponse à une contrainte mécanique ;

- la présence d'un champ électrique ;

- une réaction chimique entre les lipides membranaires et une substance active peut induire une déstabilisation locale de la membrane, et éventuellement des modifications dans ses propriétés mécaniques ; souvent, il y a formation de différents domaines plus ou moins étendus dans lesquels l'organisation de la bicouche est totalement changée. Ceci est courant dans de nombreux phénomènes biologiques comme les réactions enzymatiques, l'endocytose, ou encore lors de la réunion de couples ligand-récepteur à la surface d'une membrane cellulaire ;

- enfin, la modification locale de la composition chimique de la membrane, et donc, de sa courbure, induit des changements spectaculaires de forme. Par exemple, la transformation d'une vésicule en un chapelet de petites vésicules reliées entre elles, transformation dite de *pearling* (36), illustrée sur la figure 1.7.

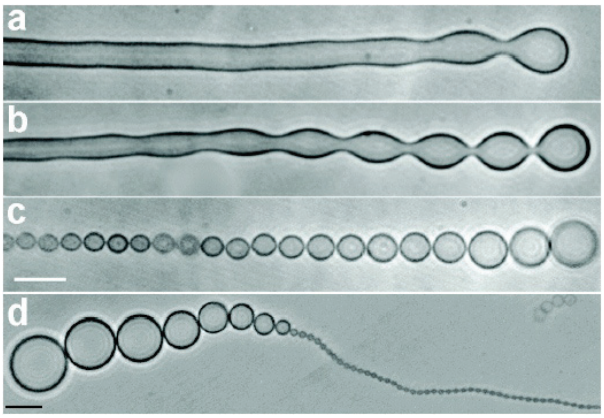



**Figure 1.7 : Images de vésicules multilamellaires de SOPC en forme de perles : instants après le début du processus de pearling : a) 0s, b) 70s, c)150s, d) état d'équilibre après 900s (barre=20microns).**

La dernière décennie a assisté au développement des premiers travaux théoriques cherchant à classer et à expliquer les formes observables et les facteurs gouvernant les transitions entre les différentes formes. Tous les modèles impliquent d'une façon ou d'une autre l'énergie de courbure d'Helfrich. Le modèle le plus simple concerne les formes observées pour des membranes parfaitement symétriques. L'énergie d'Helfrich est minimisée sous la contrainte de la conservation de la surface et du volume de la membrane. Le seul paramètre de contrôle est alors le rapport v entre le volume imposé V et le volume sphérique $4/3\pi R^3$ qu'occuperait la surface disponible. En pratique, le nombre de phospholipides dans la bicouche ne varie pas au cours d'une expérience, et le volume est fixé par les conditions d'équilibre osmotique entre l'intérieur et l'extérieur de la vésicule. On observe alors une série de formes illustrées sur la figure 1.8.

Pour v = 1, la forme optimale est sphérique. En imposant des volumes relatifs v de plus en plus petits, on passe de formes prolates aux formes oblates, puis à des formes réentrantes dites stomatocytes. En pratique, les fréquences d'échange entre les deux monocouches sont très petites, et une vésicule peut garder une asymétrie induite par le processus de formation.

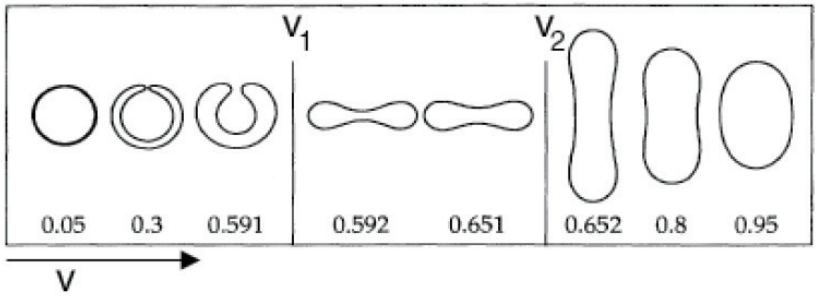



**Figure 1.8 : Formes possibles des membranes pour c0=0 et pour différentes valeurs de v ; v1 et v2 correspondent respectivement à la transition prolate-oblate et oblate-discocyte.**

Plusieurs modèles permettent alors de rendre compte de cette asymétrie. S'il existe une courbure spontanée $\rho_0$, on analyse l'énergie d'Helfrich avec $\rho_0 \neq 0$, sous les mêmes contraintes de conservation d'aire et de volume. On a ici un deuxième paramètre de contrôle qui est le rapport de la courbure spontanée à la courbure qu'aurait une sphère d'aire $4\pi R_0^2$ : $c_0 = 2\rho_0 / R_0$. Les figures 1.9 et 1.10 illustrent les formes prédites pour différentes courbures réduites en fonction du volume relatif *v*. On voit par exemple apparaître des formes en poire qui n'étaient pas dans le diagramme à $c_0 = 0$ (figure 1.8).

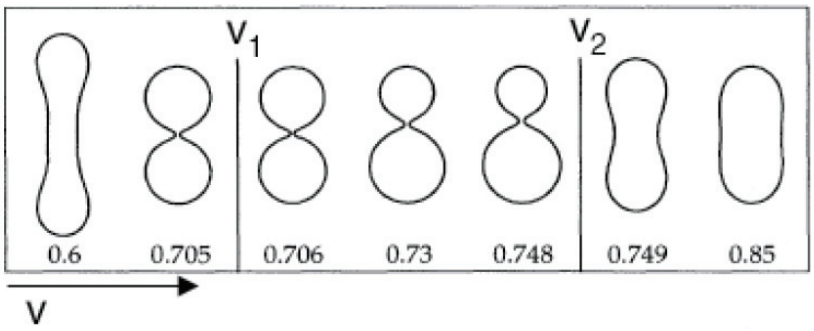



**Figure 1.9 : Formes possibles des membranes pour c0=2.4 et pour différentes valeurs de v ; les transitions v1 et v2 correspondent respectivement à une transition discontinue et continue.**

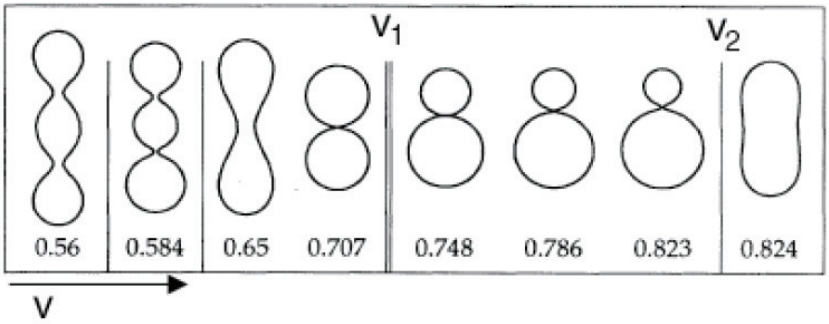



**Figure 1.10 : Formes possibles des membranes pour c0=3 et pour différentes valeurs de v ; la forme correspondant à v=0,584 est asymétrique.**

Les descriptions précédentes supposent une distribution homogène des phospholipides dans la vésicule. Dans de nombreux cas, on peut avoir à faire à des inhomogénéités : mélanges de phospholipides, régions avec des phospholipides agrégés (radeaux), inclusions membranaires, polymères greffés, etc. Ces conditions peuvent conduire à des effets surprenants : le *pearling*, déjà présenté sur la figure 1.7, ou encore l'enroulement de membranes tubulaires lors de l'addition de polymères (37) (figure 1.11).

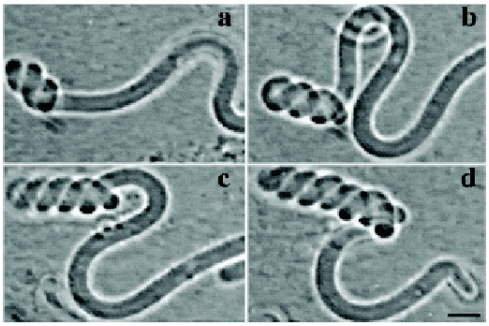



**Figure 1.11 : Membrane tubulaire de SOPC : images d'un enroulement en double hélice ; a) début de l'enroulement, b) au bout de 20mn, c) au bout de 30mn, d) au bout de 40 mn (barre=40µm).**

## 1.6 Adhésion de membranes

L'adhésion de membranes concerne l'interaction entre une membrane et une surface, qui peut être un substrat rigide, une autre membrane, ou dans le cas des cellules, une autre surface biologique complexe, comportant de multiples espèces chimiques.

### 1.6.1 Les mécanismes de l'adhésion cellulaire

L'adhésion cellulaire est un processus hors-équilibre contrôlé par la balance entre différents types d'interactions (38). Elles peuvent être classées en interactions spécifiques ou non spécifiques et être à courte ou à longue-portée.

- Les interactions non spécifiques

Il existe trois types d'interactions non spécifiques qui interviennent dans l'adhésion cellulaire. La première est l'interaction de van der Waals. Elle est de nature attractive et à longue-portée. Il s'agit de forces d'origine électromagnétique pouvant être séparées en trois types de contributions :

- Les forces de Keesom ou effets d'orientation. Elles apparaissent entre des molécules polaires (ou entre des segments de molécules) que l'on appelle dipôles permanents. Elles dépendent de l'orientation relative des dipôles impliqués.
- Les forces de Debye ou effets d'induction. Il s'agit de forces entre une espèce avec un dipôle permanent et une autre avec un nuage électronique polarisable. Le champ électrique du dipôle permanent polarise le nuage électronique de l'autre molécule, induisant un dipôle. Il en résulte une attraction entre le dipôle permanent et le dipôle induit.
  - Les forces de London ou effets de dispersion. La densité électronique des molécules est probabiliste : il y a une forte

chance à tout moment pour que celle-ci ne soit pas équitablement répartie à travers la molécule, ce qui crée un léger moment dipolaire. Ces moments varient très rapidement au cours du temps. Ainsi chaque moment dipolaire peut interagir avec celui de la molécule voisine.

Les forces de London sont les plus fréquentes. En général, il s'agit de forces attractives. En effet, l'énergie d'interaction entre deux molécules séparées par une distance *r* est de la forme :

$$U(r) = -\frac{A_{12}}{\pi^2 \rho_1 \rho_2} \frac{1}{r^6} \tag{1.3}$$

où A12 est la constante de Hamaker et $\rho_1$ et $\rho_2$ sont les densités des molécules 1 et 2. Le signe de la constante de Hamaker est relié au signe du produit $(\varepsilon_1 - \varepsilon_m)(\varepsilon_2 - \varepsilon_m)$ où $\varepsilon_1$ et $\varepsilon_2$ sont les polarisabilités des molécules 1 et 2 et $\varepsilon_m$ est la constante diélectrique du milieu. Cette expression est toujours positive, sauf lorsque $\varepsilon_m$ est comprise entre $\varepsilon_1$ et $\varepsilon_2$. C'est pourquoi l'énergie U est généralement négative et que cette interaction est le plus souvent attractive.

La stratégie pour calculer l'interaction de van der Waals entre deux corps macroscopiques consiste à additionner toutes les combinaisons d'attractions intermoléculaires entre les deux corps. Ceci a été fait par Hamaker pour différentes géométries. Nous ne considérons ici que le cas de blocs de matériaux avec une surface plane. Nous présentons le résultat de deux situations : l'interaction entre deux blocs semi-infinis et celle entre un bloc semi-infini et un film mince.

L'énergie potentielle d'interaction par unité de surface V entre deux surfaces d'aire A, séparées par une distance d (figure 1.12) vaut :

$$V = -\frac{A}{12\pi d^2} \tag{1.4}$$

où A est la constante de Hamaker.

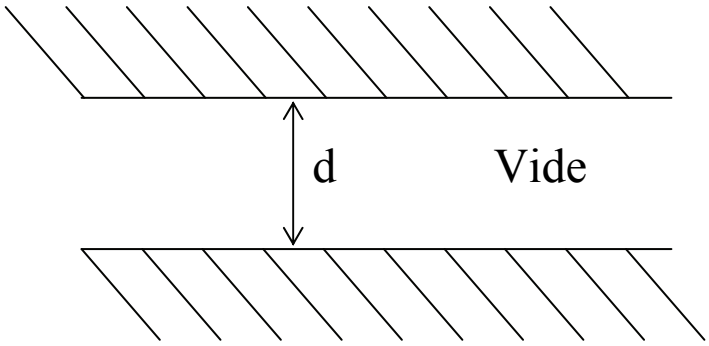



**Figure 1.12 : Interactions de Van der Waals entre deux blocs semi-infinis séparés par une longueur d.**

Lorsque l'on remplace un des blocs par un film d'épaisseur finie (figure 1.13), l'énergie potentielle d'interaction devient :

$$U = -\frac{l^2 A}{12\pi}\left(\frac{1}{h^2} - \frac{1}{(h+d)^2}\right) \tag{1.5}$$

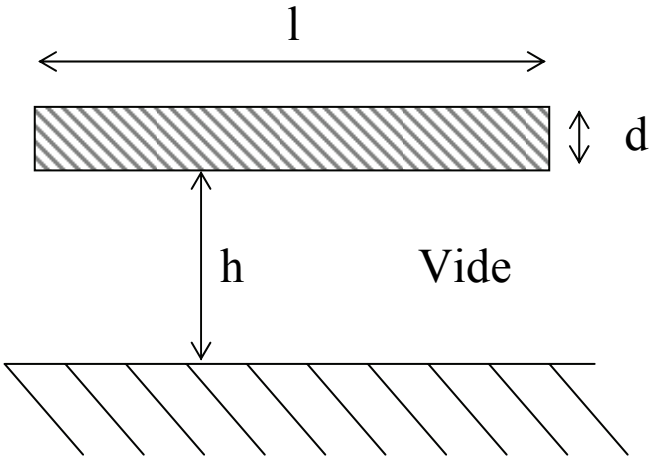



**Figure 1.13 : Interactions entre un bloc semi-infini et un film d'épaisseur d et de longueur l séparés par une longueur h.**

Si les interactions de van der Waals étaient les seules à exister, les cellules adhèreraient fortement les unes aux autres et à la plupart des surfaces, sans aucune sélectivité. Or l'adhésion est un mécanisme qui intervient dans de nombreux processus biologiques vitaux comme celui de l'action du système immunitaire (adhésion de globules blancs sur les tissus atteints par une inflammation), ou la formation des tissus (adhésion des cellules entre elles, cicatrisation...) et qui doit pouvoir être parfaitement contrôlé. Les cellules ont donc besoin de disposer de mécanismes efficaces d'anti-adhésion pour s'attacher de manière sélective.

La quasi-totalité des cellules est recouverte d'une couche de macromolécules chargées négativement appelée le glycocalyx (1, 38). Le glycocalyx constitue une barrière à l'adhésion via deux types d'interactions répulsives : l'interaction stérique (due au recouvrement des nuages électroniques lorsque les molécules s'approchent trop, qui nécessite un réarrangement de la conformation des molécules à cause de la répulsion de Pauli) et l'interaction de Coulomb, c'est-à dire la répulsion entre espèces de même charge électrique. La somme de ces trois types d'interaction est fortement répulsive.

- Les interactions spécifiques

L'adhésion cellulaire est essentiellement gouvernée par les interactions moléculaires spécifiques, qui sont mises en œuvre lorsque la membrane cellulaire est le siège d'une balance entre interactions non spécifiques attractives et répulsives. L'énergie de liaison de

ces interactions spécifiques est de l'ordre de 20 kJ/mol. De nombreuses molécules impliquées dans l'adhésion spécifique peuvent être classées en un petit nombre de familles (39). Ces familles sont :

- Les immunoglobulines (40), qui comprennent une centaines d'éléments. L'interaction peut être homotypique, c'est-à-dire que la molécule est son propre récepteur, mais elle est le plus souvent hétérotypique (ligand et récepteur sont différents). La régulation des éléments de cette famille est souvent liée à leur expression. C'est-à-dire que les molécules présentes sur la membrane sont généralement fonctionnelles, mais que leur densité peut varier de manière considérable.
- Les intégrines comportent une trentaine d'éléments (41). L'activité de ces molécules peut être modulée par des modifications de leur conformation ainsi que par des altérations de leur association à leur environnement (par exemple au cytosquelette).
- Les sélectines. Cette famille, récemment individualisée (42), ne comprend que trois éléments connus. La régulation de l'activité des sélectines repose essentiellement sur celle de leur expression.
- Les mucines. Elles peuvent exercer un double rôle (43). D'une part, elles peuvent jouer un rôle antiadhésif du fait de leur forte charge négative. D'autre part, du fait de leur grande taille, elles peuvent émerger de la matrice péricellulaire, ou glycocalyx, ce qui les rend particulièrement aptes à induire une adhésion lorsqu'elles rencontrent un ligand spécifique.
- Les cadhérines, dont il existe plusieurs dizaines d'espèces. L'interaction est généralement homotypique. Les cadhérines sont impliquées dans la cohésion de nombreux tissus (44).

L'adhésion cellulaire peut être décomposée en trois étapes principales : l'approche des surfaces, la formation de la première liaison intercellulaire et la consolidation de l'adhésion.

- Approche des deux surfaces

La première étape de l'adhésion est constituée par l'approche de deux surfaces biologiques à une distance compatible avec la formation de liaisons (39). Ce processus est, en règle générale, gêné par des interactions répulsives résultant de la présence du glycocalyx. Ce premier contact peut résulter de différents phénomènes. Une cellule peut par

exemple être dirigée passivement vers une surface par un écoulement hydrodynamique (cas des leucocytes). Les contacts peuvent aussi être dus au déplacement ou à la déformation d'une cellule fixée sur une surface.

La formation de liaisons ligands-récepteurs d'une longueur inférieure à la somme des épaisseurs des matrices péricellulaires nécessite une réorganisation du glycocalyx, comprenant éventuellement la diffusion des molécules répulsives hors de la zone de contact, et un réarrangement des molécules ne subissant pas ce déplacement.

- Formation de la première liaison intercellulaire

Si une première liaison se crée, deux possibilités se forment : soit la liaison est rompue avant d'être renforcée par des interactions supplémentaires, soit une seconde liaison est créée. Dans le premier cas, les surfaces pourront se séparer, du fait de forces extérieures, d'agitation brownienne, d'interactions répulsives…Dans le second cas, la durée de vie de l'attachement membranaire se trouvera fortement augmentée, rendant en général hautement probable la formation d'une troisième liaison. L'attachement se renforcera alors progressivement, en l'absence de toute participation cellulaire active.

- Consolidation de l'adhésion

Alors qu'une force de quelques dizaines de pN suffit à rompre une liaison unique, il faut souvent exercer une force mille fois plus importante pour séparer des cellules après un contact de quelques minutes. Cette consolidation importante résulte de la mise en jeu de plusieurs processus :

  - Il se produit une déformation des membranes cellulaires conduisant à la formation d'une aire de contact pouvant atteindre quelques $\mu m^2$.
  - Simultanément à la réorganisation membranaire, on constate une augmentation de la quantité de récepteurs dans la zone de contact. Cette réorganisation pourrait résulter de la diffusion passive de ces molécules (45), mais il est probable que les molécules d'adhésion migrent de manière coordonnée vers un pôle de la cellule. C'est un phénomène actif dont le moteur est le cytosquelette.
  - La concentration des molécules dans la région de contact s'accompagne d'une concentration des microfilaments d'actine qui augmentent la rigidité membranaire locale. Ce point est important dans la mesure où la solidité d'attachement dépend de la rigidité membranaire.

### 1.6.2 Adhésion de vésicules

Les vésicules sont d'excellent systèmes pour étudier les différents mécanismes d'adhésion de membrane. L'adhésion spécifique, obtenue à l'aide de couples ligands récepteurs placés, l'un sur le substrat, l'autre dans la membrane, est le phénomène étudié le plus activement. Ceci est sans doute dû au fait que ce type d'adhésion est plus représentatif de l'adhésion cellulaire. Elle est à comparer avec l'adhésion non spécifique des vésicules que nous décrirons d'abord.

- Adhésion non spécifique

Lorsqu'une vésicule adhère, sa forme change au fur et à mesure de l'adhésion jusqu'à atteindre une forme finale d'équilibre lorsque l'adhésion est terminée (figure 1.14). Les différents paramètres qui interviennent dans la recherche de la forme d'équilibre d'une vésicule dans le cas de l'adhésion non spécifique sont : l'aire totale de la membrane *A*, le volume total inclus *V*, la rigidité de courbure $\kappa$ et le potentiel de contact ou d'adhésion *W*, qui est l'énergie libre gagnée par unité d'aire de contact. *A* et *V* peuvent varier au cours de l'adhésion, mais ils sont soumis à des contraintes liées aux conditions expérimentales. Pour déterminer la forme d'une vésicule qui adhère, on doit prendre en compte la compétition entre le gain d'énergie d'adhésion, les contraintes sur *A* et *V* et le coût en énergie libre associé à l'élasticité de courbure de la membrane (46).

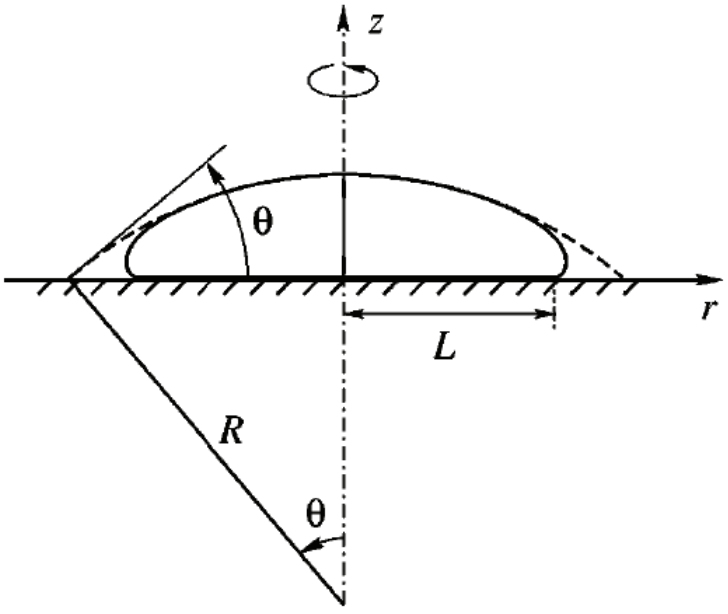



**Figure 1.14 : Définition des grandeurs associées à une vésicule adhérée.**

Considérons tout d'abord le cas où le potentiel d'adhésion tend vers l'infini. On se trouve alors dans une situation semblable à celle d'une goutte de liquide mouillant un

substrat plat. Les formes d'équilibre dans la limite des grandes énergies d'adhésion *W* sont donc des calottes sphériques. La différence principale avec le cas de la gouttelette, est que les angles de contact ne sont pas fixés par des tensions de surface, mais par les contraintes géométriques agissant sur la vésicule.

Posée sur une surface lisse et homogène chimiquement, une goutte rejoint ce solide avec un angle de contact qui dépend des valeurs des différentes tensions de surface en jeu : $\sigma_{LV}$, la tension à l'interface liquide/air, $\sigma_{SL}$, la tension à l'interface solide/liquide et $\sigma_{SV}$, la tension à l'interface solide/air (figure 1.15). En effet, chacune de ces tensions tire sur la ligne de contact, ligne de coexistence des trois phases solide, liquide et vapeur, afin de réduire l'aire de l'interface qui lui est associée. L'angle de contact est donc une propriété locale, que l'on déduit de l'équilibre de ces tensions donné par la loi de Young :

$$\sigma_{LV}\cos\theta + \sigma_{SL} = \sigma_{SV} \tag{1.6}$$

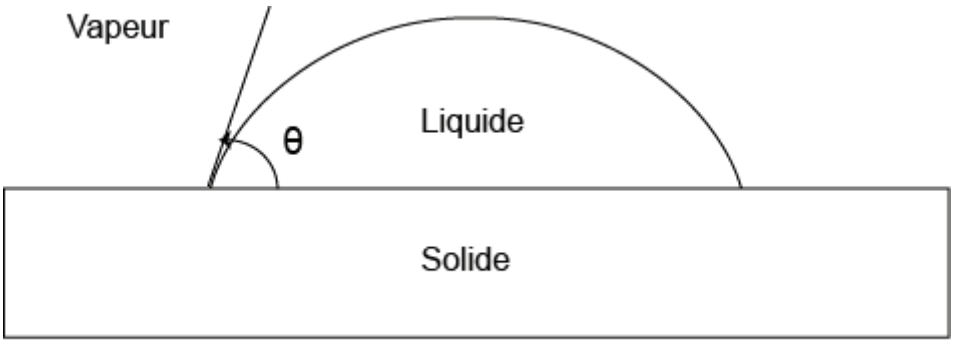



**Figure 1.15 : Goutte de liquide posée sur un substrat solide. θ est l'angle de contact de la goutte avec le substrat. Plus l'angle est faible, plus la goutte s'étale. On dit qu'elle "mouille" bien le substrat.**

Grâce à la similitude entre le cas de la goutte posée sur une surface et le cas de la vésicule qui adhère, on peut identifier les paramètres contenus dans l'expression de l'énergie libre du système à ceux concernant une goutte de liquide. La correspondance est la suivante : $\sigma_0 - W \to \sigma_{SL} - \sigma_{SV}$, $\sigma_0 \to \sigma_{LV}$ et $P_0 \to -\Delta P$ avec $\Delta P$ l'excès de pression de la goutte. On trouve ainsi l'expression de la tension de la membrane :

$$\sigma_0 = \frac{W}{1+\cos\theta} \tag{1.7}$$

et l'expression de la pression :

$$P_0 = -\frac{2\sigma_0}{R_0} = -\frac{2W\sin\theta_0}{L_0(1+\cos\theta_0)} \tag{1.8}$$

.où $L_0$ et $R_0$ sont respectivement le rayon de la zone d'adhésion et le rayon de courbure de la partie supérieure de la membrane dans la limite des grandes énergies d'adhésion.

En partant du cas du potentiel d'adhésion infini, on peut résoudre le cas du potentiel d'adhésion fini par un traitement en perturbation (47). On peut ainsi calculer les formes d'équilibre d'une vésicule pour différentes valeurs de $\kappa$ et de *WA*. Une forte énergie d'adhésion correspond au cas où le gain d'énergie d'adhésion est très grand comparé à l'énergie élastique de la vésicule, c'est-à-dire $WA >> \kappa$. Inversement, lorsque $\kappa >> WA$, on perd plus d'énergie en courbant la membrane qu'on en gagne par l'adhésion, et donc on est dans un régime de faible adhésion. Il est intéressant d'introduire le paramètre $w = WA / 4\pi\kappa$, qui représente l'importance relative de l'énergie d'adhésion par rapport à l'énergie de courbure. La figure 1.16 montre les formes d'équilibre de vésicules adhérées qui ont toutes la même aire *A*, pour différentes valeurs du paramètre *w* (47, 48). On observe que l'aire de contact avec la surface diminue lorsque w diminue, et devient nulle lorsque *w* = 2.

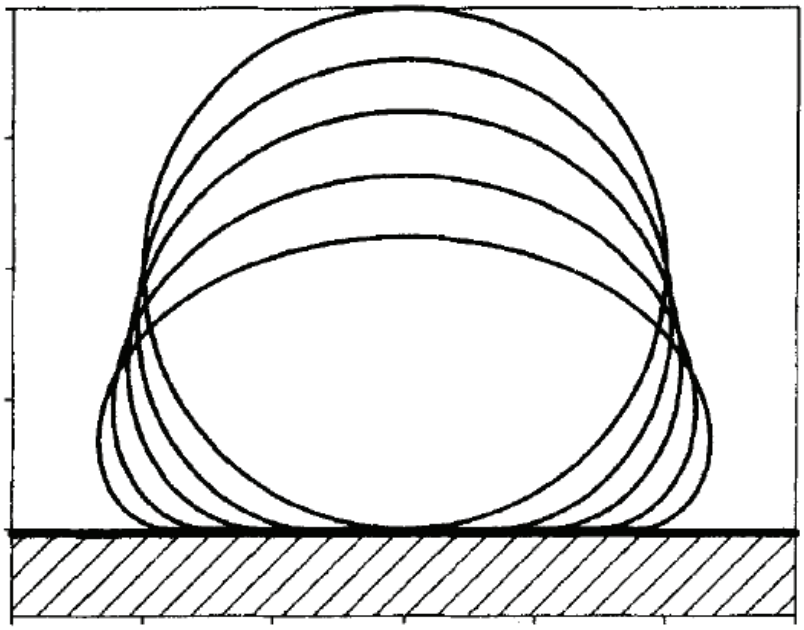


**Figure 1.16 : Formes d'équilibre de vésicules adhérées qui ont toutes la même aire pour w=2; 2,9; 4,1; 6,4 et 10,2 (47).**

Peu d'articles traitent de façon exhaustive de la cinétique d'adhésion non spécifique d'une membrane de vésicule sur un substrat. Ce type d'adhésion est facilement mis en œuvre lorsque le substrat est chargé positivement. Dans ce cas les membranes de phospholipides neutres adhèrent de façon reproductible, ce qui met en évidence le rôle des interactions électrostatiques dans ce phénomène. Nous décrivons ci-dessous l'étalement de vésicules par adhésion non spécifique, en suivant la présentation de Bernard et al. (49).

On peut décrire la dynamique d'étalement de vésicules sur une surface par trois régimes successifs caractérisés par des temps $\tau_1, \tau_2$ et $\tau_3$. Ces trois régimes sont dominés par des forces distinctes.

Le premier régime concerne l'approche de la surface par la vésicule. Celle-ci n'a pas tout à fait une forme sphérique, sa partie inférieure est légèrement aplatie au niveau du pôle. On peut donc modéliser l'approche de la vésicule par celle d'un disque. La vésicule sédimente sous l'effet de la gravité. Lorsqu'elle est très proche de la surface, elle subit la force répulsive d'Helfrich, due au fait que les fluctuations de la membrane sont gênées par la présence de la surface. Les forces électrostatiques peuvent être négligées, car la membrane se trouve à une distance de la surface supérieure à la longueur de Debye (portée des forces électrostatiques). Le disque s'approche donc de la surface, sous l'influence de la résultante du poids et de la force d'Helfrich, et la chute est ralentie par les forces hydrodynamiques. Le temps $\tau_1$ correspond donc au temps qu'il faut pour drainer le film d'eau se trouvant sous le disque. $\tau_1$ est de l'ordre de 30 s pour une vésicule d'un rayon de 20 µm, résultat en accord avec les expériences.

Le second régime concerne l'étalement de la vésicule à volume constant. C'est ce régime qui est à notre sens le plus pertinent pour l'interprétation de l'adhésion non spécifique. Dans ce régime, on suppose que l'adhésion génère une tension dans la membrane. L'accroissement du patch d'adhésion a donc pour effet la consommation de l'excès de surface présent originellement dans la vésicule. Le régime 2 prend fin lorsque tout l'excès de surface est consommé. La forme finale de la vésicule adhérée peut être décrite à ce stade par les équations (1.7) et (1.8).

Au cours du régime 2, on considère que la dissipation visqueuse contrebalance la force générée par la tension de la membrane imposée par l'adhésion. Ce régime est limité par la dissipation hydrodynamique dans le pourtour de la zone de contact de la vésicule avec le substrat, ce qui conduit à un temps caractéristique d'adhésion $\tau_2 \approx \eta R_0 / \sigma_2$. Expérimentalement, on obtient bien une cinétique du patch d'adhésion exponentielle.

Le temps typique $\tau_2$ est de l'ordre de 0,05s. Ce temps est beaucoup plus court que s'il avait impliqué un processus de diffusion d'une espèce dans la membrane (quelques dizaines de secondes), ce qui conforte l'idée qu'il s'agit d'une adhésion non spécifique.

A la fin du seconde régime, la membrane est sous tension et ne peut quasiment plus être étirée. Le volume doit donc diminuer pour que l'adhésion puisse continuer. Des lipides chargés affluent vers la zone de contact, et la tension sur la membrane est forte. Des pores se forment, et une partie du liquide contenu dans la vésicule peut s'écouler. Lorsque la tension sur la membrane s'est un peu relâchée, les pores se referment. $\tau_3$ correspond au temps qu'il faut pour que le liquide s'écoule par les pores.

- Adhésion spécifique

De même que dans le cas de l'adhésion spécifique, on peut déterminer les formes d'équilibre des vésicules adhérant de manière spécifique sur un substrat. L'énergie d'adhésion spécifique $W_s$ s'écrit, d'après Bell et al (45):

$$W_S = \Pi(\Gamma_{\text{int}}) - \Pi(\Gamma_{ext}) \tag{1.9}$$

où $\Pi(\Gamma_{\text{int}})$ et $\Pi(\Gamma_{ext})$ sont les pressions osmotiques exercées par les lipides de part et d'autre de la ligne de contact entourant le patch d'adhésion. Considérons l'équation d'équilibre des forces horizontales au niveau de la ligne de contact, c'est-à-dire l'équation de Young. Si $\sigma_0$ est la tension de surface en l'absence de ligand, la tension hors de la zone de contact vaut $\sigma = \sigma_0 - \Pi(\Gamma_{ext})$(50). La tension de surface à l'intérieur de la zone de contact est alors :

$$\sigma_0 - \Pi(\Gamma_{\text{int}}) = \sigma - \Pi(\Gamma_{\text{int}}) + \Pi(\Gamma_{ext}) \tag{1.10}$$

On en déduit que :

$$\sigma - \Pi(\Gamma_{\text{int}}) - \Pi(\Gamma_{ext}) = \sigma\cos\theta \tag{1.11}$$

avec $\sigma$ la tension de surface de la membrane hors de la zone de contact et θ l'angle de contact que la vésicule forme avec la surface. Cette équation permet de trouver la forme d'équilibre de la vésicule.

Brochard-Wyart et al (51) présentent un modèle théorique de l'adhésion spécifique de vésicules sur une surface solide, c'est-à dire via la formation de couples ligand-récepteur. Ils examinent le cas où le début de l'étalement de la vésicule est initié par de l'adhésion non spécifique. La partie de la membrane qui adhère au substrat (le patch), grandit alors par des processus de mouillage conventionnels. Ce régime dure quelques secondes. La seconde partie du processus est dominée par la diffusion des ligands dans la membrane vers la zone d'adhésion. Cette phase dure une heure.

De Gennes et al (50) proposent un modèle théorique de l'adhésion spécifique de vésicules sur une surface solide où l'adhésion n'est cette fois pas initiée par une interaction non-spécifique. La totalité de l'adhésion est due aux ligands. Cette situation se produit couramment en pratique, lorsqu'on utilise une couche de protection, comme par exemple du polyethyleneglycol (PEG), sur les vésicules. C'est également le rôle du glycocalyx sur la paroi des cellules. Une telle configuration implique que la vésicule soit amenée au contact de la surface par une force, comme le poids.

Dans cette situation, un "coussin" d'eau existe entre la membrane et la surface, dû au fait que la membrane est repoussée de la surface par des effets d'entropie (force répulsive de Helfrich). On peut calculer la hauteur $h_0$ de ce coussin. Si on considère qu'il n'y a aucune

tension dans la membrane, on trouve une hauteur de 0,5 µm. Mais il existe toujours une faible tension $\sigma$ dans la membrane (de l'ordre d'1 µJ/m$^2$). Cette tension limite les fluctuations de la membrane et diminue donc la hauteur du coussin, qui obéit alors à la formule : $h_0 = (k_B T / \sigma)^{1/2}$ avec $k_B T$ l'énergie thermique. On obtient une hauteur de 0,1 µm pour des valeurs typiques de $k_B T$ et de $\sigma$.

Les auteurs examinent une série de cas et proposent pour chacun une loi d'évolution du rayon de la zone d'adhésion au cours du temps. Les différents paramètres qu'ils font varier sont les suivants :

- Ligands qui peuvent ou non diffuser librement dans le patch d'adhésion
- Formation rapide ou non du couple ligand-récepteur
- Diffusion rapide ou lente des ligands dans le patch
- Adhésion initiée par des interactions non spécifiques ou non

Voici un tableau récapitulatif des lois de croissance du patch adhésif en fonction de ces différents paramètres :

| Diffusion des ligands dans le patch | Formation du couple ligand-récepteur | Diffusion des ligands dans le patch | Initiation par adhésion non spécifique | Loi de croissance |
|---|---|---|---|---|
| Oui | Rapide | | Non | R ~ t |
| Non | Rapide | | Non | R ~ t |
| Oui | Lente | Rapide | Oui | R ~ $t^{1/2}$ |
| Oui | Lente | Rapide | Non | R ~ $t^{5/2}$ |
| Oui | Lente | Lente | Oui | R ~ $t^{1/2}$ |

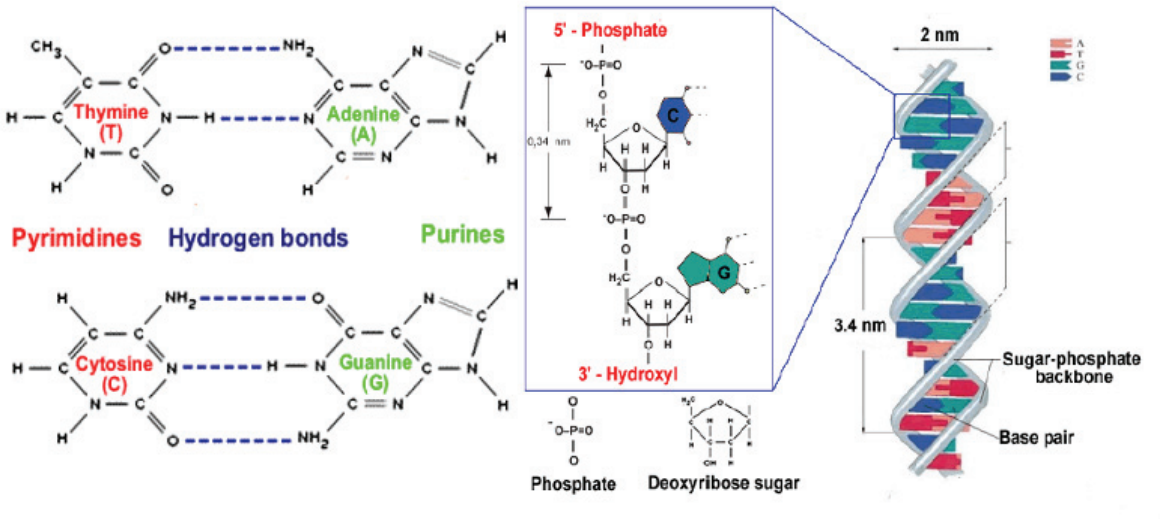
**Tableau 1 : Lois de croissance du patch adhésif en fonction de différents paramètres.**

# 2 L'ADN, un polymère modèle pour les physiciens

## 2.1 Structure de la molécule d'ADN

La molécule d'ADN, l'Acide DésoxyriboNucléique, est un long polymère constitué de deux brins enroulés formant une double hélice (figure 1.17 c). Chaque brin est composé de sous-unités appelées les nucléotides et chaque nucléotide est constitué : d'une base - adénine, guanine, thymine ou cytosine, abrégées par A, G, T ou C respectivement -, d'un sucre appelé le désoxyribose et d'un groupe phosphate. Les bases appartiennent à deux groupes : les purines, A et G, et les pyrimidines, C et T. Une purine est formée de deux

cycles accolés, une pyrimidine n'en contient qu'un (figure 1.17 a). La séquence chimique des bases définit la structure d'un brin.




(a) (b) (c)

**Figure 1.17 : (a) Représentation dans le plan de la liaison entre les bases thymine et adénine (deux liaisons hydrogène), et entre les bases cytosine et guanine (trois liaisons hydrogène) (b) Représentation de la liaison entre l'extrémité 3' d'un nucléotide à cytosine et l'extrémité 5' suivante d'un nucléotide à guanine (c) Projection à deux dimensions de la structure en double hélice de la molécule d'ADN.**

La capacité des nucléotides à coder de l'information découle de leur capacité à former des paires complémentaires de façon stable et spécifique. Cette stabilité et spécificité sont inhérentes à la géométrie des bases, et à la possibilité de former des liaisons hydrogène entre atomes capables de partager un atome d'hydrogène. Chaque base ne peut s'apparier qu'avec une seule autre : A avec T et C avec G. Les tailles différentes des purines et des pyrimidines rendent instables des hélices contenant des paires purine-purine ou pyrimidine-pyrimidine.

Les phosphates qui lient entre eux les désoxyriboses de la chaîne principale relient le carbone 3' d'un sucre au carbone 5' du suivant (figure 1.17 b). Ceci apporte une polarité à la chaîne, et donc force un sens de lecture à la machinerie chargée de décoder l'information.

Des contraintes géométriques font que l'appariement de deux chaînes de nucléotides entre elles ne peut se faire que dans une position antiparallèle, où la polarité d'une chaîne est l'inverse de l'autre, et le code de l'une est le complément inverse de celle de l'autre. Dans la notation conventionnelle de la biologie moléculaire, les deux chaînes sont représentées comme suit:

5' ACCTGAACGCGTTAGGCTA 3'
3' TGGACTTGCGCAATCCGAT 5'

Lu dans la direction habituelle $5' \rightarrow 3'$, le brin d'ADN inférieur aurait la séquence TAGCCTAACGCGTTCAGGT.

Quelle que soit la nature des chaînes d'ADN (ADN du phage lambda, fragments d'ADN d'Escherichia Coli, …), elles sont caractérisées en solution par une longueur de persistance (52). C'est la longueur selon laquelle l'orientation persiste le long de la chaîne et elle est fonction de la force ionique de la solution puisque l'ADN est un polyélectrolyte (53, 54). Dans la limite des fortes concentrations en sel, ou des petites longueurs de Debye, la longueur de persistance de la chaîne non fluorescente est de l'ordre de 50 nm ou 150 paires de bases (54, 55). Lorsque la force ionique diminue, les chaînes d'ADN deviennent plus rigides. Les interactions électrostatiques complexifient la dynamique des chaînes. La majorité des études sur l'ADN, notamment sur l'étirement des molécules par des écoulements, sont effectuées dans des solutions tampon contenant une forte concentration en sels (> 10mM).

## 2.2 Greffage d'un polymère sur une surface

Lorsqu'on souhaite immobiliser un polymère sur une surface, on peut soit l'adsorber, soit le greffer. L'adsorption physique met en jeu des liaisons faibles, du type forces de Van der Waals. Elle est en général réversible. Au contraire, le greffage de chaînes de polymères implique la formation de liaisons plus fortes, c'est-à-dire des liaisons covalentes, ou bien des interactions ligand-récepteur. Dans cette section, nous aborderons uniquement le cas du polymère greffé. Après avoir décrit les différents régimes que peuvent rencontrer des chaînes de polymère greffées (brosse de polymère ou champignon), nous nous intéresserons à la pression exercée par un polymère greffé sur son environnement, notion clé pour l'étude de l'interaction entre un polymère et une membrane.

La densité de greffage est un paramètre important. Si elle est petite, les chaînes sont isolées et agissent indépendamment les unes des autres. Il n'y a pas de répulsion entre les chaînes, et celles-ci forment des îlots isolés ou "champignons". Si elle est grande, on parle de brosse de polymère.

Une brosse de polymère est un ensemble de chaînes de polymère densément greffées sur une surface. De tels systèmes sont importants dans un certain nombre d'applications comme la stabilisation de colloïdes (56-58) ou la réduction de la friction entre des surfaces (59). L'élément important d'une brosse est sa hauteur. Dans le cas des particules colloïdales, plus la brosse est haute, plus il y a de répulsion entre les particules, et donc meilleure est la stabilité. En bon solvant, et lorsque la surface est inerte, la hauteur de la brosse est déterminée par la balance entre la répulsion entre les monomères, qui favorise des hauteurs de brosse importante, et l'entropie des chaînes, qui favorise des hauteurs faibles.

Le greffage de molécules d'ADN sur des surfaces est fréquemment utilisé dans les biotechnologies. On immobilise par exemple des brins d'ADN simple brin sur une surface

pour séquencer rapidement de l'ADN (60-62). On attache également des molécules d'ADN par une extrémité pour réaliser des expériences de peignage moléculaire, une méthode utilisée en particulier pour le mapping optique de restriction de molécules d'ADN (analyse de fragments de molécules d'ADN digérées par une enzyme) (63-65).

Etudions maintenant le cas d'un polymère unique greffé sur une surface. Le modèle physique le plus simple décrivant les polymères est celui d'une chaîne gaussienne. Chaque monomère est de longueur fixée *a* et orienté aléatoirement, toutes les directions étant équiprobables (66). La géométrie d'une chaîne est équivalente à celle d'une marche aléatoire simple à trois dimensions. Après N pas la chaîne a donc parcouru une distance $\vec{R} = \sum_{i=1}^{N} \vec{r}_i$, avec $< \vec{r}_i >= 0$ et $< \vec{r}_i \cdot \vec{r}_j >= a^2 \delta_{ij}$ (67). La valeur typique de la distance parcourue peut être calculée par l'écart quadratique moyen :

$$< \vec{R}^2 >= \sum_{i,j=1}^{N} < \vec{r}_i \cdot \vec{r}_j >= Na^2 \tag{1.12}$$

La distance bout-à-bout de la chaîne grandit donc avec la racine carrée du nombre de monomères $R_0 =< R^2 >^{1/2} = N^{1/2} a$. Ce modèle néglige les interactions de volume exclu entre monomères qui ont pour effet de gonfler les chaînes. Les chaînes à volume exclu ont donc une distance bout-à-bout plus élevée, elle s'écrit $R_0 = N^{3/5} a$ (68). Les effets de la rigidité locale, traduits par une longueur de persistance, conduisent ainsi à une augmentation de la taille des chaînes. Dans ce cas, les pas successifs sont corrélés :

$$< \vec{r}_i \cdot \vec{r}_j >= a^2 e^{-|i-j|\frac{a}{l_p}} \tag{1.13}$$

Néanmoins, si le contour de la chaîne est plus grand que la longueur de persistance, $Na >> l_p$, la statistique de la chaîne est encore gaussienne avec une taille de monomère équivalent plus grande :

$$< R^2 >= 2 a l_p N \tag{1.14}$$

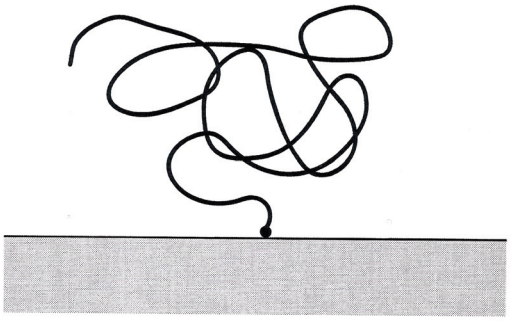


**Figure 1.18 : Chaîne gaussienne greffée sur une paroi impénétrable**

Lorsque l'on greffe un polymère sur une surface impénétrable (figure 1.18), on réduit le nombre de conformations accessibles, ce qui conduit à une perte d'entropie. Il y a donc un coût d'énergie libre $F_g$ associé au greffage. On peut montrer que ce coût augmente à mesure que diminue la distance $l$ du bout de la chaîne à la paroi :

$$F_g = -k_B T \ln \frac{l}{2R_g} \tag{1.15}$$

La chaîne exerce donc une force totale répulsive sur la paroi $f = -\partial f / \partial l \approx k_B T / l$. Cette force répulsive est l'intégrale de la pression p(r) que la chaîne exerce par unité de surface sur la paroi de greffage (69).

La figure 1.19 illustre la non-homogénéité de cette pression avec la distance $r$ au point d'attache. Elle décroît très rapidement et suit à proximité du point de greffage une loi de puissance $p(r) \approx k_B T / 2\pi r^3$ pour $a << r << R_g$ où $R_g$, le rayon de giration du polymère, obéit à l'équation $R_g^2 = Na^2 / 6$.

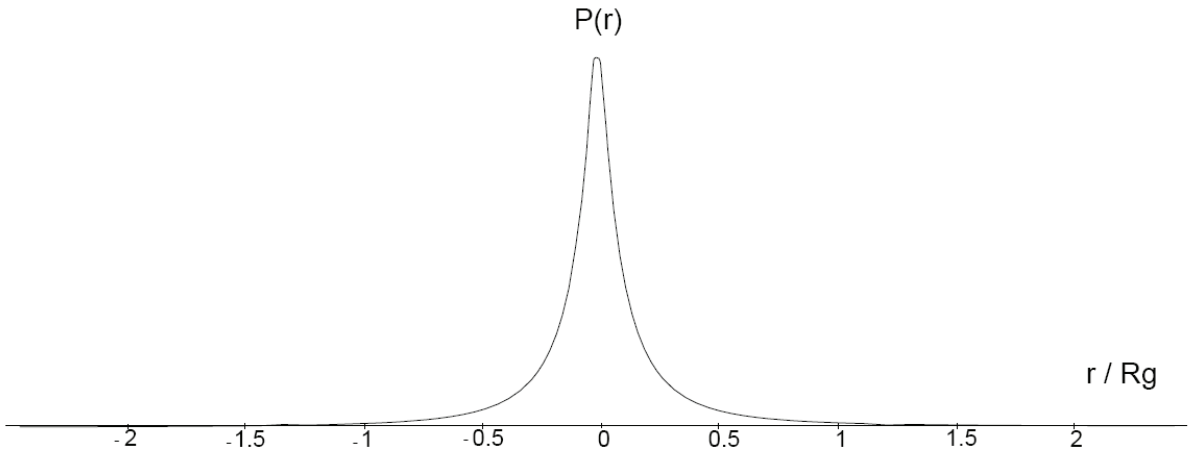



**Figure 1.19 : Profil de pression exercé par le polymère sur la paroi de greffage**

## 2.3 Confinement d'un polymère entre deux surfaces

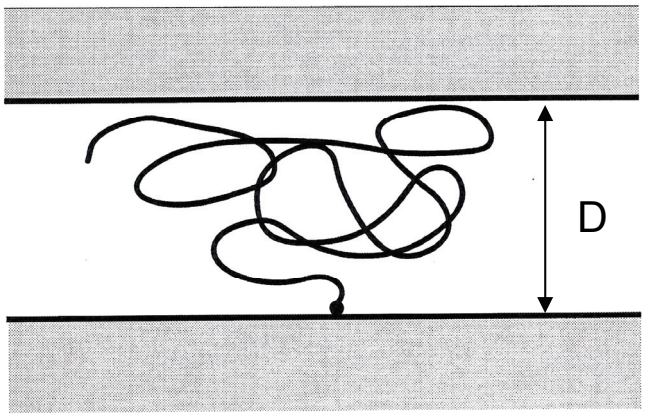



**Figure 1.20 : Chaîne gaussienne greffée confinée entre deux parois distantes de D**

Une autre configuration importante pour l'interprétation de nos résultats expérimentaux est celle de la chaîne gaussienne confinée entre deux parois parallèles, impénétrables et distantes de *D* (figure 1.20). Le polymère est greffé à l'une des deux surfaces. Cette configuration conduit aussi à une perte d'entropie de conformation et donc à une augmentation de l'énergie libre. On peut montrer que cela résulte en une force exercée par le polymère sur les parois (66) :

$$f(D) = \frac{k_B T}{D}\left(1 + 2\pi^2 \frac{R_g^2}{D^2}\right) \tag{1.16}$$

Si le point de greffage est fixe et le confinement fort, c'est-à-dire $D << R_g$ , la pression exercée sur la surface supérieure s'écrit (70, 71) :

$$p(r) = \frac{\pi k_B T}{2D^3}\Gamma\left(-\frac{r^2}{4R_g^2}\right) \tag{1.17}$$

avec $\Gamma(x) = \int_0^\infty t^{x-1} e^{-t} dt$ .

Le polymère peut être considéré comme un gaz de monomères dans une boîte cubique de côté *D*. Latéralement, la pression décroît exponentiellement pour les distances de l'ordre de $R_g$. Près du point de greffage, la pression a une forme logarithmique (figure 1.21).

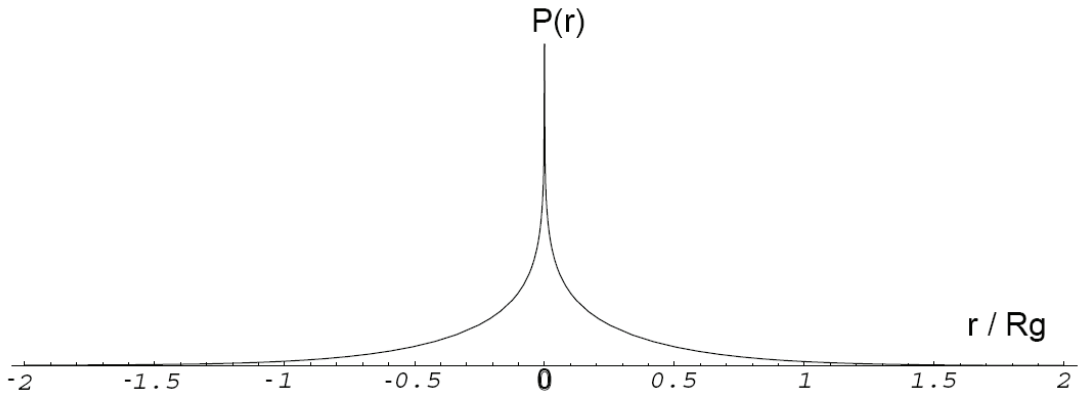



**Figure 1.21 : Profil de pression exercé par le polymère sur les deux parois**

## 2.4 Techniques d'étirement de molécules d'ADN

De très nombreuses techniques permettent d'étirer des molécules d'ADN contenues dans une solution. Nous en rappelons ici quelques unes, mais il en existe beaucoup d'autres. Toutes ces techniques ont fait l'objet de recherches approfondies et sont désormais bien connues.

### 2.4.1 Peignage moléculaire, étirement par rotation et soufflage d'air

Les molécules d'ADN peuvent être étirées et manipulées individuellement par des écoulements, des champs électriques (72), magnétiques (73) et optiques (74-76). La méthode d'étirement par écoulement est probablement la plus simple car elle n'exige pas l'utilisation d'outils complexes comme les pinces optiques ou magnétiques. Il y a deux types de forces d'étirement exercées sur les molécules d'ADN dans un écoulement : les forces visqueuses et les forces dues à un ménisque qui se déplace. Il existe plusieurs méthodes pour étirer et coller des molécules d'ADN en utilisant des écoulements de fluide, qui utilisent toutes une combinaison de ces deux forces : le peignage moléculaire (63, 64, 77), l'étirement par rotation (77) et le soufflage d'air (77). Le peignage moléculaire utilise un ménisque de recul pour étirer et coller l'ADN sur une surface hydrophobe. L'étirement par rotation consiste à "spin-coater" une goutte de solution d'ADN. La goutte s'étale par centrifugation, et les molécules d'ADN s'étirent radialement. La technique du soufflage d'air consiste à souffler de l'azote sous forme gazeuse sur une goutte de solution contenant des molécules d'ADN dans une direction parallèle au substrat. La goutte s'étale dans cette direction en étirant les molécules d'ADN. Selon le degré d'étirement et la densité de greffage souhaités, on peut choisir l'une ou l'autre de ces méthodes, faire varier le pH ou la nature de la surface.

Plusieurs applications à ces techniques sont possibles. La première est le diagnostic génétique. L'ADN "peigné" conserve sa capacité à s'hybrider avec des brins d'ADN complémentaires, ce qui permet son utilisation pour détecter la présence de séquences précises d'ADN. D'autre part, ces méthodes d'étirement permettent d'étudier les interactions entre protéines et molécules d'ADN. En effet, ce type d'interaction est difficile à étudier lors d'expériences en volume qui moyennent les résultats sur un grand nombre de molécules. De récents avancements dans l'imagerie de fluorescence permettent désormais d'observer des molécules uniques. Grâce aux techniques décrites ci-dessus, qui permettent d'immobiliser les molécules d'ADN, il a ainsi été possible par exemple d'imager le déplacement d'une protéine le long d'une molécule d'ADN.

### 2.4.2 Molécules d'ADN dans des écoulements

- Expériences avec un écoulement uniforme

Les premières expériences concernant l'étude par microscopie de fluorescence du comportement de molécules d'ADN dans des écoulements ont été réalisées dans un écoulement uniforme par Perkins et al (52, 78). Comme les écoulements uniformes ne permettent pas d'étirer les molécules d'ADN libres en solution, les polymères furent attachés à des billes, maintenues dans le flot par des pinces optiques. Les auteurs mesurèrent l'extension moyenne des molécules dans la direction de l'écoulement et la distribution spatiale des masses en fonction de la vitesse d'écoulement, pour des ADN allant de 22 à 84 µm et des viscosités de solution variables. Ils observèrent que les molécules d'ADN s'étirent en forme de "trompette". Autrement dit, la partie finale de la molécule est moins étirée que le début. Ceci s'explique par le fait qu'une force d'étirement par le fluide s'exerce sur chaque monomère. Ces contributions s'additionnent pour étirer toute la molécule : un monomère subit une force qui est la somme des forces appliquées à chaque monomère situé en aval de celui-ci. Le début de la molécule subit donc une force d'étirement plus importante que la fin de la molécule. Les forces hydrodynamiques qui s'exercent sur les monomères ont néanmoins une structure complexe, elles ne dérivent pas seulement de la vitesse moyenne d'écoulement. En effet, le déplacement de chaque monomère induit des champs de vitesse dans le liquide et donc des forces d'interaction hydrodynamique entre les monomères. Ces phénomènes de couplage force-écoulement sont connus sous le nom d'écrantage hydrodynamique. Ils impliquent par exemple qu'une pelote de polymère se comporte dans un écoulement comme une sphère dure de rayon équivalent. L'étirement des molécules d'ADN conduit à une ouverture progressive de la pelote et donc à une diminution de l'écrantage hydrodynamique à mesure que les vitesses augmentent. La figure 1.22 présente l'extension

des molécules d'ADN en fonction de la vitesse de l'écoulement pour différentes longueurs de contour.

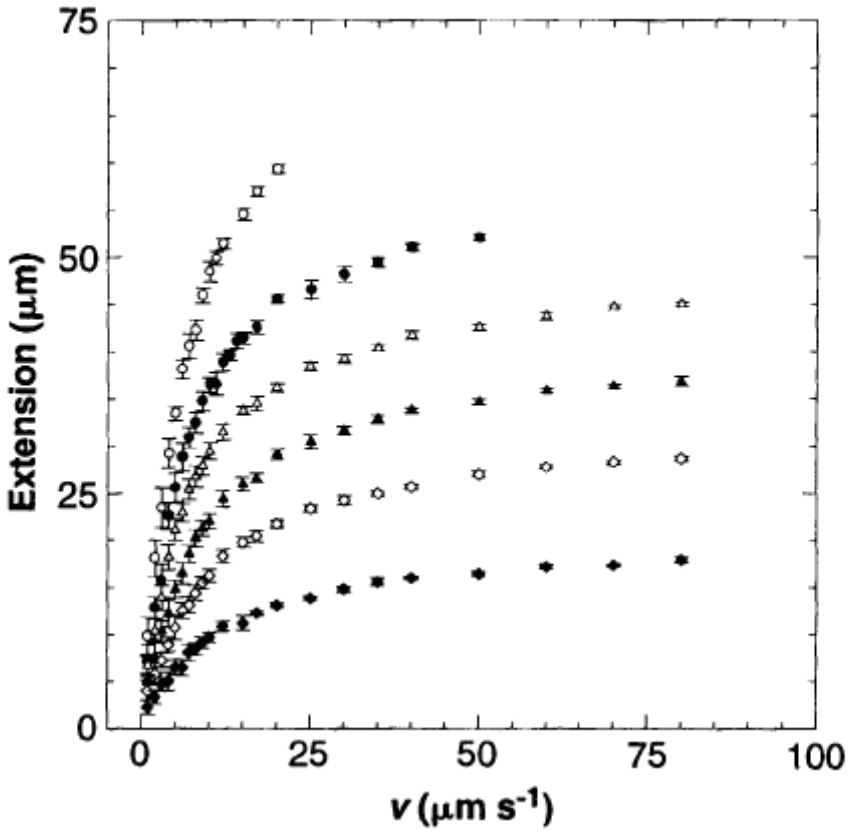



**Figure 1.22 : Extension en fonction de la vitesse de l'écoulement pour des molécules d'ADN de longueurs 22,4 ; 34,8 ; 44,0 ; 53,1 ; 63,6 et 83,8 µm attachées à une bille de 0,3 µm de diamètre et pour une viscosité de 0,95 cP.**

- Expériences avec un écoulement élongationnel pur

Un écoulement élongationnel $\left(v_x = \dot{\varepsilon}x, v_y = -\dot{\varepsilon}y, v_z = 0\right)$ est capable d'étirer les molécules d'ADN sans que celles-ci soient attachées à l'une de leurs extrémités. Un polymère dans un écoulement élongationnel commence à se déformer quand les forces dues à la friction hydrodynamique dans la molécule dépassent les forces d'entropie élastique qui tendent à enrouler la molécule en pelote (79, 80). Il y a deux sortes de temps caractéristiques. Le premier est le plus long temps de relaxation $\tau$, qui est le temps caractéristique nécessaire au mouvement brownien pour globalement réarranger la conformation du polymère. C'est également approximativement le temps nécessaire à la chaîne complètement étirée par une force extérieure pour revenir sous sa forme enroulée d'équilibre.

Le second temps caractéristique est défini par $1/\dot{\varepsilon}$ avec $\dot{\varepsilon}$ le taux élongationnel ou le gradient de vitesse le long de la direction y de l'écoulement :

$$\dot{\varepsilon} = \frac{\partial v_y}{\partial y} \tag{1.18}$$

L'étirement du polymère commence lorsque $De \equiv \dot{\varepsilon}\tau \approx 1$, avec *De* le nombre de Deborah. Au-delà de cette valeur critique, le polymère est étiré, en-deçà il reste enroulé. L'étirement du polymère a donc lieu lorsque le taux élongationnel $\dot{\varepsilon}$ est élevé, ou à l'inverse le temps caractéristique $1/\dot{\varepsilon}$ est faible, et que le temps caractéristique $\tau$ est élevé, c'est-à-dire que le polymère prend du temps pour se réarranger vers sa conformation d'équilibre.

Perkins et al (81) réalisèrent des expériences d'étirement de molécules d'ADN monodisperses d'une longueur de 22 µm (ADN du phage lambda) dans un écoulement élongationnel. Ils étudièrent la conformation et l'extension de ces molécules en fonction du temps de résidence dans l'écoulement et du gradient de vitesse.

La configuration du système expérimental est telle qu'il existe un point de stagnation, où le temps de résidence est infini, ce qui laisse le temps aux molécules d'ADN d'être étirées par le flux (figure 1.23). En mesurant l'extension des molécules en fonction du temps de résidence, on obtient des comportements très variables, ce qui était inattendu pour des molécules identiques en taille ayant subi le même gradient de vitesse et le même temps de résidence. Certains ADNs sont seulement légèrement étirés tandis que d'autres atteignent rapidement un état de forte extension. On obtient sept configurations possibles pour les molécules d'ADN : haltère, demi-haltère, plié (formant une boucle), uniforme, entortillé, en pelote et étiré. Les trois premières configurations sont dominantes pour les forts gradients de vitesse.

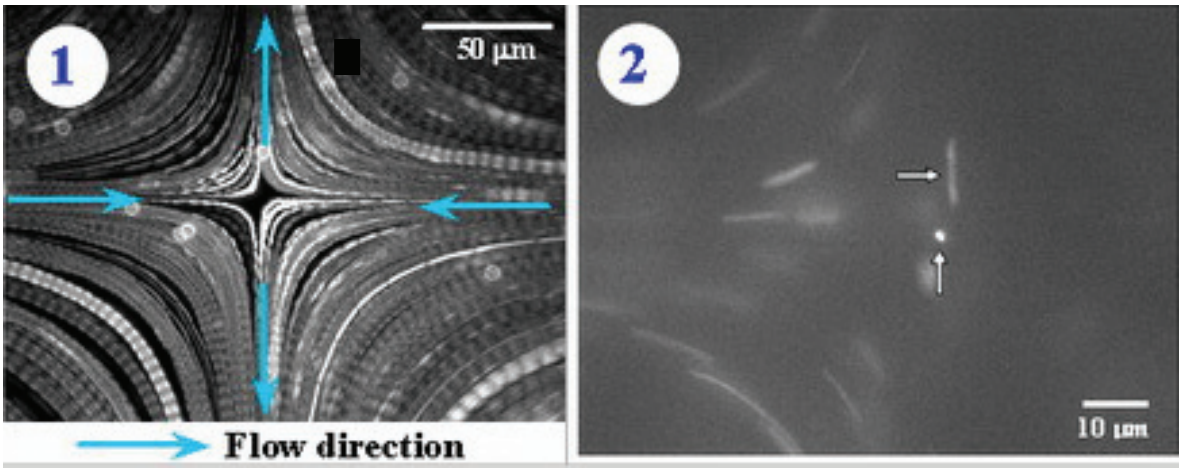



**Figure 1.23 : A gauche : écoulement élongationnel. A droite : étirement de molécules d'ADN près du point de stagnation.**

Ces différences indiquent que la conformation du polymère au moment où il entre dans le gradient de vitesse est un paramètre important. Par exemple, un polymère dont les deux extrémités se trouvent initialement du même côté du centre de masse et qui est soumis à un gradient de vitesse très supérieur à l'inverse de son temps de relaxation $\tau$, aura plutôt

une conformation finale en boucle. En effet, l'une des extrémités n'aura pas suffisamment de temps pour se déplacer de l'autre côté du centre de masse.

Cette étude comporte cependant un certain nombre de limites, évoquées dans un article ultérieur par Smith et Chu (79). Les molécules d'ADN sont déjà exposées à un gradient de vitesse avant d'arriver dans la zone d'observation. Les molécules ne sont donc peut-être pas à l'équilibre au moment où elles sont soumises à l'écoulement élongationnel.

Smith et Chu décrivent un nouveau dispositif expérimental qui permet d'étudier le comportement de molécules d'ADN dans un écoulement élongationnel tout en offrant une solution à ces divers problèmes. Le nouveau dispositif permet d'exposer les molécules d'ADN à un écoulement élongationnel soudain lorsqu'elles parviennent dans la zone d'observation. D'autre part, ils utilisent un solvant de plus grande viscosité. Grâce à ces modifications, on obtient un nombre de Deborah allant jusqu'à 55, alors qu'avec le dispositif précédent on atteignait 3,4 au maximum.

Les expériences effectuées pour des nombres de Deborah inférieurs à 3,4 confirment les résultats obtenus précédemment, malgré le fait que les molécules d'ADN subissaient déjà une élongation avant de parvenir dans la zone d'observation. Il est possible de répéter l'expérience plusieurs fois avec les mêmes molécules. En inversant l'écoulement, celles-ci relaxent vers leur position d'équilibre, puis s'étirent de nouveau. Ces molécules s'étirent à différents taux à chaque fois et atteignent différentes conformations. Cela prouve que les différentes conformations ne sont pas une propriété intrinsèque des molécules, mais dépendent aussi de la conformation instantanée de la molécule, juste avant qu'elle ne subisse l'écoulement.

Pour des nombres de Deborah très supérieurs à 1, les molécules d'ADN sont étirées trop rapidement pour pouvoir relaxer. Cet étirement rapide empêche les molécules d'explorer une quantité suffisante des différentes conformations accessibles. Par exemple, une molécule repliée en épingle à cheveux est dans une conformation métastable hors-équilibre qui n'existerait pas si l'écoulement avait été appliqué lentement.

- Expériences avec un écoulement de cisaillement simple

Un écoulement plan de la forme $\vec{v} = v_x\hat{x} + v_y\hat{y}$ peut généralement être représenté par la superposition linéaire d'un écoulement rotationnel de vorticité $\omega = 1/2\left(\partial v_Y / dx - \partial v_x / \partial y\right)$ et d'un écoulement élongationnel de gradient de vitesse $\dot{\varepsilon} = 1/2\left(\partial v_Y / \partial x + \partial v_x / \partial y\right)$(82) (figure 1.24). Dans un écoulement élongationnel pur (ω = 0) les déformations sont importantes. Dans un écoulement rotationnel pur ($\dot{\varepsilon} = 0$), il y a uniquement rotation et aucune déformation (83, 84).

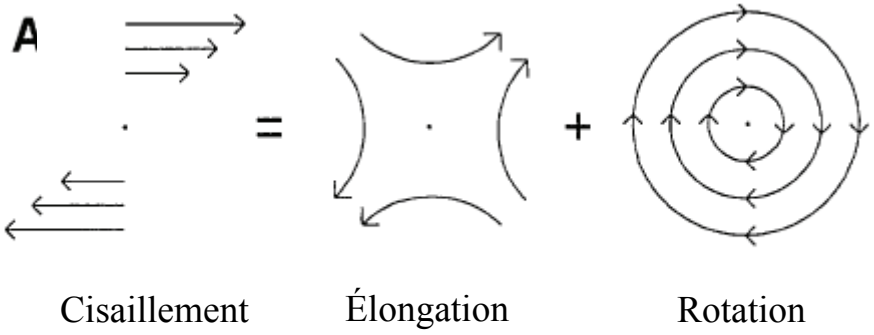



**Figure 1.24 : L'écoulement de cisaillement contient une composante élongationnelle et une composante rotationnelle.**

Dans un écoulement de cisaillement simple, où $v_y = 0$ et $v_x = \dot{\gamma} y$ avec $\dot{\gamma} = \partial v_x / \partial y$ le taux de cisaillement, les amplitudes des composantes élongationnelle et rotationnelle sont égales : $|\dot{\varepsilon}| = |\omega|$. Dans ce cas, il a été suggéré que le polymère n'atteint jamais un état stable, fortement étiré (83, 84). En fait, de grandes fluctuations dans l'extension des molécules, dues à un pliage des extrémités de la molécule sur elle-même, ont été observées dans des simulations (85-87). Lorsque la molécule s'étire, la traînée hydrodynamique diminue et la chaîne peut commencer à relaxer. Néanmoins, le mouvement brownien peut perturber une chaîne étirée qui peut soit continuer à s'étirer, soit devenir instable et se replier sur elle-même. Ces deux situations sont représentées sur la figure 1.25 (82).

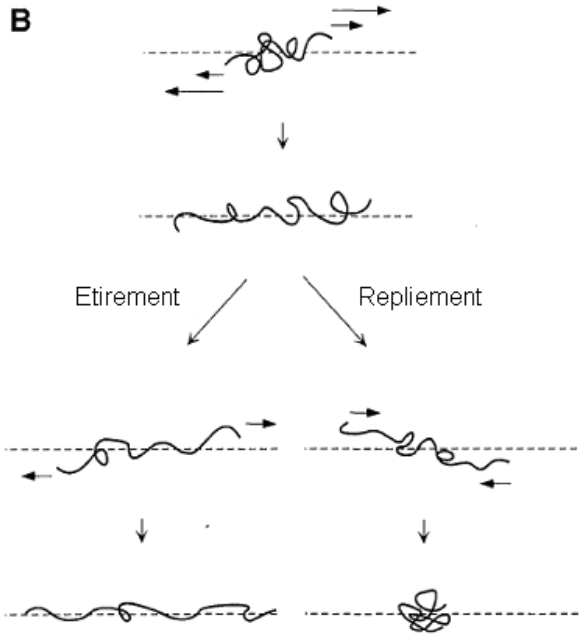



**Figure 1.25 : Comportement d'une molécule d'ADN déjà étirée dans un écoulement de cisaillement. A gauche, la chaîne continue à s'étirer. A droite, elle se replie sur elle-même.**

De même que pour l'écoulement élongationnel, on peut caractériser un écoulement de cisaillement par une grandeur sans unité, le nombre de Weissenberg $Wi = \dot{\gamma}\tau$. C'est le rapport entre le taux de cisaillement appliqué $\dot{\gamma}$ et le taux de relaxation naturel du polymère $1/\tau$.

Smith et al (82) confirment expérimentalement l'existence de telles fluctuations sur des molécules d'ADN. Ils utilisent un dispositif où ils peuvent faire varier soit le taux de cisaillement, en modifiant la vitesse de déplacement de la plaque en mouvement, soit le taux de relaxation du polymère, en changeant la viscosité de la solution.

Les données montrent que même pour des faibles valeurs de Wi, il y a des fluctuations importantes dans l'extension des molécules. Lorsque Wi augmente, les molécules fluctuent rapidement (en relation avec leur taux de relaxation) et atteignent de plus grandes extensions. L'amplitude de l'extension augmente lorsque Wi s'accroît, car le gradient de vitesse et donc les forces hydrodynamiques agissant au sein de la molécule, augmentent.

- Polymère greffé dans un écoulement de cisaillement

Doyle et al (88) observent des molécules d'ADN fluorescentes d'une longueur de contour de 20 µm (ADN du phage lambda), greffées à l'une de leurs extrémités sur une surface, et placées dans un écoulement de cisaillement. Le nombre de Weissenberg est la quantité pertinente pour étudier ce phénomène, comme lorsque le polymère n'est pas greffé. Pour différentes valeurs de Wi, les auteurs enregistrent la configuration des molécules d'ADN au cours du temps (figure 1.26). Ils observent qu'à nombre de Weissenberg constant, la longueur des molécules d'ADN fluctue au cours du temps. Ces fluctuations sont très importantes pour des nombres de Weissenberg intermédiaires, alors qu'elles sont faibles pour de petits ou de très grands Wi.

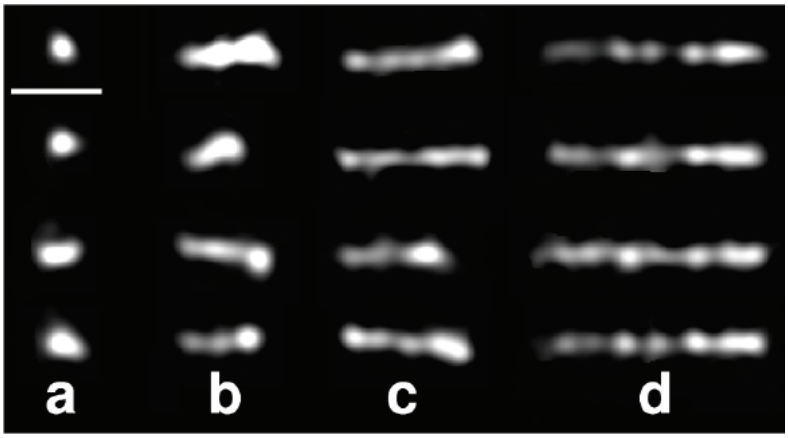



**Figure 1.26: Configurations au cours du temps (de haut en bas) de molécules d'ADN dans des écoulements de cisaillement caractérisés pas différents nombres de Weissenberg : a) équilibre (Wi = 0) b) Wi = 5,1 c) Wi = 14,5 d) Wi = 110. La barre correspond à 5 µm.**

Cette étude montre que pour obtenir des molécules d'ADN d'une longueur de 9 à 12 µm, il faut un écoulement de Wi allant de 15 à 110, ce qui correspond à un taux de cisaillement allant de 35 à 280 $s^{-1}$.

# 3 Interaction polymère-membrane : déformation d'une membrane par un polymère greffé sur une paroi

Dans le monde du vivant, les membranes interagissent fréquemment avec des espèces macromoléculaires, ancrées sur la paroi ou présentes dans son voisinage. Les membranes interagissent par exemple avec le contenu de la matrice extracellulaire qui constitue un support pour le développement des cellules. Cette matrice est constituée notamment de collagènes, des protéines permettant la résistance des tissus aux tensions et de protéoglycanes, qui en constituent la substance fondamentale. L'interaction des membranes avec les polymères joue également un rôle important en pharmacologie, à travers notamment les liposomes furtifs, qui passent "inaperçus" à travers le système immunitaire de l'organisme grâce au greffage de polymères sur leur membrane (89, 90). D'autre part, les polymères modifient la géométrie de vésicules cylindriques monolamellaires ou multilamellaires (formation d'hélices ou de perles : (37, 91)).

D'un point de vue théorique, on connaît bien le comportement des polymères au voisinage des interfaces ou confinés entre deux parois, comme nous l'avons vu dans les sections 2.2 et 2.3. Des travaux récents dans l'équipe ont également mis en évidence que ces différentes interactions peuvent être exprimées par la pression que le polymère exerce sur une interface (92). Les formes mathématiques de ces profils de pression étant désormais connues, il est possible de calculer les déformations que les polymères induisent sur des membranes fluides. Nous rappelons ici ces prédictions théoriques pour les formes attendues dans la géométrie de chaîne confinée entre une paroi solide et une membrane, géométrie que nous avons réalisée expérimentalement et que nous rediscuterons au chapitre 5.

## 3.1 Description du système

Nous considérons ici la situation expérimentale montrée sur la figure 1.27 : un polymère greffé sur une surface par une de ses extrémités est enveloppé par une membrane qui adhère sur la surface de manière non spécifique. La membrane est considérée comme infiniment mince, de rigidité $\kappa$, adhérant au substrat avec une énergie $W$. La présence de la surface ainsi que celle de la membrane réduisent les conformations possibles pour le polymère. Celui-ci repousse donc la membrane afin de maximiser son entropie

conformationnelle. Quant à la membrane, elle maximise sa surface d'adhésion et minimise sa densité de courbure et de tension.

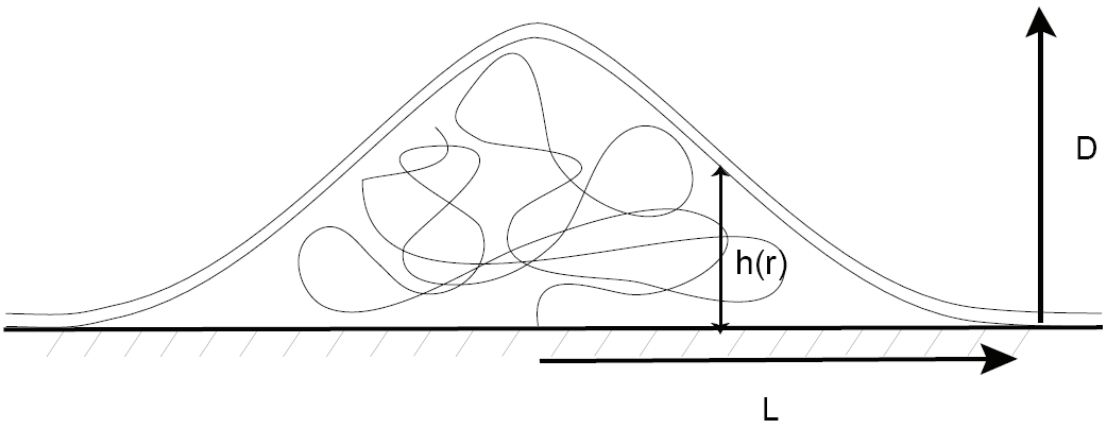



**Figure 1.27 : Polymère greffé sur une surface confiné sous une membrane**

Les formes de la membrane et du polymère sont donc déterminées par l'équilibre entre plusieurs forces : élasticité de courbure, forces liées au confinement du polymère, forces adhésives et éventuellement tension latérale. En pratique, la forme de la membrane qui respecte l'équilibre entre ces forces peut être trouvée en minimisant $\Delta F = F_{courb} + F_{conf} + F_{adh} + F_{tens}$ , combinaison de différentes contributions énergétiques :

- $F_{courb,}$ coût en énergie de la courbure de la membrane sur le rayon L.
- $F_{conf}$, coût entropique dû au confinement du polymère entre la membrane et le substrat
- $F_{adh}$, perte d'énergie d'adhésion de la membrane en raison du décollement induit par la présence du polymère.
- $F_{tens}$, coût en énergie dû à la tension dans la membrane.

## 3.2 Les différents régimes de confinement pour le polymère

Le coût énergétique associé à la géométrie de confinement du polymère de la figure 1.27 peut être compris de la façon suivante. Prenons comme point de départ un polymère greffé sur une paroi et une membrane non déformée, à une distance infinie de la paroi. Approchons d'abord la membrane de la paroi, sans modifier sa courbure. Ceci conduit au confinement du polymère entre deux parois planes. Le coût énergétique $F_{parois}(D)$ peut être calculé exactement dans ce cas pour des polymères gaussiens (voir section 2.3). Dans l'étape suivante, nous conservons la distance D comme distance maximale entre la

membrane et le substrat mais effectuons une déformation de la membrane conduisant au profil *h(r)*. Pour effectuer cette déformation, nous devons i) payer un coût énergétique de courbure de la membrane :

$$F_{courb} = \frac{\kappa}{2}\int_0^L dS\left(\Delta_r h\right)^2 \tag{1.19}$$

où $\Delta_r$ est le Laplacien en coordonnées cylindriques et ii) combattre la pression du polymère sur la paroi supérieure, avec un coût annexe :

$$F_{pression} = \int_0^L dSp(r)(D - h(r)) \tag{1.20}$$

où *p(r)* est la pression. La déformation ainsi induite conduisant au contact entre la membrane et la paroi, nous gagnons une énergie adhésive :

$$F_{adh} = -\left(S - \pi L^2\right)W \tag{1.21}$$

où $S_0$ est la surface totale de contact et $\pi L^2$ la surface décollée.

Si la membrane est soumise à des contraintes latérales, cela engendre aussi une tension qui contribue au coût énergétique total :

$$F_{tens} = \frac{\sigma}{2}\int dS\left(\nabla h(r)\right)^2 \tag{1.22}$$

Le confinement subi par le polymère est une fonction de trois paramètres essentiels : l'indice de polymérisation N, la rigidité de la membrane $\kappa$ et l'énergie d'adhésion *W*. Nous décrirons ci-après différents régimes de confinement en fonction de ces paramètres. L'énergie ΔF à minimiser s'écrit explicitement, en unités où $k_BT$ = 1 :

$$\begin{aligned}\Delta F\left[h(r),L\right] &= F_{parois}\left(D\right) + \int_0^L dSp(r)\left(D - h(r)\right) + \frac{\kappa}{2}\int_0^L dS\left(\Delta_r h\right)^2 \\ &+ \frac{1}{2\delta_\sigma^2}\int dS\left(\nabla h(r)\right)^2 + \pi\frac{L^2}{\delta_w^2}\end{aligned} \tag{1.23}$$

Le premier terme décrit l'énergie nécessaire pour confiner le polymère entre deux plaques parallèles. Le deuxième terme décrit la correction à l'énergie nécessaire pour confiner le polymère non pas entre deux plaques parallèles mais dans le volume fermé représenté sur la figure 1.27, p(r) étant la pression en unités $k_BT$ que le polymère exerce sur la membrane. Le troisième terme est l'énergie d'Helfrich, qui représente le coût en énergie de courbure de la membrane par rapport à son état non déformé ; $\kappa$ est le module de courbure de la membrane, écrit ici en unité $k_BT$. Le quatrième terme prend en compte les effets de tension, avec $\delta_\sigma^2 = k_BT/\sigma$. Le cinquième terme représente l'augmentation d'énergie nécessaire pour décoller la membrane de la zone sur laquelle se trouve le polymère, il exprime une perte d'énergie d'adhésion, avec $\delta_w^2 = k_BT/W$.

La forme *h(r)* de la membrane confinant un polymère peut donc être calculée en minimisant l'énergie : $\delta F / \delta h(r) = 0$. Nous reviendrons sur les méthodes analytiques et numériques d'extraction du profil *h(r)* au chapitre "Déformation d'une membrane phospholipidique par une molécule d'ADN unique" lorsque nous ajusterons nos résultats expérimentaux avec des courbes théoriques. Ici, nous présentons les arguments d'échelle correspondants qui permettent de comprendre intuitivement les principaux régimes de confinement. Il est aisé de voir que pour les profils présentant les caractéristiques géométriques de la figure 1.27, l'équation (1.23) a la forme d'échelle :

$$F \approx \kappa \frac{D^2}{L^2} + \frac{R_g^2}{D^2} + \frac{L^2}{\delta^2} + \frac{D^2}{\delta_\sigma^2} A(L) \qquad (1.24)$$

où $A(L) \approx 1/\ln(L/D)$ exprime une variation faible du terme de tension avec la taille du patch. Cette énergie doit être minimisée par rapport à D et à L, avec les paramètres de contrôle $\kappa$, $\delta$, $\sigma$ et $R_g$.

Lorsque la tension $\sigma$ est négligeable, on obtient (92) :

$$D \approx R_g (\delta / R_g)^{1/3} \kappa^{-1/6} ; \qquad (1.25)$$

$$L \approx R_g (\delta / R_g)^{2/3} \kappa^{1/6} \qquad (1.26)$$

En pratique, la chaîne est confinée en l'absence de tension lorsque $D \leq R_g$, soit pour $\delta_w / R_g \leq \kappa^{1/2}$. L'augmentation de l'énergie d'adhésion - diminution de $\delta_w$ - conduit à une diminution de la taille du patch L qui devient de l'ordre du rayon de giration de la chaîne pour $\delta_w / R_g \approx \kappa^{-1/4}$. Des forces adhésives supérieures conduisent au confinement latéral de la chaîne ($L << R_g$), la bulle de confinement devenant proche d'une forme de sphère ($D \approx L$) lorsque $\delta_w / R_g \approx \kappa^{-1}$. Lorsque la tension $\sigma$ est importante, soit $\delta_\sigma$ petit, on obtient

$$D \approx R_g \left( \delta_\sigma / R_g^2 \right)^{1/2} \qquad (1.27)$$

$$L \approx D \frac{\delta_w}{\delta_\sigma} = R_g \left( \frac{\delta_w^2}{\delta_\sigma R_g} \right)^{1/2} \qquad (1.28)$$

Nous testerons la validité de ces prédictions en les comparant dans la mesure du possible avec les résultats expérimentaux du chapitre 4.

# *Chapitre 2*

# *Matériel et techniques expérimentales*

L'objectif de ce travail est d'étudier expérimentalement les interactions entre une membrane et un polymère. Nous avons choisi pour cette étude l'ADN, un polymère biologique présentant de nombreux avantages : monodisperse en taille, facile à greffer de façon reproductible et avec une densité de greffage contrôlable, peu coûteux. Un moyen simple d'amener une membrane au contact de molécules d'ADN est de greffer ces molécules sur une surface et de déposer ensuite des vésicules capables d'adhérer sur cette même surface. Les molécules d'ADN sont ainsi emprisonnées entre la membrane des vésicules et le substrat. L'intérêt d'un tel système est qu'il est aisément observable par des techniques adaptées à l'étude des surfaces. Notre but est d'étudier les déformations induites par le polymère sur la membrane et de les comparer à nos prévisions théoriques. D'autre part, nous nous intéressons aux effets de l'étalement de la vésicule lors de son adhésion sur le comportement des ADN situés au voisinage. Deux techniques de microscopie nous permettront de mener à bien cette étude : la microscopie par contraste interférentiel en réflexion (RICM), qui permet de visualiser la membrane à proximité de la surface et la microscopie de fluorescence qui permet de voir les molécules d'ADN fluorescentes.

Dans ce chapitre, nous décrirons de manière détaillée comment sont constitués nos échantillons et la façon dont nous les préparons. Nous présenterons ensuite les techniques de microscopie énumérées dans le paragraphe ci-dessus, avant de décrire un nouveau dispositif expérimental que nous avons développé dans l'équipe, et qui permet d'observer des échantillons simultanément en RICM et en fluorescence.

# 1 Les matériaux utilisés

Nous décrirons dans cette partie les matériaux de base utiles à notre étude : colle moléculaire (couple biotine-streptavidine), les molécules d'ADN et les phospholipides.

## 1.1 La colle moléculaire

Que ce soit pour greffer l'ADN sur la surface ou pour rendre les vésicules adhésives, nous avons utilisé une méthode de « collage » faisant appel à deux molécules biologiques, la biotine et la streptavidine. Ces deux molécules forment un couple ligand-récepteur doté d'une très faible constante de dissociation : $10^{-15}$ M (93).

La biotine, connue également sous le nom de vitamine H, est un composé bicyclique non aromatique de formule $C_{10}H_{16}N_2O_3S$ (figure 2.1). Elle a été découverte dans le foie et le lait, mais elle existe aussi dans les levures, les céréales et dans toutes les cellules vivantes. La streptavidine est une molécule complémentaire de la biotine avec laquelle elle forme un couple ligand-récepteur. La streptavidine est produite par une bactérie, *Streptomyces avidinii*

(figure 2.1). Son poids moléculaire est de 60 kDa. Son association avec la biotine met à contribution des interactions hydrophobes, de nombreux ponts hydrogène, et un verrouillage par une boucle peptidique qui vient se refermer sur le substrat. Elle possède une structure quaternaire : c'est un tétramère de quatre chaînes identiques d'acides aminés pourvues chacune d'un site pour lier une biotine. Autrement dit, la streptavidine peut aisément faire le pont entre deux molécules biotinylées (et même entre trois ou quatre).

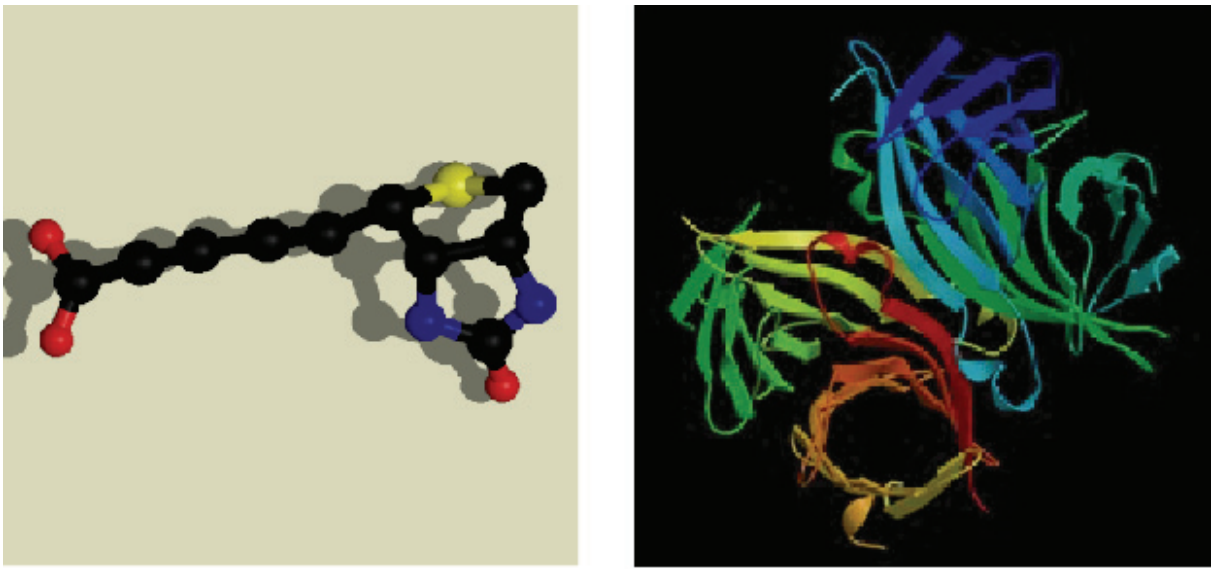


**Figure 2.1 : A gauche : molécule de biotine. A droite : molécule de streptavidine.**

## 1.2 Les molécules d'ADN "collantes"

Dans nos travaux, nous avons choisi de travailler sur l'ADN du phage λ. Les bactériophages ou phages sont des virus dont les hôtes habituels sont les bactéries, dans lesquelles ils se reproduisent. Chez certaines espèces bactériennes, les bactériophages jouent un rôle important dans la transmission des informations génétiques d'une bactérie à une autre, et peuvent être responsables de la diffusion des facteurs de résistance aux antibiotiques. Dans d'autres cas, la présence d'un phage à l'intérieur d'une bactérie peut donner lieu à la manifestation de caractères nouveaux, qui sont l'expression des gènes du phage qui parasite la bactérie.

Le phage λ, quant à lui, est constitué de deux parties : i) la tête du phage qui renferme l'ADN et ii) la queue du phage qui permet au virus de se fixer sur la cellule-hôte bactérienne. L'ADN contenu dans le phage est double brin, linéaire et d'une longueur de 48502 bases. Les extrémités de cet ADN sont simple brin sur une longueur de 12 nucléotides et complémentaires l'une de l'autre.

Lorsque le phage injecte son ADN dans la cellule-hôte, *E. coli*, celui-ci se circularise, par complémentarité des extrémités. Une ligase bactérienne scelle les brins. Cet ADN n'est pas intégré dans l'ADN bactérien mais reste dans le cytoplasme.

L'ADN du phage lambda s'achète sous forme circulaire, mais il est relativement aisé de le linéariser en le chauffant (cf. section 2). Il est ensuite possible de fonctionnaliser l'une des extrémités des molécules d'ADN avec une molécule de biotine. Par ailleurs, on peut préparer des surfaces couvertes de molécules de streptavidine. En déposant les ADN sur ces surfaces, on obtient un tapis de molécules d'ADN dont on peut contrôler la densité surfacique moyenne. Les concentration de molécules d'ADN que nous avons utilisées sont telles que beaucoup de streptavidines restent libres et donc accessibles à d'autres molécules de biotine. Nous les utilisons pour faire adhérer les vésicules, comme nous l'expliquons dans la section suivante.

Il est également possible de rendre l'ADN fluorescent, ce qui rend son observation possible au microscope optique. Nous détaillerons ce mode d'observation dans la section 3.2.

## 1.3 Les vésicules adhésives

Pour faire adhérer des vésicules sur une surface de verre, nous utilisons à nouveau le couple biotine-streptavidine. Comme expliqué précédemment, les surfaces fonctionnalisées avec de la streptavidine sur lesquelles nous greffons l'ADN sont utilisables telles quelles pour faire adhérer les vésicules. Il suffit d'insérer également de la biotine dans la membrane des vésicules pour les rendre adhésives sur ces surfaces.

La membrane des vésicules est constituée de phospholipides, des molécules amphiphiles qui s'assemblent en bicouches en présence d'eau. Un phospholipide que l'on utilise couramment pour fabriquer des liposomes est le 1,2-Dioleoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphocholine (DOPC), dont la structure est représentée sur la figure 2.2. Ce lipide contient deux queues composées chacune de 18 carbones. Chaque queue contient une double liaison en position 9.

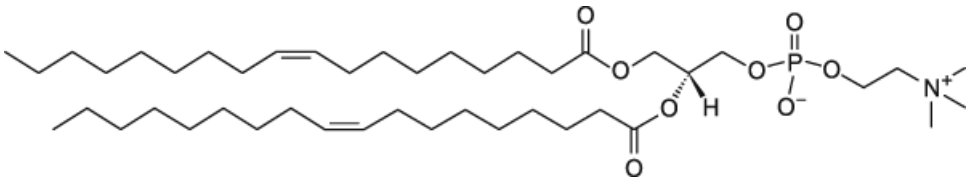



**Figure 2.2 : Structure du 1,2-Dioleoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholine (DOPC).**

De nombreux phospholipides différents sont disponibles sur le marché. Certains d'entre eux peuvent être associés pour former des membranes. Le DOPC peut par exemple être mélangé avec du 1,2-Distearoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphoethanolamine (DSPE). On trouve également sur le marché des lipides fonctionnalisés avec différents groupes chimiques, comme des fonctions carboxyles, amines, … ou des molécules fluorescentes, que ce soit sur la tête ou sur la queue.

Le DSPE peut être fonctionnalisé avec une molécule de biotine sur sa tête polaire. En l'associant au DOPC, on obtient ainsi des vésicules dont la membrane contient de la biotine. Les têtes étant en contact avec l'eau, un certain nombre de molécules de biotine se trouvent à l'extérieur de la vésicule et sont accessibles pour former des liaisons avec des streptavidines.

Afin de rendre les biotines les plus accessibles possibles aux streptavidines, un espaceur (polyéthylèneglycol) est inséré entre la tête du phospholipide et le groupement biotine. La structure de ce phospholipide, appelé 1,2-Distearoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphoethanolamine-N-[Biotinyl(Polyethylene Glycol)2000] (DSPE-PEG(2000)Biotin), et disponible chez Avanti Polar Lipids, est représentée sur la figure 2.3.

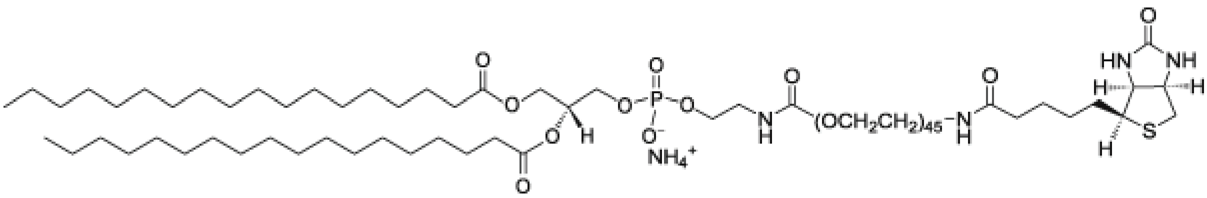



**Figure 2.3 : Structure du 1,2-Distearoyl-sn-Glycero-3-Phosphoethanolamine-N-[Biotinyl(Polyethylene Glycol)2000]**

On peut faire varier la quantité de biotine présente dans la membrane, et ainsi réguler la force d'adhésion de la vésicule sur le substrat. On utilise toujours une forte proportion de DOPC et une quantité plus faible de DSPE-PEG(2000)Biotin, car c'est suffisant pour garantir l'adhésion. Avec par exemple un DSPE-PEG(2000)Biotin pour cinquante DOPC, noté 1:50, l'adhésion est très forte. Lors de nos expériences, nous avons essentiellement utilisé des vésicules dont la proportion de lipides biotinylés/lipides non-biotinylés varie de 1:50 à 1:5000. Nous verrons comment la force d'adhésion varie en fonction du taux de biotine dans la membrane dans la section 3.1.2.

Nous allons dans la section suivante détailler les protocoles permettant de :

- préparer des surfaces couvertes de streptavidine
- linéariser, fonctionnaliser et greffer des molécules d'ADN
- préparer des vésicules adhésives.

# 2 Protocoles expérimentaux

## 2.1 Préparation des vésicules par électroformation

### 2.1.1 Sensibilité des vésicules à la pression osmotique

Les bicouches de molécules amphiphiles sont perméables vis-à-vis des molécules d'eau. Les vésicules sont donc très sensibles à la pression osmotique du milieu dans lequel elles se trouvent.

Considérons une membrane, dite membrane semi-perméable, qui sépare deux milieux ayant des concentrations de soluté différentes et qui est perméable aux molécules d'eau mais pas aux molécules de soluté. L'eau diffusera de la solution la moins concentrée vers la solution la plus concentrée. Ce phénomène qui tend à égaliser la concentration des deux milieux est appelé osmose. La pression osmotique, ou osmolarité, d'une solution peut être définie comme sa capacité à gagner des molécules d'eau lorsqu'elle est séparée d'un réservoir d'eau pure par une membrane semi-perméable. Ainsi, si une membrane semi-perméable sépare deux solutions ayant des pressions osmotiques différentes, les molécules d'eau diffuseront de la solution ayant la pression osmotique la plus faible vers la solution ayant la pression osmotique la plus forte.

Les deux milieux qui se trouvent à l'intérieur et à l'extérieur des vésicules peuvent avoir des pressions osmotiques différentes. La membrane des vésicules se comportant comme une membrane semi-perméable, la forme des vésicules en solution aqueuse dépend fortement des valeurs relatives de ces pressions osmotiques. Si les vésicules sont plongées dans un milieu dont la pression osmotique est supérieure à celle qui règne en leur sein, l'eau diffuse de l'intérieur vers l'extérieur des vésicules. L'équilibre est atteint lorsque les deux pressions osmotiques deviennent égales. Dans ce cas de figure, la vésicule se dégonfle et devient flasque. La membrane a alors une tension très basse. Si les vésicules sont plongées dans un milieu dont la pression osmotique est inférieure à celle qui règne en leur sein, l'eau diffuse de l'extérieur vers l'intérieur des vésicules. Celles-ci gonflent et l'équilibre est atteint lorsque la tension de la membrane compense la différence de pression osmotique entre les deux milieux. Dans ce cas de figure, la membrane est mise sous tension. Les vésicules sont sphériques. Si les vésicules sont plongées dans des solutions très diluées, dont la pression osmotique est très faible, il peut arriver que les membranes se tendent jusqu'à dépasser les limites de leur cohésion et qu'elles se rompent. Dans ce cas, les vésicules explosent : elles sont détruites par choc osmotique.

Lorsque nous préparons des vésicules, nous contrôlons l'osmolarité de la solution dans laquelle elles se forment, ainsi que celle de la solution dans laquelle on les dilue pour les observer. Les osmolarités de ces deux solutions doivent être très proches. Une petite

différence (de l'ordre de quelques pourcents) est souhaitable afin de rendre les vésicules plus molles, ce qui facilite l'adhésion. Nous avons effectué toutes les mesures d'osmolarité sur un osmomètre Osmomat 030 de chez Gonotec, Allemagne.

### 2.1.2 Méthode de fabrication

Il existe plusieurs méthodes pour fabriquer des vésicules (cf. chapitre "Introduction"). La plus efficace est l'électroformation (94), qui permet de préparer des vésicules géantes unilamellaires en quelques heures.

Les lipides sont solubles dans le chloroforme. On utilise un mélange de DOPC et de DSPE-PEG(2000)biotin de proportion contrôlée, comme expliqué dans la section précédente. Les lipides proviennent de chez Avanti Polar Lipids, et sont vendus soit sous forme de poudre, soit dilués dans du chloroforme. On travaille avec des concentrations en lipides de l'ordre de 1 mg/ml.

Afin de préparer des vésicules, on prélève quelques dizaines de microlitres de la solution de phospholipides et on les dépose sur une surface de verre métallisé à l'oxyde d'indium-étain (Indium Tin Oxide, ITO) de 4 $cm^2$ environ. Le dépôt est fait à l'aide d'une seringue sur la face conductrice de la lame. On dépose une goutte de solution et on l'étale sur la surface jusqu'à évaporation du solvant. On renouvelle l'opération jusqu'à ce que l'ensemble de la lame soit recouvert d'un film qui présente un aspect irisé à la lumière. La lame de verre est alors recouverte par une seconde lame, elle aussi conductrice, les deux faces conductrices étant scellées en vis-à-vis avec une cire inerte (Vitrex, Danemark), de manière à former une cellule fermée d'environ 1 mm d'épaisseur. Cette cellule est remplie avec une solution aqueuse de sucrose de concentration 0,15 M, rendue étanche, et branchée à un générateur de tension. On impose une tension alternative d'une amplitude de 1,5 V et d'une fréquence de 10 Hz (figure 2.4). On laisse la cellule branchée quelques heures, puis on en récupère le contenu à l'aide d'une seringue. Les vésicules sont prêtes.

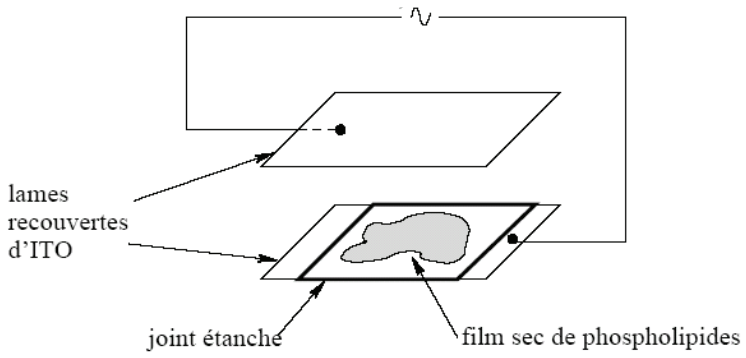



**Figure 2.4 : Schéma du montage permettant de fabriquer les vésicules**

## 2.2 Fonctionnalisation de surfaces de verre avec de la streptavidine

Nos surfaces fonctionnalisées avec de la streptavidine sont obtenues en déposant successivement trois couches moléculaires : un silane aminé, du glutaraldéhyde et de la streptavidine.

### 2.2.1 Solutions tampon

Les protocoles expérimentaux qui suivent requièrent l'utilisation de plusieurs solutions tampon. En effet, presque toutes les molécules biologiques comme les protéines et les acides nucléiques ont des groupes fonctionnels chargés, par exemple les groupes carboxyle et amine. En solution aqueuse, ces groupes fonctionnels peuvent subir des réactions acido-basiques et les propriétés des molécules peuvent varier en fonction de l'acidité du solvant. Dans le cadre de notre étude, on peut s'attendre à ce que les groupes chargés phosphate et hydroxyde de l'ADN notamment soient impliqués dans des réactions acide-base. De telles réactions modifieraient le système de façon incontrôlable. On peut prévenir ce problème en conservant le pH constant. Ceci nécessite l'utilisation de différentes solutions tampon dont le pH est indiqué dans le tableau 1.

| Solution tampon | pH |
|---|---|
| Phosphate buffer saline (PBS) | 7,4 |
| Tris Borate EDTA (TBE) | 8,4 |
| Tris EDTA | 7-8 |

**Tableau 1 : pH des solutions tampon utilisées dans nos expériences**

### 2.2.2 Préparation de surfaces silanisées

La silanisation est effectuée sur des lames de verre couvre-objet pour permettre l'observation au microscope optique. La forme et la taille des lames (carrée, rectangulaire, …) est choisie en fonction de la forme de la cellule d'observation. On utilise des portoirs pour lamelles couvre-objets en céramique qui supportent l'immersion dans les différents solvants et dans l'acide sulfurique.

Avant de silaniser les lamelles, on les nettoie, par des procédés de plus en plus abrasifs. On les trempe tout d'abord dans de l'isopropanol, de l'acétone, puis de l'eau milli-Q (eau ultra pure fabriquée à partir d'eau distillée). Les lames sont ensuite plongées dans de l'eau milli-Q et passées aux ultrasons pendant trente minutes. La dernière étape consiste à laisser les lames pendant une heure dans une solution piranha. Il s'agit d'un mélange d'eau oxygénée $H_2O_2$ et d'acide sulfurique $H_2SO_4$ en proportion 1:1. Cette étape est très "agressive" pour le verre. Elle arrache tout ce qui se trouve sur la surface. L'inconvénient est

qu'après ce procédé, la surface du verre n'est pas lisse mais pleine de reliefs. Les lames sont ensuite abondamment rincées à l'eau. Le nettoyage est terminé.

La silanisation proprement dite consiste à laisser les lames pendant deux heures dans une solution contenant 5% de 3-aminopropyltriethoxysilane, provenant de chez Sigma, et 95% d'éthanol. A la fin de la silanisation, on rince les lames à l'éthanol, de manière à éliminer toutes traces de solution de silane. Il faut en effet éviter au maximum les contacts entre le silane et l'eau, sinon un précipité se forme et le traitement de surface échoue. Les lames sont ensuite rincées à l'eau milli-Q, puis séchées au four à 80°C pendant quelques heures. Elles peuvent être ensuite conservées dans un dessiccateur pendant plusieurs mois.

### 2.2.3 Fonctionnalisation avec la streptavidine

La silanisation est effectuée sur la lame entière et sur les deux faces, puisque les lames sont trempées dans la solution. En ce qui concerne les étapes suivantes, on procède différemment. On ne fonctionnalise qu'une petite partie de la lame (un disque d'environ 0,8 cm de diamètre), car on ne dispose pas de suffisamment de glutaraldéhyde, de streptavidine et surtout d'ADN pour couvrir la totalité de la surface. On dépose environ 70 µL de glutaraldéhyde (figure 2.5), acheté chez Polysciences, sur la lame. La structure du glutaraldéhyde est représentée sur la figure 1.2. Après 30 minutes d'attente, on retire le glutaraldéhyde. On rince ensuite plusieurs fois avec une solution tampon de PBS (Sigma), de pH compris entre 6 et 7.

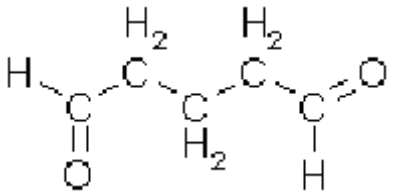


**Figure 2.5: Structure du glutaraldéhyde.**

L'étape suivante consiste à déposer de la streptavidine, provenant de chez Roche. On procède de la même manière qu'avec le glutaraldéhyde, mais cette fois l'attente est d'une heure. Le rinçage s'effectue avec une solution tampon de TBE, de pH 8,4.

## 2.3 Préparation et greffage de molécules d'ADN

Nous avons vu comment préparer des surfaces de verre pour le greffage de molécules d'ADN. Avant de procéder au greffage lui-même, une préparation de l'ADN est nécessaire :

- l'ADN du phage lambda est circulaire, il faut le linéariser.

- pour permettre à l'ADN de coller à la surface, il faut le fonctionnaliser avec de la biotine.
- l'ADN ainsi préparé doit être purifié afin d'éliminer tous les accidents de fabrication.

### 2.3.1 Préparation de l'ADN

L'association des bases par paires procure un outil très simple pour fonctionnaliser l'extrémité des molécules d'ADN par l'utilisation d'oligomères simples brin. Des oligomères comprenant jusqu'à 100 nucléotides sont disponibles sur le marché. Durant leur synthèse, il est possible d'ajouter une très grande variété de molécules différentes à l'une des extrémités de la séquence, comme par exemple la biotine, la digoxigenine, un thiol ou bien encore des molécules fluorescentes. En hybridant un oligomère à l'extrémité simple brin de l'ADN, on peut ainsi attacher divers types de molécules à l'extrémité de l'ADN.

L'ADN est fourni sous forme circulaire. Pour ouvrir la molécule d'ADN, on la chauffe à environ 75°C pendant 10 à 15 minutes. Comme le squelette de l'ADN n'est pas fermé, la double hélice se défait et on obtient un ADN linéaire. En refroidissant rapidement la solution sur de la glace, les molécules sont maintenues dans cette conformation linéaire. Les coupures sur chaque brin n'étant pas opérées face à face, la molécule est simple brin sur une longueur de 12 nucléotides à chaque extrémité. Les extrémités finales sont 5'.

Pour greffer de l'ADN sur une surface de verre, on utilise la très forte affinité de la streptavidine pour la biotine. La streptavidine est déjà accrochée aux surfaces que nous fabriquons, il reste donc à attacher des molécules de biotine à l'une des extrémités de l'ADN. Concernant l'autre extrémité des ADNs, on peut accrocher n'importe quelle molécule, exceptée la biotine, afin d'éviter que les molécules d'ADN ne s'accrochent à la surface par les deux extrémités. Nous avons la plupart du temps utilisé la digoxigenine (DIG), qui est complémentaire d'anti-DIG.

On achète chez MWG-biotech les oligomères complémentaires aux brins dénudés de la molécule d'ADN. L'un est équipé d'une molécule de biotine, l'autre d'une molécule de DIG. Pour hybrider ces oligomères avec les molécules d'ADN, on mélange la solution d'ADN, qui est diluée dans une solution tampon de TE et les deux oligomères. On chauffe à 50°C pendant une heure. Après avoir refroidi le mélange dans la glace, on rajoute une enzyme, la T4 DNA ligase (Roche). On laisse reposer à température ambiante pendant une heure. Les ADNs sont prêts à être greffés.

### 2.3.2 Purification de l'ADN

Pour la purification, on utilise des colonnes Nick, provenant de chez Amersham Biosciences, contenant un gel appelé Sephadex® G-50. Ce type de gel est très largement

employé en chromatographie de filtration sur gel. Il contient des billes poreuses dont le diamètre est de l'ordre de quelques dizaines de micromètres. Les billes sont très hydrophiles et gonflent dans l'eau.

Le principe de la chromatographie de filtration sur gel ou chromatographie d'exclusion est le suivant : on dépose un mélange de deux molécules (des grosses et des petites) sur une colonne remplie d'un gel de Sephadex®. Les petites molécules peuvent pénétrer dans les billes de Sephadex® car leur diamètre est inférieur à celui des pores du gel. Les grosses molécules ne le peuvent pas en raison de leur grande taille. Elles sont donc exclues du gel (d'où le nom de chromatographie d'exclusion).

Les molécules de taille supérieure à celle des pores des billes de Sephadex® sont totalement exclues du gel et ne se répartissent que dans le volume extérieur aux billes, c'est-à-dire dans la phase mobile (éluant). Elles sortent les premières.

Les molécules de taille inférieure à celle des pores des billes de Sephadex® peuvent pénétrer librement dans les billes et se répartissent dans l'ensemble des liquides de la colonne (volume de liquide à l'intérieur des billes ou phase stationnaire et volume de liquide à l'extérieur des billes ou phase mobile). Elles sortent les dernières.

Les molécules de taille intermédiaire pénètrent un peu dans les billes, en fonction de leur taille et de leur forme. Elles pénètrent d'autant moins qu'elles sont plus grosses et elles sont éluées dans l'ordre des masses molaires décroissantes.

En ce qui nous concerne, nous cherchons à conserver uniquement les molécules d'ADN auxquelles se sont accrochées les oligomères. Nous voulons éliminer :

- Les oligomères qui seraient restés célibataires : ce sont de petites molécules, elles restent dans le gel après la récupération de l'ADN purifié.
- Toutes les molécules d'ADN qui se seraient attachées entre elles, ou qui seraient restées circulaires : ce sont de grosses molécules, elles sortent les premières, dans l'échantillon que l'on jette.
- D'une manière générale toute impureté provenant de réactions chimiques imprévues et non souhaitées : elles sortent en premier ou restent dans le gel selon leur taille.

Les colonnes sont pourvues d'un capuchon supérieur et d'un capuchon inférieur. On retire le capuchon supérieur et on jette le liquide contenu dans la colonne. On verse 1 ml d'une solution tampon TE dans la colonne, puis on jette le liquide qu'elle contient. On retire ensuite le capuchon inférieur. On rince trois fois la colonne avec 1 ml de TE, en laissant cette fois la solution tampon s'écouler par le bas de la colonne.

On dépose 50 µL d'ADN dans la colonne, en faisant bien attention à le déposer sur le gel et pas sur les bords. On verse 400 µL d'une autre solution tampon, TBE. Pendant ce

temps, on récupère le liquide à la sortie et on le jette. Il contient les molécules que l'on veut éliminer. On verse à nouveau 400 µL de TBE et on récupère le liquide qui s'écoule : c'est l'ADN purifié, dont la concentration est d'environ 50 ng/µl. On le conserve au congélateur.

### 2.3.3 Greffage d'ADN sur une surface streptavidinée

Pour greffer de l'ADN sur une surface de verre, on utilise les surfaces streptavidinées dont nous avons décrit la préparation dans le paragraphe 2.2. On contrôle la densité de greffage des ADNs en :

- Diluant plus ou moins la solution
- Augmentant ou diminuant le temps de dépôt sur la surface (de trente minutes à une heure et demie)

Nous utilisons couramment une solution diluée 25 fois : on mélange 10 µL d'ADN avec 3,8 µL de Yoyo-1 (dilué à 2%) et 245 µL de solution tampon TBE. Yoyo-1, achetée chez Molecular Probes, est une molécule fluorescente qui s'intercale entre les paires de bases de l'ADN et permet de l'observer en microscopie de fluorescence. La concentration ainsi obtenue, combinée à un temps de dépôt variable, nous permet de contrôler la densité surfacique, dont la moyenne est d'un ADN par 5 $\mu m^2$ . Après avoir retiré l'ADN, on rince plusieurs fois avec du TBE.

# 3 Techniques d'observation

Deux techniques de microscopie optique nous suffisent pour étudier nos échantillons. La microscopie par contraste interférentiel en réflexion, ou RICM, nous permet d'étudier l'état de la membrane des vésicules à proximité de la surface. La microscopie de fluorescence, quant à elle, nous permet d'observer les molécules d'ADN.

## 3.1 RICM

### 3.1.1 Principe de fonctionnement

La microscopie par contraste interférentiel en réflexion est une technique optique utilisée principalement dans les domaines de la biologie cellulaire, de l'étude des surfaces et du mouillage. C'est une technique de choix pour l'étude de certains phénomènes d'interaction entre deux surfaces très proches comme par exemple l'adhésion. Le cas qui nous intéresse est celui de l'observation d'une membrane au voisinage d'une lame de verre avec une solution aqueuse interstitielle.

Considérons le cas d'une vésicule géante au voisinage d'une lame de verre. La distance vésicule-substrat est déterminée par les multiples forces en présence : gravité,

force répulsive de Helfrich, forces de Van der Waals, et forces électrostatiques. Si cette distance est suffisamment faible, typiquement de l'ordre de la longueur d'onde lumineuse d'observation, un éclairage en réflexion génère des interférences entre le faisceau réfléchi par la lamelle et celui réfléchi par la membrane. De nombreuses informations sont contenues dans ces interférences. Cette technique a par exemple été utilisée en biologie pour l'observation qualitative de cellules sur un substrat de verre. Des résultats plus quantitatifs ont été obtenus : l'épaisseur de la membrane de la vésicule a été mesurée, ainsi que le profil en trois dimensions de la membrane au voisinage du substrat.

La configuration expérimentale est représentée sur la figure 2.6. La vésicule est observée avec une lumière incidente monochromatique. Les coefficients ni et nj sont les indices de réfraction des couches i et j, à l'interface desquelles a lieu la réfraction. Dans notre cas, l'indice de réfraction du verre vaut $n_0$=1,49, celui de la solution aqueuse interstitielle vaut $n_1$=1,33 et celui de la membrane vaut $n_2$=1,5.

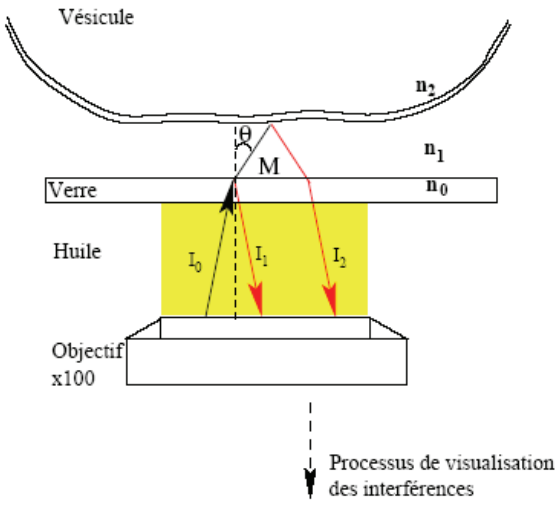



**Figure 2.6 : Principe de l'observation en RICM**

Le rayon incident donne naissance à deux rayons réfléchis d'intensités $I_1$ et $I_2$, de phases $\Phi_1$ et $\Phi_2$. On note θ l'angle d'incidence et h(M) la distance verre-membrane au point M repéré dans le plan de la lame de verre (figure 2.7).

Pour des objets tels que ceux que l'on étudie, l'intensité lumineuse réfléchie aux interfaces verre-eau et eau-membrane est très faible et comparable aux réflexions parasites qui se produisent sur les surfaces internes de l'objectif. Il est donc nécessaire d'améliorer le contraste des figures d'interférence en éliminant les rayons parasites. Pour cela, on place un polariseur après la source lumineuse, une lame quart d'onde à la sortie de l'objectif, et un analyseur sur le trajet retour de la lumière, avant l'optique de visualisation. Après avoir traversé l'objectif, le rayon est polarisé circulairement. Les rayons réfléchis par les interfaces traversent une deuxième fois la lame quart d'onde et sont donc à nouveau polarisés

linéairement, avec un déphasage de 90° par rapport au rayon incident. Ainsi, un analyseur orienté à 90° par rapport au polariseur, placé avant l'oculaire, laisse passer la lumière polarisée provenant de l'objet observé, mais pas les rayons issus de réflexions parasites dans l'objectif. Le schéma du montage expérimental est représenté sur la figure 1.4.

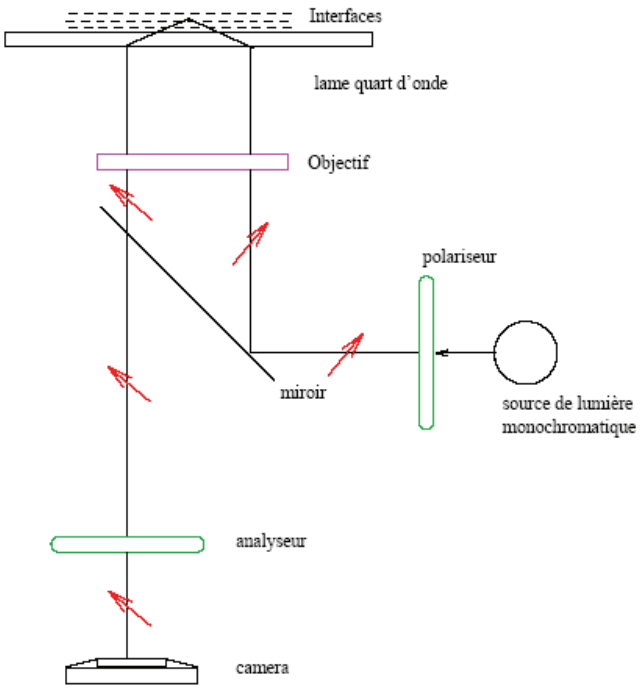



**Figure 2.7 : Schéma montrant le parcours des rayons lumineux à travers le microscope optique dans le cas d'une utilisation en mode RICM**

L'utilisation de cette technique pour l'observation de membranes lipidiques au voisinage d'un substrat est bien documentée. On se place ici dans une configuration expérimentale simplificatrice : l'ouverture numérique est réduite au maximum par la fermeture importante du diaphragme d'ouverture. On est ainsi proche des conditions d'incidence normale.

L'intensité totale réfléchie est une fonction sinusoïdale de la distance h entre la membrane et le substrat. Elle s'écrit :

$$I(h) = I_1 + I_2 + 2\sqrt{I_1 I_2}\cos(2kh + \delta) \qquad (2.1)$$

où $I_1$, $I_2$ et δ se calculent à partir des indices de réfraction de l'eau, du verre et de la membrane, et k est le nombre d'onde dans le fluide interstitiel. La figure 2.8 montre l'allure générale de la fonction théorique $I(h)/I_0$ en fonction de la distance h entre la membrane et le substrat.

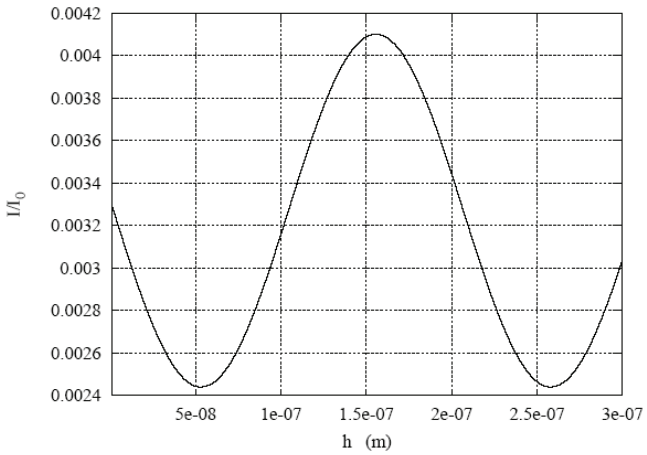



**Figure 2.8 : Intensité lumineuse théorique normalisée par rapport à $I_0$ et exprimée en fonction de la distance h membrane-substrat.**

La figure 2.9 montre deux images typiques de vésicules géantes au voisinage d'une lame de verre. L'image de gauche montre une vésicule plutôt tendue tandis que l'image de droite représente une vésicule plus flasque. Lorsque la vésicule est tendue, l'interaction verre-membrane modifie très peu la forme de la vésicule ; au contraire, lorsque la tension de la membrane est suffisamment faible, l'interaction verre-membrane déplie une partie de la surface cachée, créant une région où la membrane est parallèle au substrat. Dans cette région, la membrane reste fluctuante ; l'adhésion est très faible et un film d'eau sépare la membrane du substrat. Les anneaux que l'on observe sur les deux images représentent les lignes de niveau qui vont permettre de calculer le profil à 3 dimensions de la membrane. Il est également possible de calculer l'épaisseur de la membrane à partir du contraste de l'image.

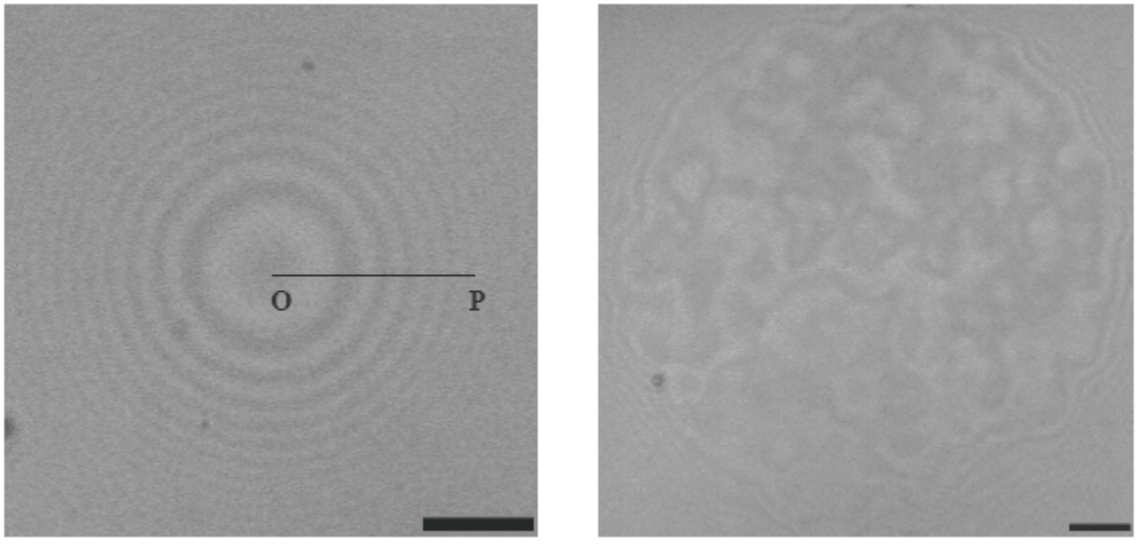



**Figure 2.9 : Photographies de vésicules en RICM. A gauche : vésicule tendue. A droite : vésicule fluctuante. Barre = 5 µm.**

Notons que tous ces calculs sont simplifiés par l'utilisation d'un logiciel d'acquisition et de traitement d'image, qui récupère les images de la caméra et donne accès à l'intensité de chaque pixel sous la forme d'une valeur entière comprise entre 0 et 255 : le ton de gris du pixel.

### 3.1.2 Méthodes d'analyses de données

- Détermination du profil d'une vésicule

La détermination du profil d'une vésicule est relativement simple ; considérons la vésicule représentée à gauche sur la figure 2.9. Comme dans tout phénomène d'interférences, la succession entre une frange claire et une frange sombre (ou inversement) correspond à une variation de la différence de marche entre les deux faisceaux qui interfèrent, de $\lambda/2n$. Dans le cas particulier qui nous intéresse, cette différence de marche est obtenue pour une différence d'altitude de la membrane de $\lambda/4n_1$. Ainsi, une fois connue l'altitude du premier anneau, on peut calculer l'altitude de tout autre point de la vésicule, situé à une plus grande distance du centre que cet anneau de référence. La figure 2.10 montre une vésicule tendue et le profil de sa membrane à proximité du substrat.

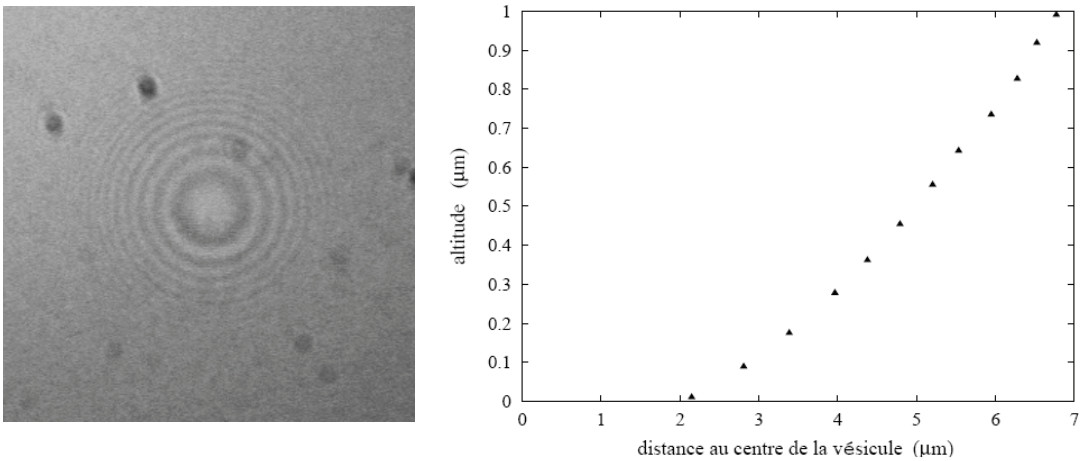



**Figure 2.10 : (a) Image RICM d'une vésicule tendue (b) Profil de la vésicule**

À partir de ce profil, on peut calculer le rayon de courbure $R_c$ de la membrane au voisinage de la paroi. On ajuste les points expérimentaux à un arc de cercle ; la hauteur h(x) pour un arc de cercle s'écrit :

$$h(x) = h_0 + R_c - \sqrt{R_c^2 - x^2} \qquad (2.1)$$

et $h_0$ est l'altitude du premier anneau (figure 2.11). Lorsqu'on compare le rayon $R_c$ ainsi calculé au rayon $R_0$ mesuré en transmission, on obtient en général une bonne adéquation dans le cas de vésicules tendues ; en revanche, dans le cas de vésicules flasques présentant une région de contact aplatie, le rayon de courbure obtenu peut dévier sensiblement de sa valeur observée en transmission.

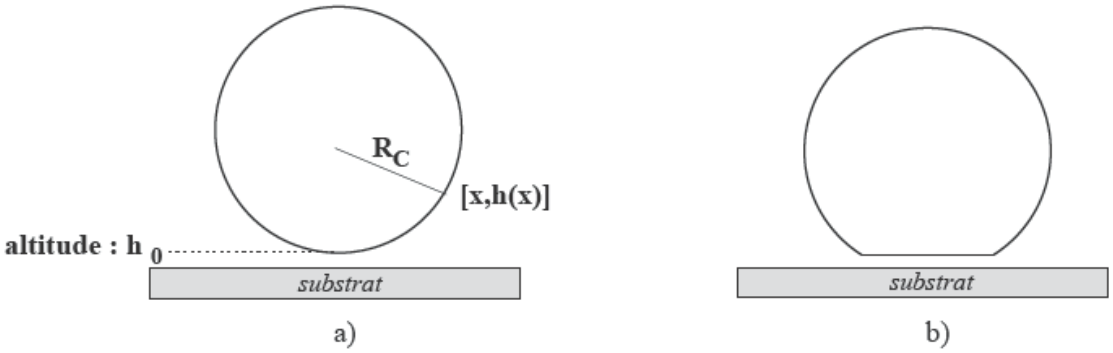



**Figure 2.11 : Schéma des vésicules de la figure 2.9**Erreur ! Source du renvoi introuvable. **vues de profil.**

- Mesure de l'épaisseur de la membrane

Il est également possible de mesurer l'épaisseur d de la membrane à partir de la formule du contraste :

$$\nu = \frac{I_{max} - I_{min}}{I_{max} + I_{min}} \tag{2.2}$$

On obtient :

$$\frac{I_{max} - I_{min}}{I_1} = \frac{8 r_{eau-membrane}}{r_{verre-eau}} \sin(kd) \tag{2.3}$$

$I_{min}$ et $I_{max}$ sont respectivement les intensités minimale et maximale de l'image. $r_{eau\text{-}membrane}$ et $r_{verre\text{-}eau}$ sont les coefficients de réflexion aux interfaces eau-membrane et verre-eau.

- Etude de l'adhésion

La technique RICM permet également d'étudier des vésicules qui ont adhéré sur une surface. Grâce à cette technique, on peut évaluer la force d'adhésion de la membrane sur le substrat, qui est à relier dans notre cas à la quantité de biotine présente dans la membrane.

Lorsqu'une vésicule a adhéré à une surface, on observe en RICM une zone gris foncé qui correspond à la région d'adhésion. Dans cette région, chaque pixel de l'image conserve une valeur constante au cours du temps : la distance membrane-substrat ne varie pas (dans la limite de la résolution de la technique). La forme du patch change en fonction de la force d'adhésion. Les figures 2.12, 2.13 et 2.14 montrent cette zone d'adhésion pour différents

taux de biotine : 1:500 (forte adhésion), 1:5000 (adhésion moyenne) et 1:50000 (adhésion plus faible).

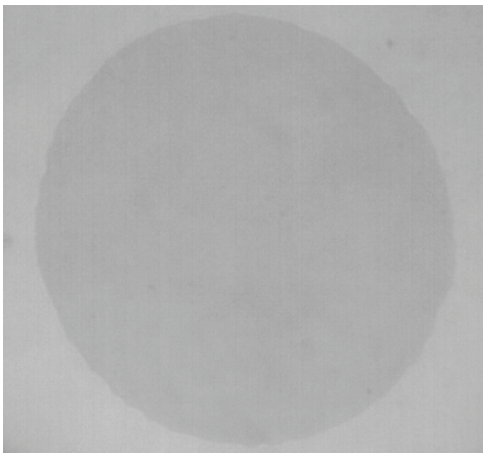


**Figure 2.12 : Zone d'adhésion d'une vésicule de taux de biotine 1:500.**

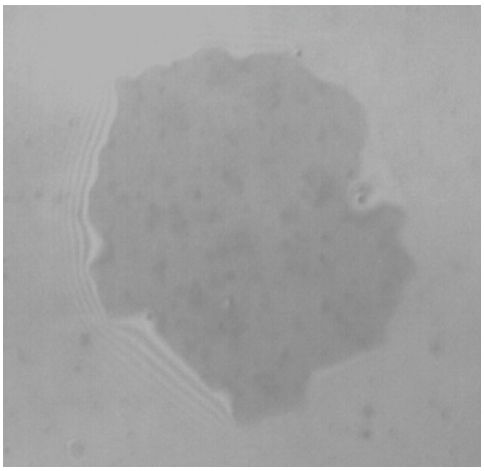


**Figure 2.13 : Zone d'adhésion d'une vésicule de taux de biotine 1:5000.**

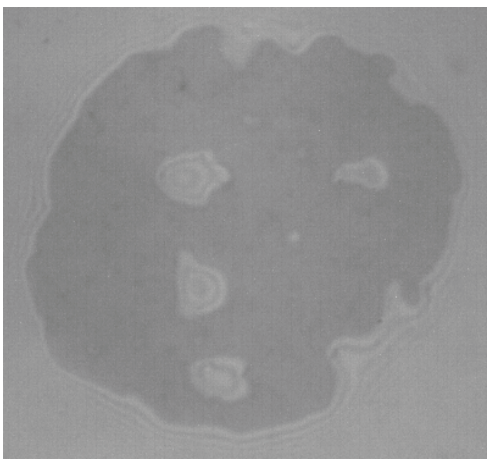


**Figure 2.14 : Zone d'adhésion d'une vésicule de taux de biotine 1:50000.**

On remarque que lorsque l'adhésion est forte, la zone de contact entre la membrane et le substrat est circulaire. Aucun anneau d'interférences n'est visible, ce qui signifie que la paroi de la vésicule est quasiment verticale au niveau du bord de la région d'adhésion. La vésicule a atteint une forme quasi-hémisphérique (figure 2.15).

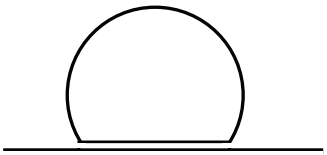


**Figure 2.15 : Schéma d'une vésicule adhérée qui a atteint une forme hémisphérique. En RICM, la zone d'adhésion d'une telle vésicule n'est entourée d'aucun anneau.**

Lorsque l'adhésion est plus faible, la zone de contact n'est plus circulaire, mais de forme plus irrégulière. Parfois ces irrégularités peuvent également être liées à la présence de molécules d'ADN lorsqu'il y en a. On voit également apparaître quelques anneaux autour de la zone d'adhésion.

Enfin, lorsque l'adhésion est vraiment plus faible, comme c'est le cas pour un taux de biotine de 1:50000, la membrane n'adhère pas complètement à la surface dans la région de contact : il existe des zones de non adhésion à l'intérieur du patch.

## 3.2 Microscopie de fluorescence

### 3.2.1 La fluorescence

Les molécules fluorescentes (fluorophores ou fluorochromes) sont généralement des hydrocarbures contenant des cycles aromatiques. Ce sont des molécules capables d'absorber une énergie lumineuse et d'émettre une radiation d'énergie plus faible, c'est-à-dire de longueur d'onde plus grande, après un temps de l'ordre de la nanoseconde.

La conformation des molécules fluorescentes leur permet d'être liées de manière covalente à d'autres molécules sans perdre leur propriété de fluorescence. Elles jouent ainsi le rôle de sonde ou de marqueur et rendent possible la détection des espèces marquées en microscopie de fluorescence.

Le phénomène de fluorescence est le résultat de trois étapes (figure 2.16) :

- la première étape correspond à l'absorption par le fluorophore d'un photon d'énergie $E_1 = h\nu_{abs}$, où $h$ est la constante de Planck et $\nu_{abs}$ la fréquence du rayonnement absorbé. La molécule passe ainsi du niveau électronique fondamental à un état excité instable.
- La seconde étape correspond à la transition d'un état excité à un autre de plus faible énergie ($E_2 < E_1$). Cette relaxation est due à l'interaction

du fluorophore avec son environnement (dissipation d'énergie sous forme de chaleur par exemple).

- La troisième étape est le retour à l'état fondamental par émission d'un photon d'énergie $E_3 = h\nu_{em}$, plus faible que celle du photon d'excitation à cause de la dissipation d'énergie lors de l'étape 2 ($\nu_{em}$ est la fréquence du rayonnement émis).

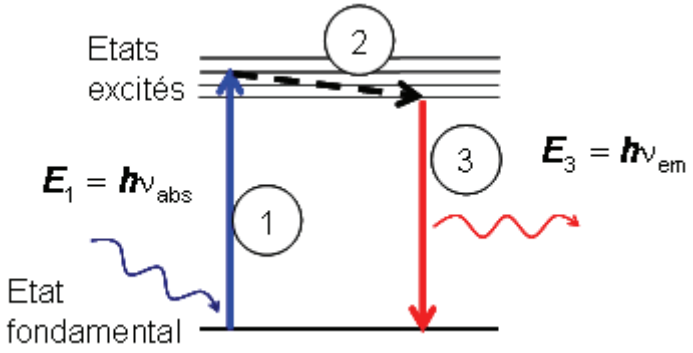



**Figure 2.16 : Schéma en trois étapes du phénomène de fluorescence**

Lorsque la molécule est à l'état excité, il existe une certaine probabilité pour qu'elle participe à des réactions chimiques (on parle alors de réactions photochimiques), en particulier avec l'oxygène. Le fluorochrome perd alors ses propriétés de fluorescence. Un fluorophore est donc capable de supporter un nombre d'excitations plus ou moins important, dépendant de cette probabilité de réaction. Lorsque ce nombre est atteint, ce qui se produit notamment dans le cas d'une illumination trop intense, le fluorophore peut se détruire de manière irréversible et ainsi ne plus émettre de photon. Autrement dit, quand on excite une solution de molécules fluorescentes, une certaine proportion d'entre elles est détruite à chaque instant et par conséquent l'intensité de fluorescence décroît au cours du temps. Ce phénomène peut être gênant, notamment en microscopie de fluorescence, mais il peut également être mis à profit pour mesurer la mobilité moléculaire par la méthode de redistribution de fluorescence après photoblanchiment (FRAP) ou par la méthode de perte de fluorescence au cours d'un photoblanchiment local (FLIP).

### 3.2.2 Principe de fonctionnement

Le microscope à fluorescence possède les mêmes éléments qu'un microscope à transmission, auquel s'ajoute un bras d'épifluorescence. Cette partie permet la visualisation de l'échantillon en mode réflexion, mais la source de lumière est une lampe à vapeurs de mercure. La lumière est émise après excitation d'un gaz par un arc électrique entre deux électrodes. Elle permet un éclairage puissant et stable, et le spectre de la lumière émise possède plusieurs pics utilisables pour exciter les fluorophores usuels (en utilisant des filtres pour sélectionner le pic choisi). Le spectre d'une telle lampe est donné sur la figure 2.17. On

note en particulier une série de pics intenses à quelques longueurs d'ondes particulières : 365 nm, 546 nm, 577 nm, …

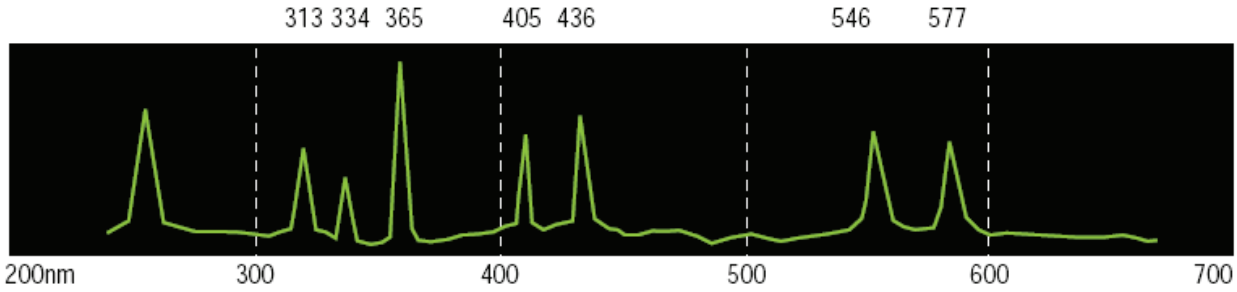



**Figure 2.17 : Spectre d'excitation d'une lampe à vapeurs de mercure.**

Le microscope est équipé d'un certain nombre de blocs d'épifluorescence, comportant chacun un filtre d'excitation, un miroir dichroïque et un filtre d'émission. Les filtres servent à sélectionner les gammes de longueur d'onde que l'on veut utiliser pour exciter les fluorophores et que l'on veut récupérer pour faire une image. Il existe principalement trois types de filtres. Le plus souvent, le filtre d'excitation est un filtre passe-bande alors que le filtre d'émission peut-être passe-haut ou passe-bande suivant le cas. Le miroir dichroïque présente la propriété d'être à près de 100 % réfléchissant pour les longueurs d'onde inférieures à une longueur d'onde seuil, et presque 100 % transmettant au-delà. Son utilisation permet d'optimiser l'observation en mode épifluorescence : concentration de la lumière excitatrice sur l'échantillon et renvoi de la lumière émise vers l'observateur.

Dans le microscope, les filtres sont le plus souvent regroupés sur un cube qui comporte un filtre d'excitation, un filtre dichroïque et un filtre d'émission (figure 2.18). On peut ainsi avoir plusieurs cubes avec pour chacun un jeu de filtres adapté à un fluorophore particulier. Il suffit de changer le cube dans le chemin optique du microscope suivant le type de marquage effectué dans l'échantillon.

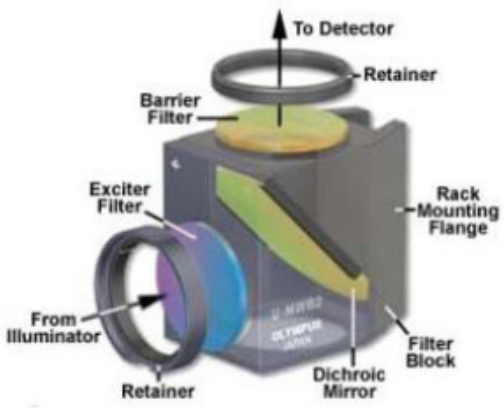



**Figure 2.18 : Cube à filtres pour la fluorescence**

La figure 2.19 montre le principe de fonctionnement du microscope de fluorescence : la lumière part de la source (en haut à droite) passe à travers le filtre d'excitation puis est réfléchie par le filtre dichroïque vers l'objectif jusqu'à l'échantillon. Les fluorophores présents dans l'échantillon sont alors excités et la fluorescence émise est collectée par l'objectif, traverse le miroir dichroïque puis le filtre d'émission pour aller vers les oculaires ou un détecteur (caméra CCD, appareil photo...).

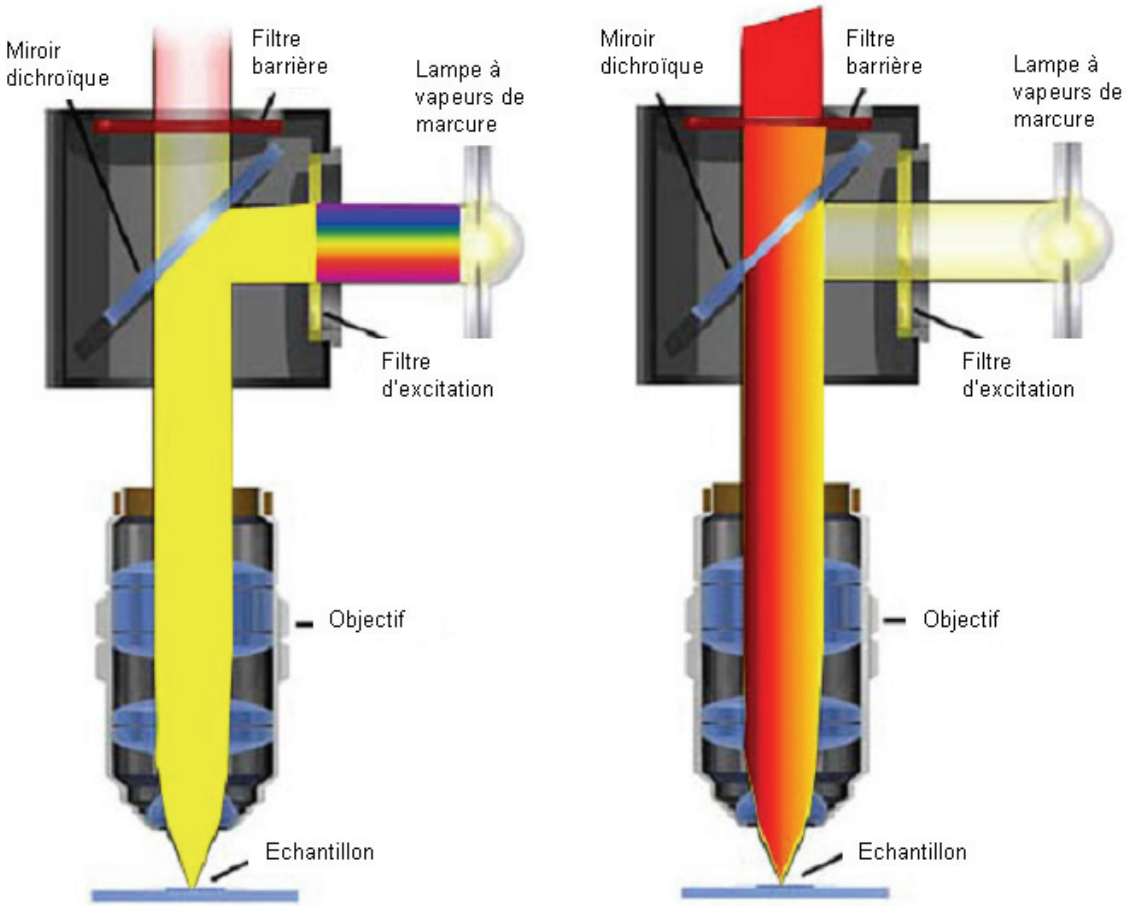



**Figure 2.19 : Schéma du trajet optique dans un microscope en épifluorescence à l'excitation (gauche) et à l'émission (droite). Les flèches indiquent le sens de propagation de la lumière. A gauche : la lampe à vapeur de mercure émet de la lumière blanche. Celle-ci passe à travers un filtre qui ne sélectionne que la longueur d'onde d'excitation du fluorophore (jaune sur le schéma). Le miroir dichroïque réfléchit la majeure partie de la lumière d'excitation et l'envoie sur l'échantillon. Le filtre barrière retient la lumière d'excitation qui est passée à travers le miroir dichroïque. A droite : les fluorophores émettent une lumière rouge. Celle-ci passe à travers le miroir dichroïque et n'est pas arrêtée par le filtre barrière, conçu pour laisser passer la gamme de longueur d'onde d'émission du fluorophore.**

### 3.2.3 Méthode d'analyse des données

Les molécules d'ADN sont rendues fluorescentes, et donc observables au microscope optique, par l'utilisation de Yoyo-1, comme expliqué dans le paragraphe 2.3.3. La figure 1.17 montre à quoi ressemble un tapis d'ADN observé au microscope optique. Ici, la densité de greffage est assez faible.

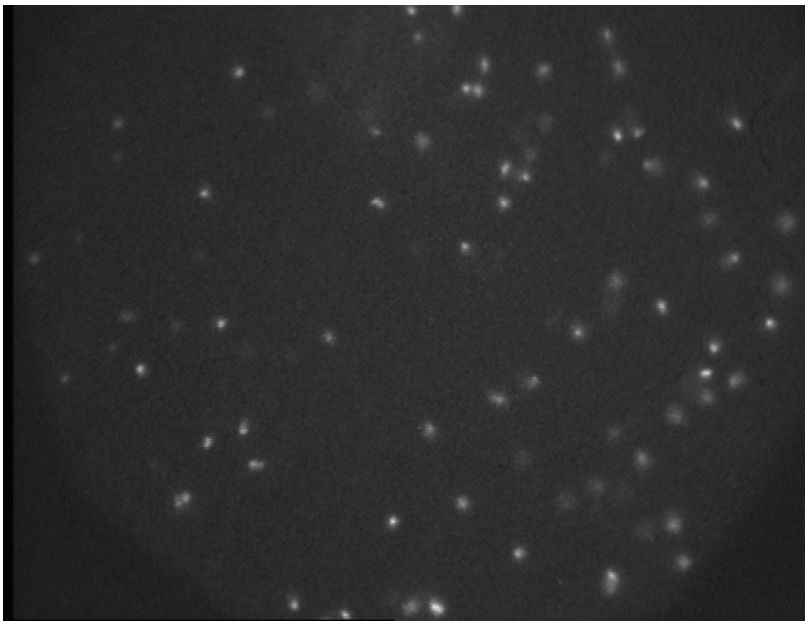


**Figure 2.20 : Image en niveaux de gris d'un tapis de molécules d'ADN prise au microscope optique en fluorescence.**

Les molécules d'ADN sont sous forme de pelotes d'environ 1 µm de diamètre, donc de taille suffisante pour être observées au microscope. Elles fluctuent autour de leur point de greffage sous l'action de leur mouvement brownien. Chaque tache blanche sur la figure 2.20 représente une de ces molécules d'ADN. Lorsqu'on moyenne quelques dizaines d'images, on obtient l'image de gauche de la figure 2.21. Les taches blanches circulaires et diffuses représentent la probabilité de présence des molécules d'ADN autour de leur point d'attache. Lorsqu'on trace le profil d'intensité le long de la ligne dessinée sur l'image de gauche, on obtient un profil gaussien, comme représenté sur l'image de droite.

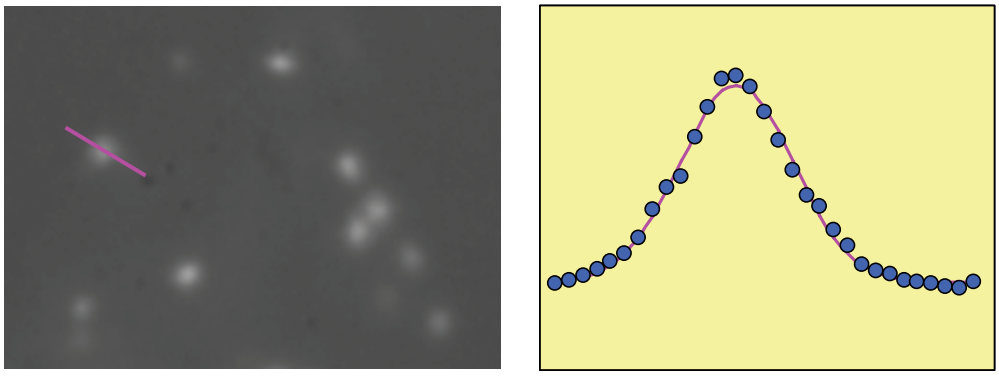


**Figure 2.21 : A gauche : moyenne sur une cinquantaine d'images en fluorescence d'une portion de tapis d'ADN. A droite : profil d'intensité gaussien pris le long de la ligne rose.**

Sur de telles images, il est possible de mesurer la position des molécules d'ADN, de mesurer des distances, et des intensités lumineuses.

## 3.3 Système RICM-fluorescence simultanés

Au début de notre étude les deux microscopes que nous utilisions (Leica droit et Nikon inversé) étaient équipés afin de permettre l'acquisition d'images en mode RICM et en mode de fluorescence. Passer d'un mode à l'autre nécessite quelques manipulations : insertion ou retrait d'un filtre interférentiel, changement de cube (cube épifluo/cube épipolarisation), et réglage de la caméra aux nouvelles conditions d'illumination, très différentes pour les deux modes. La dernière étape a pu être supprimée sur notre microscope droit Leica grâce à l'acquisition d'un bloc séparateur de faisceau, permettant de doubler l'image et de l'envoyer sur deux caméras : l'une sensible, adaptée à l'imagerie de fluorescence, l'autre adaptée à l'imagerie en mode RICM.

Dans tous les cas quelques secondes sont nécessaires pour passer d'un mode d'observation à l'autre. Afin de permettre la prise d'images simultanées dans les deux modes, nous avons mis au point un montage qui, à notre connaissance, reste unique à ce jour. Ce montage est schématisé sur la figure 2.22, et il a été adapté pour le microscope droit Leica, pour des raisons financières exclusivement. A l'avenir, il serait bon de pouvoir le dupliquer sur le microscope inversé Nikon.

Le principe de fonctionnement d'un tel montage est le suivant. La lumière incidente envoyée sur l'échantillon contient d'une part la longueur d'onde qui servira à former l'image en mode RICM, et d'autre part la longueur d'onde qui permettra l'imagerie en mode fluorescence. Nous avons décidé de ne pas modifier notre protocole expérimental pour le marquage des ADNs. Donc, la longueur d'onde d'excitation de la molécule fluorescente Yoyo-1 doit être conservée : notre montage doit permettre l'excitation de l'échantillon à environ 490 nanomètres, et le retour de la lumière de fluorescence, dans la gamme [510-540] nm. La longueur d'onde idéale pour l'observation en mode RICM est 547 nm, fixée par la lame quart d'onde de l'objectif que nous utilisons. Il apparaît techniquement assez complexe de laisser passer de la lumière à 490 nm et à 547 nm tout en ne "polluant" pas l'échantillon avec de la lumière dans la gamme 510-540 nm. Nous avons donc choisi de changer de longueur d'onde pour le mode RICM, au détriment de la qualité d'image, qui reste cependant acceptable. Ainsi, le montage actuel se compose :

1. d'un filtre passe bande [420-490], qui restreint la gamme d'ondes envoyées sur l'échantillon.
2. d'un miroir dichroïque avec trois zones d'intérêt :
    a. une bande de réjection dans la gamme [440-490]
    b. une bande de transmission au-delà de 510 nm
    c. une région de transmission/réflexion 50/50 dans la gamme [375-440]

Ainsi, l'échantillon est éclairé comme nécessaire, avec une efficacité 100% pour la gamme [440-490], et une perte d'environ 50% dans la gamme [420-440]. La lumière de cette dernière gamme est renvoyée par l'échantillon, et à nouveau transmise à 50% vers les caméras lors de son deuxième passage à travers le miroir dichroïque. En revanche il n'y a aucune transmission vers les caméras de la lumière réfléchie par l'échantillon dans la gamme [440-490]. De plus, la lumière émise par le fluorophore, dans la gamme 510 nm et plus, est totalement transmise vers les caméras. Finalement , le trajet optique se termine par un miroir 50/50, qui renvoie l'image vers chaque caméra. Ce miroir serait avantageusement remplacé par un miroir dichroïque afin d'éviter une nouvelle perte de lumière de 50%, mais il nous a été impossible d'effectuer cette modification sur le bloc Leica. Enfin, un filtre passe bande [510-560] nm est placé juste devant la caméra sensible, afin d'éliminer la composante bleue qui forme l'image RICM. En revanche, aucun filtre passe bande n'est placé devant la deuxième caméra, car l'intensité de la composante verte (fluorescence) est très faible en comparaison de la composante bleue, et on ne voit pas apparaître les ADN fluorescents sur l'image RICM.

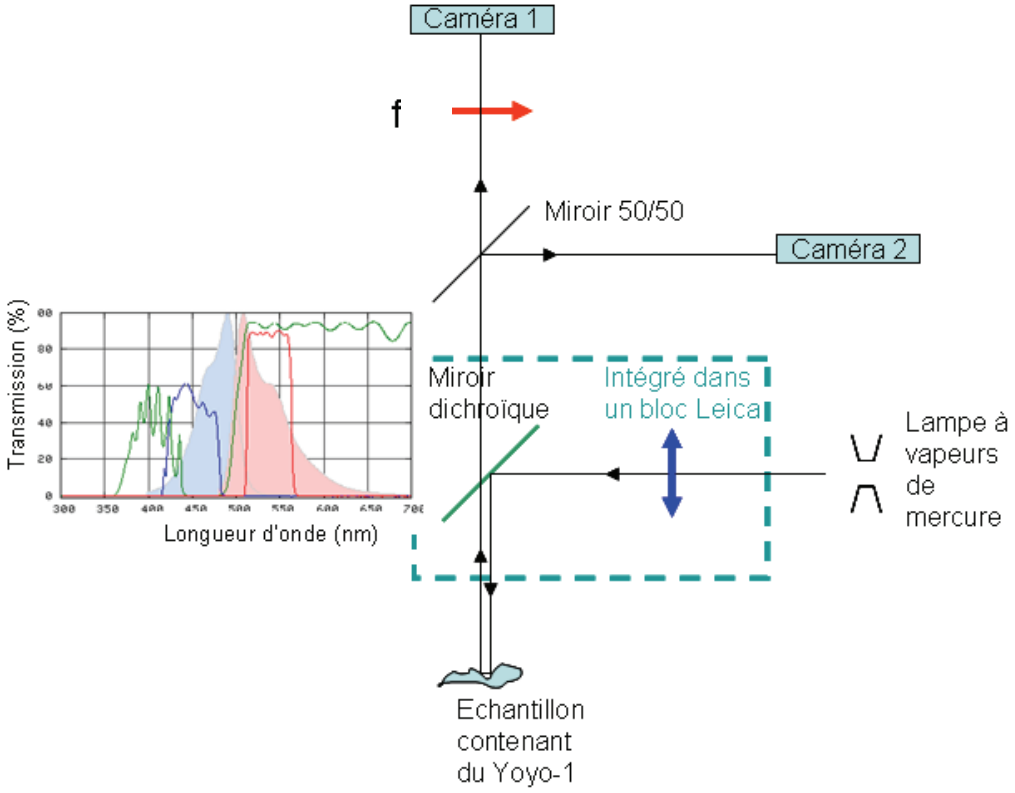



**Figure 2.22 : Schéma du double montage RICM/fluorescence monté sur le microscope droit Leica. Le graphique à gauche représente la transmission en fonction de la longueur d'onde du miroir dichroïque (en vert), et des deux filtres (en rouge et en bleu). On a également représenté sur ce graphique, les longueurs d'onde d'excitation (en bleu clair) et les longueurs d'onde d'émission (en rose) du Yoyo-1.**

Dans un montage idéal le dernier miroir 50/50 devrait donc être remplacé par un miroir dichroïque. En revanche la perte de lumière de 75% dans la gamme [420-440] nm due au

premier miroir dichroïque est inévitable car nécessaire à la visualisation RICM ; elle est également présente dans la visualisation RICM "orthodoxe".

Il faut enfin noter que le mode interférentiel est ici un mode pseudo-RICM, car d'une part la lame quart d'onde en tête d'objectif n'est pas adaptée à la longueur d'onde utilisée, et d'autre part, afin de compenser la perte de lumière due à la succession des miroirs, nous collectons l'ensemble de la lumière dans la gamme [420-440] nm pour former l'image interférentielle. Les images RICM sur ce montage sont donc moins contrastées.

# *Chapitre 3*

# *Étirement de molécules d'ADN induit par l'étalement de vésicules phospholipidiques*

La caractéristique principale qui distingue l'adhésion cellulaire de l'adhésion ou de l'agrégation dans les systèmes colloïdaux est l'adhésion spécifique entre les récepteurs à la surface de la cellule et les ligands situés sur une autre cellule ou sur une surface biologique (38). Les récepteurs des cellules sont souvent enchâssés dans la membrane cellulaire, une suspension de nombreuses protéines dans une bicouche fluide de lipides (1). Des centaines de récepteurs et autant de ligands participent à l'adhésion cellulaire. Elle a été explorée à travers des systèmes biomimétiques simples comme les vésicules phospholipidiques : dotées de récepteurs dans leurs membranes, elles sont capables d'adhérer de manière spécifique à des substrats contenant le ligand complémentaire (18, 19). Néanmoins, on connaît peu de choses sur les mécanismes et les forces en action dans la zone de contact durant le processus d'adhésion.

Afin de mieux comprendre ces phénomènes, nous avons mené des expériences pour étudier simultanément la dynamique d'étalement de vésicules adhésives et les déformations de molécules d'ADN greffées sur la surface se trouvant dans la région de contact. Grâce à ces expériences, nous espérons mieux comprendre les forces entrant en jeu dans les mécanismes de l'adhésion, forces s'exerçant sur les membranes ou sur les bio-macromolécules.

# 1 Configuration après étalement

L'expérience consiste à étudier le comportement de molécules d'ADN se trouvant dans la zone de contact entre la membrane d'une vésicule et une surface solide. Les chaînes d'ADN sont greffées sur la surface au moyen du couple ligand-récepteur streptavidine-biotine, comme expliqué dans le chapitre "Matériels et méthodes". Les vésicules sont constituées d'un mélange de deux lipides : le DOPC et le DSPE-PEG2000-biotine, dont on peut varier les proportions. Le DOPC est un lipide très couramment utilisé ; il est le constituant principal des membranes dans nos expériences. L'utilisation du DSPE-PEG2000-biotine a pour but de rendre la vésicule adhésive au substrat. Ce dernier comporte en effet, outre des molécules d'ADN, un certain nombre de molécules de streptavidine libres, capables de s'accrocher aux biotines contenues dans la membrane des vésicules. Ainsi, on dispose d'un substrat partiellement couvert de molécules d'ADN réparties régulièrement sur la surface et dont on peut contrôler la densité. Sur cette surface on peut déposer des vésicules qui vont y adhérer en emprisonnant les molécules d'ADN sous la partie de membrane collée à la surface (figure 3.1).

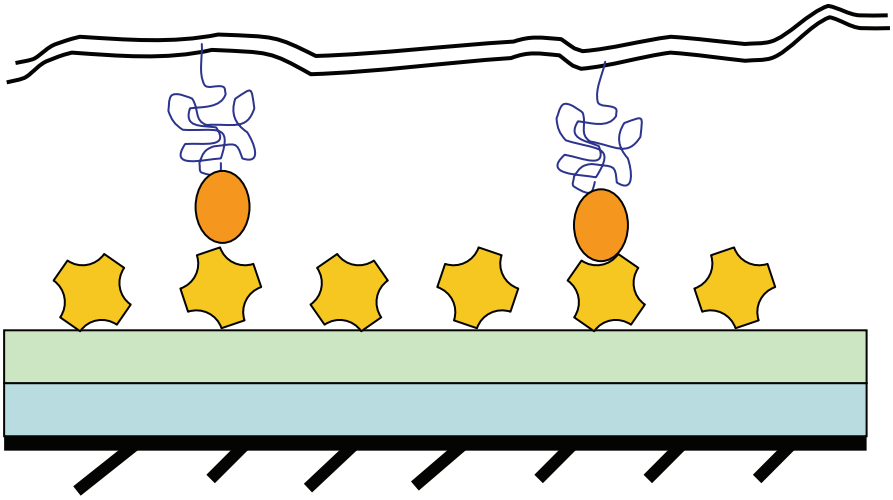


**Figure 0.1 : Représentation schématique de l'adhésion d'une portion de membrane sur une surface de verre. La surface de verre est fonctionnalisée avec une succession de trois couches de molécules, dont la dernière est une couche de streptavidines (en jaune). La membrane (en noir), est équipée de molécules de biotine (en orange), attachées aux têtes des phospholipides par un espaceur, du polyéthylèneglycol (en bleu).**

On peut étudier le comportement de la membrane à proximité du substrat à l'aide de la microscopie par contraste interférentiel en réflexion (RICM), décrite plus en détail dans le chapitre "Matériels et méthodes". c'est une technique optique interférométrique, qui permet, dans certaines conditions expérimentales bien définies, de visualiser les différences de hauteurs entre 2 surfaces proches. La condition idéale est que l'une des surfaces est plane

(typiquement une lamelle de verre couvre objet), et l'autre surface présente une homogénéité d'indice optique et d'épaisseur. C'est une technique de choix pour étudier l'adhésion. Grâce à cette méthode, on peut notamment visualiser la zone d'adhésion, donc savoir si une vésicule a adhéré ou non. On a ainsi accès à de nombreuses informations comme la taille et la forme de la zone d'adhésion par exemple, qui sont caractéristiques de la force adhésive.

Les molécules d'ADN, quant à elles, sont rendues fluorescentes par l'intercalation de molécules de Yoyo entre les paires de bases. Elles sont ainsi visibles au microscope optique en mode fluorescence. Les ADNs fluctuent autour de leur position de greffage. Lorsqu'on moyenne leur déplacement sur une durée de quelques dizaines de secondes, on observe une tache lumineuse à peu près circulaire, d'un diamètre d'environ 1 µm (cf. "Matériels et méthodes").

On contrôle la force d'adhésion des vésicules sur le substrat en modifiant la proportion entre les deux sortes de lipides, c'est-à dire le taux de couverture en biotine de la membrane. Nous avons travaillé avec des taux de 1 phospholipide biotinylé (DSPE-PEG2000-biotine) pour 50 phospholipides "normaux" (DOPC), noté 1:50, et également avec 1:500 et 1:5000. Ces taux correspondent à de fortes adhésions, caractérisées par des patchs d'adhésion de forme assez, voire complètement, circulaire. Les diamètres de ces patches sont très proches du diamètre de l'équateur de la vésicule (80 % en moyenne).

Lorsque de telles vésicules adhèrent sur un tapis de molécules d'ADN, on observe que la majorité des molécules d'ADN situées sous le patch d'adhésion s'étire radialement. La figure 3.2 montre les images RICM et de fluorescence typiques que l'on obtient lorsqu'une vésicule adhésive de taux de couverture en biotine de 1:50 s'est étalée sur un tapis d'ADN. Ce sont des images moyennes (moyenne sur une cinquantaine d'images), ce qui permet d'avoir une meilleure résolution en RICM, et d'obtenir le déplacement moyen des molécules d'ADN autour de leur point d'attache pour la fluorescence. Le disque gris foncé sur l'image 3.2 a correspond à la zone d'adhésion de la vésicule, qui a ici un diamètre moyen de 20 µm. Ce disque gris est caractéristique d'une adhésion très forte et l'absence d'anneaux signifie que la vésicule a atteint une forme quasi-hémisphérique. L'image 3.2 b montre l'état du tapis d'ADN dans la même région. Les taches blanches grossièrement circulaires en dehors de la zone d'adhésion de la vésicule correspondent aux positions moyennes au cours du temps des molécules d'ADN qui suivent un mouvement brownien autour de leur point d'attache.

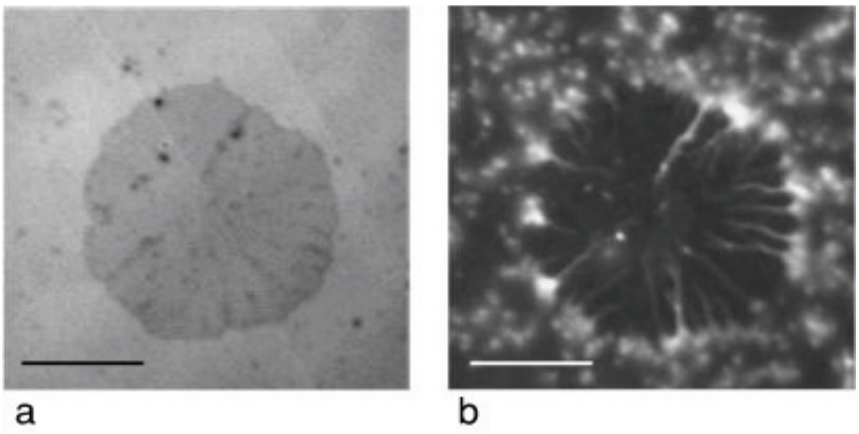



**Figure 0.2 : a) image RICM du patch d'adhésion d'une vésicule de taux de couverture en biotine 1:50 b) image en fluorescence du tapis d'ADN situé sous la vésicule. La barre représente 20 µm sur chaque image.**

La grande majorité des chaînes d'ADN dont le point de greffage est situé sous la zone d'adhésion a une forme très différente. Ces chaînes ont la forme de stries de faible intensité lumineuse terminées à l'extérieur du patch adhésif par une tache blanche, plus ou moins circulaire, plus brillante. Les stries, ou queues, varient en longueur et en intensité, mais elles sont presque toutes orientées dans la direction radiale. Les extrémités, ou « têtes », présentent un mouvement brownien, de la même façon que les ADNs à l'extérieur de la zone d'adhésion, alors que les queues sont complètement immobiles, comme « agrafées » sur le substrat. Lorsque la densité de greffage des ADNs est élevée, les têtes des molécules forment une sorte de couronne signalant la position du pourtour de la zone d'adhésion.

Ce résultat a pu être reproduit à de très nombreuses reprises, avec des taux de biotine différents : 1:50, 1:500, 1:5000 et 1:25. Les figures 3.3 et 3.4 présentent des images RICM et de fluorescence pour des taux de biotine de 1:500 et 1:5000. L'image RICM de la figure 3.3 montre une situation un peu particulière : un accident d'adhésion. Probablement à cause d'un défaut de la surface, le patch d'adhésion n'a pas une forme circulaire.

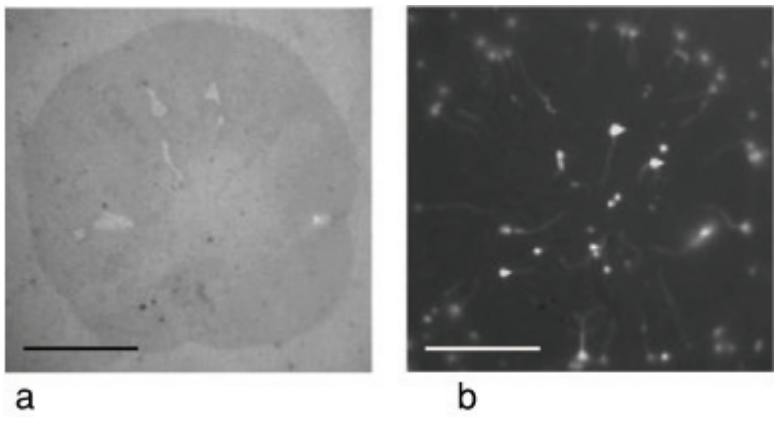



**Figure 3.3 : a) Image RICM d'une vésicule adhérée de taux de couverture en biotine 1:500 b) Image en fluorescence des ADNs étirés situés sous le patch d'adhésion. La barre représente 20 µm sur chaque image.**

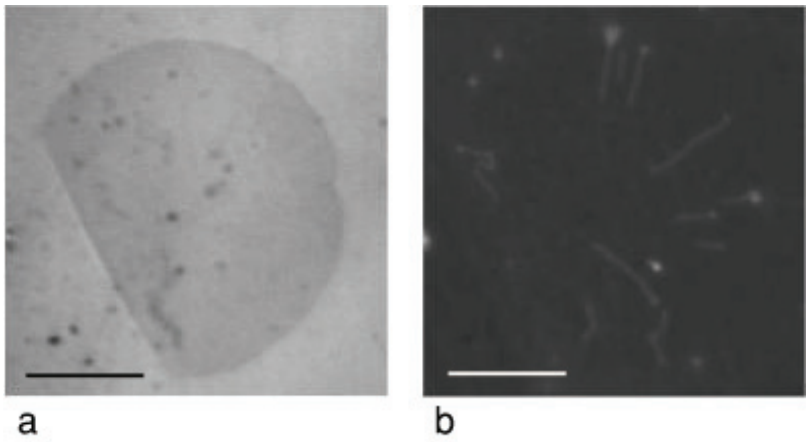



**Figure 3.4 : a) Image RICM d'une vésicule adhérée de taux de couverture en biotine. 1:5000 b) Image en fluorescence des ADNs étirés situés sous le patch d'adhésion. La barre représente 20 µm sur chaque image.**

Nos études statistiques portent sur les taux 1:50, 1:500 et 1:5000 et notre but est d'étudier dans quelle mesure la force d'adhésion influe sur le comportement statistique des molécules d'ADN.

## 1.1 Distribution spatiale et orientation des molécules d'ADN

Nous avons reproduit nos expériences afin de mener des études statistiques sur la position des sites de greffage des ADN, sur la position de leur tête et sur l'angle qu'ils forment avec la direction radiale.

Ces études ont été menées pour trois taux de biotine différents : 1:50, 1:500 et 1:5000. Nous avons extrait de chacune de nos expériences les positions des sites de greffage des molécules d'ADN, les positions de leurs têtes et le rayon moyen du patch adhésif $r_f$. Le centre du patch est pris comme origine de l'espace et toutes les dimensions sont renormalisées par rapport à $r_f$, ce qui nous permet de rassembler les données provenant de vésicules différentes mais avec un même taux de biotine sur un même diagramme.

La figure 3.5 rassemble toutes les données concernant les ADNs étirés sous des vésicules dont le taux de couverture est de 1:500, c'est-à-dire plus d'une centaine d'ADNs étirés, observés sous plusieurs dizaines de vésicules, correspondant elles-mêmes à une dizaine d'expériences différentes. Cette figure en forme de cible illustre ce que l'on observerait sous une vésicule étalée sur un tapis d'ADN de forte densité. On remarque que :

- 80 % des sites de greffage des ADN se trouvent dans un anneau à peu près à mi-chemin entre le centre et le pourtour de la zone d'adhésion (anneau bleu).
- 10 % des sites de greffage se trouvent autour du centre du patch d'adhésion

- 80 % des têtes des ADNs se trouvent dans une région centrée autour du pourtour du patch d'adhésion (anneau rouge).

On trouve donc très peu de sites de greffage de molécules d'ADN au centre du patch adhésif. On en déduit que les vésicules, qui se déplacent au niveau de la surface avant de débuter leur adhésion, se posent de préférence dans une région où il y a peu d'ADN. Quant aux têtes des ADN, la plupart d'entre elles se trouvant au-delà du pourtour de la zone d'adhésion, on en conclut que les ADN s'étirent jusqu'à ce que l'étalement de la vésicule cesse. La partie non étirée de la molécule, la tête, reste à l'extérieur de la zone d'adhésion pour avoir un maximum de liberté de mouvement. Sur la figure 3.5, on remarque également que la direction dans laquelle les chaînes d'ADN s'étirent est très proche de la direction radiale dans la grande majorité des cas.

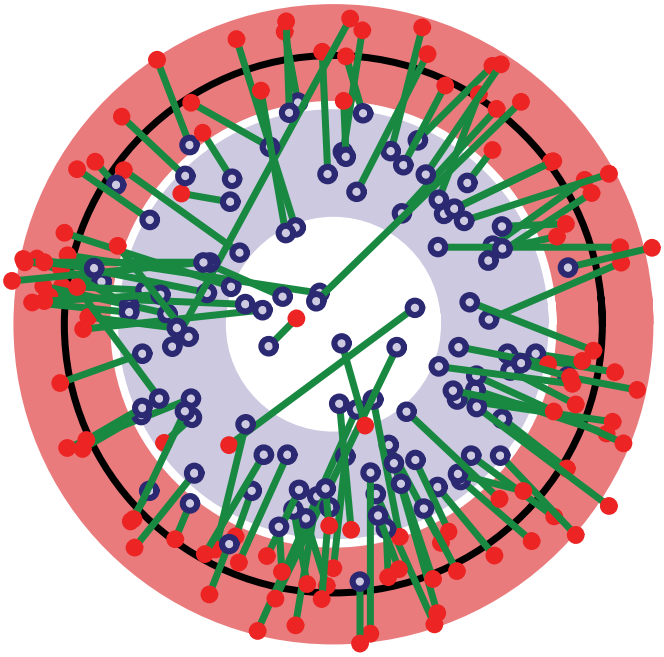


**Figure 3.5: Représentation graphique de la distribution d'ADN étirés sous le patch d'adhésion. Cette image en forme de cible représente les extrémités greffées des ADN, les têtes libres et le vecteur bout-à-bout. Le cercle noir correspond à la frontière du patch adhésif, et les anneaux bleu et rouge représentent les zones où se trouvent 80 % des sites de greffage (bleu) et 80 % des têtes (rouge).**

Nous disposons de quasiment autant de données concernant des ADNs étirés sous des vésicules de taux de biotine 1:50 (environ 90 ADNs étirés étudiés) et 1:5000 (idem), mais nous n'avons pas jugé utile de représenter une cible pour chaque taux de biotine, l'impression visuelle étant toujours la même.

Les observations qualitatives effectuées sur la figure 3.2 peuvent être renforcées par des mesures plus précises. Il est possible de calculer l'angle entre le vecteur qui relie le site de greffage et la tête de l'ADN et la direction radiale. Nous avons tracé sur la figure 3.7 la distribution $P(\theta)$ des vecteurs bout-à-bout des ADNs étirés en fonction de l'angle qu'ils

forment avec la direction radiale pour les trois taux de biotine étudiés ici. On peut ajuster sur ces données une courbe gaussienne centrée autour de 0 d'une largeur de 0,19 radians. La formule que nous utilisons pour la gaussienne est la suivante :

$$y_0 + y_c \exp\left(-\frac{(\theta - \theta_c)^2}{2\sigma^2}\right)$$

où $y_0$, $y_c$ et $\theta_c$ sont trois paramètres (ligne de base de la gaussienne, valeur et abscisse du maximum) que nous ajustons grâce aux données expérimentales. $\sigma$ est un autre paramètre qui correspond à la moitié de l'écart-type (figure 3.6).

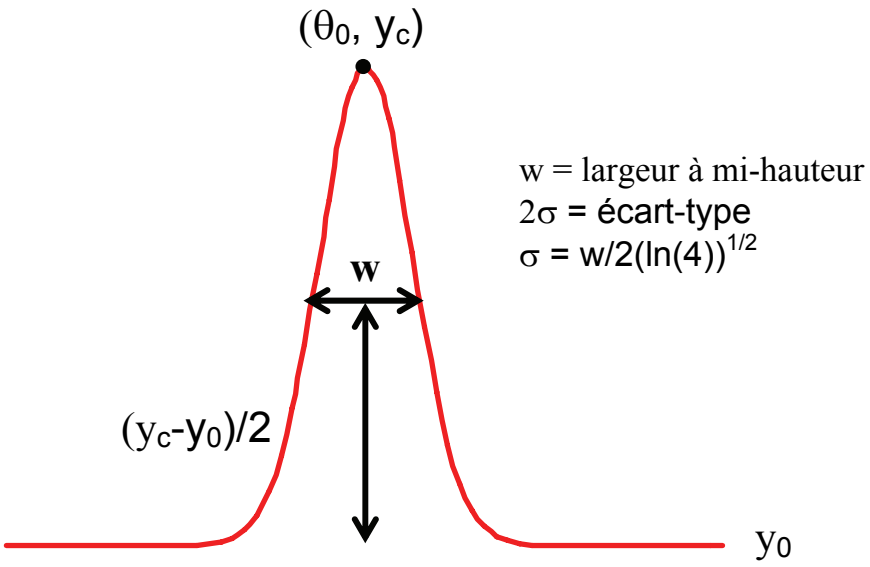



**Figure 3.6 : Représentation des différents paramètres intervenant dans l'expression d'une gaussienne.**

La plupart des ADN sont donc bien orientés dans la direction radiale, ou s'en écartent très peu.

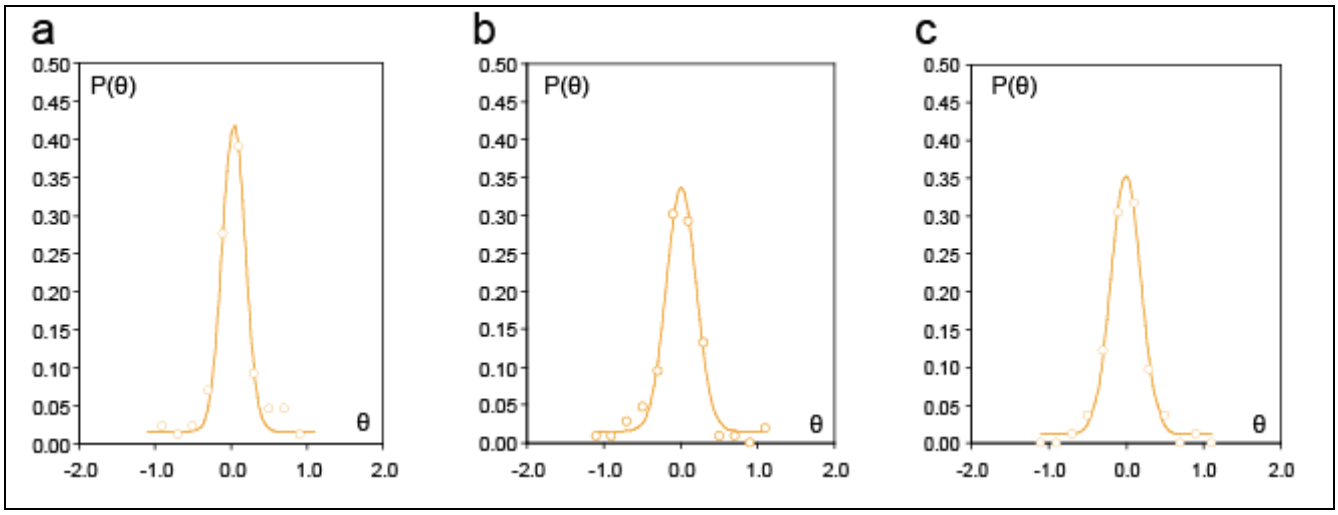



**Figure 3.7 : Distribution P(θ) de l'orientation θ des vecteurs bout-à-bout par rapport à la direction radiale. a) Taux de biotine de 1:50. Largeur de la gaussienne : 0,15 radians. b) Taux de biotine de 1:500. Largeur de la gaussienne : 0,19 radians. c) Taux de biotine de 1:5000. Largeur de la gaussienne : 0,19 radians.**

En ce qui concerne la distribution spatiale des molécules d'ADN, nous avons représenté la distribution de leurs sites de greffage et de leurs têtes par rapport à la distance au centre du patch adhésif. La figure 3.8 montre cette distribution pour les trois taux de biotine 1:50, 1:500 et 1:5000. La distribution *P(r)* des positions des sites de greffage et des têtes à été calculée de manière à tenir compte de la taille de la zone considérée. En effet, on calcule le nombre d'occurrences dans des anneaux qui ont toujours la même largeur radiale, mais qui se déplacent du centre vers la périphérie. Ils correspondent donc à des zones de plus en plus grandes. D'autre part, on normalise la distribution, de manière à ce que la somme de toutes les probabilités vale un. La distribution P(r) des positions des sites de greffage et des têtes est bien une densité surfacique. Elle se calcule par la formule :

$$P(r) = \frac{nombre\ d'occurences}{2\pi r dr\, N}$$

où N est le nombre total de points pris en compte et *dr* est la largeur de chaque anneau.

Les points bleus représentent la distribution des sites de greffage, et les points rouges la distribution des extrémités libres. Les courbes gaussiennes rouges et bleues s'ajustent grossièrement sur les pics de chaque distribution. En ce qui concerne les extrémités initiales des ADNs, on remarque un maximum entre 0,4 et 0,7. Cela correspond à ce que l'on avait déjà observé sur la figure 3.5, à savoir qu'il y a très peu de sites de greffage de molécules d'ADN près du centre du patch adhésif. On remarque que la distribution des têtes des ADNs est centrée autour de 1 en moyenne (0,95 pour 1:50, 1,04 pour 1:500 et 1,03 pour 1:5000), donc un grand nombre de têtes d'ADNs se trouve autour du pourtour du patch adhésif, ce qui confirme encore nos observations concernant la figure 3.5.

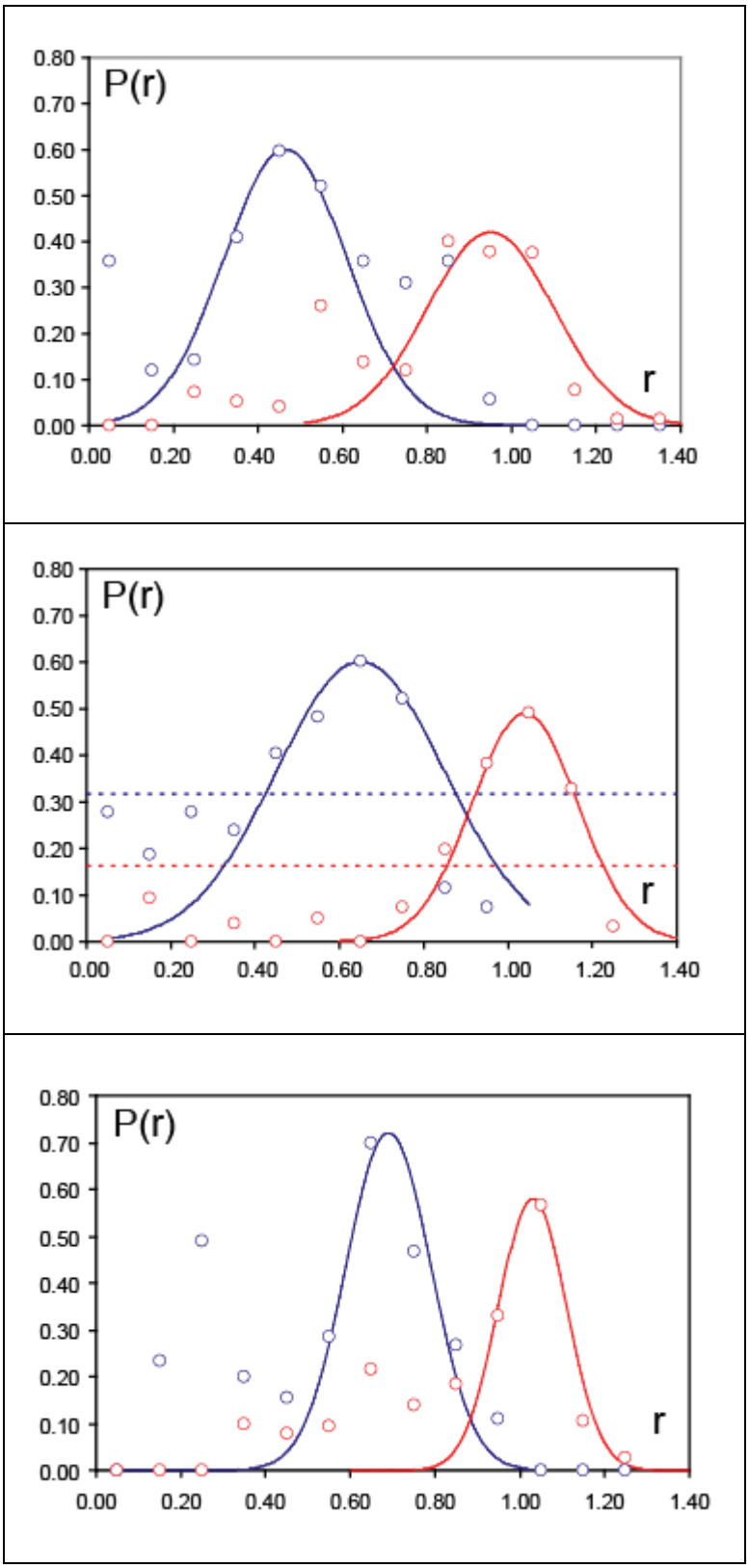



**Figure 3.8 : Distribution P(r) des sites de greffage et des extrémités libres par rapport au rayon normalisé r du patch ($\int_0^1 P(r)2\pi r dr = 1$). a) Taux de biotine 1:50 b) Taux de biotine 1:500 c) Taux de biotine 1:5000**

## 1.2 Degré de repliement

Les images de fluorescence nous donnent des informations sur la position des molécules d'ADN et sur leur orientation par rapport à la direction radiale. Mais on peut également mesurer l'intensité lumineuse émise par ces molécules, qui nous donne accès à un autre type d'information, le degré de repliement de la queue des molécules d'ADN.

On suppose que les fluorophores se répartissent régulièrement dans la molécule d'ADN entre les paires de base. L'ADN étant un polymère, on peut considérer qu'il peut être subdivisé en unités simples appelées monomères. A l'intérieur de chacun de ces monomères, c'est-à dire de ces petits segments de chaîne, on trouve à peu près le même nombre de fluorophores. L'intensité lumineuse émise par un segment de la molécule dépend donc de la quantité de monomères dans la région considérée.

Comme on peut distinguer deux parties dans une molécule d'ADN, la tête et la queue, on peut séparer les intensités lumineuses émises respectivement par ces deux régions. La figure 3.9 a montre un agrandissement d'une molécule d'ADN fluorescente, où l'on distingue nettement la tête et la queue. La zone entourée de bleue représente la région où l'on mesure une intensité $I_1$, l'intensité émise par la tête. Quant à la région entourée de rouge, c'est la zone d'intensité $I_2$, émise par la queue de la molécule d'ADN. On peut ainsi calculer l'intensité relative $I_r$, qui est le rapport entre l'intensité lumineuse émise par la queue $I_2$ et l'intensité lumineuse totale émise par la molécule $I_1$+ $I_2$. Cette quantité est donc la fraction de monomères se trouvant sous le patch d'adhésion. La figure 3.9 b présente une vue tridimensionnelle de l'intensité lumineuse émise par cette molécule d'ADN. On remarque la forte luminosité de la tête par rapport à la queue, ce qui est logique puisque la chaîne est plus repliée sur elle-même dans la tête.

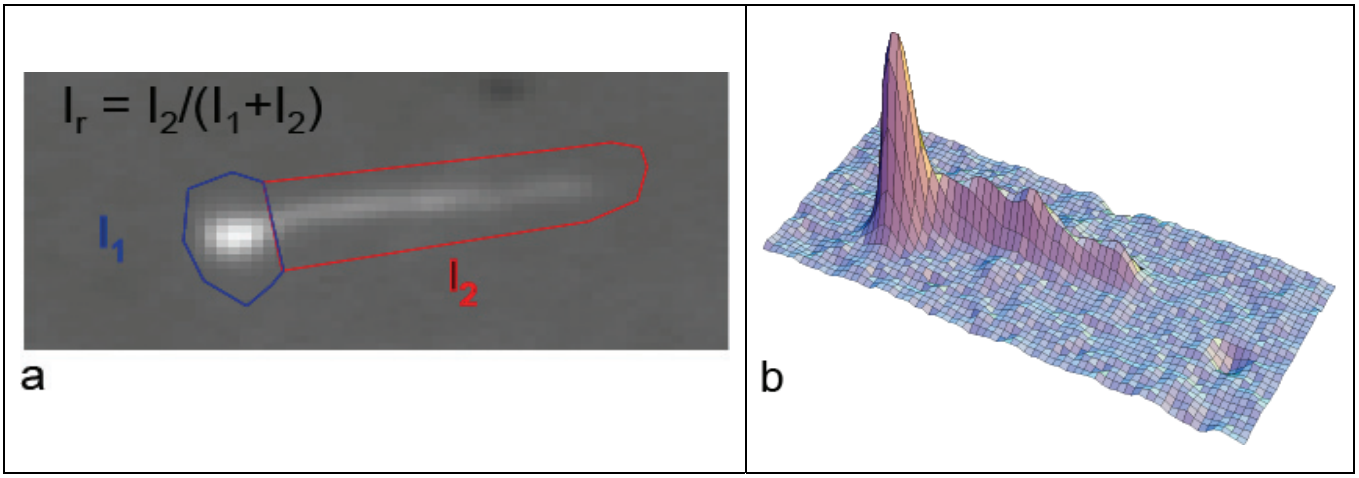



**Figure 3.9: a) Image de fluorescence originale d'une molécule d'ADN étirée en niveaux de gris. b) Représentation tridimensionnelle de l'intensité de fluorescence de la même image.**

Une autre grandeur peut être calculée, la fraction de longueur $L_r$. Il s'agit du rapport entre la longueur apparente de la molécule d'ADN $L_{apparente}$ mesurée sous le patch et la

longueur maximale que celle-ci peut atteindre lorsqu'on l'étire, c'est-à dire sa longueur de contour, qui est de l'ordre d'une vingtaine de micromètres (95). $L_r$ varie donc de 0 à 1, atteignant sa valeur maximale 1 lorsque toute la molécule se trouve sous le patch d'adhésion dans une configuration complètement étirée.

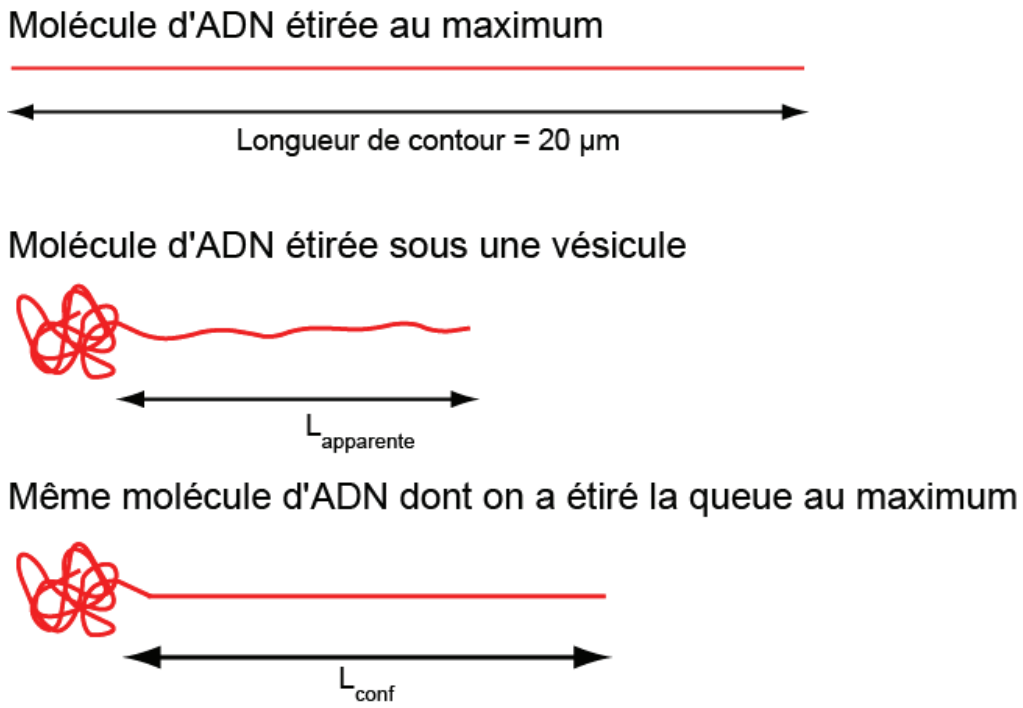



**Figure 3.10 : Définition de la longueur de contour d'une molécule d'ADN, de la longueur réelle et de la longueur maximale de la queue.**

On définit le rapport $n$ de l'intensité relative $I_r$ et de la fraction de longueur $L_r$ par la formule : $n = I_r / L_r$. Ce rapport est caractéristique du degré de repliement de la queue de la molécule d'ADN. On peut également écrire $n = L_{conf} / L_{apparente}$ avec $L_{conf}$ la longueur de contour confinée sous le patch (figure 3.10). Lorsque la queue est complètement étirée, $n = 1$. Plus $n$ est grand, plus le repliement est important, d'où le nom de degré de repliement pour la grandeur $n$ (figure 3.11).

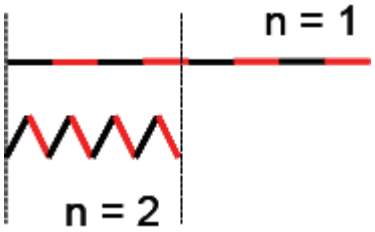



**Figure 3.11 : Illustration du repliement de la queue d'un ADN pour deux valeurs de n.**

Nous avons calculé ce degré de repliement pour un grand nombre de molécules d'ADN et pour les trois taux de biotine habituels : 1:50, 1:500 et 1:5000. Les résultats sont présentés sur la figure 3.12. Nous y avons représenté $n$ en fonction de la position relative de

greffage $r = r_g / r_p$ où $r_g$ est la distance du site de greffage au centre du patch, et $r_p$ le rayon du patch. Les données originales représentées sur le graphique inséré en haut de la figure 3.12 sont apparemment très bruitées. Mais les données moyennées (moyenne glissante sur une taille de fenêtre $\Delta r = 0{,}3$ ), présentées sous les données originales, montrent que pour la plus grande partie de l'intervalle disponible de $r_g$ [0,15 – 0,85], $n$ est constant pour une force d'adhésion donnée. De plus, n décroît avec le taux de couverture en biotine $\delta$, qui est le rapport entre le nombre de phospholipides biotinylés et le nombre de phospholipides non biotinylés : $n \approx \delta^{-1/4}$. Ce résultat est particulièrement intéressant car il montre qu'à l'intérieur de l'intervalle de force d'adhésion étudié, le contrôle de la teneur en ligand permet d'influer sur le degré de repliement de l'ADN.

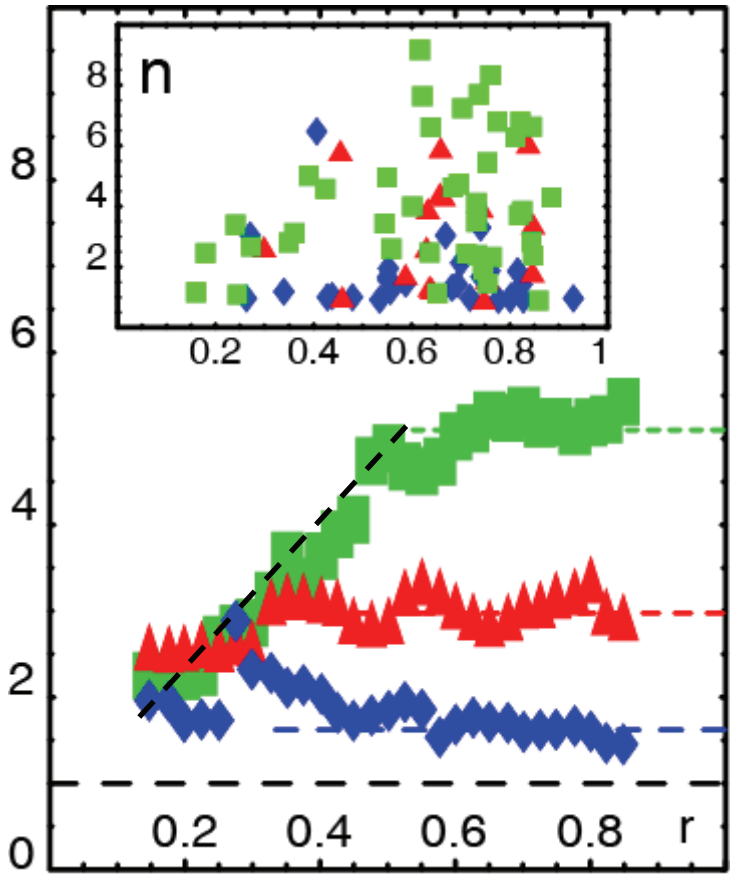



**Figure 3.12 : Degré de repliement des molécules d'ADN en fonction de la distance r de leur point de greffage au centre du patch adhésif (pour un rayon du patch normalisé à 1). En insert, les données originales. En-dessous, les données sont moyennées (moyenne glissante). Pour la courbe bleue, le taux de biotine est de 1:50, pour la courbe rouge il est de 1:500 et pour la courbe verte de 1:5000.**

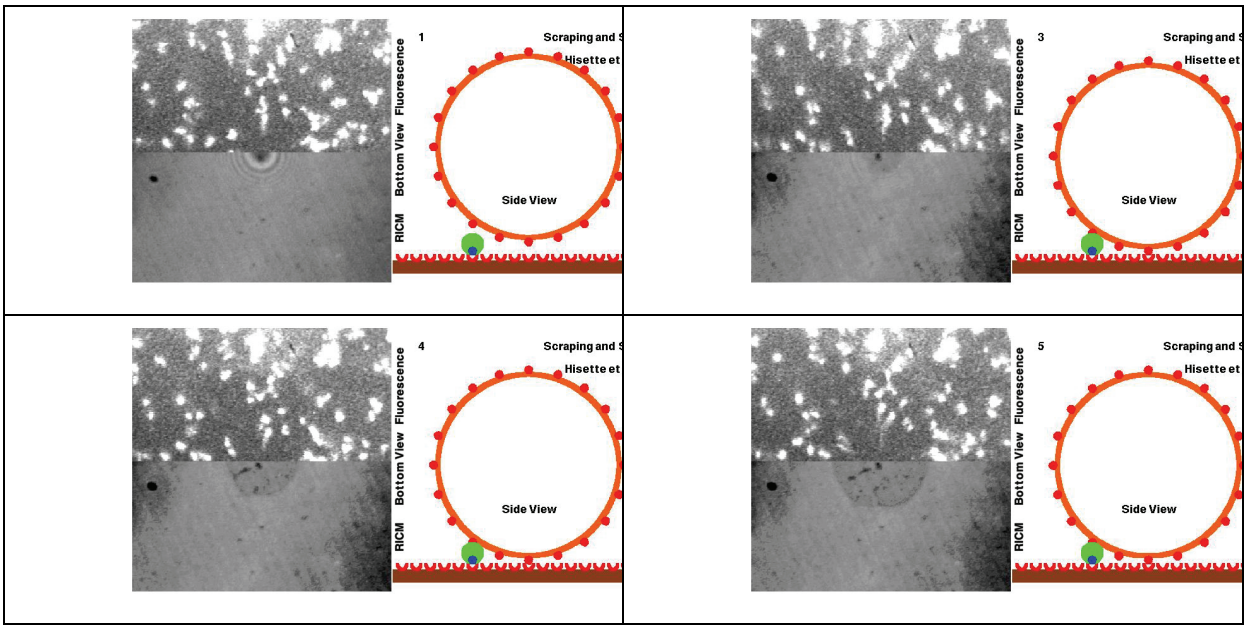
## 2 Dynamique d'étalement et d'étirement

Nous avons pour le moment bien étudié la figure finale des ADNs étirés. Nous avons pu relier une partie du comportement des molécules d'ADN à la force d'adhésion. Mais pour

progresser dans la compréhension du phénomène, il faut relier le comportement des molécules d'ADN au comportement de la vésicule elle-même. Il faut pour cela étudier la position des molécules d'ADN relativement à celle du front d'étalement au cours du temps.

Les premières observations effectuées sur le système ne nous montraient que le résultat final : la vésicule étalée et la figure étoilée de fluorescence. Il est déjà difficile de surprendre une vésicule en pleine adhésion, il est encore plus difficile, voire impossible, de passer suffisamment rapidement du mode RICM au mode fluorescence pour avoir le temps d'observer les ADN en train de s'étirer, le phénomène ne prenant que quelques secondes. En aucun cas il n'était possible, dans la configuration de notre microscope, d'observer la totalité du phénomène simultanément en RICM et en fluorescence, puisqu'on ne pouvait visualiser qu'un mode du microscope à la fois. Or nous avions besoin de ces informations pour pouvoir étudier complètement le phénomène d'étirement des molécules d'ADN et en identifier précisément les causes, comme nous venons de l'évoquer ci-dessus.

Nous avons donc créé un nouveau montage expérimental, décrit dans le chapitre 2 "Matériel et méthodes". A l'aide de différents filtres, ce nouveau montage nous permet d'observer la même région de l'échantillon simultanément en RICM et en fluorescence. Deux caméras différentes reliées à deux ordinateurs nous permettent également d'enregistrer ces images.  Il a ainsi été possible lorsque nous avons surpris une vésicule lors de son adhésion, de filmer simultanément le comportement des ADN dans la même région (figure 3.13).



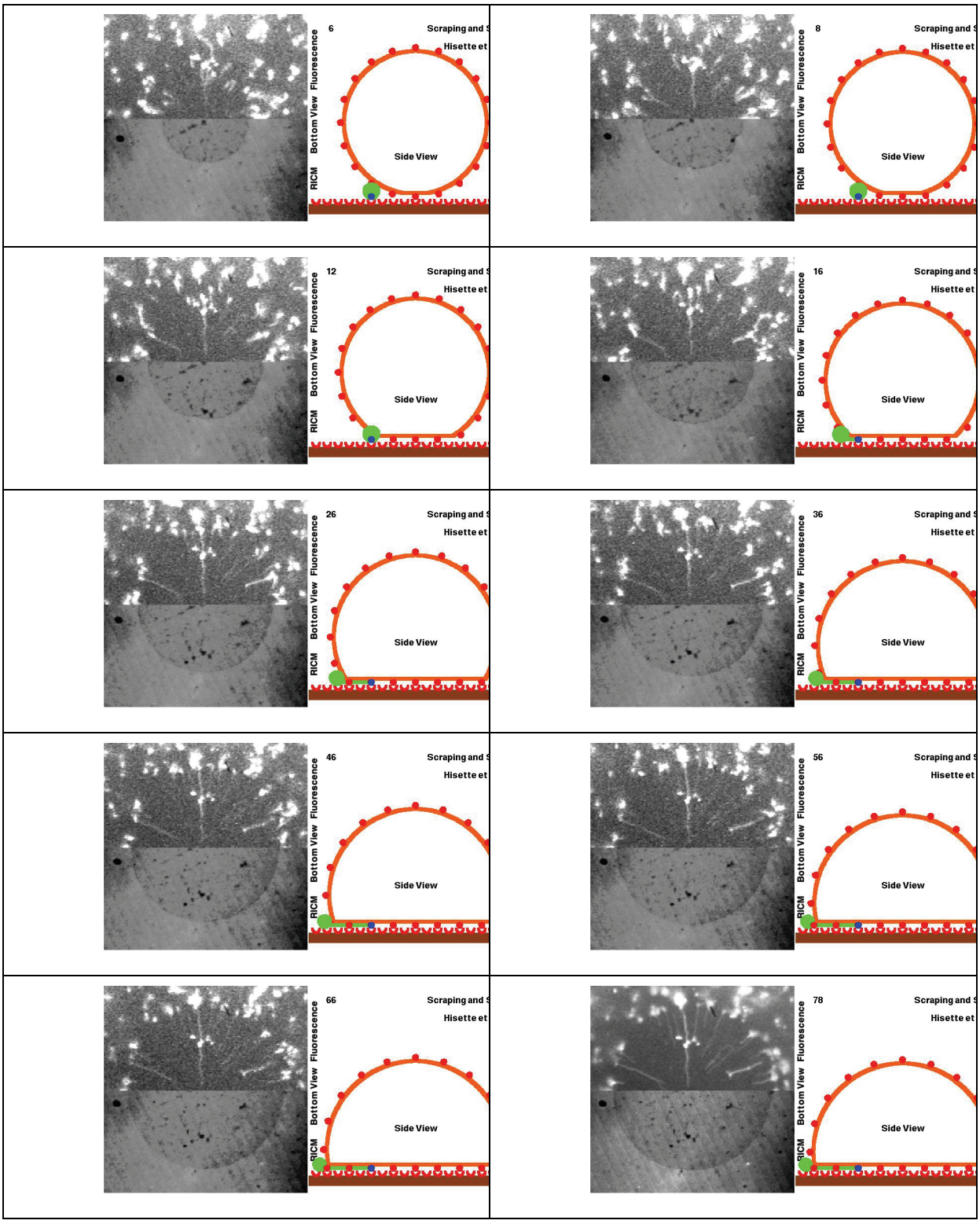



**Figure 3.13 : Quelques images extraites d'un film montrant l'adhésion d'une vésicule et le comportement des molécules d'ADN dans la région d'adhésion. Sur la partie gauche de chaque groupe d'images est présentée la moitié d'une image de fluorescence et la moitié d'une image RICM. Elles correspondent à la même région de l'échantillon et chaque image est le miroir de l'autre. Sur les images de fluorescence (en haut), on voit les molécules d'ADN qui s'étirent au fur et à mesure de l'étalement de la vésicule. Sur les images RICM (en bas), on observe la progression du patch adhésif. Sur la partie droite de chaque groupe d'images, nous avons représenté une vue de profil de la vésicule en train de s'étaler sur le substrat en repoussant une molécule d'ADN vers l'extérieur de la zone d'adhésion. On remarque le changement de**

**forme de la vésicule au cours de l'adhésion : elle s'étale à volume constant, en consommant son excès de surface jusqu'à atteindre une forme d'équilibre (cf. chapitre "Introduction").**

La figure 3.14 b montre trois groupes d'images représentant trois étapes de ce processus. Chaque groupe est divisé en deux images, représentant chacune la même zone de l'échantillon, l'une en RICM et l'autre en fluorescence. Nous avons pris une moitié de chaque image originale RICM et de fluorescence et nous les avons associées en position de miroir l'une de l'autre.

Le premier groupe d'images a été pris avant que ne débute l'adhésion. L'image du bas montre les anneaux caractéristiques d'une vésicule proche de la surface mais pas encore adhérée. Au-dessus, on voit une image renversée des ADNs en-dessous de cette vésicule. le mouvement de la vésicule qui s'approche de la surface induit un léger étirement des chaînes d'ADN les plus proches du bas de la vésicule : on voit sur l'image qu'un ADN présente un léger étirement, ici vertical. A la seconde étape, deux secondes plus tard, l'adhésion a débuté. Les ADNs atteints par le front d'étalement du patch d'adhésion ont commencé à s'étirer. La troisième étape montre le résultat final, lorsque le front de propagation s'est arrêté. Une meilleure qualité d'image a été obtenue pour cette situation finale en moyennant plusieurs dizaines d'images successives. On voit clairement que la plupart des ADNs sous le patch ont été étirés durant le processus d'adhésion, une faible quantité de chaînes restant sous le patch dans une configuration enroulée.

Sur la figure 3.14 a, nous avons schématisé le processus d'étalement de la vésicule et le comportement d'une molécule d'ADN située en-dessous au cours des mêmes phases que dans la figure 3.14 b. Nous avons représenté une vésicule qui s'étale sur la surface. Le processus d'adhésion commence par la formation de quelques liaisons ligand-récepteur. Le patch d'adhésion nucléé a une forme grossièrement circulaire et grandit radialement. Il attrape les molécules d'ADN qu'il trouve sur son chemin et les plaque sur la surface en les étirant. L'étalement, d'abord très rapide, ralentit exponentiellement, avant que l'adhésion s'arrête lorsque la vésicule a atteint une forme d'équilibre.

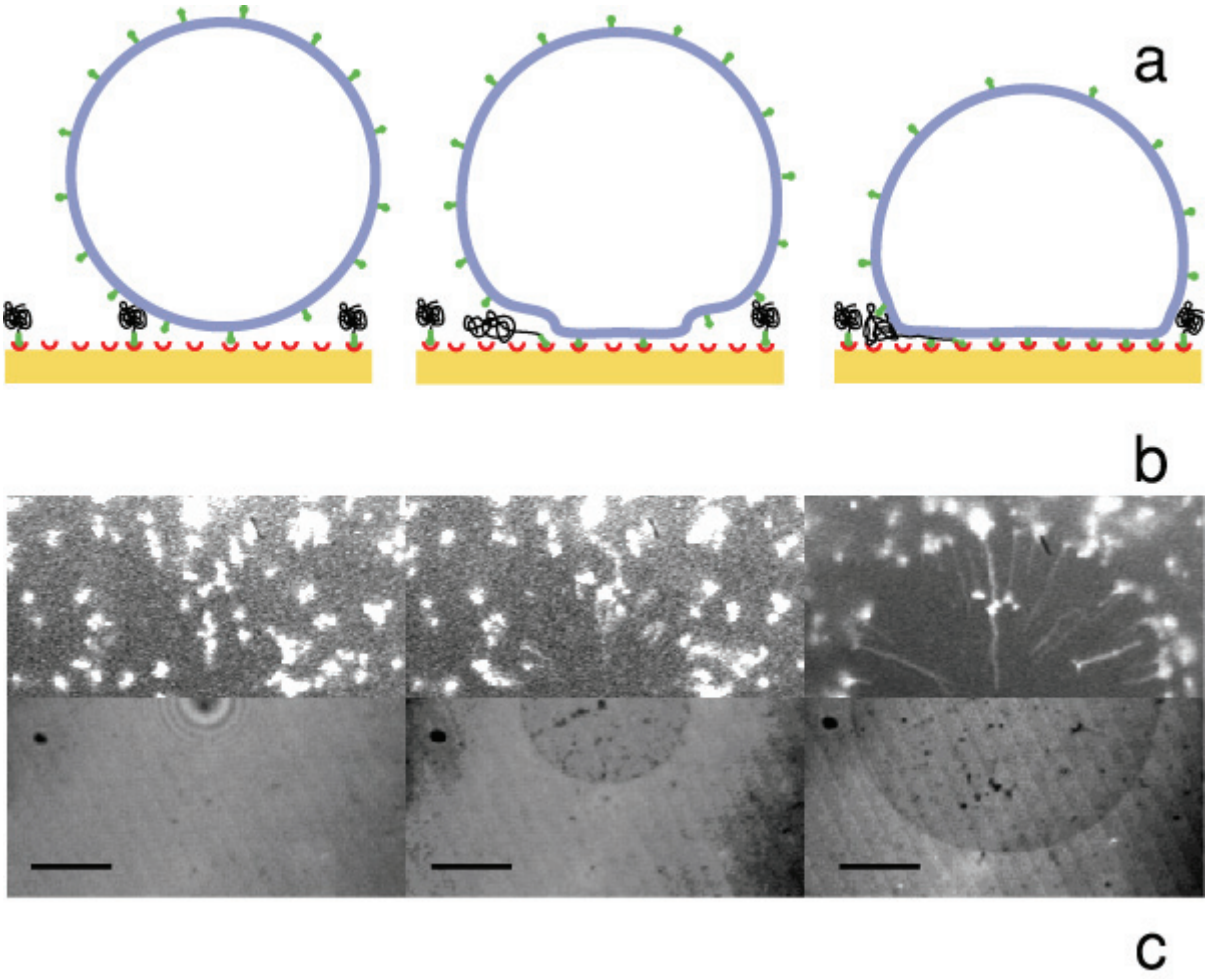



**Figure 3.14 : a) Schématisation du processus d'étalement d'une vésicule sur un tapis d'ADN b) trois étapes de l'étirement de molécules d'ADN lors de l'adhésion d'une vésicule de taux de biotine 1:25. Barre = 10 µm.**

Pour comprendre précisément quels sont les mécanismes qui gouvernent l'étirement des molécules d'ADN, nous nous sommes attachés à étudier le comportement individuel de ces molécules au cours du processus d'adhésion. Pour cela, nous avons mesuré la distance $r_h$ au centre du patch d'adhésion du début de la tête de molécules d'ADN en fonction du temps, ainsi que la distance $r_f$ au centre du front d'étalement (qui peut varier selon la direction radiale choisie). La figure 3.15 indique précisément la position des points de mesure.

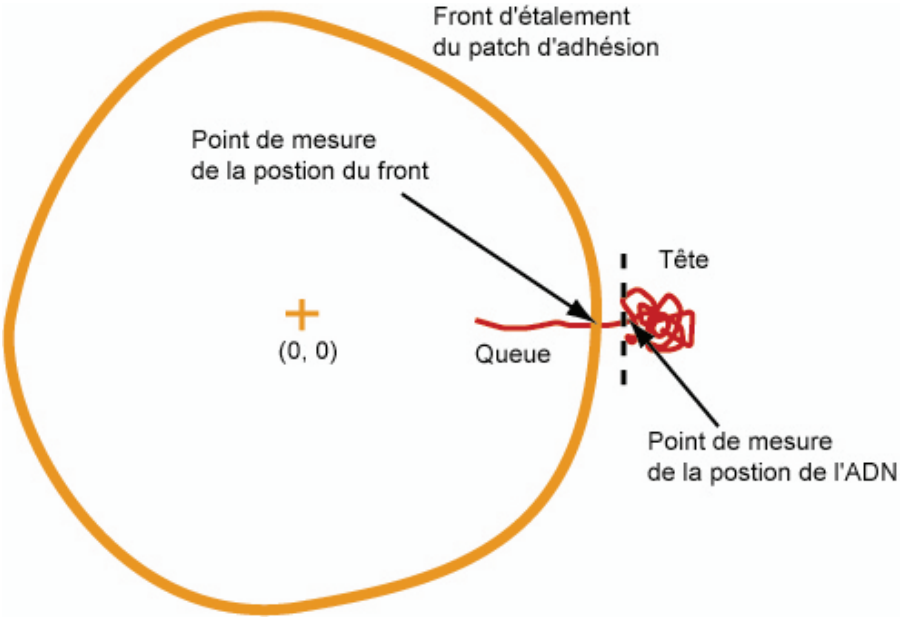



**Figure 3.15 : Emplacement des mesures de position de la tête de la molécule d'ADN et du front d'étalement par rapport au centre du patch adhésif de la vésicule.**

Les deux courbes de la figure 3.16 montrent une cinétique d'adhésion de vésicules typique de temps caractéristique d''étalement de l'ordre de 10 secondes. La courbe de droite corrèle $r_h$ et $r_f$. Elle montre que les forces induites par le front de propagation commencent à agir sur la chaîne d'ADN quand le front s'en approche à quelques micromètres. A partir de ce moment, la chaîne conserve sa position à l'orée du front jusqu'à ce que la propagation cesse. Les expériences montrent que quelques instants avant la nucléation de l'adhésion, le mouvement de la vésicule qui s'approche de la surface induit un léger étirement des chaînes d'ADN les plus proches du bas de la vésicule. Le taux de cisaillement maximal (voir annexe) induit par une sphère de rayon $R$ à une distance $h$ de la surface s'écrit :

$$\dot{\gamma} = -9/16\sqrt{6R/h^3}\, dh/dt.$$

donnant avec nos conditions expérimentales $\dot{\gamma} \approx 2\, s^{-1}$. Cet étirement de molécules d'ADN que nous observons est comparable à celui reporté précédemment sur des molécules d'ADN greffées se trouvant dans des écoulements de cisaillement de même $\dot{\gamma}$ (voir chapitre 1). Une fois que la nucléation a eu lieu, le front d'adhésion se propage avec une vitesse initiale de l'ordre de 10 µm.s$^{-1}$ (dans le cas présenté sur la figure 3.14) et avec un angle de contact de 90° indiqué par l'absence d'anneaux d'interférences autour de la zone d'adhésion sur l'image RICM (figure 3.14).

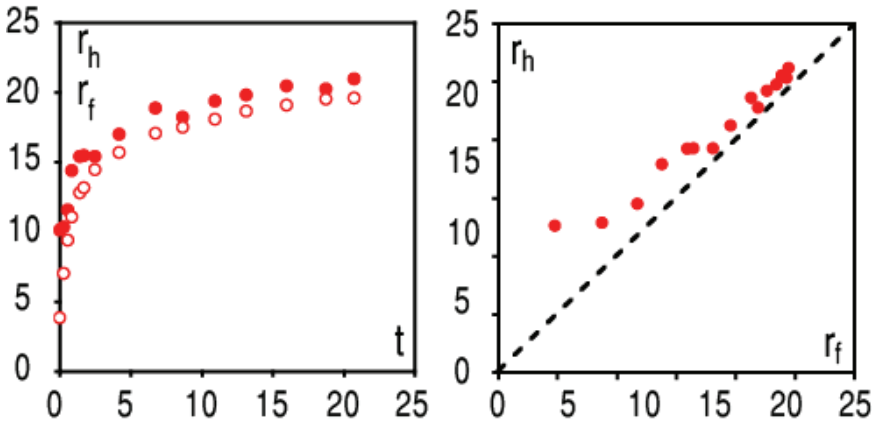



**Figure 3.16 : A gauche : distance au centre de la tête d'une molécule d'ADN et distance au centre du front d'étalement en fonction du temps. A droite : distance au centre de la tête de l'ADN en fonction de la distance au centre du front.**

La nature de l'écoulement hydrodynamique généré par la progression de la paroi verticale de la membrane combine une composante uniforme et une composante de cisaillement (figure 3.17). Loin de la paroi verticale, et jusqu'à quelques microns au-dessus de la surface, l'écoulement a la même symétrie que celle d'un fluide incompressible autour d'un cylindre en expansion. La vitesse est radiale et décroît avec la distance *r* au centre du patch (96) :

$$v(r) = \frac{dr_f(t)}{dt}\frac{r_f(t)}{r}$$

On peut conclure à partir des deux graphes de la figure 3.16 que l'ADN commence à s'étirer à partir de sa position non perturbée à un moment où la vitesse atteint environ 3 µm.s$^{-1}$, une valeur pour laquelle notre molécule d'ADN est connue pour s'étirer seulement de quelques micromètre (78), ce qui est cohérent avec les valeurs de $r_h$-$r_f$ montrées dans la figure.

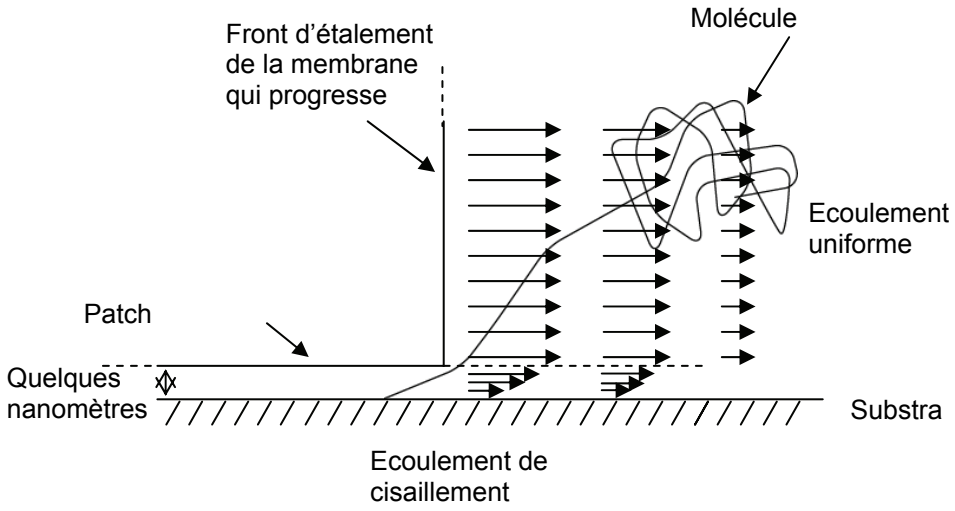



**Figure 3.17 : Description de la nature de l'écoulement hydrodynamique à proximité du front d'étalement : composante uniforme et composante de cisaillement.**

Près de la surface, l'écoulement a une structure en cisaillement, avec un taux de cisaillement à peu près donné par $v(r)/h$ où $h$ est la distance entre la membrane et la surface. Pour une vitesse maximale de 10 $\mu$m $s^{-1}$ et $h \approx 7$ nm, le taux de cisaillement prend une valeur $\dot{\gamma} \approx 500\, s^{-1}$ et décroît exponentiellement jusqu'à zéro avec le ralentissement de la progression du patch. De tels taux de cisaillement élevés peuvent étirer fortement une molécule d'ADN (ref). Néanmoins, dans notre géométrie, la région soumise à ce fort taux de cisaillement est confinée à la proximité immédiate de la surface et du front de propagation. Ainsi, les forces d'écoulement en jeu aident certainement à orienter les segments de chaîne d'ADN à proximité du front d'étalement, mais il n'y a aucune force à longue distance susceptible d'étirer les molécules d'ADN plus de deux ou trois micromètres en avant du front, correspondant à ce qui est observé expérimentalement.

Hormis l'écoulement, un autre mécanisme entre en jeu : l'effet rouleau-compresseur de la membrane. Il est dû à la formation de liaisons ligand-récepteur entre la membrane et la surface en grand nombre qui plaquent la molécule d'ADN sur la surface et la maintiennent dans sa position étirée. Chaque fois que la molécule d'ADN est étirée de quelques micromètres par l'écoulement, elle est ensuite immédiatement coincée par la membrane. L'écoulement n'étire la molécule que sur une petite portion, mais au final la molécule d'ADN peut être étirée sur une grande distance. La densité de liaisons dépend de plusieurs facteurs, mais elle est clairement suffisante pour prévenir la relaxation des chaînes d'ADN vers leur configuration en pelote une fois l'adhésion terminée.

La figure 3.12 montre l'existence de ces deux régimes. Près du centre du patch d'adhésion, le degré de repliement des molécules d'ADN est faible, et plus on s'en éloigne, plus le repliement est important. La vitesse de propagation du front d'étalement diminuant avec l'éloignement du centre du patch, la force de l'écoulement généré par cette progression est de plus en plus faible, et étire donc de plus en plus faiblement les molécules d'ADN. A un moment, la vitesse de propagation du front devient trop faible pour générer des écoulements capables d'étirer les molécules d'ADN. Seul le passage de la membrane sur la molécule d'ADN peut étirer celle-ci. A ce moment-là, la distance à laquelle on se trouve du centre du patch n'a plus d'importance, et c'est pourquoi les courbes présentées sur la figure 3.12 atteignent un plateau.

On peut conclure que l'étirement des molécules d'ADN est causé par la combinaison de forces visqueuses agissant au voisinage du front d'étalement de la membrane et par une interaction directe de l'ADN avec la membrane qui avance.

# 3 Conclusion

Notre travail présente les mécanismes entrant en jeu lorsqu'une membrane adhésive s'étale sur un substrat couvert de macromolécules biologiques. Nous avons découvert que le front d'adhésion qui progresse génère des forces vers l'extérieur sur les bio-molécules ancrées au substrat, dans un mouvement de "raclement" capable d'étirer fortement les chaînes d'ADN greffées. Nos résultats suggèrent que ces forces ont une faible composante hydrodynamique agissant sur quelques micromètres et une forte composante stérique agissant au niveau du contact entre la membrane et le polymère. Lorsque la bicouche avance sur une section étirée d'une molécule d'ADN, elle l'agrafe sur le substrat, grâce à la formation de nombreuses liaisons ligand-récepteur, un mécanisme qui nous rappelle les Lilliputiens de Jonathan Swift liant Gulliver au sol.

La découverte de ces mécanismes aura probablement un large impact dans l'étude de la bio-adhésion : cela fournira non seulement de nouvelles indications pour effectuer des expériences et créer des systèmes biomimétiques plus pertinents, mais cela contribuera également à mieux comprendre l'adhésion cellulaire.

# Annexe

Dans cette partie, nous rappelons quelques résultats théoriques utiles pour l'interprétation des résultats expérimentaux de ce chapitre. Nous rappellerons tout d'abord ce qu'est un écoulement de Poiseuille, ce qui nous permettra de développer le marteau de Poiseuille. Nous en viendrons ensuite à l'approche d'une surface par une sphère. C'est ce dernier résultat qui est utilisé dans le chapitre.

## L'écoulement de Poiseuille à une dimension

La figure 3.18 montre comment on produit un écoulement de Poiseuille.

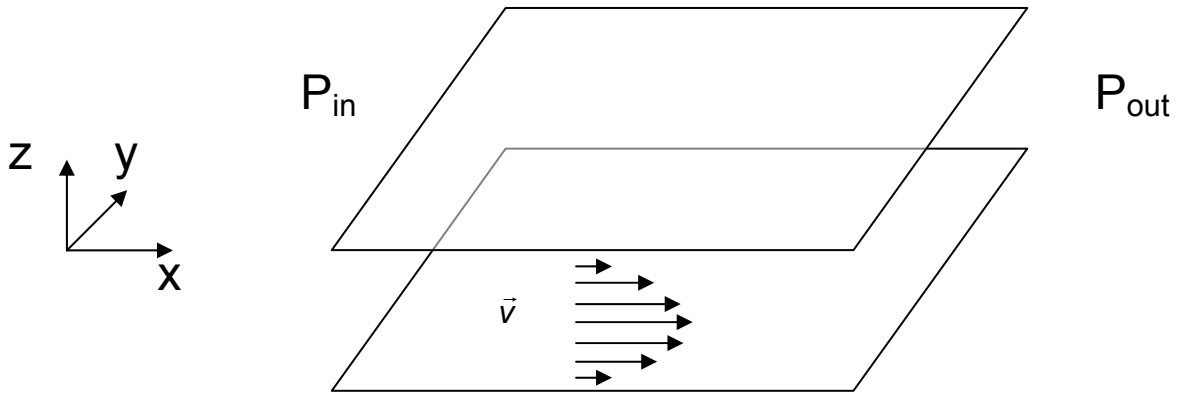



**Figure 3.18 : Ecoulement de Poiseuille : le fluide est poussé entre deux plaques immobiles par la différence entre la pression en amont $P_{in}$ et la pression en aval $P_{out}$. La vitesse est donc nulle au niveau des parois. Elle n'a qu'une composante suivant l'axe des x, qui dépend de z. L'écoulement est de forme parabolique.**

Cet écoulement est caractérisé par une vitesse de la forme : $\vec{v} = (v_x, 0, 0)$. D'après l'équation de Stokes, on peut écrire :

$$\frac{\partial^2 v_x}{\partial z^2} = \frac{1}{\eta}\frac{\partial p}{\partial x} \qquad (1)$$

Après intégration, on obtient :

$$v = \frac{1}{2\eta}\frac{\partial p}{\partial x} z(z-h) \qquad (2)$$

On peut calculer la vitesse moyenne :

$$\bar{v} = \frac{1}{h}\int_0^h dz\, v = -\frac{h^2}{12\eta}\frac{\partial p}{\partial x}, \qquad (3)$$

ce qui nous permet d'écrire que :

$$v = 6\bar{v}\frac{z}{h}\left(1-\frac{z}{h}\right) = \dot{\gamma}_0 z\left(1-\frac{z}{h}\right) \tag{4}$$

où $\dot{\gamma}_0 = 6\bar{v}/h$ est le taux de cisaillement à la paroi, c'est-à-dire pour $z = 0$. Sur les parois s'exerce une contrainte selon *x* : $\sigma = \eta\dot{\gamma}$.

L'écoulement de Poiseuille est un écoulement parabolique, avec une vitesse maximale à mi-hauteur.

## Ecoulement entre deux surfaces planes : le marteau de Poiseuille

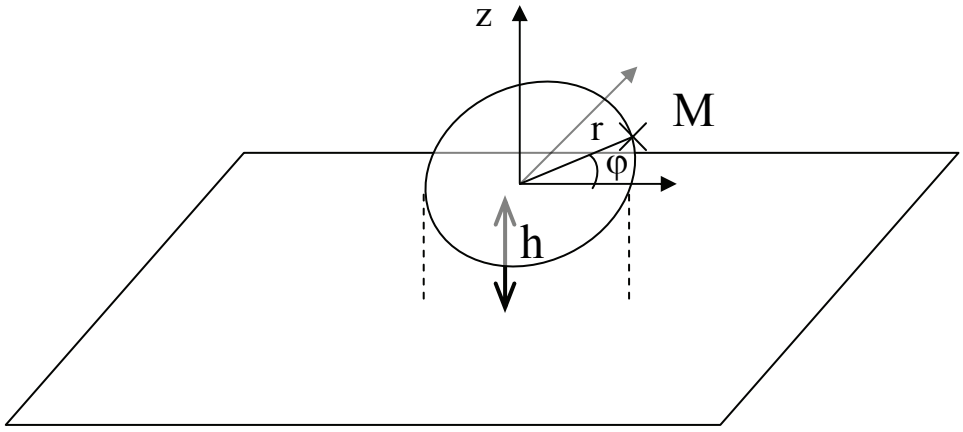



**Figure 3.19 : Disque de rayon R approchant une surface plane. Le disque et la surface sont distants de h. On utilise des coordonnées cylindriques.**

Le marteau de Poiseuille est équivalent à un disque de rayon *R* approchant une surface plane (figure 3.19). Nous sommes dans l'approximation de lubrification, donc, à tout instant, la vitesse est parallèle aux surfaces : $\vec{v} = (v_r(r,z),0,0)$. D'après l'équation de conservation du liquide :

$$\frac{1}{r}\frac{\partial(r(v_r))}{\partial r} + \frac{\partial v_z}{\partial z} = 0 \tag{5}$$

En intégrant sur l'épaisseur *h* entre les plaques, on obtient :

$$\frac{1}{r}\frac{\partial r\, h\bar{v}_r(r)}{\partial r} = -\frac{\partial h}{\partial t} \tag{6}$$

On en déduit ainsi la relation entre la vitesse moyenne $\bar{v}_r$ et la distance entre les surfaces *h(t)* :

$$\bar{v}_r = -\frac{r}{2h}\frac{\partial h}{\partial t} \tag{7}$$

Le taux de cisaillement à la paroi vaut ici :

$$\dot{\gamma} = 3\frac{r}{h^2}\frac{\partial h}{\partial t} \tag{8}$$

On peut montrer que :

$$\frac{\partial p}{\partial r} = -\frac{12\eta}{h^2}\bar{v}_r(r) = 6\eta\frac{r}{h^3}\frac{\partial h}{\partial t} \tag{9}$$

Après intégration, on obtient l'expression de la pression sur la paroi :

$$p = p_0 + 3\eta\frac{1}{h^3}\left|\frac{\partial h}{\partial t}\right|\left(R^2 - r^2\right) \tag{10}$$

ce qui nous permet de calculer la force exercée selon *z* par le disque sur le liquide :

$$F = \int_0^R (p - p_0)2\pi r\, dr = \frac{3\pi\eta}{2}\frac{1}{h^3}\frac{\partial h}{\partial t}R^4 \tag{11}$$

## Sphère approchant d'une surface plane

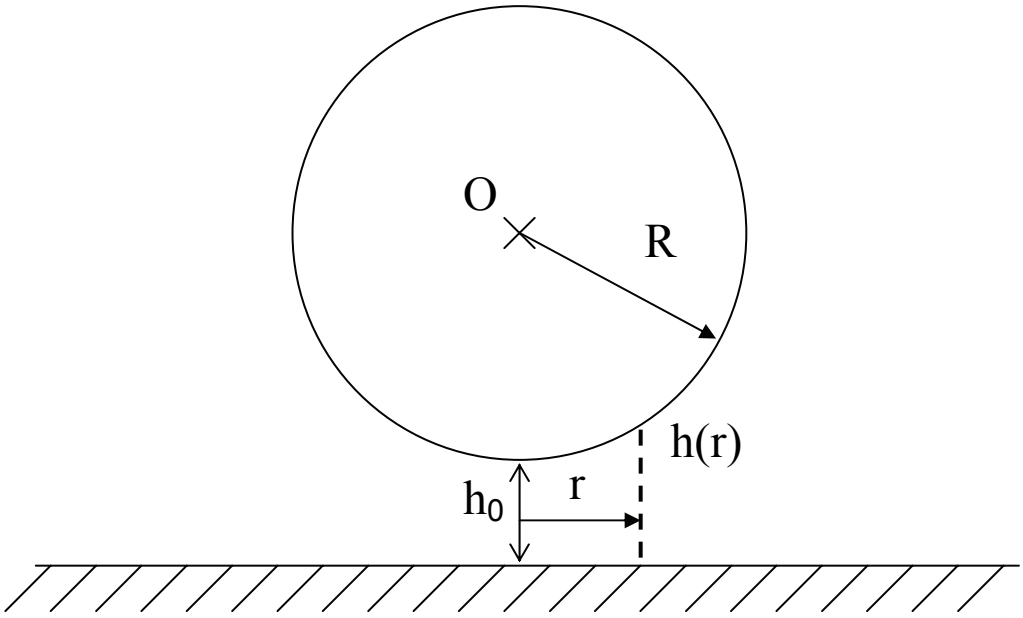



**Figure 3.20 : Sphère dure approchant d'une surface plane.**

Considérons une sphère dure approchant d'une surface plane (figure 3.20). Nous sommes toujours dans l'approximation de lubrification, avec une vitesse parallèle à la paroi. Contrairement au cas du marteau de Poiseuille, la hauteur *h* varie cette fois en fonction de *r* :

$$h(r) \approx h_0 + \frac{1}{2}\frac{r^2}{R} \tag{12}$$

On procède de la même manière pour déterminer la relation entre le gradient de pression radial et la hauteur *h* qui s'écrit ici :

$$\frac{\partial p}{\partial r} = 6\eta\frac{r}{h^3(r)}\frac{\partial h_0}{\partial t} \tag{13}$$

On en déduit l'expression de la pression :

$$p(r) = p_0 + 3\eta R \frac{1}{\left(h_0 + \frac{1}{2}\frac{r^2}{R}\right)^2}\left|\frac{\partial h_0}{\partial t}\right| \approx p_0 + \frac{3\eta}{h_0^3}\left|\frac{\partial h_0}{\partial t}\right|\left(Rh_0 - r^2\right) \tag{14}$$

A partir de cette expression, on calcule la force :

$$F = 6\pi\eta R \frac{R}{h_0}\left|\frac{\partial h_0}{\partial t}\right| \tag{15}$$

Le taux de cisaillement du fluide en $h_0$ s'écrit :

$$\dot{\gamma}_0 = -3\frac{r}{h_0^2}\frac{1}{\left(1+\frac{1}{2}\frac{r^2}{h_0 R}\right)^2}\frac{\partial h_0}{\partial t} \tag{16}$$

Le taux de cisaillement atteint sa valeur maximale pour $r^2 = 2h_0R/3$ :

$$\dot{\gamma}_{max} = -\frac{9}{16}\sqrt{\frac{6R}{h_0^3}}\frac{\partial h_0}{\partial t} \tag{17}$$

# *Chapitre 4*

# *Déformation d'une membrane de phospholipides par une molécule d'ADN unique*

Dans le chapitre précédent, nous avons décrit le comportement de molécules d'ADN greffées sur une surface sur laquelle s'étalent des vésicules phospholipidiques adhésives. Nous avons vu que la majorité de ces chaînes de polymère étaient étirées radialement lors de l''adhésion par un processus d'étirement et d'agrafage. Nous allons maintenant nous intéresser à un autre aspect des interactions membranes-polymères en étudiant les déformations de la membrane des vésicules induites par le polymère. Nous explorerons la situation, moins courante, des molécules d'ADN en configuration "pelote" confinées sous le patch d'adhésion. Dans le chapitre "Introduction", nous avons indiqué quelques résultats théoriques montrant qu'un polymère gaussien confiné entre deux parois exerce une pression sur la paroi supérieure, pression dont nous avons donné l'expression. Nous avons également indiqué la forme que peut prendre cette paroi lorsqu'elle est déformable. Cette forme dépend de la balance entre plusieurs énergies : énergie d'adhésion de la membrane sur la surface, énergie de courbure de la membrane, énergie de confinement du polymère et énergie associée à la tension dans la membrane. Dans ce chapitre, nous allons comparer nos observations expérimentales à ces prédictions théoriques.

# 1 Description du système

## 1.1 Rappel de la configuration expérimentale

La configuration expérimentale est similaire à celle que nous avons décrite dans le chapitre précédent : on dépose des vésicules phospholipidiques adhésives sur des tapis de molécules d'ADN. On fait aussi varier la quantité de biotine dans la membrane, ce qui contrôle la force d'adhésion de la vésicule sur la surface. Mais cette fois, on n'étudie pas les chaînes d'ADN qui sont étirées et dont la tête sort de la zone d'adhésion. On s'intéresse aux ADNs confinés complètement sous la membrane.

Deux configurations sont possibles : soit la molécule est enroulée en pelote, soit elle est partiellement étirée, mais la tête est restée sous le patch adhésif. Ces deux situations se produisent assez fréquemment, même si elles ne sont pas aussi courantes que l'étirement radial des ADNs avec une tête fluctuante en périphérie de la zone d'adhésion. Dans ces deux cas, on étudie les régions de la membrane au-dessus de ces molécules, ainsi que ces molécules elles-mêmes, par des techniques décrites dans le paragraphe suivant.

## 1.2 Techniques et méthodes utilisées

Les mêmes techniques d'observation que dans le chapitre précédent nous seront utiles : la microscopie optique par contraste interférentiel en réflexion (RICM) et la microscopie de fluorescence. La première nous permet d'observer la forme de la membrane à proximité de la surface. Comme nous l'avons vu précédemment, on peut ainsi déterminer si une vésicule est adhérée ou non, et "voir" la zone d'adhésion. Le patch adhésif est visible sous la forme d'un disque uniformément gris, qui signifie que la membrane dans cette zone est, à la résolution optique près, à la même distance du substrat. Ainsi, si une partie de la membrane est déformée dans cette région à cause de la présence d'un ADN qui exerce une pression sur elle, la technique de RICM nous le révèlera, à condition que cette déformation soit de dimensions supérieures aux résolutions optiques accessibles (environ 300 nm dans le plan xy et 5 nm en z). Une telle déformation, si elle est de forme circulaire, sera révélée par la présence d'anneaux d'interférences, dont le nombre nous permettra de déterminer la hauteur de cette "montagne". Cette analyse est la même que celle qui nous permet de calculer le profil de forme d'une vésicule à proximité de la surface et qui a été décrite dans le chapitre "Matériel et techniques expérimentales".

Grâce à la microscopie de fluorescence, nos ADNs fluorescents sont visibles, et on peut ainsi déterminer si les éventuelles déformations de la membrane sont bien dues à la présence d'une ou de plusieurs chaînes de polymère, dont on connaîtra alors également la

forme. On peut aussi observer les fluctuations d'un polymère confiné autour de son point d'attache, et les comparer avec celles des molécules d'ADN libres.

# 2 Résultats expérimentaux

## 2.1 Déformation de la paroi de vésicules géantes par des molécules d'ADN

Lorsqu'une vésicule s'étale sur un tapis de molécules d'ADN, la membrane peut être déformée de plusieurs manières par la présence des chaînes de polymère. Tout d'abord, en présence d'ADNs étirés, on observe souvent sur les images RICM des nervures plus sombres que le fond gris du disque adhéré, superposées aux chaînes polymères étirées visualisées en mode fluorescence (figure 4.1). La courbe théorique de l'intensité lumineuse RICM (figure 2.8 du chapitre "Matériel et techniques expérimentales") nous apprend que cela correspond à une zone de membrane légèrement plus élevée que le patch d'adhésion : la membrane se situe entre l'altitude moyenne du patch et le premier minimum de la courbe théorique. On peut donc affirmer que l'on visualise ainsi des "tunnels" formés par la membrane au dessus de l'ADN. Cependant, il est assez difficile d'estimer même une altitude moyenne pour ces tunnels, car il manque en général sur l'image une référence permettant de connaître la valeur de ton de gris du premier minimum sombre (figure 2.8 du chapitre "Matériel et techniques expérimentales"). Enfin, il n'est pas toujours possible d'associer ces tunnels à des molécules d'ADN : parfois il n'y a pas de tunnel décelable au dessus d'un ADN, et parfois la membrane adhérée présente ce type de tunnels en l'absence d'ADN observable.

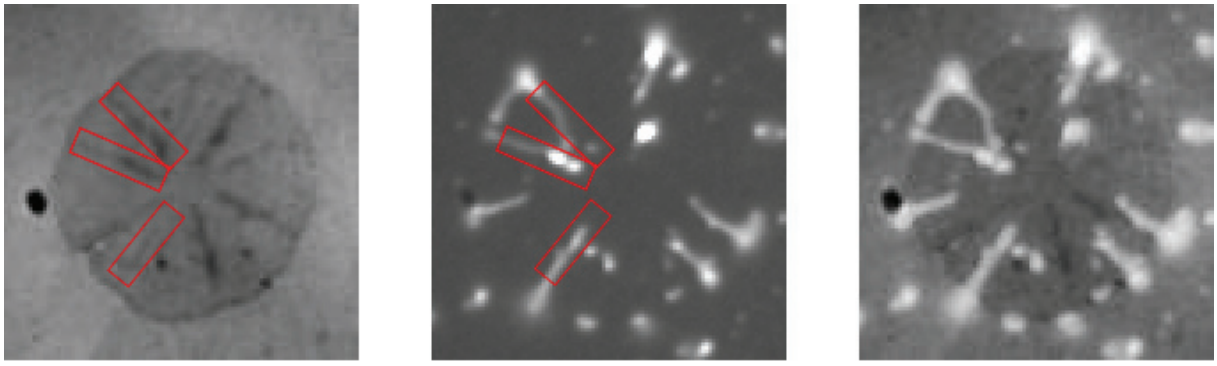


**Figure 4.1 : A gauche, image RICM du patch d'adhésion d'une vésicule de taux de biotine 1:50. On remarque la présence de tunnels gris sombres. Certains d'entre eux ont été encadrés en rouge. Au milieu, image en fluorescence de la même région. Les ADNs responsables des tunnels de l'image de gauche ont été encadrés en rouge. Certains tunnels ne semblent pas liés à la présence d'une molécule d'ADN. De même, tous les ADNs ne semblent pas créer de tunnels, ou alors de taille inférieure à la résolution de notre technique. A droite, superposition de l'image RICM et de l'image de fluorescence.**

Si la queue des molécules d'ADN est capable de déformer la membrane de vésicules adhérées, on peut s'attendre à ce que la tête de ces ADNs étirés, et surtout les ADNs entiers coincés sous la membrane, des objets plus hauts et plus larges que la queue, soient également à l'origine de bosses dans la membrane. En scrutant attentivement la zone d'adhésion de vésicules sous lesquelles on observe soit des ADNs entiers, soit des ADNs étirés dont la tête est restée sous le patch adhésif, on constate la présence de petites "montagnes" ou "bulles". Elles se traduisent, comme nous l'avons expliqué plus haut, par des anneaux d'interférences sur l'image RICM. Ces anneaux sont plus ou moins circulaires, et ne méritent parfois plus vraiment le terme d'anneaux. Ceci signifie que les montagnes ne présentent pas toujours une symétrie circulaire, sans doute car le processus de piégeage de l'ADN par la membrane adhérente est rapide et donc hors équilibre.

La figure 4.2 présente les images RICM agrandies de huit de ces bulles. A côté de chaque bulle nous présentons l'image en fluorescence de la même région, avec l'ADN situé sous la bulle encerclé en rouge. On remarque que ces bulles sont assez différentes les unes des autres. Comme nous le disions ci-dessus, certaines présentent de beaux anneaux bien visibles, tandis que d'autres ont des anneaux incomplets, dont la largeur varie le long de leur contour. Dans ce cas, il devient difficile de trouver le centre de la montagne et de calculer son profil moyen, au vu de la technique que nous utilisons, et qui est détaillée dans le paragraphe suivant. On remarque également que les ADNs à l'origine des bulles peuvent être soit entièrement en configuration pelote, soit partiellement étirés.

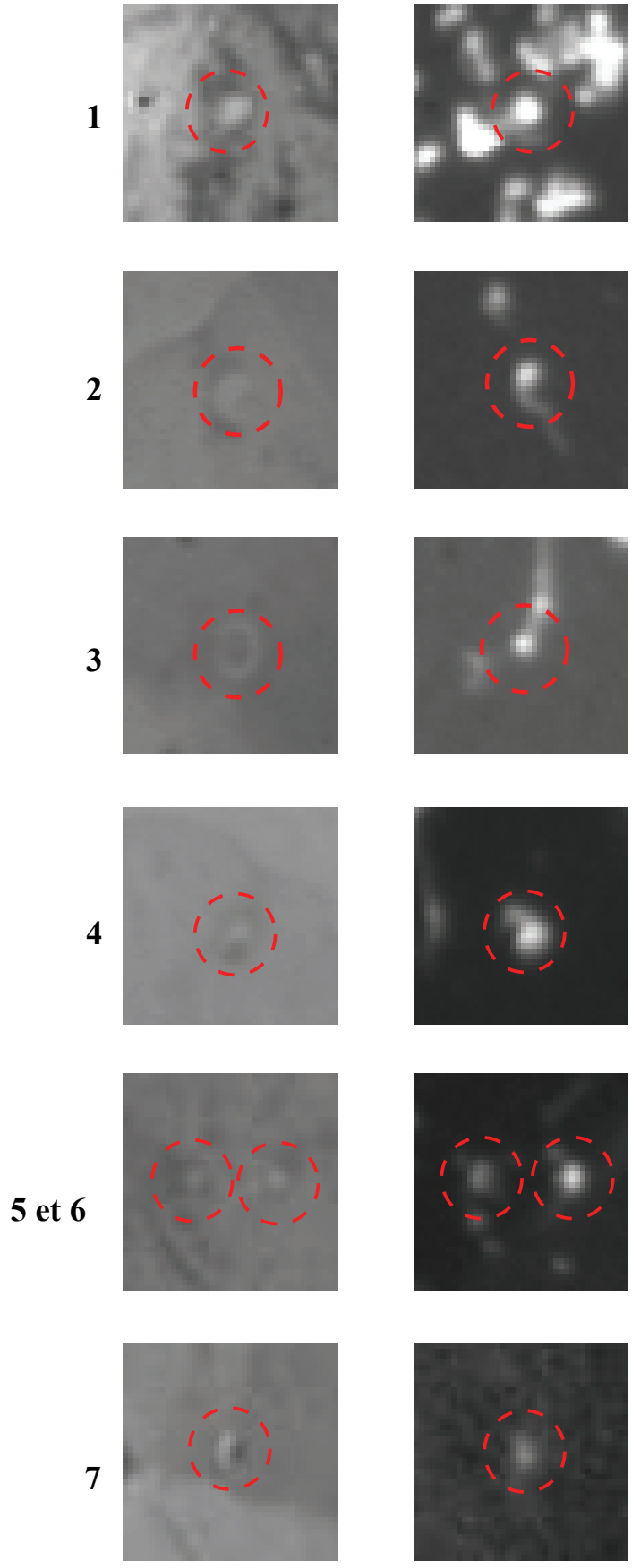



**Figure 4.2 : A gauche, images RICM de huit bulles. A droite, images en fluorescence de l'ADN identifié sous chaque bulle. Les bulles 1 et 7 ne sont pas exploitables et sont montrées à titre d'exemple.**

## 2.2 Analyse des bulles

Comme nous l'avons vu sur la figure précédente, les variations de ton de gris sur une image RICM sont faibles, et il nous faut calculer un profil moyen d'une bulle en intégrant sur 2π pour améliorer le rapport signal sur bruit. La méthode de calcul de ce profil intégré sur 2π sera donnée ultérieurement en annexe. C'est pourquoi le manque de symétrie de certaines bulles pose un problème. Une fois le profil de niveaux de gris obtenu, nous calculons le profil de forme de la bulle. La méthode employée est similaire à celle utilisée pour calculer la forme de la membrane d'une vésicule à proximité de la surface et qui est décrite dans le chapitre "Matériel et techniques expérimentales" : on utilise les minima et les maxima d'intensité successifs comme points de repère d'altitude de la membrane en se basant sur la courbe théorique (équation (2.1)).

En revanche, contrairement au cas de la vésicule posée, dont la membrane s'élève lorsque l'on s'éloigne du centre de symétrie, la zone la plus basse correspond ici à la périphérie de la bulle, et la membrane s'élève lorsqu'on se rapproche du centre de symétrie. Ici aussi nous devons supposer pour notre calcul que la membrane a une forme monotone de montagne.

Enfin, un calcul même approximatif du profil n'est possible que si on distingue clairement au moins un anneau d'interférence sur la bulle. On sait en effet avec certitude que ce premier anneau correspond à l'altitude $h_0 = \lambda / 8n_1$ (voir paragraphe 3.1.2 du chapitre "Matériel et techniques expérimentales"), soit 51,4 nm. En effet, on ne connaît pas l'altitude du premier anneau extérieur, car on ignore la distance exacte entre la membrane et le substrat. On sait cependant qu'elle se situe autour de 10 nanomètres.

Parmi les huit bulles que nous présentons sur la figure 4.2, nous allons en analyser deux en priorité. Il s'agit des bulles numéro 2 et numéro 3. La figure 4.3 montre leurs profils d'intensité le long d'un rayon moyennés sur 2π. Le centre de la bulle se trouve en 0 sur le graphique et son bord extérieur vers 2-3 µm. En partant de l'extérieur où nous avons le niveau de gris moyen correspondant au patch d'adhésion, nous observons d'abord une décroissance de niveaux de gris conforme à une augmentation progressive de la hauteur *h(r)* du profil à mesure que l'on se dirige vers le centre de la bulle. Les niveaux de gris passent ensuite par un maximum : le premier anneau clair. La présence de ce maximum est importante pour calibrer la différence de hauteur absolue entre le pied du profil et son maximum.

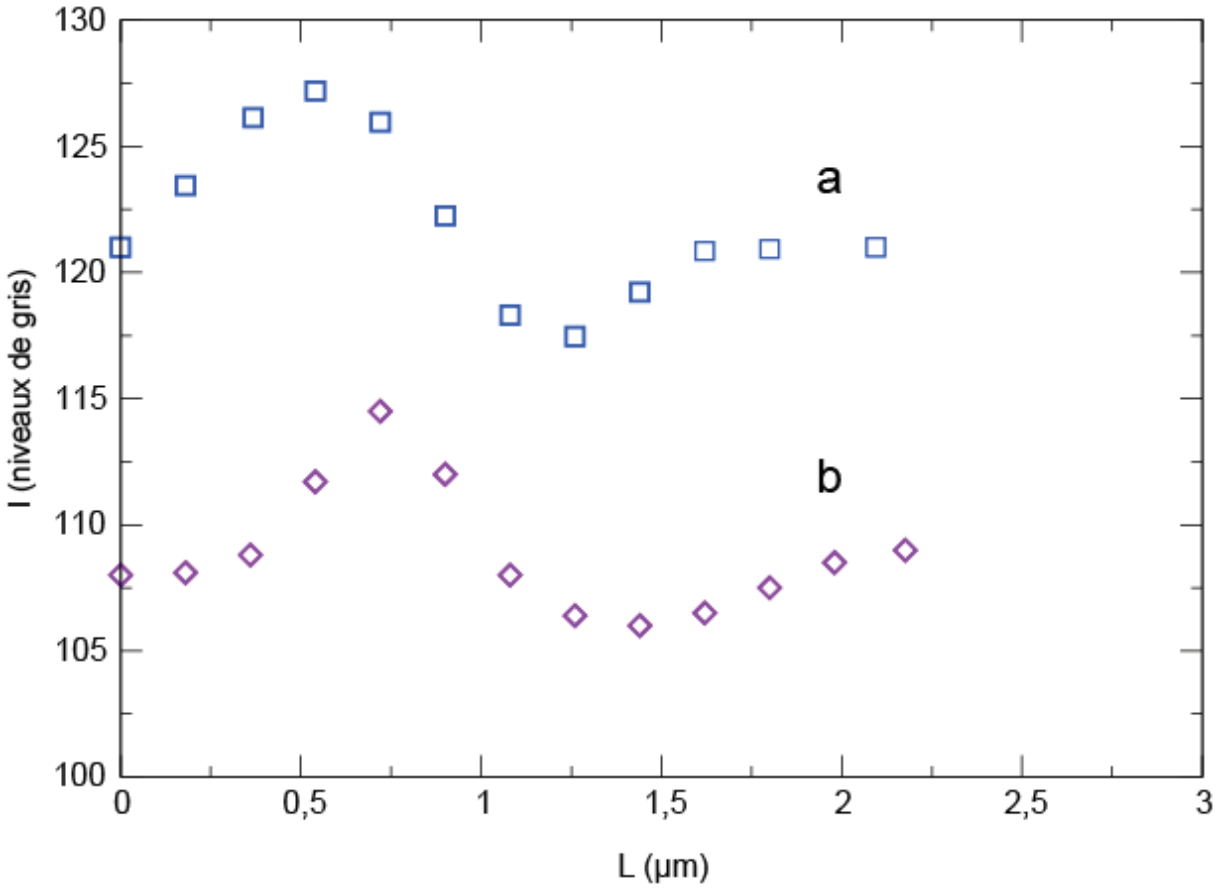



**Figure 4.3 : Profils d'intensité *I* des bulles numéro 3 (en violet) et numéro 2 (en bleu) en fonction de la distance *L* au centre du patch adhésif.**

Commençons par étudier la bulle numéro 2, (profil d'intensité a sur la figure 4.3). La figure 4.4 présente un certain nombre de calculs concernant cette bulle. Tout d'abord, la courbe noire correspond au demi profil de forme de la bulle, c'est-à-dire le profil à partir du centre jusqu'à l'un des bords. On remarque que la montagne est haute de 200 nm, et d'une largeur totale de presque 3 µm. Cela signifie que la bulle est beaucoup plus large que haute, l'échelle des hauteurs étant ici dilatée d'un facteur cinq.

Nous avons comparé ce résultat expérimental avec les prédictions théoriques que nous avons évoquées dans le chapitre "Introduction". Nous expliquerons ultérieurement en annexe à ce chapitre la méthode numérique suivie pour tracer les profils théoriques. Brièvement, elle revient à trouver la forme du profil qui minimise la fonctionnelle d'énergie (équation (1.17)) étant donné un certain nombre de contraintes connues. Par exemple, pour nos profils, la longueur L du patch étant mesurée, nous ne minimisons donc pas l'énergie par rapport à L. Dans ces conditions, en acceptant la validité de l'expression de la pression (équation (1.23)) et la valeur connue de la rigidité de courbure de la membrane $\kappa = 20 k_B T$, les paramètres potentiellement ajustables du problème sont le rayon de giration de la molécule d'ADN et la tension de la membrane. Lorsque l'on peut identifier sans ambigüité une molécule d'ADN entière confinée sous sa bulle, le rayon de giration doit correspondre à

la totalité de la chaîne, ici $R_g = 0{,}56\ \mu m$. Par contre, lorsque seule une partie de la chaîne est confinée sous la bulle, le paramètre $R_g$ doit être ajusté. La tension $\gamma$ de la membrane résulte du processus d'étalement et peut présenter des valeurs assez différentes. Nous devons donc chercher à optimiser les profils en ajustant $\gamma$.

Sur la figure 4.4, nous avons représenté trois courbes théoriques pour lesquelles nous avons imposé un même rayon de giration de 0,56 µm mais des valeurs différentes de la tension. La courbe b correspond visiblement à une tension trop faible ($\gamma = 5.10^3\, k_B T / \mu m^2$), tandis que la courbe c correspond à une tension trop élevée ($\gamma = 5.10^5\, k_B T / \mu m^2$). Aucune des deux courbes ne permet de tracer une bulle de la même hauteur que celle obtenue expérimentalement lorsqu'on lui impose une largeur identique. On obtient un meilleur résultat avec une tension $\gamma = 5.10^4\, k_B T / \mu m^2$ (courbe d) : on trouve une hauteur à peu près identique à la valeur expérimentale, par contre la courbe théorique n'épouse pas très bien la forme de la courbe expérimentale (courbe a).

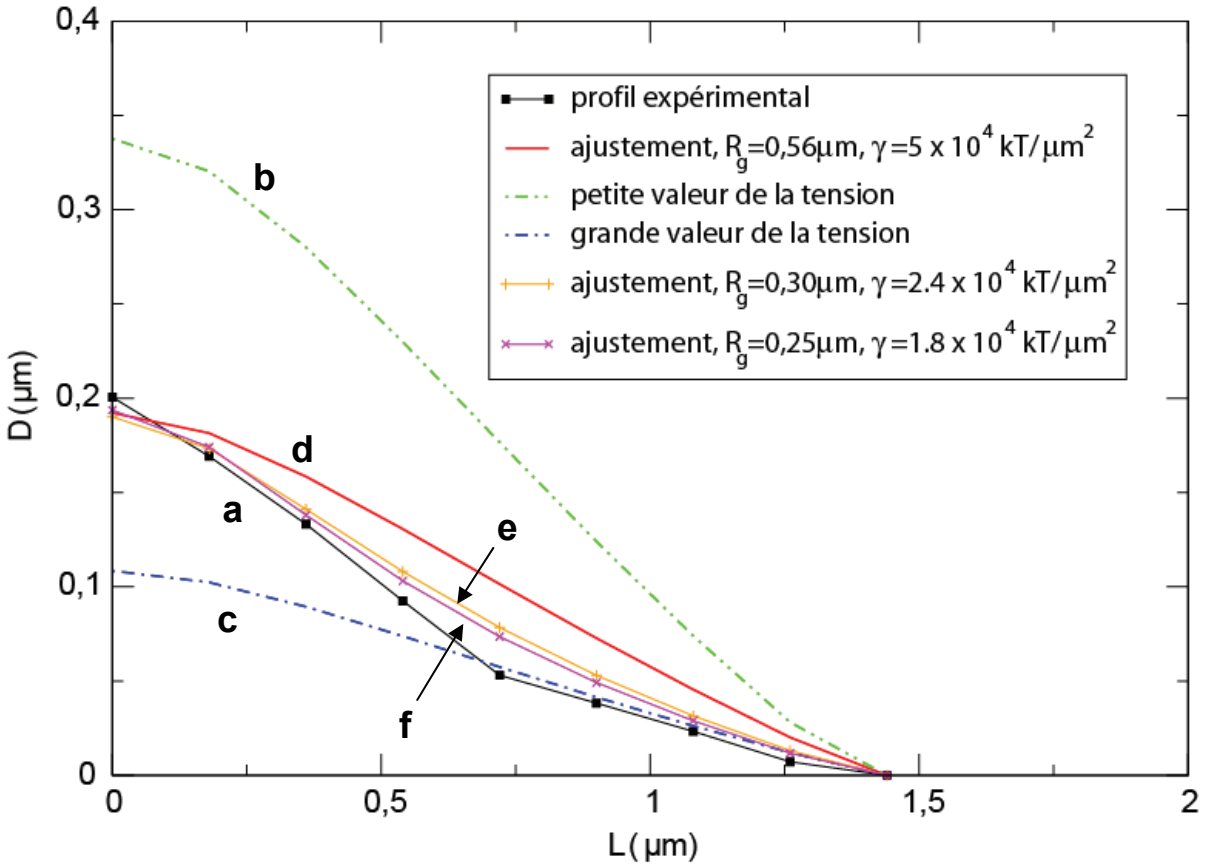



**Figure 4.4 : a) Profil de forme correspondant au profil d'intensité b de la figure 4.3 b) Ajustement pour une faible valeur de la tension c) Ajustement pour une grande valeur de la tension d) Ajustement pour un rayon de giration correspondant à un ADN entier, avec la bonne valeur de tension e) et f) Ajustement pour des rayons de giration plus petits que celui d'une chaîne entière**

Mais nous avons utilisé ici un rayon de giration de 0,56 µm qui correspond à un ADN entier. Or, si on observe l'image de fluorescence numéro 2 de la figure 4.2, on remarque que l'ADN est un peu étiré, et que seule une partie de la chaîne se trouve sous la bulle. Nous avons donc diminué le rayon de giration du polymère se trouvant sous la bulle dans notre étude théorique. Ceci correspond aux courbes e et f de la figure 4.4. Pour chacune de ces courbes, le rayon de giration est différent ($R_g$ = 0,30 µm et $R_g$ = 0,25 µm) et la tension possède une valeur différente. On constate que ces deux courbes sont très proches l'une de l'autre, et qu'elles sont proches également du profil de forme expérimental. Il est impossible de dire laquelle est la meilleure, mais cela confirme qu'il faut bien utiliser un rayon de giration plus faible lorsque seule une partie de la molécule d'ADN est à l'origine de la bulle.

Nous allons maintenant étudier le cas de la bulle numéro 3, dont le profil d'intensité RICM est donné par la courbe b de la figure 4.3. La figure 4.5 montre le profil de forme correspondant de la bulle. Par rapport à la bulle précédente, elle est plus haute et atteint environ 230 nm, c'est la bulle observée la plus haute et la plus large. Nous avons testé sur cette bulle les limites de notre analyse dans le cas où il y a une ambigüité de la détermination du nombre de molécules d'ADN sous la bulle. En effet, dans ce cas précis, l'analyse des images de fluorescence ne permet pas de déterminer avec certitude s'il s'agit d'une ou de deux chaînes confinées. La figure 4.5 montre que l'ajustement des profils peut être effectué aussi bien avec la pression résultante d'une seule chaîne et une tension de $2.10^4$ $k_BT/\mu m^2$ qu'avec la pression résultante de deux chaînes et une tension deux fois supérieure. Ceci souligne l'importance de l'acquisition d'images de grande qualité en RICM et en fluorescence.

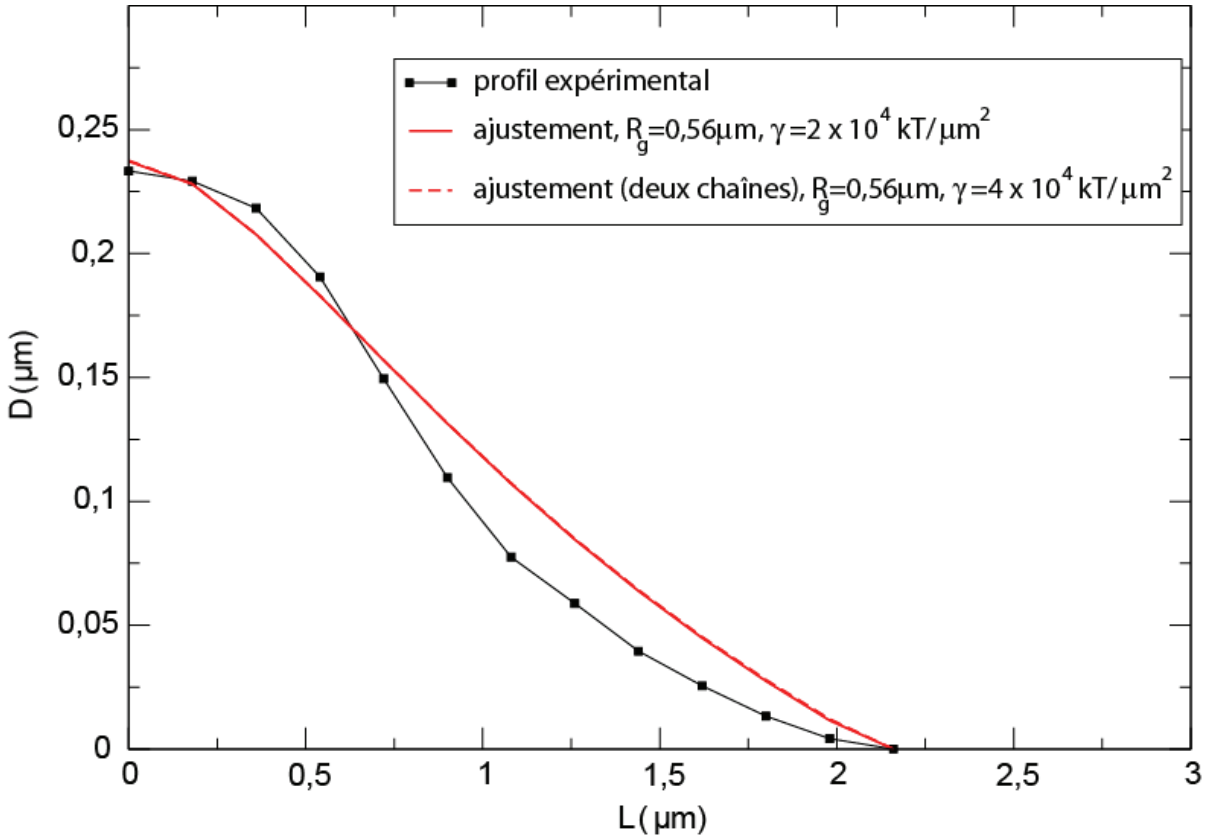



**Figure 4.5 : Profil de forme correspondant au profil d'intensité b de la figure 4.3 et ajustement théorique.**

La figure 4.6 résume les profils de forme obtenus pour les deux bulles étudiées. On remarque la différence de hauteur et de largeur déjà signalée. Les deux profils ont également des formes différentes : celui correspondant à la bulle n°2 est plus pointu que celui de la bulle n°3. Remarquons que ce caractère pointu n'est pas une impossibilité physique, mais dû à la résolution latérale des images optiques. En effet, la longueur typique $\lambda$ en dessous de laquelle les formes sont arrondies par les effets d'élasticité de courbure de la membrane est donnée par $\lambda = (\kappa/\gamma)^{1/2}$ (48). Pour $\kappa \approx 20 k_B T$ et $\gamma$ = 5.10$^4$ $k_B$T/µm$^2$, nous avons $\lambda \approx 20$ nm, bien en deçà de la résolution latérale dans nos expériences.

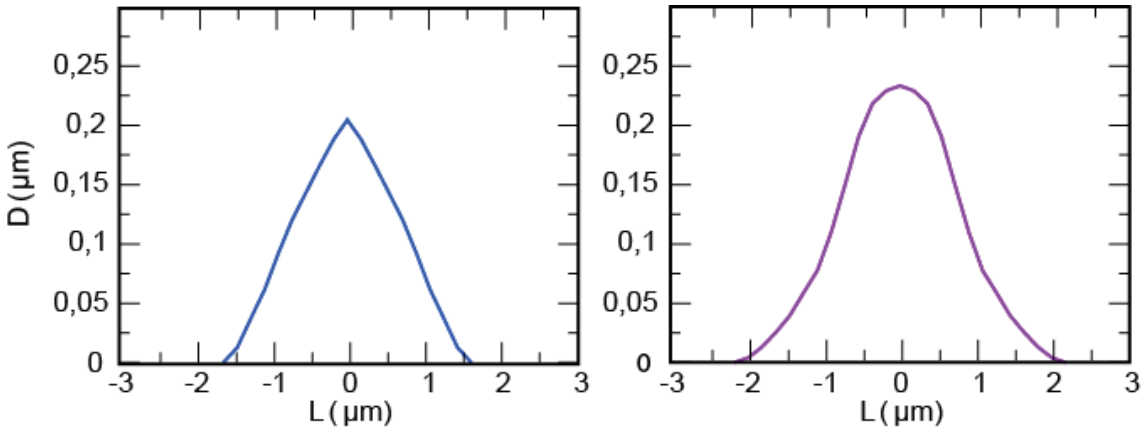



**Figure 4.6 : Comparaison des profils de forme des bulles numéro 2 et numéro 3.**

## 2.3 Les fluctuations des molécules d'ADN

Il est intéressant de comparer le comportement de molécules d'ADN sous une bulle avec celui d'ADNs libres et avec celui d'ADNs confinés sous une membrane non déformée. Cela apporte en effet une confirmation visuelle complémentaire de l'effet de confinement sur l'ADN. La figure 4.7 présente quelques images de fluorescence de trois molécules d'ADN appartenant chacune à l'une des catégories citées ci-dessus.

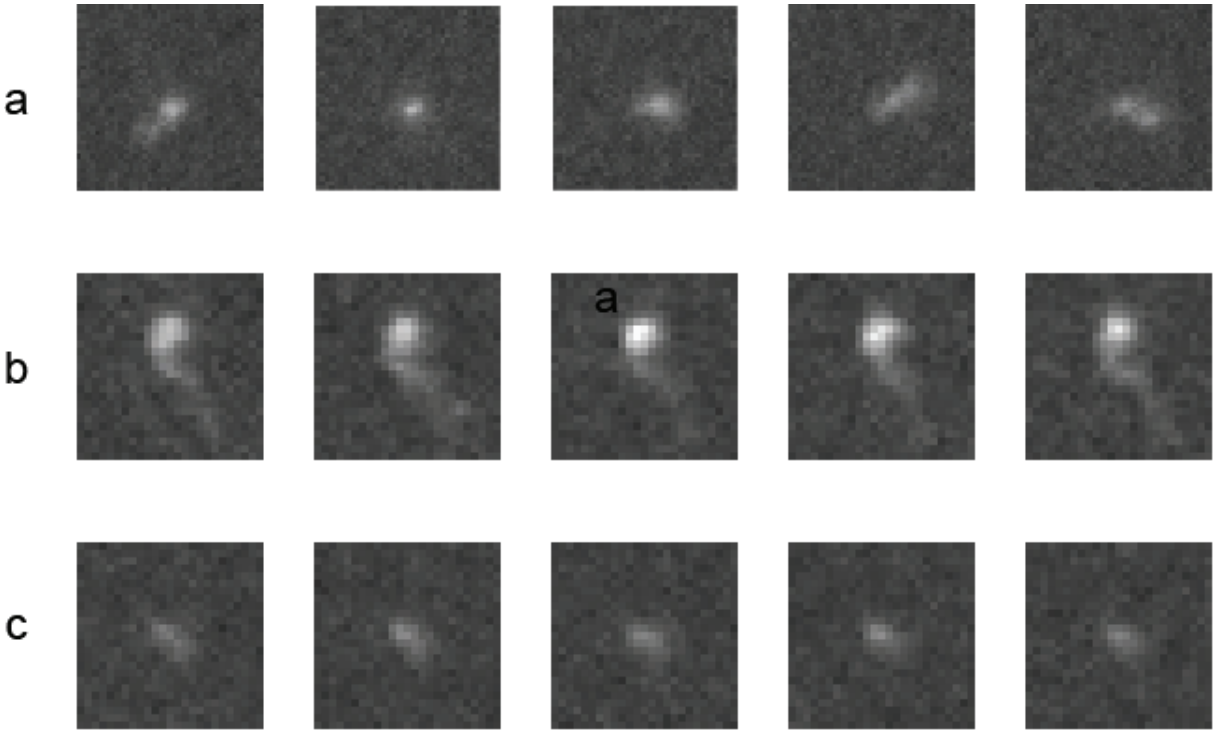



**Figure 4.7 : Images de fluorescence de trois molécules d'ADN fluctuant autour de leur point d'attache au cours du temps (sur quelques secondes). a) ADN fluctuant librement autour de son point d'attache b) ADN sous une bulle c) ADN en configuration pelote sous une vésicule dont la membrane n'est pas déformée.**

La première série d'images montre une molécule d'ADN libre, en dehors de tout patch adhésif. Elle fluctue beaucoup autour de son point d'attache et change sans cesse de forme. La dernière série d'images montre une molécule d'ADN coincée sous une membrane mais pour laquelle on ne détecte pas de déformation membranaire. La chaîne de polymère est quasiment immobile, ce qui pourrait correspondre à un écrasement très important de la molécule. On ne peut pas non plus exclure que parfois la molécule d'ADN interagisse de façon non spécifique avec le substrat, à des endroits où celui-ci présente des défauts de couverture en streptavidine. Dans ce cas, l'ADN pourrait être plus proche d'une configuration de polymère adsorbé que de polymère greffé, et donc plus écrasé par le substrat. La série d'images b correspond à un ADN formant une bulle dans la membrane (bulle numéro 2 que nous avons étudiée dans le paragraphe précédent). Comme on peut s'y attendre, il est moins mobile que l'ADN libre. En effet, la bulle est de taille très inférieure au volume

nécessaire à l'ADN pour fluctuer librement (environ 1 $\mu m^3$). Par contre elle est plus mobile que l'ADN confiné sous la membrane.

# 3 Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons mis en évidence l'existence de déformations de la membrane de vésicules adhérées induites par des molécules d'ADN greffées confinées sous la zone d'adhésion. Ces déformations, que nous appelons "bulles", avaient été prédites par la théorie évoquée dans la troisième partie du chapitre "Introduction".

Les bulles peuvent aussi bien être induites par une molécule d'ADN entière que par une portion de la molécule lorsque celle-ci est étirée. Nous avons calculé les profils de forme de ces bulles grâce à la technique de microscopie par contraste interférentiel en réflexion. Elles ont une hauteur de l'ordre de 200 nm et une largeur à la base de l'ordre de quelques micromètres. Nous avons comparé ces profils expérimentaux avec les prédictions théoriques évoquées dans la revue bibliographique. Certaines contraintes, comme la largeur de la bulle, sont connues. Les paramètres potentiellement ajustables sont la tension de la membrane et le rayon de giration. Ce dernier est connu, excepté lorsque seule une partie de la molécule d'ADN induit la formation d'une bulle. Nous avons obtenu un bon accord entre nos données expérimentales et les prévisions théoriques et ainsi trouvé des valeurs de la tension de l'ordre de 2 à 4. $10^4$ $k_BT/\mu m^2$.

1. B. Alberts (2002). *Molecular biology of the cell*. Garland, New York.

2. H. Lodish, A. Berk, P. Matsudaira, C.A. Kaiser, M. Krieger, M.P. Scott, S.L. Zipursky and J. Darnell (2003). *Molecular cell biology*. W H Freeman & Co.

3. D.H. Everett (1988). *Basic principles of colloid science*. Royal Science of Chemistry Paperbacks, London.

4. F. Evans and H. Wennerström (1998). *The colloidal domain*. Wiley-VCH, New York.

5. C. Tanford (1972), *Micelle shape and size*. J. Phys. Chem. **76**, 3020-3024.

6. L.R. Pratt (2002), *Molecular theory of hydrophobic effects : "She is too mean to have her name repeated"*. Annu. Rev. Phys. Chem. **53**, 409-436.

7. J. Israelachvili (1995). *Intermolecular and surface forces*. Academic Press, London.

8. A. Haibel, G. Nimtz, R. Pelster and R. Jaggi (1998), *Translational diffusion in phospholipid bilayer membranes*. Physical Review E **57**, 4838-4841.

9. K. Simons and E. Ikonen (1997), *Functional rafts in cell membranes*. Nature **387**, 569-572.

10. S.L. Veatch and S.L. Keller (2003), *Separation of lipid phases in giant vesicles of ternary mixtures of phospholipids and cholesterol*. Biophysical Journal **85**, 3074-3083.

11. K. John, S. Schreiber, J. Kubelt, A. Herrmann and P. Müller (2002), *Transbilayer movement of phospholipids at the main phase transition of lipid membranes : implications for rapid flip-flop in biological membranes*. Biophysical Journal **83**, 3315-3323.

12. B. de Kruijff and E.J.J. van Zoelen (1978), *Effect of the phase transition on the transbilayer movement of dimyristoylphosphatidylcholine in unilamellar vesicles*. Biochim. Biophys. Acta **511**, 105-115.

13. A. Lorin, C. Flore, A. Thomas and R. Brasseur (2004), *Les liposomes : description, fabrication et applications*. Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement **8**, 163-176.

14. F.J. Carrion, A. De La Maza and J.L. Parra (1994), *The influence of ionic strength and lipid bilayer charge on the stability of liposomes*. J. Colloid Interface Sci. **164**, 78-87.

15. F. Nacka, M. Cansell and B. Entressangles (2001), *In vitro behavior of marine lipid-based liposomes. Influence of pH, temperature, bile salts and phospholipase A2*. Lipids **36**, 35-42.

16. F. Szoka and D. Papahadjopoulos (1980), *Comparative properties and methods of preparation of lipid vesicles (liposomes)*. Annu. Rev. Biophys. Bioeng. **9**, 467-508.

17. L.A. Tonkonog, V.A. Bondarenko, A.M. Belous and T.P. Bondarenko (1982), *Permeability of liposomes with different cholesterol content as affected by low temperature*. Ukrainian Biochemical Journal **54**, 293-297.

18. A. Albersdörfer, T. Feder and E. Sackmann (1997), *Adhesion-induced domain formation by interplay of long-range repulsion and short-range attraction force: a model membrane study.* Biophysical Journal **73**, 245-257.

19. A. Boulbitch, Z. Guttenberg and E. Sackmann (2001), *Kinetics of membrane adhesion mediated by ligand-receptor interaction studiede with a biomimetic system*. Biophysical Journal **81**, 2743-2751.

20. A.D. Bangham, M.M. Standish and J.C. Watkins (1965), *Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids*. J. Mol. Biol. **13**, 238-252.

21. A.D. Bangham and R.W. Horne (1964), *Negative stainins of phospholipides and their structural modification by surface-active agents as observed in the electron microscope*. J. Mol. Biol. **12**.

22. K. Anzai, M. Yoshida and Y. Kirino (1990), *Change in intravesicular volume of liposomes by freeze-thaw treatment as studied by the esr stopped-flow technique*. Biochim. Biophys. Acta **1021**.

23. Y. Barenholzt, S. Amselem and D. Lichtenberg (1979), *A new method for preparation of phospholipid vesicles (liposomes) - french press*. Febs Letters **99**.

24. R.L. Hamilton, J. Goerke, L.S. Guo, M.C. Wiliams and R.J. Havel (1980), *Unilamellar liposomes made with the french pressure cell: a simple preparative and semiquantitative technique*. J. Lipid Res. **21**.

25. R.C. MacDonald, R.I. MacDonald, B.P.M. Menco, K. Takeshita, N.K. Subbarao and L. Hu (1991), *Small-volume extrusion apparatus for preparation of large, unilamellar vesicles*. Biochim. Biophys. Acta **1061**.

26. M.I. Angelova and D.S. Dimitrov (1986), *Liposome electroformation*. Faraday Discussions **81**.

27. M.I. Angelova and D.S. Dimitrov (1987), *Swelling of charged lipids and formation of liposomes on electrode surfaces*. Mol. Cryst. Liq. Cryst. **152**.

28. N. Rodriguez, F. Pincet and S. Cribier (2005), *Giant vesicles formed by gentle hydration and electroformation: A comparison by fluorescence microscopy*. Colloids and Surfaces B-Biointerfaces **42**.

29. D.D. Lasic (1998), *Novel applications of liposomes*. Trends Biotechnol. **16**, 307-321.

30. G. Redziniack (2003), *Liposomes et peau : passé, présent, futur. Liposomes and skin: past, present, future.* Pathologie Biologie **51**, 279-281.

31. O. Bouffioux (1995), *Utilisation des modèles moléculaires numériques dans la recherche industrielle pharmaceutique*. Travail de fin d'études. Institut supérieur industriel de Bruxelles, 65p.

32. H.Y. Yu and J.H. Lin (2000), *Intracellular delivery of membrane-impermeable hydrophilic molecules to a hepatoblastoma cell line by asialoglycoprotein-labeled liposomes*. J. Formos. Med. Assoc. **99**, 936-941.

33. S. Espuelas, P. Haller, F. Schuber and B. Frisch (2003), *Synthesis of an amphiphilic tetraantennary mannosyl conjugate and incorporation into liposome carriers*. Bioorg. Med. Chem. Lett. **13**, 2557-2560.

34. G. Gregoriadis (1981), *Targeting of drugs: implications in medicine*. Lancet **2**, 241-246.

35. R.E. Pagano and J.N. Weinstein (1978), *Interactions of liposomes with mammalian cells*. Annu. Rev. Biophys. Bioeng. **7**, 435-468.

36. I. Tsafrir, D. Sagi, T. Arzi, M.A. Guedeau-Boudeville, V. Frette, D. Kandel and J. Stavans (2001), *Pearling instabilities of membrane tubes with anchored polymers*. Phys. Rev. Lett. **86**, 1138-1141.

37. V. Frette, I. Tsafrir, M.A. Guedeau-Boudeville, L. Jullien, D. Kandel and J. Stavans (1999), *Coiling of cylindrical membrane stacks with anchored polymers*. Phys. Rev. Lett. **83**, 2465-2468.

38. D.A. Hammer (1996), *Biological adhesion at interfaces*. Annual Review of Materials Science **26**, 651-691.

39. P. Bongrand (2003), *Adhésion cellulaire*, http://www.crmcn.univ-mrs.fr/confs/bio2003/bongrand.pdf.

40. A.F. Wiliams and A.N. Barclay (1988), *The immunoglobulin superfamilly - domains for cell surface recognition*. Annu. Rev. Immunol. **6**, 181-405.

41. R.O. Hynes (1992), *Integrins: versatility, modulation and signaling in cell adhesion*. Cell **69**, 11-25.

42. M.P. Bevilacqua and R.M. Nelson (1993), *Selectins*. J. Clin. Invest. **91**, 379-387.

43. J.R. Ostberg, R.K. Barth and J.G. Frelinger (1998), *The Roman god Janus: a paradigm for the function of CD43*. Immunol. Today **19**, 546-550.

44. B. Geiger and O. Ayalon (1992), *Cadherins*. Annu. Rev. Cell Biol. **8**, 307-332.

45. G.I. Bell, M. Dembo and P. Bongrand (1984), *Cell adhesion. Competition between nonspecific repulsion and specific bonding*. Biophysical Journal **45**, 1051-1064.

46. C. Tordeux, J.B. Fournier and P. Galatola (2002), *Analytical characterization of adhering vesicles*. Physical Review E **65**, 041912.

47. U. Seifert and R. Lipowsky (1990), *Adhesion of vesicles*. Phys. Rev. A **42**.

48. U. Seifert (1997), *Configurations of fluid membranes and vesicles*. Advances in Physics **46**, 13-137.

49. A.L. Bernard, M.A. Guedeau-Boudeville, L. Jullien and J.M. di Meglio (2000), *Strong adhesion of giant vesicles on surfaces: Dynamics and permeability*. Langmuir **16**, 6809-6820.

50. P.G. De Gennes, P.H. Puech and F. Brochard-Wyart (2003), *Adhesion induced by mobile stickers: A list of scenarios*. Langmuir **19**, 7112-7119.

51. F. Brochard-Wyart and P.G. de Gennes (2002), *Adhesion induced by mobile binders: Dynamics*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **99**, 7854-7859.

52. E. Shaqfeh (2005), *The dynamics of single-molecule DNA in flow*. Journal of Non-Newtonian Fluid Mechanics **130**, 1-28.

53. P.J. Hagermann (1998), *Flexibility of DNA*. Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem. **17**, 265-286.

54. J.F. Marko and E.D. Siggia (1995), *Stretching DNA*. Macromolecules **28**, 8759-8770.

55. C. Bustamante, J.F. Marko, E.D. Siggia and S. Smith (1994), *Entropic elasticity of lambda-phage DNA*. Science **265**, 1599-1600.

56. D.L. Elbert and J.A. Hubbell (1998), *Self-assembly and steric stabilization at heterogeneous, biological surfaces using adsorbing block copolymers*. Chem. Biol. **5**, 177-183.

57. J.R. Roan and T. Kawakatsu (2002), *Self-consistent-field theory for interacting polymeric assemblies. II. Steric stabilization of colloidal particles*. J. Chem. Phys. **116**, 7295-7310.

58. J. Esquena, F.J. Dominguez, C. Solans, B. Levecke, K. Booten and T.F. Tadros (2003), *Stabilization of latex dispersions using a graft copolymer of inulin based surfactants*. Langmuir **19**, 10463-10467.

59. J. Klein (2006), *Molecular mechanisms of synovial joint lubrication*. Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers Part J-Journal of Engineering Tribology **220**, 691-710.

60. S. Dubiley, E. Kirillov, Y. Lysov and A. Mirzabkov (1997), *Fractionation, phosphorylation and ligation on olignucleotides microchips to enhance sequencing by hybridization*. Nucleic Acids Res. **25**, 2259-2265.

61. L.A. Chrisey, E. O'Ferrall, B.J. Spargo, C.S. Dulcey and J.M. Calvert (1996), *Fabrication of patterned DNA surfaces*. Nucleic Acids Res. **24**, 3040-3047.

62. L.A. Chrisey, G.U. Lee and E. O'Ferrall (1996), *Covalent attachment of synthetic DNA to selfassembled monolayer films*. Nucleic Acids Res. **24**, 3031-3039.

63. A. Bensimon, A. Simon, A. Chiffaudel, V. Croquette, F. Heslot and D. Bensimon (1994), *Alignment and sensitive detection of DNA by a moving meniscus*. Science **265**, 2096-2098.

64. D. Bensimon, A.J. Simon, V. Croquette and A. Bensimon (1995), *Stretching DNA with a receding meniscus: experiments and models*. Phys. Rev. Lett. **74**, 4754-4757.

65. H. Yokota, F. Johnson, H. Lu, R. Robinson, A. Belu, M. Garrison, B. Ratner, B. Trask and D. Miller (1997), *A new method for straightening DNA molecules for optical restriction mapping*. Nucleic Acids Res. **25**, 1064-1070.

66. M. Doi and S.F. Edwards (1986). *The theory of polymer dynamics*. Oxford University Press.

67. P.G. De Gennes (1979). *Scaling concepts in polymer physics*. Cornell University Press.

68. P.J. Flory (1969). *Statistical mechanics of chain molecules*. John Wiley & Sons, Inc.

69. T. Bickel, C. Marques and C. Jeppesen (2002), *Pressure patches for membranes: the induced pinch of a grafted polymer*. Physical Review E **62**, 1124-1127.

70. T. Bickel, C. Marques and C. Jeppesen (2002), *Grafted polymers are miniaturized pressure tools*. Comptes Rendus de l'Academie des Sciences. Serie IV **1**, 661-664.

71. T. Bickel, C. Jeppesen and C. Marques (2001), *Local entropic effects of polymers grafted to soft interfaces*. European Physical Journal E **4**, 33-43.

72. V. Namasivayam, R.G. Larson, D.T. Burke and M.A. Burns (2002), *Electrostretching DNA molecules using polymer-enhanced media within microfabricated devices*. Anal. Chem. **74**, 3378-3385.

73. T.R. Strick, J.F. Allemand, D. Bensimon, A. Bensimon and V. Croquette (1996), *The elasticity of a single supercoiled DNA molecule*. Science **271**, 1835-1837.

74. S.B. Smith, Y. Cui and C. Bustamante (1996), *Overstretching B-DNA: the elastic response of individual double-stranded and single-stranded DNA molecules*. Science **271**, 795-799.

75. P. Cluzel, A. Lebrun, C. Heller, R. Lavery, J.L. Viovy, D. Chatenay and F. Caron (1996), *DNA: an extensible molecule*. Science **271**, 795-799.

76. M.D. Wang, H. Yin, R. Landrick, J. Gelles and S.M. Block (1997), *Stretching DNA with optical tweezers*. Biophysical Journal **72**, 1335-1346.

77. J.H. Kim, W.-X. Shi and R.G. Larson (2006), *Methods of stretching DNA molecules using flow fields*. Langmuir **23**, 755-764.

78. T.T. Perkins, D.E. Smith, R.G. Larson and S. Chu (1995), *Stretching of a single tethered polymer in a uniform flow*. Science **268**, 83-87.

79. D.E. Smith and S. Chu (1998), *Response of flexible polymers to a sudden elongational flow*. Science **281**, 1335-1340.

80. R.G. Larson (1988). *Constitutive Equations for Polymer Melts and Solutions*. Butterworths Series in Chemical Engineering.

81. T.T. Perkins, D.E. Smith and S. Chu (1997), *Single polymer dynamics in an elongational flow*. Science **276**, 2016-2021.

82. D.E. Smith, H.P. Babcock and S. Chu (1999), *Single-polymer dynamics in steady shear flow*. Science **283**, 1724-1727.

83. P.G. De Gennes (1974), *Coil-stretch transition of dilute flexible polymers under ultrahigh velocity gradient*. J. Chem. Phys. **60**, 5030-5042.

84. J. Lumley (1969), *Drag reduction by additives*. Annual Review of Fluid Mechanics **1**, 367-384.

85. P. Doyle and E. Shaqfeh (1998), *Dynamic simulation of freely-draining, flexible bead-rod chains: Start-up of extensional and shear flow*. Journal of Non-Newtonian Fluid Mechanics **76**, 43-78.

86. P.S. Doyle, E.S.G. Shaqfeh and A.P. Gast (1997), *Dynamic simulation of freely draining flexible polymers in steady linear flows*. J. Fluid Mech. **334**, 251-291.

87. T. Liu (1989), *Flexible polymer chain dynamics and rheological properties in steady flows*. J. Chem. Phys. **90**, 5826-5842.

88. P. Doyle, B. Ladoux and J.L. Viovy (2000), *Dynamics of a thethered polymer in shear flow*. Phys. Rev. Lett. **84**, 4769-4772.

89. T. Bickel and C. Marques (2006), *Entropic interactions in soft nanomaterials*. Journal of nanoscience and nanotechnology **6**, 2386-2395.

90. T. Bickel and C. Marques (2002), *Scale-dependent rigidity of polymer-ornamented membranes*. European physical Journal E **9**, 349-352.

91. H. Ringsdorf, J. Venzmer, F.M. Winnick and Angew (1991), *Interaction of hydrophobically-modified poly-N-isopropylacrylamides with model membranes - or playing a molecular accordion*. Angewandte Chemie International Edition in English **30**, 315-318.

92. V. Billot (2005), *Deux approches de l'interaction entre membranes et supra-molécules : effets de polymères et de cyclodextrines*. Thesis, Université Louis Pasteur.

93. P.C. Weber, D.H. Ohlendorf, J.J. Wendoloski and F.R. Salemme (1989), *Structural origins of high-affinity biotin binding to streptavidin*. Science **243**, 85-88.

94. M.I. Angelova, S. Soléau, P. Mélard, J.F. Faucon and P. Bothorel (1992), *Preparation of giant vesicles by external AC electric fields. Kinetic and applications*. Prog. Colloid Polym. Sci. **89**, 127-131.

95. R. Lehner, J. Koota, G. Maret and T. Gisler (2006), *Segment distributions of end-tethered polymers in a good solvent*. Phys. Rev. Lett. **96**, 107801.

96. L.D. Landau and E.M. Lifschitz (1971). *Mécanique des fluides*. Editions Mir, Moscou.

# Conclusions et perspectives

Ce travail de thèse à concerné l'étude de l'adhésion de vésicules phospholipidiques sur un substrat fonctionnalisé avec des molécules d'ADN. Nous nous sommes intéressés à l'interaction entre les molécules d'ADN et la membrane, et plus particulièrement i) au comportement des chaînes d'ADN dans la région d'adhésion ii) et aux déformations de la paroi des vésicules induites par le polymère.

Notre étude a révélé que lorsqu'une vésicule phospholipidique adhère sur un tapis de molécules d'ADN, les chaînes d'ADN dont le site de greffage se trouve sous la zone d'adhésion sont majoritairement étirées radialement au fur et à mesure de la progression du front d'étalement. Nous avons effectué des études statistiques sur la position des sites de greffage et des têtes des ADNs pour différentes forces d'adhésion. Nous avons constaté que peu de sites de greffage se trouvent près du centre de la vésicule. Celles-ci évitent donc de se poser dans des régions denses en ADNs greffés. D'autre part, la grande majorité des têtes des ADNs se trouve proche de la frontière du patch adhésif, même si un petit nombre d'entre elles reste confiné sous la membrane. Nous avons également vérifié que l'étirement était bien radial. Ces études ont été faites pour différentes forces d'adhésion. Nous n'avons pas constaté de dépendance notable de la radialité vis-à-vis de la force d'adhésion.

Nous avons également étudié le degré d'étirement de la queue des molécules d'ADN étirées en fonction de la position du site de greffage par rapport au centre du patch d'adhésion. Nous avons constaté que le degré d'étirement est constant sur une bonne partie de l'intervalle étudié, par contre il dépend de la force d'adhésion de la membrane sur la surface : il diminue lorsque le taux de couverture en biotine diminue. Le contrôle de la teneur en ligand permet donc d'influer sur le degré d'étirement de l'ADN.

Grâce au nouveau dispositif expérimental que nous avons mis en place et qui permet de visualiser simultanément une même région d'un échantillon en microscopie par contraste interférentiel en réflexion et en fluorescence, nous avons pu suivre simultanément l'adhésion d'une vésicule et l'étirement des ADNs situés en-dessous. Nous avons constaté que la tête des molécules d'ADN se maintient à quelques micromètres devant le front d'étalement. Les forces agissant sur les molécules d'ADN ont une faible composante hydrodynamique agissant sur quelques micromètres devant le front et une forte composante stérique agissant au niveau du contact entre la membrane et le polymère. Lorsque la bicouche avance sur une section étirée d'une molécule d'ADN, elle l'agrafe sur le substrat, grâce à la formation de nombreuses liaisons ligand-récepteur, un mécanisme qui nous rappelle les Lilliputiens de

Jonathan Swift liant Gulliver au sol. La vitesse de propagation du front diminuant avec l'éloignement du centre du patch, les ADNs dont le site de greffage se trouve éloigné du centre sont essentiellement étirés par la progression du patch et non par l'écoulement ainsi créé, car la force générée par l'écoulement devient insuffisante. C'est pourquoi le degré de repliement de ces chaînes devient constant dès qu'on s'éloigne suffisamment du centre du patch, car l'agrafage de l'ADN sur le substrat dû à l'effet rouleau-compresseur de la membrane est indépendant de la vitesse à laquelle elle avance.

D'autre part, nous avons mis en évidence l'existence de petites déformations de la membrane des vésicules adhérées induites par des molécules d'ADN uniques. Ces déformations, que nous appelons "bulles", sont détectées par la présence d'anneaux d'interférence sur les images RICM. Elles peuvent aussi bien être induites par une molécule d'ADN entière que par une portion de la molécule lorsque celle-ci est étirée.

La technique de RICM nous permet de calculer le profil de forme de ces bulles. Elles ont une hauteur de l'ordre de 200 nm et une largeur à la base de l'ordre de quelques micromètres. Nos bulles sont donc beaucoup plus larges que hautes. Nous avons comparé ces profils expérimentaux avec les prédictions théoriques évoquées dans la revue bibliographique. Certaines contraintes, comme la largeur de la bulle, sont connues. Les paramètres potentiellement ajustables sont la tension de la membrane et le rayon de giration. Ce dernier est connu, excepté lorsque seule une partie de la molécule d'ADN induit la formation d'une bulle. Nous avons obtenu un bon accord entre nos données expérimentales et les prévisions théoriques pour des valeurs de la tension de l'ordre de 2 à 4. $10^4$ $k_BT/\mu m^2$, une tension inférieure à la tension de lyse des membranes qui est de l'ordre de $10^5$ à $10^6$ $k_BT/\mu m^2$.

Ce travail présente l'intérêt d'avoir mis en évidence les déformations induites par un polymère sur une membrane, qui n'avaient encore jamais été étudiées expérimentalement. Il confirme d'autre part la validité du modèle théorique présenté dans la partie introductive de la thèse. Dans nos expériences, la tension de la membrane n'est pas contrôlée. Elle dépend de la technique de préparation des vésicules, mais n'est pas ajustable précisément par ce moyen. On pourrait poursuivre cette étude en imposant une tension à la membrane, au moyen d'une micropipette par exemple. Il serait intéressant d'étudier la taille des bulles obtenues en fonction de la tension.

Nous avons également observé la déformation d'une macromolécule biologique, l'ADN, dans la région d'adhésion d'une membrane modèle. Cette étude a fait progresser notre connaissance des forces en jeu à proximité d'une membrane qui adhère ; elle pourrait aussi ouvrir la voie vers de nouvelles pistes en matière de transfection.

**Gulliver lié au sol par les Lilliputiens**