Vésicules géantes décorées– adhésion et transport –

Pierre-Henri Puech

▶ **To cite this version:**

Pierre-Henri Puech. Vésicules géantes décorées– adhésion et transport –. Biophysique [physics.bio-ph]. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2005. Français. NNT : . tel-00149723

HAL Id: tel-00149723
https://theses.hal.science/tel-00149723

Submitted on 28 May 2007

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THESE de DOCTORAT de l'UNIVERSITE PARIS VI

Ecole doctorale de Chimie Physique et Analytique de Paris Centre

Spécialité :

Matière Condensée / Chimie Physique

présentée par

Pierre-Henri Puech

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

Sujet de la thèse :

Vésicules géantes décorées – adhésion et transport –

soutenue publiquement le 20/10/2003

devant le jury composé de :

M.	Loïc Auvray,	Rapporteur
M.	Pierre Bongrand,	Rapporteur
Mme.	Françoise Brochard-Wyart,	Directrice de thèse
M.	Pierre-Gilles de Gennes,	Président du Jury
M.	Pierre Turq	

Merci(s)...

Quelques mots, pour remercier beaucoup de personnes qui se sont investies, directement ou indirectement dans ce travail... ce sera un peu long, elles sont nombreuses et encore, à mon dam, je risque d'en oublier... ne m'en veuillez pas !

Cette thèse a été effectuée au Laboratoire Physico-Chimie Curie, dirigé d'abord par Jacques Prost, puis par Jean-Fançois Joanny. Je les remercie de m'y avoir accueilli et d'avoir toujours eu leur porte ouverte, pour discuter science(s) ou autre.

M. Pierre-Gilles de Gennes a accepté d'être président du jury. Je l'en remercie profondément, ainsi que de toutes les discussions, stimulantes, que nous avons eues à la fin de cette thèse. Sa vision de la science, amusée, curieuse, m'a beaucoup apporté.

Je témoigne mon extrême gratitude à MM. Loïc Auvray et Pierre Bongrand d'avoir accepté de juger ce travail et d'avoir eu la pénible tâche d'écrire les rapports sur ce manuscrit.

M. Pierre Turq m'a honoré de bien vouloir faire partie du jury. Ses conseils, toujours avisés, m'ont amené jusqu'à ce laboratoire et à cette thèse. Je l'en remercie ici.

Comment la remercier de la confiance, implicite, qu'elle a en nous, ses thésards ? Comment lui dire tout ce que l'on a appris d'elle, de sa façon d'aborder un problème ou d'en créer d'autres ? Elle nous soutient, nous écoute, nous pose des questions, nous amène à nous en poser, à développer des trésors d'imagination dont on se serait cru incapable... Pour tout cela, merci à ma directrice de thèse, Françoise Brochard-Wyart, de m'avoir permis de passer quatre années en sa compagnie à bricoler, bidouiller, calculer, tracer, bref... de faire une thèse.

Bien, bon, ben... j'ai une pensée émue pour ceux qui m'ont subi dans notre bureau commun, nos salles de manipes, pendant ces années, qui ont supporté ma main mise sur les ordinateurs qui trainaient, ma musique,... entre autres ! Bien du courage pour ceux qui finissent, ou ceux qui commencent... à vous, Juliette, Hadia, Emilie, Xavier, James-Olivier, Jean-Yves... Un salut particulier à mes ex-stagiaires-esclaves que j'ai enchaînés au microscope, ou forcés à faire des dépôts de lipides à 4°C avec des mouffles... : le petit Nicolas, l'homme de la vésicule tubulante, maintenant, et Vesna.

En dehors des "poussins" de l'équipe, il y a un moins jeune qui m'a souvent étonné mais aussi vanné, baché... qui est toujours là quand on a besoin d'un conseil ou d'une signature... merci Axel (Buguin) d'avoir mis autant de points d'interrogation dans les marges de mes pré-manuscrits...

Il y a bien sûr mes "anciens" en vésicules géantes, qui m'ont montré les aspects pratiques de choses aussi diverses que la fabrication de cellules d'électroformation, la juste mesure d'une osmolarité, la rédaction d'un article dans la joie et la patience, l'art du point et de la virgule... Merci à Olivier (Sandre) d'avoir amené ces sujets dans l'équipe, à Erdem (Karatekin) de m'avoir montré la rigueur qu'il faut pour (essayer d') être imparable dans l'écriture d'un papier et à Andreas "da boss" (Fery) pour son soutient, son esprit cartésien et sa façon intuitive de construire une manipe. Merci à Olivia (du Roure) de m'avoir montré le calme que requiert une expérience avec du matériel biologique.

Mes re-lecteurs, patients, critiques, qui ont su calmer mes ardeurs dantec-sques, qui ont répondu à mes questions avec un calme certain (alors que des moines contemplatifs des lamasseries les plus reculées du Tibet auraient déjà commencé à grimper aux rideaux), sont

ici salués. Merci Pierre (Nassoy) pour tes remarques et tes conseils. Merci Pascal (Silberzan) de m'avoir, en plus de tout, recueilli à Princeton, de m'avoir nourri de pancakes et promené dans ces lieux mythiques...

Il y a ceux à qui j'ai tout volé, tout emprunté, TOUT RENDU (il faut que cela soit dit), mes voisins et correligionnaires de la "vésicoule géante" de l'équipe Bassereau... Le chef, Patricia, pour le temps passé dans son bureau, Jérôme pour son accent et tout ce qu'on a en commun (comme le dit Flo, "Babylon will fall after us"), Jacques, Cécile, Aurélien, Sébastien...

Merci à TOUS les membres de l'UMR, permanents ou étudiants, des multimillionnaires du Troisième Etage, ceux chez qui la rumeur voudrait que les eppendorfs aient plusieurs tailles et même plusieurs couleurs, aux taupes du sous-sol, pour les prêts de matériel, les idées, les discussions... COURAGE à ceux qui commencent ou finissent... Conservez l'ambiance chaleureuse qui remplit ce labo ! Pèle-mèle et dans le désordre : équipes Prost-Joanny-Jülicher, Amblard , Farge (Ricky, Willy), Viovy, Rondelez (Nico, Geo,...), Sykes (Hakim B.), Keller... Merci à H. Feracci de l'équipe de Jean-Paul Thiery (UMR 144) pour les interactions que nous avons eues.

Une petite dame, au Collège de France, m'a permis de relativiser le début de thèse grâce à ses conseils et m'a fourni (sous le manteau, ne le répétez pas) en "Saint ITO qui marche" quand nous tombions en rade... Merci Booboo (a.k.a. Marie-Alice) pour tout cela ! J'admire ton enthousiasme à tout va et tes idées : faire des framboises avec des vésicules... c'est très poétique !

Un grand merci à Mireille Blanchard-Desce de nous permettre d'utiliser ses colorants membranaires miraculeux.

Il y avait Pierre Dac et Jean-Marc Thibaut, Pif et Hercule, Charibe et Scilla, T et A... ce sont deux autres duettistes, amis du verbe clair et du titre de mail évocateur que je vais saluer, chapeau bas. Des hommes de grande valeur, même si de cave (de, pas deux). En premier, l'ami Fred (Pincet), qui tire, pousse, bricole, souffle, tel un homme-orchestre de la micromanipulation de vésicules. La parole du sage. Le deuxième, plus jeune, est ZE poor lonesome singer loin de chez lui, avec qui j'ai usé mes godasses à Manhattan et bu de la "Brooklin' Lager". Merci David (Tareste) : on sait qu'on ne sait rien et que ça peut tout aussi bien foirer, mais on le démontrera expérimentalement, par une manipe sioux. Ce que vous saint-thomatiseriez en disant : "fais-la, après on en reparle".

Deux/trois comiques de l'ESPCI sont à mettre en avant, pour m'avoir patiemment inculqué que "l'optique, ce n'est pas le Mal". J'ai investi leurs locaux et pris de leur temps, sali leur microscope à "dieux-photons". Merci Jérome (Mertz), Laurent (Moreaux) et Thomas (Pons) pour tout cela et plus encore... Mais il faut lire plus bas...

Il y a ceux qui ne liront que ça. Qui n'attendent que cette page. Qui se demandent comment je vais m'en sortir, de cet exercice difficile du "je tiens à remercier...". Ceux à qui je vais rendre grâce(s) pour leur accueil, dirais-je leur asile, contre-politique et alternatif. Pour leur façon critique de voir les choses, la science, parfois/souvent au vitriol. On les appelle les Biologistes-ou-Assimilés de l'UMR. On dit d'eux qu'ils ne lavent jamais leur cafetière (qui a dit ça ?). C'est une secte un peu à part... Merci au grand gourou Jean-Louis (chef, tu connais maintenant ma réponse à ta question...), au bon docteur Levi (bon courage pour ta thèse en gynécologie-obstétrique, préviens moi quand/si tu soutiens), au bondissant Sergio (débranchez-le ou enlevez la pile de l'organizer), au calme Ludo, au très très calme Yohann... Au p'ti suisse que le canal St. Martin entier nous envie, Simon, le caresseur de protéines... A mon camarade transfuge, qui ne joue pas au foot (il faut souvent le préciser), mais sait aussi faire des calculs (faut le voir chez Leclerc) et sans qui bien des choses (mon pot, mon Mac,...) auraient été impossibles à faire marcher aussi bien que cela n'est ou n'a été... mon bon Philippe : COURAGE, la fin (de ta thèse) est proche ! Merci d'être comme vous êtes, les amis. Arrêtez de lire, on va plutôt aller s'en vider un...

Quelques mots pour leur dire le plaisir que j'ai eu à venir les emm...er consciencieusement, à leur poser des questions débiles... et à avoir

leur avis et leurs conseils... d'avoir réparé mes erreurs et de m'avoir montré, tournevis à l'appui, "mais non, ça craint rien ! Moi même, sur mon 386 quand j'étais à la fac..." : merci au gang des informaticiens, à la tête duquel officie Stéph-le-Mojo, avec ses redoutables cliqueurs à gages, Jean-Gab (dit "le calme"), FraDav (dit "le Bien Sapé"), Mohammed (dit "Steve Austin") et Mansour (dit "Say-Say")... Ce que vous allez être tranquilles...

Aux "Hommes de la Destinée des Salles", qui m'ont permis de mettre ma soutenance et mon pot au point, merci de votre confiance et de votre aide... Véro, Jean-Louis et Cigare-Michel.

Dans les personnages de l'Institut, au fin fond du sous-sol travaillent des hommes-machines, Vulcains du Tour, Rois de la Fraise et Princes du Dural, qui sont capables de percer une platine de microscope sans faillir ou d'ouvrager du Téflon récalcitrant à la mèche de 1 mm... Torse-poil sous le bleu, Michel "Rock'n Roll" Petit, dit "Travolta" (ne lui prétez pas votre femme, en un tour de piste elle est sous le charme). Gilles "ça roule" Rousseau, dit aussi "la barbiche", l'homme numérique... Merci aussi à l'homme-électronique, "Bioman" Codarbox. Sans eux, souvent, on ne ferait rien. Messieux, la science vous doit beaucoup...

Arriver les matins gris au labo, passer la porte et voir son sourire... on commence bien la journée ! Merci Brigitte (da Silva) d'avoir gardé mes cadeaux (quand j'en avais), de m'avoir donné de quoi écrire. Allez savoir pourquoi, elle a jamais eu de chèque pour moi...

J'ai pu bénéficier des conseils et de l'aide de Patrick (Suchet) pour toutes mes recherches de cartons (déménagements), mes bricolages/rafistolages/plomberie... mon pot de thèse... Je l'en remercie ici très sincèrement.

Je remercie aussi notre trio de secrétaires, Francine (Vérin), Françoise (Annotiau) et Nicole (Blandeau), qui n'hésitent pas à prendre le téléphone pour vérifier une commande, réserver un avion, un hôtel... afin de nous faciliter la vie.

Il y a mes amis, ceux que je n'ai pas encore cités et qui ont étés de mes soirées, diners, sorties, euphories ou coups de déprime... Sans ces "zoziaux", ces "zazous", la vie aurait été d'un triste à pleurer ! Merci mille fois à toutes et tous !

Respect à la Climbing "Fu Manchu" Family, avec qui j'ai partagé de nombreux moments à la salle et à la Mecque (Bleau) : Elodie et Jérome (post-docs de luxe, ou bien !), Mai et Laurent "le kid", David (sa Majesté), Emmanuel (le frère éthylique de sa Majesté), Jo, Jenny et Pierre-Arnaud, Thorsten, Andy et Christian-de-chez-Belin-en-face (l'éditeur, pas les gâteaux). Sans ces moments de pur bourrinage (et d'esthétisme, de douceur dans la tenue de la réglette, de délicatesse, de posage de pieds...), je crois que j'aurais explosé. Quoi que certains en pensent, un jour j'y arriverai, à mon 7a...

Big-up au crew du Baby-de-Midi-à-la-cafèt-à-PC, Thomas, Yann, Momo... Un jour je marquerais... Aie confiance Momo... on les aura...

One love au possee "Curie/PC même combat", Renô et Nam, Jérém', Valou et Gio, Zuzi, le ténébreux "so frenchy now" Kevin, Aurélie, Nicos, Manu, Jean, Jack, Remi... Pour beaucoup d'entre vous, COURAGE ! Vous voyez, même moi j'y suis arrivé, alors... Et toujours là pour me soutenir, mon co-ti'punch, le roi du Langmuir-qui-tue, mon charli-bibi (kilébomoncharlibibi)...

Et enfin, mes hommages à Marie-Marie et Clémentine-Jyl Bioskop...

Je ne peux m'empêcher de rendre hommage à ceux qui m'ont tenu hors d'atteinte au long des jours plus ou moins durs qui sont passés : à Frodo et Gandalf, Merry et Pippin, Strider, qui m'ont accompagnés au cours de l'écriture de ce manuscrit. A Maurice G. Dantec pour sa vision du monde, proche de la mienne, parfois. A Philip K. Dick, à Sun Tzu, à la Série Noire,... comme à Tarentino, Lynch... et aux Tontons Flingueurs. Avec Lino, Bernard, Francis et le Vieux, y'aura toujours quelque chose en plus que de la pomme... A Kraftwerk, au Cypress, aux Sisters of Mercy, aux Fields, à Max Romeo, à Mad Professor, Dr. Bobby, NIN, aux Stones... à ces lignes musicales, du métal au reaggae, du classique à l'électronique, qui m'ont maintenu à flot... des jours et des nuits durant.

Enfin, une pensée pour ceux qui m'ont appris à lire, écrire, bricoler, mes grands-parents et leurs amis. A Jacques[†], celui qui a ouvert une brèche et montré la voie. On peut ne pas savoir où l'on va, mais il faut savoir d'où l'on vient. A ma famille...

Mes proches a toujours été là et m'ont soutenu au cours de ces années passées à Paris, loin de la verdure et des vaches. Merci Pa/Ma de votre confiance, d'être là, simplement. Merci Aurélie de vouloir comprendre ce que je fais. Merci Sylvain de savoir m'écouter. Merci à ceux qui en font maintenant partie, Claude et François, Pedro et Jules, de votre présence. Merci à Toffee de m'avoir fait une jolie balafre sur la joue pour le jour de ma soutenance... Merci Cécile, pour tout et le reste...

à Paris, le 12 novembre 2003
Pierre-Henri

Table des matières

Vésicules décorées : adhésion et transport **1**

1 Adhésion cellulaire et cadhérines **9**
1.1 L'adhérence cellulaire : quelques éléments 9
1.1.1 Assemblage en tissus : exemple de l'endothélium 10
1.1.2 Adhésion et perméation de leucocytes 12
1.1.3 Adhésion et motricité cellulaire 13
1.2 Les récepteurs moléculaires d'adhérence 14
1.3 Les cadhérines 15
1.3.1 Les cadhérines dites "classiques" 16
1.3.2 Interactions entre cadhérines 17
1.4 Les fragments utilisés : $EC1-2$ de E-cad 24

2 Propriétés des vésicules géantes **29**
2.1 Auto-organisation et propriétés moléculaires 29
2.1.1 Structure des molécules amphiphiles 29
2.1.2 Auto-organisation des lipides 31
2.2 Description mésoscopique d'une bicouche 32
2.3 Interactions entre bicouches 37
2.3.1 Interactions non spécifiques 39
2.3.2 Attractions spécifiques "clef-serrure" 44
2.3.3 Représentation d'une interaction spécifique 45

3 Matériel et méthodes **47**
3.1 Les lipides 47
3.1.1 Provenance et conservation 47
3.1.2 Une matrice lipidique fluide 48
3.1.3 Les lipides chélatants 49
3.1.4 Les lipides "polymères" 50
3.1.5 Décoration avec une "super-glue" moléculaire 50
3.1.6 Isothermes de compression 52
3.2 Solutions utilisées 52
3.3 Méthodes d'obtention de vésicules géantes 54

3.3.1 Méthode “corse” 54
3.3.2 Electroformation 55
3.4 Fabrication de bicouches supportées 57
3.4.1 Les différentes méthodes 57
3.4.2 Fabrication par fusion de petites vésicules 58
3.5 Les microscopies de fluorescence (MF) 60
3.5.1 Incorporation des colorants dans les membranes 62
3.5.2 Deux photons et seconde harmonique 64
3.6 La microscopie interférentielle 67
3.6.1 Principe et réalisation pratique 67
3.6.2 Observations 67
3.6.3 Reconstruction du profil d’une vésicule 69
3.6.4 Comment jouer sur le contraste des franges 71
3.6.5 Tension et énergie d’adhésion 72

4 Mesure de la tension de vésicules lourdes 77
4.1 Vésicules lourdes posées : détermination de la tension 78
4.2 Résultats 79
4.2.1 Sur une population de vésicules 80
4.2.2 Dégonflement doux d’une vésicule 80
4.2.3 Mise sous tension photoinduite 82

5 Adhésion faible : cadhérines 85
5.1 Préparation de vésicules géantes “décorables” 86
5.1.1 Décoration par chélation 86
5.1.2 Variation du % de lipide chélatant 87
5.1.3 Conclusions 90
5.2 Adhésion non spécifique due au calcium 90
5.2.1 Vésicules “nues” 90
5.2.2 Vésicules “chevelues” 92
5.2.3 Protection des parois de la cellule d’observation 92
5.2.4 Conclusions 93
5.3 Chélation de protéines à “étiquette 6-His” 94
5.3.1 Visualisation de la fixation 94
5.3.2 Effet du % de lipide chélatant 96
5.3.3 Résistance de la chélation 99
5.3.4 Conclusions 103
5.4 Décoration des surfaces de verre avec des protéines 103
5.4.1 Microscopie de fluorescence 104
5.4.2 Microscopie à force atomique 105
5.5 Adhésion entre vésicules géantes 109
5.5.1 Réalisation de l’expérience 110
5.5.2 Résultats des expériences 113

5.5.3 Conclusions 115
5.6 Adhésion entre vésicules géantes et surfaces décorées 116
5.6.1 Réalisation des expériences 116
5.6.2 Résultats des expériences 117
5.6.3 Discussion 122

6 Adhésion forte **129**
6.1 Interactions électrostatiques et "blisters" 129
6.1.1 Action du pH sur le polycation PAH 130
6.1.2 Cinétique d'adhésion et instabilité du contact 130
6.2 Adhésion spécifique forte 133
6.2.1 Adhésion vésicule/vésicule 134
6.2.2 Adhésion vésicule/surface décorée 139

7 Phénomènes de transport : pores transitoires **151**
7.1 Transport à travers une membrane 152
7.1.1 Dans les systèmes biologiques 152
7.1.2 Observation de pores lipidiques 152
7.2 Pores photo-induits : un tensiomètre "de ligne" 155
7.2.1 Système expérimental 155
7.2.2 Modèle 156
7.2.3 Lipides seuls 158
7.2.4 Tension photo-induite : quel mécanisme ? 160
7.2.5 Autres méthodes de mise sous tension 162
7.3 Modification de la tension de ligne 163
7.3.1 Courbure négative : le cholestérol 165
7.3.2 Courbure positive : les Tween 166
7.4 Conclusions et perspectives 172

Conclusions et perspectives **175**

Bibliographie **178**

Vésicules décorées : adhésion et transport

Tout ce qui vit est composé au moins d'une cellule ou est un assemblage plus ou moins complexe de cellules.

Depuis maintenant plus d'un siècle, les biologistes ont décrit comment les cellules se différencient et s'associent pour former les différents organes des êtres vivants. Mais cette "brique élémentaire" de la construction du vivant est en elle-même un objet composite renfermant énormément de sous-unités ayant chacune un rôle crucial dans le fonctionnement de cette "usine" (noyau, organites intracellulaires - mitochondries... -, appareil de Golgi,...). Sur la Fig. 1A, une vue tridimentionnelle d'une cellule eucaryote (c'est-à-dire nucléée, du type de celles qui nous constituent) permet de se rendre compte de la complexité et du niveau d'intégration de ce système qui fait quelques microns à quelques dizaines de microns. Il faut voir cette assemblée comme un ensemble dynamique de petites usines à produire ou dégrader des protéines et qui communiquent entre elles.

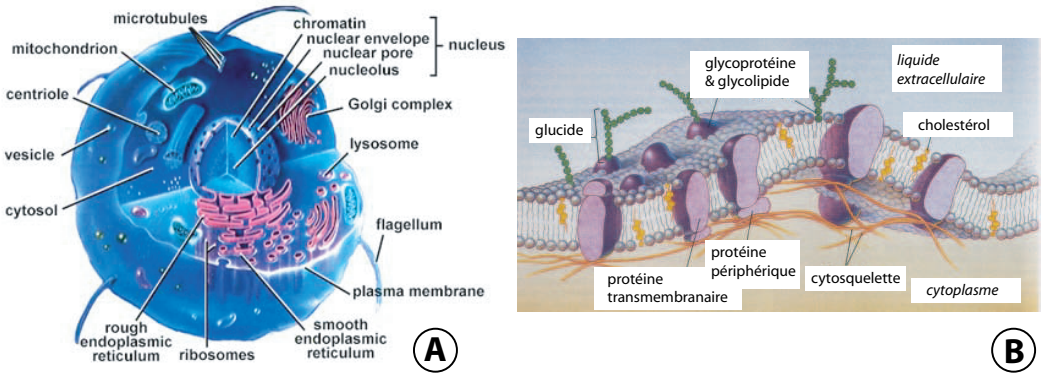

FIG. 1 – A : Représentation schématique d'une cellule eucaryote : les différents organites intracellulaires, l'appareil de Golgi, le noyau sont les principales sous-unités visibles (http ://www.ebi.ac.uk/) - B : sa membrane où sont ancrées des protéines, sous-tendue par le cytosquelette (http ://fig.cox.miami.edu).

Une caractéristique importante de la cellule est d'isoler un milieu intérieur.

Cela paraît anodin mais on peut penser que ce simple fait, de pouvoir séparer un intérieur fragile d'un milieu extérieur hostile, a pu favoriser l'émergence de la vie dans toute sa diversité. La "cloison séparatrice" s'appelle la membrane cellulaire : elle protège les usines de l'intérieur du monde extérieur, comme une muraille, mais elle permet quand même des échanges (nourriture, matériel de construction vers l'intérieur, produits de chimie à haute valeur ajoutée – protéines,... – ou résidus de transformation vers l'extérieur). D'autres membranes, présentes à l'intérieur de la cellule, entourent des organites intracellulaires et jouent un rôle crucial, en particulier dans la transduction des signaux cellulaires.

La membrane cellulaire, en tant que lieu du contact avec le milieu extérieur et les autres cellules, s'affirme comme étant un site essentiel de communication et d'interactions. Comme l'illustre la Fig. 1B, la membrane est elle aussi un objet composite. On peut la décrire succinctement comme une bicouche, composée de plusieurs types de lipides, où sont ancrées des transporteurs ou canaux (permettant des échanges de matière entre milieux intérieur et extérieur), des protéines de communication/adhérence (permettant à la cellule de sonder le milieu extérieur et/ou de former des assemblées pour mieux "se défendre"), des forêts de molécules glycosylées/le glycocalyx (jouant majoritairement un rôle de rempart stérique)... Elle est de plus sous-tendue (et liée, via des protéines) par un réseau "de cables", appelé cytosquelette et formé d'actine, qui lui confère une résistance mécanique plus grande. Pour une revue sur les propriétés et particularités de la membrane cellulaire, voir le chapitre introductif de E. Sackmann dans [Lipowski and Sackmann] et les parties subséquentes de [Alberts et al., 2002] qui exposent dans un langage relativement accessible aux physiciens de la "matière molle" l'essentiel de la "matière vivante".

Vers un système modèle de la membrane cellulaire

Comment/par quoi peut-on modéliser des objets si complexes, face auxquels des générations de biologistes se sont affrontées et en ont tiré des quantités de données, parfois relativement empiriques ? Comment extraire *un* effet (au risque de très souvent simplifier les choses de manière un peu trop abrupte) ?

Une des pistes, suivie tout d'abord par certains biologistes et biophysiciens, consiste à dire : "la cellule c'est compliqué, enlevons donc tout ce qu'il y a dedans, et ne gardons que la membrane". On obtient ainsi un "sac" qui délimite un intérieur et un extérieur. Un sac rigide, alors : "enlevons aussi le cytosquelette", on aura un sac "mou". La suite logique de cette idée est d'ajouter : "mais même la membrane qui reste est un fatras extraordinaire, ne gardons que les lipides, pour commencer". Mais même là, c'est encore complexe : la membrane d'un globule rouge contient une centaine de lipides différents et est asymétrique (le feuillet

interne de la bicouche n'a pas la même composition que le feuillet externe). "Au final, ne prenons qu'un type de lipide, ou deux, ou trois, et peut-être une protéine, et regardons ce que l'on peut en tirer !". La bicouche obtenue est un système autoassemblé relativement robuste, comme nous allons le voir.

Les liposomes

Le premier système modèle qui a découlé de cette approche est la vésicule unilamellaire ou liposome (SUV pour *Small Unilamellar Vesicle*, LUV pour *Large Unilamellar Vesicle*). Les liposomes unilamellaires sont préparés soit par traitement mécanique de suspensions multilamellaires de phospholipides (sonication, presse de French, congélation/décongélation, extrusion), soit par évaporation de solvants organiques à partir de suspensions de micelles inverses de phospolipides (réversion de phase, éther ou éthanol injection). Ils ont des diamètres de 10 à 200 nm et ont été étudiés de manière intensive pour leurs applications comme vecteurs de drogues en pharmacologie [Lasic, 1993, Rosoff, 1996].

Dans une deuxième étape, des protéines membranaires ont pu être reconstituées dans de telles vésicules lipidiques pour former des protéoliposomes. Ces objets sont idéaux pour analyser les mécanismes fonctionnels ainsi que les topologies et topographies de protéines membranaires reconstituées dans la bicouche lipidique [Rigaud et al., 1995, Rigaud and Levy, 2003].

Bien que les méthodologies pour obtenir ces vésicules unilamellaires (liposomes ou protéoliposomes) sont parfaitement maîtrisées, leur taille est mal adaptée à l'études des propriétés dynamiques des phénomènes d'intérêt, comme l'adhésion par exemple.

Les bicouches planes

En parallèle de cela, des bicouches supportées sur des solides, fabriquées par des techniques de dépôt en cuve de Langmuir ou par fusion de SUV, ont aussi servi de systèmes modèles de la membrane cellulaire [Sackmann, 1996], que l'on peut étudier par résonnance de phonons et/ou par microscopie de fluorescence. Cette fois-ci, une des limitations est la présence d'un solide au-dessous de la bicouche, qui perturbe fortement ses propriétés mécaniques. Beaucoup d'améliorations (par incorporation d'une couche de polymères hydrosolubles gonflés [Schmitt et al., 2001], d'espaceurs [Wagner and Tamm, 2000], de gels d'agarose ou de polysaccharides [Baumgart and Offenh, 2003] entre la bicouche et le substrat) ont été proposées et le sont encore.

D'autres expériences utilisent une bicouche suspendue (*Black Lipid Membrane*) et sont basées sur des mesures de conductivité afin de détecter l'activité de protéines incorporées ou l'existence de pores [Winterhalter, 1999a, Winterhalter, 1999b].

Les vésicules géantes

Enfin, un dernier système modèle est "la vésicule géante unilamellaire" (ou GUV, voir Fig. 2) qui a une taille comparable à celle de nos cellules et qui est observable par microscopie optique, alors que les SUVs ne le sont que par microscopie électronique ou de fluorescence. Ce système a reçu une attention toute particulière de la part des (bio)physiciens dans les deux dernières décennies (voir par exemple [Luisi and Walde, 2000]).

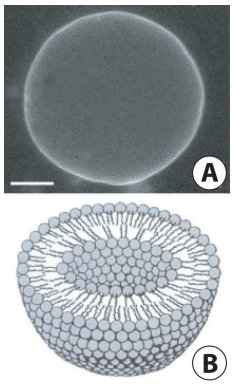

FIG. 2 – A : Image par microscopie de fluorescence d'une vésicule géante – à l'équilibre, une telle vésicule a une tension nulle. La barre représente 10 microns. L'épaisseur de la bicouche à l'image ne correspond bien sûr pas à son épaisseur réelle à cause de la diffusion de la lumière de fluorescence ; B : schéma illustrant l'organisation des lipides en bicouche dans une vésicule. La structure est bien plus simple que celle d'une cellule.

C'est une bicouche libre et fermée, composée de peu de types de lipides et parfois décorée avec une protéine ou un fragment protéique, un anticorps. L'objet artificiel résultant est fragile et sa taille, entre 10 et 100 μm de diamètre. Ces dimensions sont proches de celles des cellules . Cela permet l'observation des GUVs par les microscopies optiques classiques (DIC, fluorescence, confocal,...) et le suivi de phénomènes en temps réel. La membrane est animée de fluctuations géantes car sa tension de surface est nulle : les molécules de lipides qui la constituent sont insolubles et minimisent leur surface par tête polaire.

Ce système est celui qui a été utilisé au cours du travail de thèse que ce manuscrit présente, afin de modéliser certains aspects de la membrane cellulaire : ses propriétés d'adhésion et de transport.

Systèmes modèles d'adhésion cellulaire

A la surface des cellules, beaucoup de molécules (protéines, sucres et même lipides) jouent un rôle dans l'adhésion cellulaire. Cette dernière est essentielle pour pouvoir construire et organiser des tissus (embryogénèse, cohésion tissulaire,...), ou bien permettre à des cellules de se déplacer (motilité). La compréhension du rôle et du mode de fonctionnement de ces molécules est donc essentielle, ainsi que la mesure d'une "énergie d'adhésion".

Deux types d'expériences sont à mettre en avant à ce stade : ou l'on parle d'adhésion entre vésicules, ou entre une vésicule et une surface. Les deux surfaces

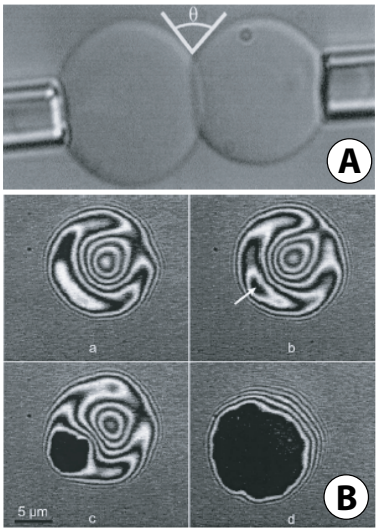

FIG. 3 – Expériences d'adhésion – A : micropipettes – on met en contact deux vésicules décorées avec des clefs et des serrures et on mesure l'angle de contact qui donne une mesure de l'énergie d'adhésion, la tension des membranes étant connue [Pincet et al., 2001a] ; B : microscopie interférentielle (RICM) : cinétique de l'adhésion – on observe une vésicule adhérant sur une surface, décorée – cette dernière expérience sera décrite en détail dans ce manuscrit [Boulbitch et al., 2001].

que l'on va mettre en contact doivent présenter des interactions non spécifiques (charges, attraction par déplétion) ou spécifiques (en étant décorées avec des molécules de type "clef/serrure").

Le premier type regroupe toutes les expériences dites de vésicules libres (en suspension, qui interagissent quand elles se rencontrent) et celles de "micropipettes" comme illustré par la Fig. 3A. Dans ce dernier cas, deux vésicules sont aspirées dans des micropipettes. Elles peuvent porter des molécules complémentaires en surface, des charges opposées, être placées dans une solution de macromolécules,... Une est maintenue tendue et l'autre est laissée plus "molle". Cette dernière adhère sur la vésicule tendue par un phénomène s'apparentant à du mouillage. La tension des membranes et l'angle de contact θ étant mesurés, on peut en déduire facilement une énergie d'adhésion via la relation de Young.

Le second regroupe les adhésions sur substrat texturé (où des séries de bandes adhésives/non adhésives décorent la surface [Bernard et al., 2000]) et ceux où le substrat présente une décoration homogène qui peut être une combinaison d'une interaction attractive (une protéine par exemple) et d'une interaction répulsive (un lipide portant un polymère hydrosoluble permet de créer une chevelure protectrice). Dans ce dernier cas, illustré sur la Fig. 3B, les études réalisées sur la statique et la dynamique de la zone d'adhésion (en noir au centre de l'image) par microscopie interférentielle ont permis de mettre en évidence des séparations de phase (coexistence de zones de membrane adhérant fortement avec d'autres n'adhérant pas, à l'image des "plaques d'adhésion" cellulaires) dans des gammes de densités en récepteurs/ligands de l'ordre de celles présentes à la surface des cellules.

Phénomènes de transport : pores transitoires et tubes de membrane

Pores transitoires

Bien évidemment, les vésicules géantes peuvent aussi être vues comme des modèles des petits liposomes de "drug delivery" utilisés en pharmacologie et en galénique. Ces objets, de par leur nature lipidique, sont essentiellement biocompatibles. Ils peuvent aussi être vus comme un "agrandissement" des vésicules servant de cargo à l'intérieur des cellules lors des échanges de matériels entre les différentes usines de la cellules, ou entre la cellule et l'extérieur (synapses...).

Ils permettent d'élucider les différents modes de délivrance d'un principe encapsulé (éclatement de la vésicule, apparition d'un pore suite à une mise sous tension par adhésion ou par modification des propriétés mécaniques de la membrane (changement de phase dû à la température...).

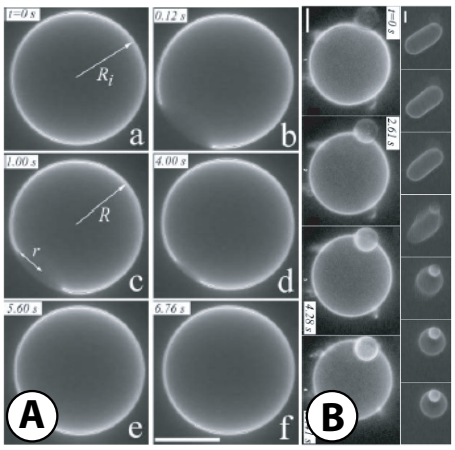

FIG. 4 – A : Pore transitoire s'ouvrant et se refermant dans une vésicule tendue par éclairement – on accède ainsi à la tension de ligne $\mathcal{T}$ de la membrane [Sandre, 2000, Sandre et al., 1999a, Karatekin et al., 2003b, Puech et al., 2003] (barre : 10 μm); B : mise sous tension de vésicules géantes négatives par adhésion sur des billes de charge opposée micromanipulées avec des pinces optiques [Karatekin et al., 2003b, Fery et al., 2003] (barre : 3 μm)

Un exemple de ces études, effectué au cours de ce travail de thèse, est présenté sur les Fig. 4A et B : mise sous tension par éclairement et apparition d'un pore transitoire ; mise sous tension par adhésion sur une bille. Cette dernière expérience illustre l'idée suivante : si, à la place d'une bille recouverte de polycation, on utilise une capsule de polyélectrolytes (dont les paramètres mécaniques et la porosité sont excessivement bien contrôlés), il devient envisageable d'utiliser les vésicules géantes comme des cargos de réactifs et les capsules comme des réacteurs calibrés.

Fusion de membranes Des phénomènes de réorganisation des membranes peuvent aussi être observés. Sans agents fusogènes (peptides, SNAREs ou simplement tensioactifs), l'occurence du phénomène de fusion est (quasi)nulle entre vésicules de même composition. La séquence d'images de la Fig. 3.8 montre un

événement de fusion dans un milieu contenant un tensioactif (Tween 20). Des études en cours cherchent à déterminer un système minimal, à base de vésicules géantes dont la membrane contient des lipides chargés ou des molécules fusogènes d'intérêt biologique (SNAREs par exemple), permettant de modéliser les mécanismes moléculaires de la fusion.

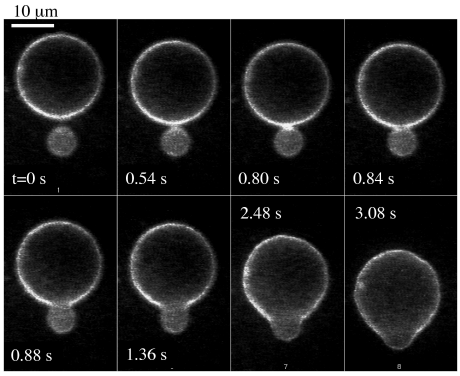

FIG. 5 – Séquence de fusion de deux vésicules en présence d'un tensio-actif, le Tween 20 – cette fusion montre qu'il y a ouverture simultanée de deux pores au voisinage l'un de l'autre [Karatekin et al., 2003a].

Tubes de membrane

Certaines structures de la cellule sont composées de tubes de membranes (appareil de Golgi, invaginations,...). Des systèmes minimaux d'étude de tubes de membrane, de leur mécanique (comment les extrait-on, comment se déforment-ils sous contraintes, comment les relaxent-ils ?) ont été étudiés récemment au laboratoire (Fig. 6A et B). On peut observer des tubes lorsque l'on soumet une vésicule, attachée en un point sur une surface, à un flux : des lois d'extraction et de rétraction on été établies expérimentalement et sont en train d'être comparées à des modèles théoriques (Fig. 6A). De même, un système d'inspiration biologique a été mis en place, où les tubes sont cette fois-ci tirés par des moteurs moléculaires fixés sur la membrane en présence d'ATP, se déplaçant le long de microtubules jonchant la surface (Fig. 6B).

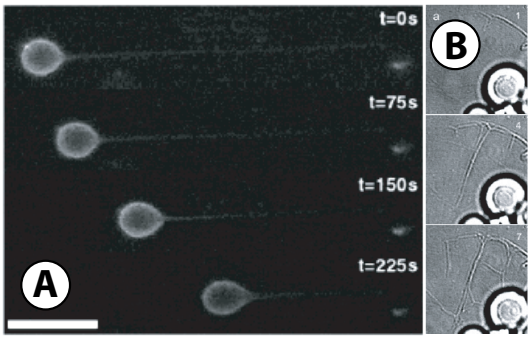

FIG. 6 – A : Extraction et rétraction de tubes de membrane sous écoulement [Rossier et al., 2003] ; B : tubes de membrane tirés à partir de vésicules géantes par des moteurs moléculaires "courant" le long de microtubules déposés sur une surface de verre [Roux et al., 2002]

Au sujet du travail présenté ici...

Le travail présenté dans ce manuscrit a porté principalement sur l'élaboration d'un nouveau système minimal mimant l'adhésion cellulaire à l'aide de fragments recombinants d'une protéine cruciale dans l'embryogénèse, la cohésion et la différenciation tissulaire, ainsi que dans la prolifération de tumeurs cancéreuses : la E-cadhérine. En parallèle, nous avons étudié plusieurs systèmes d'adhésion forte et modélisé la cinétique de croissance de la zone d'adhésion. Nous nous sommes intéressés au problème de la mise sous tension de vésicules géantes, pouvant conduire à la formation de pores transitoires, comme moyen de contrôler les phénomènes de transport à travers la membrane. Enfin, nous avons mis au point une méthode permettant d'extraire des tubes de membrane, et d'en étudier les propriétés dynamiques lors de l'extrusion et de la rétraction.

Dans un premier temps, nous effectuerons un bref exposé des enjeux et questions de l'adhésion cellulaire, ainsi que des protéines que nous avons utilisées, les cadhérines. Puis, nous présenterons quelques aspects de la physique des vésicules géantes, avant de rentrer dans le détail des matériels et méthodes utilisés au cours de ce travail. Enfin, quatre groupes d'expériences seront détaillés et discutés. Dans le Chapitre 4, sera présentée la mise au point et la validation d'une nouvelle méthode permettant d'accéder à la tension de vésicules lourdes reposant au voisinage de surfaces. Les Chapitres 5 et 6 portent sur des études d'adhésion (i) par décoration de vésicules géantes avec des fragments de cadhérines (étude des interactions vésicule/vésicule et vésicule/substrat) ; (ii) avec des systèmes chargés ou en utilisant un système spécifique de "super-glue" moléculaire, qui créent une adhésion très forte. Dans le Chapitre 7 (iv) l'étude de la modification de la dynamique de pores transitoires dans des vésicules géantes, plongées dans un milieu visqueux, par ajout de molécules agissant sur le bord du pore et donc sur la tension de ligne La mise sous tension de la membrane par adhésion sur des billes chargées, ou par application d'un flux conduisant à l'extraction de tubes lipidiques, sera illustrée par des articles. Enfin, nous essayerons de montrer les voies possibles de poursuite de ce travail sur des systèmes modèles de membrane cellulaire, et comment se rapprocher un peu plus encore des phénomènes biologiques.

Chapitre 1

Adhésion cellulaire et cadhérines

L'adhérence d'une cellule à une autre, ou bien sur un substrat, est un phénomène central et capital en tant qu'il permet à cette cellule de communiquer avec ses voisines, de se mouvoir ou de former un assemblage plus complexe, un tissu [Alberts et al., 2002].

A contrario des agrégations entre particules colloïdales qui sont médiées par des interactions non spécifiques, l'adhésion cellulaire est, elle, essentiellement et hautement spécifique. La surface de la cellule porte des molécules d'adhérence (protéines) capables de reconnaitre leur complémentaire.

Dans ce chapitre, nous allons décrire brièvement comment adhèrent les cellules, et présenter les différents protagonistes de ce comportement. Nous essayerons de mettre en avant le caractère particulier de cette adhérence : elle est régulée, c'est-à-dire exprimée ou inhibée, par des signaux venant de l'extérieur de la cellule (hormones de croissance, présence d'une cellule voisine ou d'un substrat,...) ou de l'intérieur de la cellule (cascades de signalisation). Nous présenterons alors plus particulièrement une famille de molécules homotypiques d'adhérence impliquées dans des zones d'adhésion qui maintiennent la cohésion des tissus : les *cadhérines*.

Nous montrerons alors comment les études de la structure tridimentionnelle de ces protéines conduisent à formuler des hypothèses sur leur "mode de fonctionnement" (géométrie des assemblages, zones d'interaction), et comment a été sondée la résistance de l'attachement qu'elles induisent par différentes méthodes de mesures de force (SFA, AFM, chambre à flux, micromanipulations de cellules). Nous présenterons alors le système formé de segments de cadhérine épithéliale (ou E-cad), que nous avons utilisé lors de ce travail de thèse.

1.1 L'adhérence cellulaire : quelques éléments

Dans un organisme multicellulaire, les cellules sont des entités hautement spécialisées, capables de communication et de reconnaissance [Alberts et al., 2002].

En quelque sorte, elles sont "programmées" afin d'avoir un comportement bien défini. Certaines adhèrent entre elles (entre cellules du même type) pour former des tissus, et interagissent avec la matrice extra-cellulaire. Un exemple type sont les cellules épithéliales, constitutives des tissus séparant l'intérieur d'un vaisseau sanguin des tissus l'environnant. D'autres se déplacent et sont capables de reconnaitre différents types cellulaires mais de n'interagir avec eux qu'en réponse à un signal spécifique : les leucocytes circulant dans le sang sont capables de "s'arrêter" sur un lieu d'inflammation ou d'infection, afin de lutter contre. L'adhésion d'une cellule sur un substrat est aussi à la base de la motilité cellulaire.

Ces phénomènes sont impliqués à des stades très différents de l'évolution d'un organisme : développement et différenciation des embryons, renouvellement et cohésion des tissus (pour former des barrières semi-perméables, comme les parois des vaisseaux sanguins), défense de l'organisme contre des attaques extérieures (comme le font les leucocytes, qui "traquent" dans nos vaisseaux les agents pathogènes)... ou bien, et plus malheureusement, cancer (une métastase qui migre d'un organe malade vers un autre s'est en quelque sorte "décollée" de la première tumeur) [Thiery, 2003]. Dans ces fonctions, il y a toujours un phénomène d'adhésion ou de détachement d'une cellule par rapport à une autre, ou par rapport à un substrat.

Toutes ces interactions sont médiées par des molécules présentes à la surface des cellules, souvent des protéines ancrées dans la membane cellulaire, et appellées pour cela *molécules d'adhésion cellulaire* (en anglais *Cell Adhesion Molecules* ou CAMs). On estime que plus de 3% des protéines codées dans le génome humain font partie par au moins une de leur fonctions connues des molécules adhérentes [Thiery, 2003].

D'une manière très générale, on nomme ces molécules des *récepteurs* : leur reconnaissance moléculaire est généralement hautement spécifique (via des contraintes géométriques, des liaisons hydrogène,...). C'est ce qui différencie l'adhésion de type cellulaire, via des assemblages de molécules "clef-serrure", des agrégations colloïdales, dues aux attractions classiques (électrostatique, van de Waals,...). On perçoit bien ici le caractère "discret" de l'adhérence induite par ces molécules, qui sont généralement présentes en faibles quantités à la surface des cellules.

1.1.1 Assemblage en tissus : exemple de l'endothélium

Un cas particulier de tissu, l'endothelium vasculaire, qui est celui qui tapisse les parois des vaisseaux sanguins, est un bon exemple pour illustrer ces différents types de jonctions entre cellules. Les assemblages intercellulaires que forment les molécules d'adhérence (*jonctions*) en s'associant sont des entités très localisées. Ils sont classifiés en trois groupes, suivant leur structure (en termes de distance entre membranes) et leur fonction (imperméabilisation des assemblages ou communication) : les jonctions étanches, les jonctions adhérentes et les jonctions de communication.

Sur la Fig. 1.1 est présentée la zone de contact entre deux cellules de l'endothélium ainsi que les différentes jonctions cellulaires dont on vient de parler.

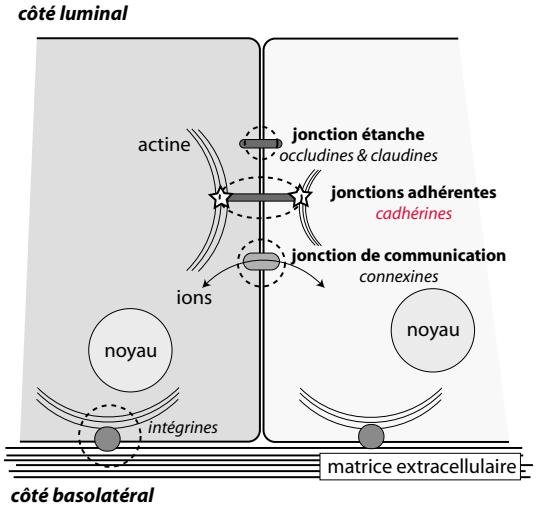

FIG. 1.1 – Schéma montrant deux cellules endothéliales vasculaires et les trois types de jonctions adhérentes entre elles : jonction étanche, adhérente, de communication. L'attachement de ces cellules à la matrice extracellulaire est aussi représenté.

Ce tissu joue plusieurs rôles cruciaux dans notre organisme : il contrôle la circulation sanguine, permet les échanges de gaz (O_2, CO_2) entre les organes et le sang, intervient dans les propriétés de coagulation lors d'une blessure. C'est donc une paroi solide mais aussi capable de laisser les globules blancs passer (par extravavasation) pour aller réparer une inflammation ou lutter contre un foyer infectieux. Il n'est pourtant formé que d'une monocouche de cellules endothéliales liées entre elles latéralement et qui sépare l'intérieur du vaisseau (côté luminal, où se trouve le fluide sanguin) de la matrice extra-cellulaire (côté basolatéral).

Les jonctions existant entre ces cellules sont responsables de la forte cohésion de l'endothélium : en partant du côté luminal ("extérieur", Fig. 1.1) et en descendant dans le tissu (vers le côté "intérieur"), on trouve successivement (i) les jonctions dites *étanches* (ou ZO, pour *zonula occulens*, sur la Fig. 1.1), qui sont formées par des protéines appelées claudines et occlusines, et imperméabilisent le vaisseau ; (ii) les jonctions dites *adhérentes* (ou ZA, pour *zonula adherens*, sur la Fig. 1.1), qui sont formées essentiellement par des *cadhérines*, qui entourent la cellule comme une ceinture et sont reliées à des filaments d'actine ; (iii) les jonctions dites *de communication* (ou *gap junctions*), qui permettent le passage d'ions ou de petites molécules entre deux cellules contigües via des canaux formés d'hexamères de connexines.

Les interactions avec la matrice extracellulaire (fibres de collagène,...) située côté basolatéral sont réalisées via d'autres catégories de protéines d'adhésion, les intégrines. Lors d'une interaction entre un lymphocyte et la paroi endothéliale (côté luminal), ces mêmes intégrines ainsi que des sélectines, sont impliquées [Alberts et al., 2002].

L'endothélium est un cas particulier d'épithélium simple. Sur la Fig. 1.2 est présentée la zone de jonction entre deux cellules épithéliales vue en microscopie électronique : on peut remarquer l'organisation similaire de celle-ci par rapport à l'organisation décrite sur la Fig. 1.2. La jonction de type "desmosome" (Ma) n'existe pas entre cellules endothéliales.

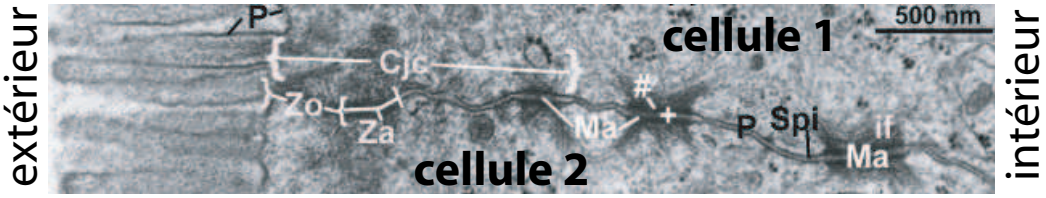

FIG. 1.2 – Deux cellules épithéliales dans un tissu en contact (microscopie électronique) : (Zo) jonction étanche, proche du côté luminal de la cellule ("vers l'extérieur du tissu") qui est constituée par des protéines appelées claudines et occlusines ; (Za) jonction adhérente où l'on trouve la E-cadhérine et beaucoup de filaments d'actine ; (Ma) desmosomes. Ensemble, elles forment une jonction cellulaire complexe (Cjc). Sont aussi visibles la membrane plasmique (P), ainsi que l'espace intercellulaire (+) [EMAtlas, 2003].

1.1.2 Adhésion et perméation de leucocytes

En réponse à une inflammation, les leucocytes entrainés par la circulation sanguine sont capables d'adhérer, d'abord faiblement, sur la surface d'un vaisseau sanguin se trouvant à proximité de la zone malade (Fig. 1.3). Les cellules endothéliales de ce vaisseau y expriment des sélectines, molécules reconnues spécifiquement par des oligosaccharides présents sur la surface des globules blancs.

Ceux-ci peuvent alors rouler sur la paroi interne du vaisseau jusqu'à se rapprocher suffisamment de la zone inflammée, au voisinage de laquelle les interactions entre les cellules endothéliales et leucocytes deviennent plus fortes : le système adhésif intégrine (sur le globule) / ICAM (sur la paroi) est activé et immobilise les leucocytes aux zones intercellulaires de l'endothélium. Ainsi, les leucocytes peuvent, en se déformant et en profitant du fait que les cellules de la paroi se font localement un peu plus laches, pénétrer dans les tissus plus profonds (on dit qu'il y a extravavasation) et migrer par chemotaxie vers la zone malade.

On voit que dans ce phénomène, essentiel à la défense de notre organisme, les processus d'adhésion sont omniprésents et en gouvernent toutes les étapes. La migration qui a lieu après passage ne faillit pas à cette règle comme nous allons le voir.

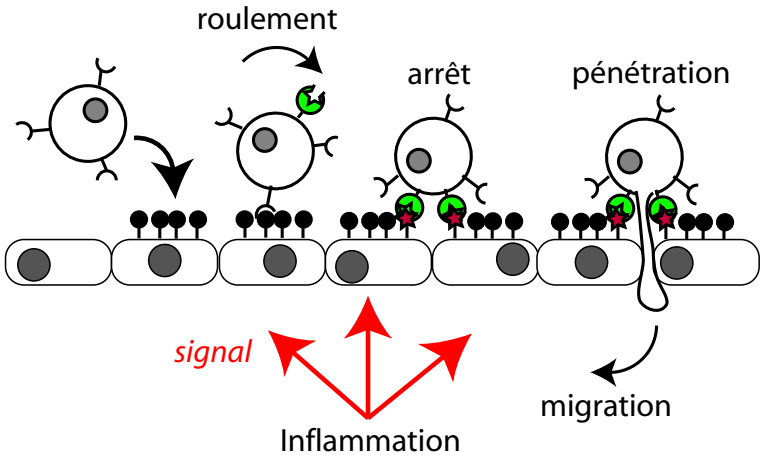

FIG. 1.3 – Un tissu inflammé émet des "messages chimiques" qui poussent les leucocytes à se coller sur la paroi du vaisseau sanguin le plus proche qui exprime des sélectines. L'adhésion est alors due à l'interaction entre ces molécules et des oligosaccharides portés par les globules blancs. Ils y roulent alors, jusqu'à la zone enflammée, où il s'arrètent. Un système d'adhésion plus forte est alors activé, mettant en jeu des intégrines qui vont se lier à des ICAM. Enfin, le leucocyte peut s'infiltrer entre les cellules endothéliales et migrer vers l'inflammation.

1.1.3 Adhésion et motricité cellulaire

Sans adhésion les cellules ne pourraient migrer. En effet, comme le montre la Fig. 1.4, la plupart des cellules progressent par un mécanisme d'adhésion/traction sur des lamellipodes.

Une cellule adhérant sur un substrat par le biais de zones focales d'adhésion doit, pour avancer, à la fois créer de nouveaux points adhésifs, sur lesquels elle va se tracter, et détruire des points adhésifs qui sinon la retiendrait là où elle se trouve. Ayant "choisi" (en réponse à des signaux chimiques de type hormones de croissance ou autre) une direction, elle avance un pied en concentrant à l'intérieur de celui-ci de l'actine. Puis ce pied adhère, et la polymérisation de l'actine génère des forces de traction qui vont faire avancer la cellule. Simultanément, celle-ci détruit des points focaux d'adhésion situés en arrière de son mouvement à venir. La cellule bouge, et répète ce cycle de phénomènes jusqu'à ce qu'elle soit arrivée.

L'adhésion est donc un phénomène dynamique pour la cellule : elle la construit ou la détruit suivant ce qu'elle va faire. L'adhésion est donc à la fois forte (pour résister à la traction) et versatile (pour être faite ou défaite sans coûter trop d'énergie à la cellule). Pour cela, nous avons vu que la cellule utilise beaucoup de molécules, qui chacune adhérerait faiblement avec son complémentaire, et les ordonne en structures qui sont régulées par de nombreuses voies de signalisation.

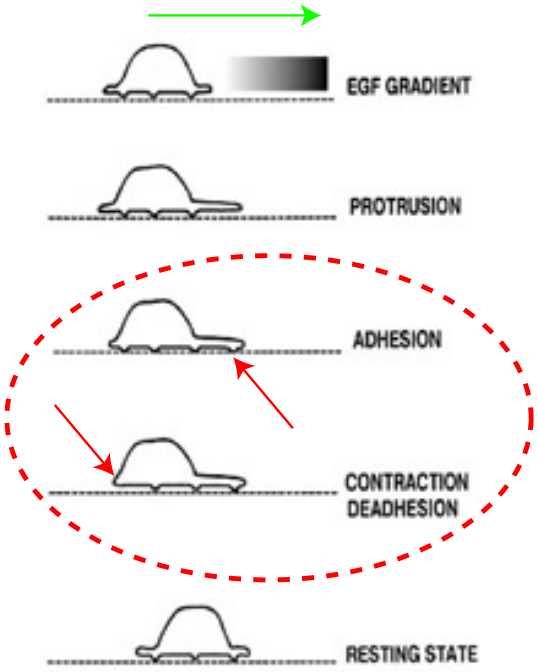

FIG. 1.4 – Déplacement d'une cellule en réponse à un un gradient d'hormone de croissance (d'après http ://www.ucl.ac.uk/) : la cellule émet un "pied" (lamellipode) dans la direction où elle veut aller (flèche verte). Ce pied s'attache sur la surface, pendant que l'arrière de la cellule se détache (flèches rouges). Une traction s'exerce alors via ce nouvel ancrage, et permet ainsi à la cellule de se déplacer. Le phénomène se poursuit, et la cellule avance ainsi à des vitesses de l'ordre de quelques microns par minute.

1.2 Les récepteurs moléculaires d'adhérence

Toutes les molécules d'adhérence que l'on vient de citer sont des glycoprotéines présentes à la surface des cellules et présentent trois "segments" (Fig. 1.5) : une partie extracellulaire, jouant le rôle de récepteur proprement dit (elle sonde le milieu extérieur et va être le site de la reconnaissance moléculaire et de l'interaction avec une cellule voisine) ; une partie transmembranaire hydrophobe, qui va lui permettre de s'intégrer dans la membrane cellulaire ; une "queue" cytoplasmique pouvant lui servir d'ancre au cytosquelette (et la mettant "en contact" avec les voies de signalisation intracellulaire). Elles sont regroupées en cinq grandes familles selon leurs caractéristiques structurales et/ou fonctionnelles : les cadhérines, les immunoglobulines, les sélectines, les intégrines et les protéoglycanes [Gumbiner, 1996]. Elles interagissent avec une molécule de même type (interaction dite "homotypique") ou non (interaction dite "hétérotypique"), entre deux cellules qui peuvent être de même type (interaction dite "homophilique") ou non (interaction dite "hétérophilique"). Les cadhérines sont une famille de CAMs intervenant dans des interactions homotypiques (interactions cadhérine/cadhérine) et homophiliques (entre deux cellules d'endothélium, par exemple).

Il faut noter que le rôle des CAMs ne se limite pas à être seulement une "colle moléculaire" : elles interviennent très fortement dans la signalisation cellulaire [Gumbiner, 2000].

Nous allons maintenant nous focaliser sur la famille des cadhérines.

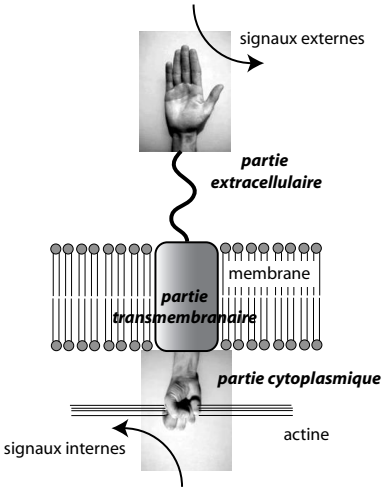

FIG. 1.5 – Représentation schématique d'une protéine d'adhésion avec ses trois parties : extracellulaire, transmembranaire et cytoplasmique. La première sonde l'extérieur de la cellule (zone de reconnaissance), la deuxième assure l'incorporation de la protéine dans la membrane, la troisième la couple au cytosquelette.

1.3 Les cadhérines

Les cadhérines sont des protéines qui, comme nous venons de le voir, sont engagées dans des interactions homophiliques et homotypiques. Ces interactions sont de plus calcium-dépendantes, c'est-à-dire que le calcium est nécessaire à la formation de liaisons entre cadhérines. Dans le corps humain, la concentration en calcium libre est de l'ordre du mM, les cadhérines interagissent pour une concentration locale en calcium entre 1 et 2 mM. Cette concentration locale est régulée par un ensemble de protéines actives présentes dans les membranes. Des études récentes tendent à montrer qu'un appauvrissement sévère du milieu désorganise les jonctions entre cellules [Rothen-Rutishauser et al., 2002].

La nomenclature des cadhérines couramment utilisée est la suivante : elles portent comme initiale celle du tissu dans lequel on les a identifiées en premier ou dans lequel elles sont majoritaires. Pour exemple, citons la E-cad que nous avons utilisé : elle a été identifiée en premier dans l'épithélium. Dans ce tissu, les E-cads se regroupent au niveau des jonctions adhérentes. Ce regroupement, en plus de son lien aux filaments d'actine, est souvent invoqué comme origine de la solidité de la jonction [Shapiro et al., 1995].

Les cadhérines permettent donc la création de tissus solides et différenciés, par exemple lors de la morphogénèse [Takeichi, 1995]. Il faut noter que toutes les cadhérines ne sont pas purement "homotypiques" : la N-cad (neurale) et la R-cad (rétinale) sont deux exceptions à la règle et des interactions "croisées" peuvent exister [Shapiro et al., 1995].

De plus, ces protéines ne sont pas qu'une "colle cellulaire", mais jouent aussi un rôle de grande importance dans la reconnaissance entre cellules [Takeichi, 1991] et dans la signalisation. Leur expression peut entrainer la différenciation des cellules et la formation de tissus. La dérégulation de cette même expression est considérée comme étant une étape dans le processus de propagation de tumeurs

cancéreuses [Thiery, 2003].

Plusieurs familles de cadhérines existent, à la fois suivant leur structure (les cadhérines dites classiques ont cinq domaines relativement semblables, les cadhérines atypiques en ont plus), et suivant leur caractère plus ou moins adhérent (les cadhérines de type I sont plus adhérentes que celles dites de type II). Dans ce qui va suivre, nous nous concentrerons essentiellement sur des cadhérines classiques de type I, comme les cadhérines épithéliales.

1.3.1 Les cadhérines dites "classiques"

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés à un type de cadhérine, la *E*-cad. Cette cadhérine fait partie de ce qui est communément nommé les cadhérines classiques. Nous allons présenter ici les aspects généraux de la structure de ces protéines, qui sont des protéines transmembranaires, constituées de trois parties [Gumbiner, 1996, Gumbiner, 2000] (voir Fig. 1.6).

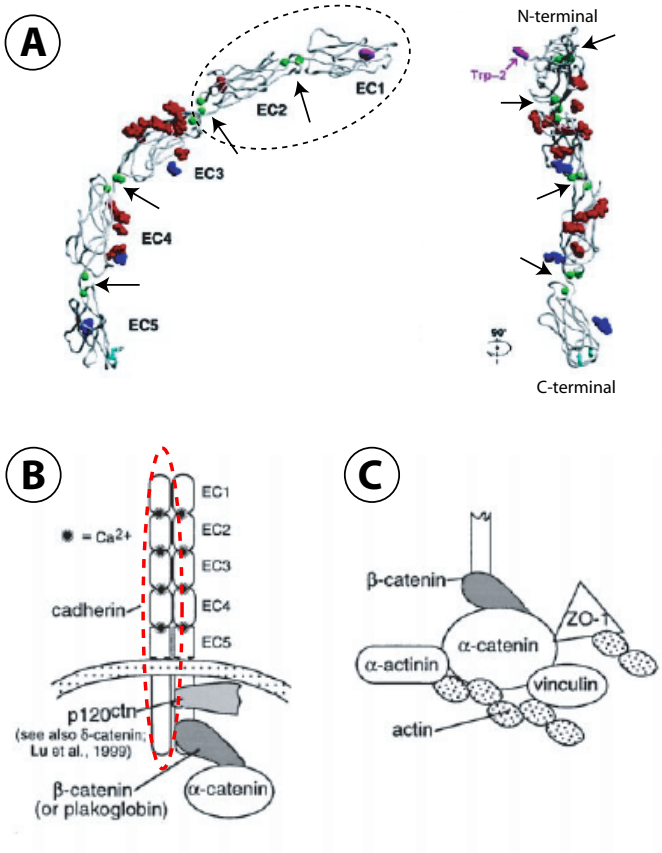

FIG. 1.6 – A : Partie extracellulaire de la *C*-cad d'après [Boggon et al., 2002] vue de côté et sa rotation à 90° ; elle est composée de 5 fragments entre lesquels se fixent trois ions calcium (en vert, signalés par des flèches). On peut aussi voir les différents sites de glycosylation (en bleu et rouge) ainsi que le résidu tryptophane 2 (Trp2 ou W, en violet) sur *EC*1 – B : cadhérines insérées dans la membrane cellulaire, d'après [Gumbiner, 2000] : le domaine extracellulaire rigidifié grâce au calcium, la partie transmembranaire ainsi que la partie cytoplasmique, couplée aux filaments d'actine sont représentés ; C : détail du couplage à l'actine, via les caténines β et α, et d'autres protéines cytoplasmiques.

Les cadhérines classiques (comme la *E*-cad ou la *C*-cad) présentent à l'extérieur

de la cellule leur *domaine extracellulaire* glycosylé, qui est une espèce de "doigt" formé de cinq segments *EC* homologues, semblables à des domaines immunoglobulines [Shapiro et al., 1995]. Ces segments ou domaines sont numérotés de 1 à 5 en partant depuis le domaine le plus extracellulaire (voir Fig. 1.6A). Chaque domaine fait approximativement 4,5 nm de long, pour 3 nm de diamètre. La partie extracellulaire de la protéine, étendue, mesure donc à peu près 25 nm. Cette partie de la protéine est le site des interactions adhérentes entre cadhérines et donc de la reconnaissance cellulaire. Le calcium, nécessaire à l'adhérence, est aussi nécessaire au bon repliement de cette partie de la protéine et lui confère une résistance à la protéolyse : trois ions se fixent entre deux domaines, soit douze pour une cadhérine complète. Cette structure se prolonge par une *partie transmembranaire* hydrophobe qui permet à la protéine de s'ancrer dans la membrane cellulaire.

Enfin, à l'intérieur de la cellule se trouve une *partie cytoplasmique*, très conservée entre cadhérines (c'est-à-dire dont la structure et l'organisation est la même d'un membre à l'autre de cette famille), qui est reliée au cytosquelette d'actine par un assemblage d'autres protéines cytoplasmiques (dont les caténines, voir Fig. 1.6B et C). Par le biais de cet assemblage, les cadhérines sont au contact des chaînes de signalisation intracellulaire qui consistuent une voie "active" de régulation et de recrutement. Cette fixation joue aussi vraisemblablement un rôle de renforcement des jonctions entre cellules [Gumbiner, 2000].

1.3.2 Interactions entre cadhérines

De nombreuses études ont porté sur la façon dont ces protéines interagissent et créent une adhésion aussi forte que celle générée dans les jonctions adhérentes des cellules. On peut diviser ces travaux en deux groupes :

1. les expériences *in vivo*, où les biologistes ont utilisé les outils de la biologie moléculaire pour (i) localiser des interactions entre cadhérines et (ii) cerner le rôle de la partie cytoplasmique et de ses connexions avec les cascades de signalisation ;
2. les expériences *in vitro* où seuls des fragments solubles de la partie extracellulaire ont été utilisés, afin de comprendre la structure de cette partie et ses implications dans les interactions entre protéines, ainsi que de mesurer les forces mises en jeu lors de l'adhésion.

Nous allons ici tenter de présenter une revue de ces travaux afin de faire état des connaissances et hypothèses sur le mode de fonctionnement des cadhérines. Nous avons choisi de regrouper par thème, plutôt que par type d'expérience. Il est à noter que les travaux relatés ici portent essentiellement sur des cadhérines classiques que nous avons utilisées.

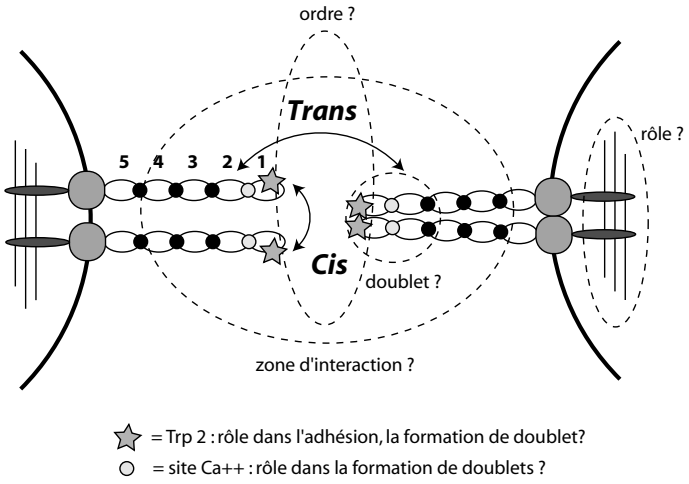

FIG. 1.7 – Interactions entre cadhérines de deux cellules adjacentes : interactions dites "*cis*" entre cadhérines de la même cellule et "*trans*" entre cadhérines n'appartenant pas à la même cellule. Les différentes questions ouvertes sont signalées : géométrie de la formation du dimère ? Interactions *cis/trans* ? Zone d'interpénétration des parties extracellulaires ? Rôle du tryptophane 2 ? Rôle de la partie intracellulaire ?

1.3.2.a Rôle du calcium

Le rôle du calcium en tant que régulateur des interactions adhésives entre cadhérines est maintenant relativement établi. Depuis les travaux de Nagar sur la *E*-cad [Nagar et al., 1996], le calcium est considéré comme étant impliqué à la fois dans la rigification de la structure tertiaire des cadhérines, les rendant plus résistantes à la protéolyse, et dans la formation des doublets de cadhérines (que nous présentons dans le paragraphe à suivre).

Depuis que la structure complète de l'ectodomaine de la *C*-cad a été publiée par Boggon et al. [Boggon et al., 2002], on a pu confirmer que le calcium s'intercale entre les domaines *EC* à raison de 3 ions calcium par site (Fig. 1.6A). Son rôle direct sur l'adhésion est, lui, encore assez mal compris.

1.3.2.b Formation de dimères

Afin d'interagir, les cadhérines de deux cellules voisines doivent former des complexes adhérents. Ce type d'interaction, entre cadhérines de deux cellules différentes, est appelé *interaction "trans"* ou *antiparallèle*.

Un autre type d'interaction a été mis en évidence lors de l'étude de fragments *EC*1 (les fragments terminaux de la partie extracellulaire) de la *N*-cad en cristallographie [Shapiro et al., 1995] : des interactions entre cadhérines "de la même cellule", afin de former des dimères ayant une activité adhérente, ont été observées. Elles portent le nom d'*interactions "cis"* ou *parallèles*.

Pour un grand nombre d'auteurs, ces interactions *cis* sont une condition initiale à la mise en place des interactions adhérentes (pour une revue récente, voir [Leckband, 2002]). Leur origine (et donc la géométrie des doublets qu'elles entrainent) est encore une question ouverte.

Selon les observations de Shapiro [Shapiro et al., 1995], ces interactions seraient dues à un échange de tryptophanes entre deux fragments de cadhérine : un Trp2 du fragment $EC1$ d'une cadhérine se loge dans une "poche hydrophobe" de la cadhérine voisine et vice et versa. Ce phénomène est indépendent de la présence de calcium, et les $EC1$ sont "parallèles" (Fig. 1.8A). Selon les observations de Nagar [Nagar et al., 1996], elles ont lieu au niveau de la zone de fixation des ions calciums, et les $EC1$ sont "croisés" (Fig. 1.8B). Selon Boggon [Boggon et al., 2002], la géométrie de l'interaction est plus complexe, entre $EC1$ d'une cadhérine et $EC2$ d'une autre molécule (Fig. 1.8C).

La poche hydrophobe portée par $EC1$ et dont on vient de parler est une succession de trois acides aminés (histidine, alanine, valine ou HAV), très conservée d'une cadhérine à l'autre, du moins à l'intérieur du groupe des cadhérines de type I (les plus adhérentes, comme par exemple la E-cad, comparativement aux cadhérines moins adhérentes, dites de type II, comme la cad-11 ; ces dernières portent un motif QAV, où l'histidine est remplacée par une glutamine, voire QAI, la valine étant remplacée par une isoleucine). D'autres successions d'acides aminés (comme les sites de fixation du calcium) sont plus ou moins conservés. Le rôle du domaine HAV lui aussi sujet à discussions : dimérisation *cis*, avec l'aide du Trp2, comme on vient de le mentionner ; interaction *trans* par couplage avec un Trp2 d'une cadhérine "d'une autre cellule" [Shapiro et al., 1995]. Certaines études de mutagénèse portant sur ce groupement HAV montrent qu'il n'est peut être pas impliqué dans les phénomènes d'adhérence [Boggon et al., 2002].

Il faut ici souligner que les trois études dont on vient de présenter les résultats ont été conduites avec des fragments de longueurs différentes de cadhérines différentes. Les interactions latérales entre cadhérines peuvent ressentir l'absence de certains EC. De plus, les conditions de cristallisation reflètent parfois mal les conditions *in vivo* : la géométrie des interactions observées est alors conditionnée par les interactions entre molécules lors de la cristallisation.

1.3.2.c Où se situent les sites adhésifs ?

Le domaine extracellulaire, véritable "clef" et "serrure" de l'interaction entre cadhérines, formé de cinq domaines EC de structure homologue, a été étudié de manière intensive, afin de déterminer les sites d'interactions, à la fois pour la formation de doublets *cis* et pour les interactions adhérentes *trans*. Les deux principales questions (qui restent encore relativement en suspens) sont "si la formation de doublets de cadhérines est nécessaire à l'adhérence, comment (et quand) ceux-ci se forment-ils à la surface de la cellule ?" et "où, le long des ces cinq domaines homologues, se situe(nt) le(s) site(s) adhérents et comment

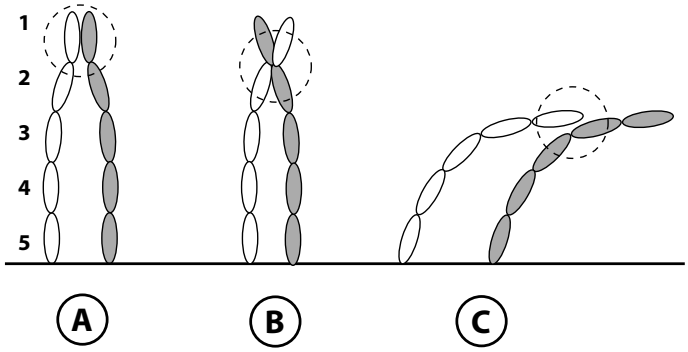

FIG. 1.8 – Forme d'un doublet *cis* de cadhérines, le cercle en pointillés entourant la zone d'interaction ; A : selon le modèle de Shapiro [Shapiro et al., 1995] obtenu par cristallographie du domaine $EC1$ de la $N-cad$. Cette interaction est basée sur la pénétration d'un Trp2 d'une cadhérine dans la poche hydrophobe de sa voisine ; B : selon le modèle de Nagar [Nagar et al., 1996], obtenu sur des fragments $EC12$ de la E-cad en présence de calcium. Dans ce modèle, l'interaction a lieu au niveau de la zone où se place le calcium, conduisant à une géométrie croisée, et les Trp2 (ainsi que les poches hydrophobes), sont libres ; C : selon le modèle de Boggon obtenu sur $EC15$ de la C-cad [Boggon et al., 2002], les molécules sont courbées de telle sorte que l'interaction se ferait entre $EC1$ et une partie de $EC2$.

fonctionne(nt)-il(s) ?"

Depuis longtemps, des études de biologie cellulaire avaient montré que $EC1$ était le site permettant aux cadhérines de se reconnaitre [Takeichi, 1991]. Une première hypothèse de travail a été de considérer que l'interaction adhésive *trans* était située sur $EC1$.

Une première approche de l'étude de l'organisation des complexes adhérents de cadhérines a donc été de construire, à l'aide des outils de biologie moléculaire, des fragments solubles de ces protéines, c'est-à-dire un ou deux fragments EC, et de les cristalliser, afin d'en avoir la structure, semblable à un domaine immunoglobuline. Deux études ont alors posé les bases d'un modèle d'interactions appellé "zipper linéaire" (Fig. 1.9A). Tout d'abord sur $EC1$ de la N-cad [Nagar et al., 1996], puis sur un fragment $EC1-2$ de E-cad [Shapiro et al., 1995], les auteurs ont observé l'existence de doublets *cis*, et une "super-organisation" de ces doublets en une espèce de fermeture-éclair, les doublets *cis* de cadhérines "de la même cellule" s'intercalant avec des doublets *cis* "de la cellule voisine". Les interactions *trans* vues alors semblent en faveur d'un site d'interaction porté par $EC1$. Néammoins, comme nous l'avons vu précédemment, les auteurs ne sont pas d'accord quant à l'organisation interne des doublets.

Récemment, la structure de la partie extracellulaire complète de la C-cad [Boggon et al., 2002] a permis de montrer que celle-ci n'avait pas la forme d'un

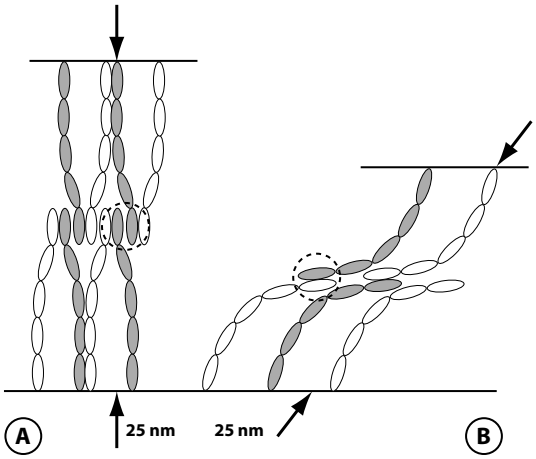

FIG. 1.9 – Forme d'un agrégat *trans* de cadhérines, le cercle en pointillés entourant la zone hypothétique de l'interaction – deux modèles proposent une interaction localisée à l'interface entre les domaines $EC1$ de cadhérines, regroupées en doublets préliminairement, appartenant à deux cellules différentes ; A : selon le modèle de Shapiro [Shapiro et al., 1995], on a une forme de "zipper" linéaire ; B : selon le modèle de Boggon [Boggon et al., 2002], la géométrie de l'interaction est plus complexe

bâtonnet rigide, mais que le domaine $EC1$ est presque perpendiculaire au domaine $EC5$ (Fig. 1.6A). L'organisation alors proposée pour les agrégats adhérents reste dans la ligne d'un modèle de zipper, mais de géométrie plus complexe, où l'interaction *trans* est alors médiée par l'échange du groupe Trp2 entre deux cadhérines de deux cellules différentes (Fig. 1.9B). Dans ce modèle, seul $EC1$ apparaît comme une zone adhérente, aucun autre niveau d'intercalation des fragments EC n'étant présent. La longueur mesurée selon l'axe des protéines est toujours de l'ordre de 25 nm, comme dans le cas supposé de bâtonnets rigides n'interagissant que par $EC1$ (Fig. 1.9).

Les interactions entre fragments solubles de protéines qui sont déduites des informations données par la cristallographie sont à prendre avec précaution, car elles peuvent très bien ne pas ressembler totalement à ce qu'il se passe au niveau de la surface des cellules : en effet, les organisations observées peuvent avoir été induites par les contraintes de symétrie (et donc de géométrie) de l'empilement des molécules.

Le caractère adhérent, mais faible et transitoire, des interactions entre fragments tronqués $EC1-2$ ont été aussi mis en évidence par mesure de force à l'échelle de la molécule unique à l'Institut Curie, par AFM ($\sim$ 20 pN/molécule, [du Roure, 2003]) et par chambre à flux (durée de vie d'une liaison cadhérine/cadhérine $\sim$ 1 sec, [Perret et al., 2002a]). Ceci soutient l'idée que $EC1$ porte un site d'adhésion.

En parallèle de ceci, des expériences à l'aide de l'appareil à force de surface (ou SFA) menées par l'équipe de D. Leckband, ont mis en évidence plusieurs sites d'adhésion le long de l'architecture de fragments extracellulaires entiers ($EC1-5$) de C-cad [Sivasankar et al., 1999, Sivasankar et al., 2001, Zhu et al., 2003]. Trois "points de décrochement" entre protéines totalement imbriquées ont été vus (en effet, le SFA permet d'imposer une distance minimale d'approche entre surface,

et donc de se mettre à une distance telle que les protéines s'interdigitent, $EC1$ d'une cadhérine d'un côté en contact avec $EC5$ d'une cadhérine opposée). Ces expériences ont été réalisées avec des "doublets forcés" de cadhérines, en couplant ces protéines avec une tierce protéine, portant deux sites de fixation plus une étiquette 6His. La fixation de ces doublets se fait alors par chélation à l'aide de lipides NTA ou IDA (ce type de couplage sera présenté en détails plus loin). Les positions des trois positions d'adhésion vues (et les configurations EC_{m1} vs. EC_{m2} correspondantes) sont présentées sur la Fig. 1.10. Cela montre que d'autres fragments en plus du fragment $EC1$ sont capables de générer de l'adhésion, et même que les interactions générées par $EC1$ sont les plus faibles. Comparant ces interactions avec la structure des domaines extracellullaires [Boggon et al., 2002], il semble que le domaine $EC3$ soit impliqué dans les interactions les plus fortes. Il se trouve que ce domaine est celui qui porte le plus de sites glycosylés (Figs. 1.10 et 1.6). Selon certains auteurs, les polysaccharides présents à ces sites peuvent jouer un rôle prépondérant dans l'organisation de certains types de cadhérines aux jonctions adhérentes. Ceci n'est pas encore très bien compris à l'heure actuelle, mais on peut néanmoins souligner une similarité avec les interactions adhésives engendrées en présence de calcium par un sucre, le Lewis X [Pincet et al., 2001a].

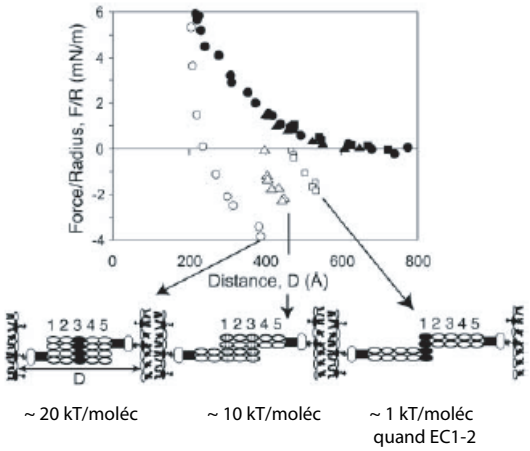

FIG. 1.10 – Positions et intensités des zones adhérentes entre doublets de cadhérines, en SFA (d'après [Zhu et al., 2003]) : l'attachement le plus résistant est celui où les doublets sont totalement enchevêtrés, puis un autre attachement relativement fort où $EC1/EC3$ est l'interaction dominante, et enfin, le minimum le plus extérieur (et le plus faible), entre les fragments les plus extracellulaires (cette interaction semble dépendre un peu du nombre de fragments EC, surement par un "effet d'espaceur").

Enfin, des études d'auto-association de fragments solubles de différentes tailles de C-cad par centrifugation analytique et adhésion de cellules en chambre de flux ont été menées [Chappuis-Flament et al., 2001], avec ou sans délétion de certains domaines (notamment du domaine $EC3$). Il résulte de ces études que les fragments composés au moins des trois fragments $EC1, 2, 3$ présentent une association et un comportement adhérent important, tandis que les fragments

$EC1-2$ s'autoassocient faiblement. Une délétion de $EC3$ dans des fragments contenant $EC1-2-4-5$ n'ayant pas entrainé une variation importante du caractère associatif de fragments longs, ce fragment n'a alors pas été reconnu indispensable à l'adhésion.

En conclusion de tout ceci, on peut dire que beaucoup d'études tendent à montrer que plusieurs sites adhérents existent le long de la partie extracellulaire des cadhérines et que la dimérisation de ces protéines est nécessaire à l'adhésion, tout autant que l'est le calcium. Néanmoins, comme on l'a vu, il est difficile de concilier toutes les observations faites, car très souvent elles l'ont été sur des cadhérines différentes, sur des fragments différents et avec des conditions imposées par les expériences très différentes : on peut imposer une distance minimale d'interaction avec le SFA alors qu'avec des cellules, on ne contrôle aucune distance et le résultat obtenu est une moyenne de comportements individuels...

1.3.2.d Rôle de la partie intracellulaire

La grande différence entre les expériences menées avec des appareils de mesure de force ou des associations de fragments solubles et celles menées avec des cellules est que dans le deuxième cas, il y a présence non seulement de la partie transmembranaire de la protéine, mais aussi et surtout de sa queue cytoplasmique qui la relie au cytosquelette (Figs. 1.6B et C). La difficulté de travailler avec des protéines purifiées contenant des domaines très hydrophobes explique pourquoi la majorité des études au niveau moléculaire se font avec les fragments extracellulaires qui eux sont solubles.

Il a été montré que l'ablation de cette partie cytoplasmique rend l'adhérence beaucoup plus faible, et qu'il en est de même si l'on supprime une des tierces protéines qui relient les cadhérines aux filaments d'actine, comme la β-caténine [Gumbiner, 1996]. La partie cytoplasmique de la cadhérine ainsi que les protéines l'accompagnant seraient impliquées dans des voies de transduction internes à la cellules, et joueraient le rôle d'un renforcement de l'interaction médiée par les domaines extracellulaires [Gumbiner, 1996, Gumbiner, 2000], en plus d'un rôle de recrutement actif des protéines.

En fait, la partie extracellulaire initierait l'adhésion, soit par réponse à un signal extérieur ou un signal interne reçu via les caténines, puis cette adhésion serait renforcée par la construction d'assemblages protéiques au niveau intracellulaire : ceci expliquerait pourquoi, alors que l'adhésion entre domaines extracellulaires même entiers est relativement faible, l'adhésion entre cellules est, elle, très résistante, efficace et versatile (répondant aux signaux locaux).

1.4 Les fragments utilisés : $EC1-2$ de E-cad

Les fragments que nous avons utilisés dans l'étude qui est présentée ici sont des fragments solubles de E-cad, la cadhérine que l'on retrouve au niveau des jonctions adhérentes des épithéliums. Ils comportent les deux sous-unités $EC1$ et $EC2$.

Ces fragments sont produits par ingénieurie bio-moléculaire par l'équipe d'H. Feracci, au sein de l'UMR 144 dirigé par J.-P. Thiery à l'Institut Curie. Ces protéines recombinantes ont la particularité de porter un petit hexapeptide d'histidine en lieu et place du site de liaison entre $EC2$ et $EC3$, que l'on appelle une "étiquette 6-His" (Fig. 1.11A).

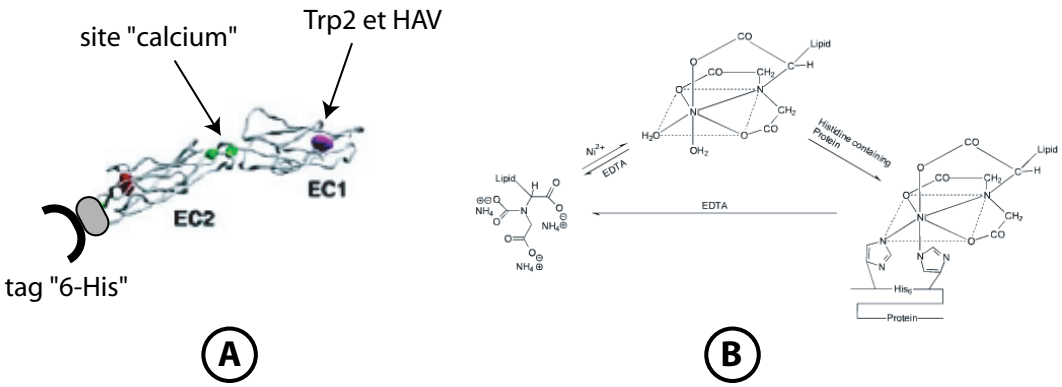

FIG. 1.11 – Fragments de E-cad utilisés dans cette étude : A, représentation (d'après [Boggon et al., 2002]) des fragments composés des deux domaines terminaux $EC1-2$, avec, indiqués, les tryptophane 2 (Trp2) et poche hydrophobe (HAV) sur $EC1$, le site de fixation du calcium conservé entre $EC1$ et $EC2$ et la localisation et orientation de l'étiquette histidine ; B, chélation par un groupement NTA(Ni) d'une protéine 6-His et compétiteurs (d'après Avanti Polar Lipids Inc.)

Fixation par chélation

Cette étiquette 6His reconnait les ions divalents, qu'il a la capacité de chélater, et en particulier le nickel. Il permet d'effectuer des séparations sur colonnes de billes porteuses de sites de chélation au nickel, en particulier de dérivés du groupement acide nitrilotriacétique (ou NTA) qui peuvent chélater un ion nickel en laissant libres deux sites qu'un donneur d'électrons peut occuper. Des compétiteurs de cette fixation sont l'imidazole, qui est une petite molécule qui a une structure proche du 6His, et qui peut déplacer l'équilibre de chélation vers le relargage, et l'EDTA (acide éthylènediaminetétracétique) qui lui peut "voler" l'ion nickel, de par sa ressemblance avec le NTA. Ceci est résumé sur la Fig. 1.11B. De plus la

fixation est sensible au pH (les groupements de chélation sont des acides carboxyliques).

L'introduction de cette étiquette 6His sur une position donnée d'une protéine est rendue possible de manière relativement contrôlée par les développements de la biologie moléculaire. Il suffit d'introduire un fragment d'ADN codant pour 6His à l'endroit désiré sur le plasmide codant pour la protéine et ce avant d'introduire le plasmide dans des bactéries ou cellules qui vont se charger de produire la protéine.

Le type de fixation par chélation d'ion, depuis qu'il a été proposé par Hochuli [Goldstein et al., 1990], a connu de nombreux développements, depuis l'utilisation sur colonnes de filtration pour purifier des protéines recombinantes ou sur billes pour les conserver (www.quiagen.com), en passant par la cristallisation à deux dimensions de protéines 6His (il permet alors d'orienter la protéine suivant l'endroit où elle se trouve le groupement) ou l'étude de monocouches de protéines à la surface eau/air [Schmitt et al., 1994, Martel, 2002], l'utilisation pour décorer des pointes d'AFM avec des cadhérines [du Roure, 2003] ou des surfaces de mica avec des bicouches portant des cadhérines en SFA [Sivasankar et al., 1999, Sivasankar et al., 2001, Zhu et al., 2003, Tareste, 2003b]. La chélation a été étudiée en termes de forces, par AFM [Kienberger et al., 2000, Lévy, 2002] ou SFA [Tareste, 2003b].

Dans notre cas, nous avons choisi d'utiliser le fait que le 6His est situé au bout du $EC2$ des fragments de la protéine, afin de (i) décorer des vésicules lipidiques géantes contenant des lipides chélatants commerciaux, appelés DOGS-NTA(Ni) (Avanti Polar Lipids Inc., Alabaster) et (ii) de les orienter majoritairement perpendiculairement à la surface de ces vésicules, afin de présenter le plus possible $EC1$ vers l'extérieur et de permettre aussi que des cadhérines parallèles construisent des interactions *cis*.

Protocole d'obtention des fragments solubles

Sur la Fig. 1.12 est présenté le protocole de construction des fragments de E-cad que nous avons utilisé au cours de cette étude. Plus de détails peuvent être trouvés dans [Perret et al., 2002a]. Tant que les fragments ne portent pas de sites de glycosylation, on peut utiliser comme "usines de production" des bactéries, le rendement étant alors relativement bon et les bactéries sont peu fragiles. Dès lors que l'on cherche à obtenir des protéines avec des sites de glycosylation, on est obligé de passer par la culture de cellules, seules capables de réaliser cette étape difficile : elles sont beaucoup plus fragiles et le rendement est beaucoup moins bon.

Résultats connus sur $EC1-2$

Plusieurs résultats sont déjà connus concernant le comportement adhésif et associatif de fragments du types $EC1-2$ de cadhérines, sur la E et la C-cad,

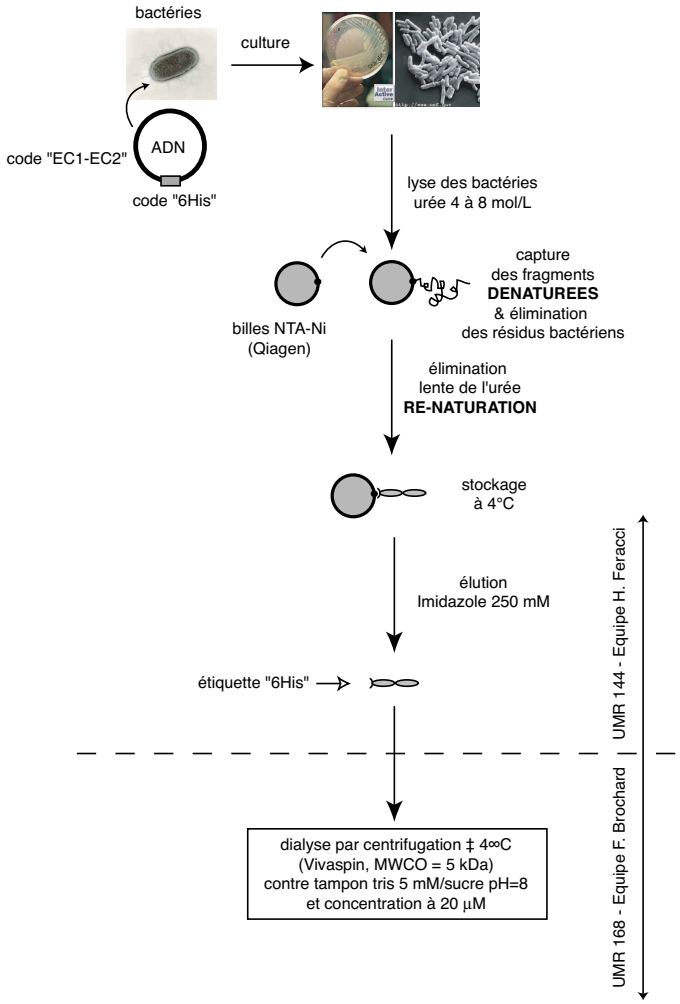

FIG. 1.12 – Obtention des fragments de cadhérines – Collaboration avec l'équipe d'H. Feracci, UMR 144/Institut Curie

provenant de divers groupes.

Tout d'abord, des études de cristallographie indiquent que des doublets *cis* peuvent se former, et des interactions *trans* ont aussi été vues [Shapiro et al., 1995]. Les mesures de force, en AFM ou en SFA, indiquent que les interactions entre molécules séparées de cadhérines [du Roure, 2003] ou entre doublets [Zhu et al., 2003] sont de très faible intensité (force de l'ordre de 10 à 20 pN entre deux molécules, énergies de l'ordre de kT entre doublets), et n'existent qu'en présence de calcium ($\sim$ 1 mM). Ceci est confirmé par la faible association vue par centrifugation analytique et la faible résistance en chambre à flux avec des cellules [Chappuis-Flament et al., 2001]. Des expériences en chambre à flux, avec des billes, à l'échelle de la molécule unique nous disent que l'interaction est brève

($\sim$ 1 sec) , calcium-dépendante, mais aussi qu'une mutation du tryptophane 2 en alanine (dite transformation W2A) diminue le caractère adhérent de ces protéines [Perret et al., 2002a].

Dans le cadre des études réalisées à l'UMR 168 sur ces fragments de cadhérines, deux approches ont été proposées : une étude sur molécules uniques (par AFM [du Roure, 2003], BioForce Probe [Merkel et al., 1999, Pierrat, 2003] et billes en chambre à flux [Perret et al., 2002a]) et une étude de comportements plus collectifs *in vivo* [Chu et al., 2003] ou avec des systèmes modèles. Cette dernière approche est celle qui a été suivie lors de cette thèse.

Nous avons voulu, en décorant des vésicules fluides avec ces fragments adhésifs, adresser le problème du comportement collectif de ces molécules qui peuvent diffuser à la surface des vésicules pour interagir latéralement pour former des doublets cis, ce qui doit en principe renforcer l'interaction générée par l'adhésion.

Notre système

Nous disposons d'une molécule-colle faible (que nous nommerons EC12), et aussi d'un mutant non-adhérent (que nous nommerons par la suite W2A), avec une étiquette 6His à la même position, cette colle étant calcium dépendante. Nous utiliserons le 6-His pour fixer, via des lipides chélatant un ion nickel, les protéines à la surface de nos vésicules géantes. Les études antérieures au laboratoire Physico-Chimie Curie ont porté sur l'interaction entre deux fragments de cadhérines. Notre but est ici d'étudier les effets coopératifs où de nombreuses protéines attachées à des membranes lipidiques viennent diffuser pour construire des contacts adhésifs.

Chapitre 2

Propriétés des vésicules géantes

Dans un premier temps, nous effectuerons un bref rappel sur la structure chimique des lipides, et comment leur structure amphiphile leur permet de s'auto-assembler en structures complexes (bicouches et vésicules). Nous décrirons ensuite les propriétés statiques des membranes fluides à l'échelle mésoscopique et quelques unes de leurs propriétés dynamique (diffusion à l'intérieur des feuillets et entre les feuillets, fluctuations thermiques,...). Nous essayerons toujours de mettre en avant comment les idées théoriques évoquées servent de guide au regard de l'expérimentateur posé sur l'oculaire de son microscope. Nous présenterons enfin les différentes forces et énergies en jeu dans les interactions adhésives entre bicouches, en partant des interactions "non spécifiques" (van der Waals, électrostatiques, stériques,...) jusqu'aux interactions "spécifiques" (ou clef/serrure) caractéristiques des processus d'adhésion cellulaire.

2.1 Auto-organisation et propriétés moléculaires

Les lipides sont des molécules qui illustrent bien l'intime connexion entre structure chimique et propriétés physiques. Partant d'une description moléculaire d'un lipide, nous allons montrer comment celle-ci conditionne leur comportement collectif.

2.1.1 Structure des molécules amphiphiles

Suivant sa capacité à solvater des espèces chargées (présence de liaisons H,...), un solvant peut-être classé comme polaire (les solvatant bien, comme l'eau) ou apolaire (les solvatant mal, comme les alcanes). Un composé chimique donné peut alors se solubiliser préférentiellement dans l'un ou l'autre type de solvant, et ce suivant sa struture chimique.

Cependant, une catégorie de molécules possède l'étonnante capacité d'être soluble dans les deux types de solvants car leur structure est telle qu'une par-

tie de la molécule va préférer les solvants polaires tandis que l'autre va plutôt rechercher les solvants apolaires[1]. On les nomme *amphiphiles* (littéralement, *qui aiment les deux* – pour une description très complète, voir [Israelachvili, 1992]). Ces molécules ont des propriétés dites "tensioactives" car elles se précipitent aux interfaces eau/air ou eau/huile pour satisfaire leurs propriétés antagonistes. Citons les tensioactifs anioniques, cationiques ou non ioniques (copolimères blocs) et les lipides qui s'organisent en feuillet.

Les phospholipides sont des amphiphiles

Il existe trois types principaux de lipides dans les membranes cellulaires : les glycérolipides, les glycolipides et les stérols. Pour une revue de la composition de ces membranes et sur la description des différentes familles de lipides, le lecteur pourra se reporter à [Lipowski and Sackmann, Alberts et al., 2002].

Les glycérolipides, qui sont les plus présents dans les membranes biologiques, sont composés *grosso modo* de trois "segments" chimiques. Au centre de la structure se trouve un noyau glycérol dont deux fonctions alcool sont estérifiées par deux acides gras constituant les chaînes ou queues hydrophobes (pouvant être saturées ou non), la troisième étant associée à un groupement polaire (la tête hydrophile de la molécule) généralement via un acide phosphorique. Un tel lipide est alors appelé un *phospholipide*. Le groupement polaire peut être globalement neutre (une choline), négativement chargé (une sérine, une éthanolamine) ou porter un groupe fonctionnel (une biotine, un polymère hydrosoluble, une cage de chélation) dans le cas des phospholipides synthétiques.

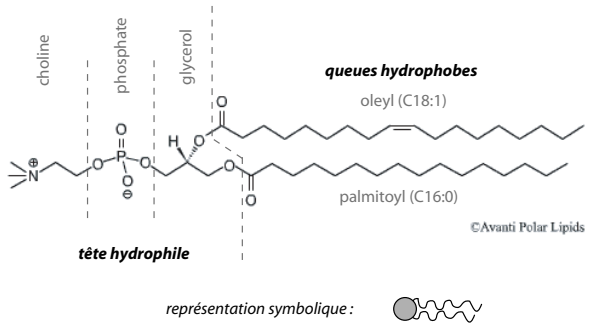

FIG. 2.1 – Un phospholipide, le POPC ou 1-Palmitoyl-2-Oleoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphocholine ou 16 :0–18 :1 PC. Sa structure, composée d'une tête hydrophile et de deux queux hydrophobes, résultant en une forme globalement cylindrique, est présentée ici, ainsi que sa représentation schématique (qui sera utilisée par la suite).

Sur la Fig. 2.1 est représenté un phospholide (le 1-Palmitoyl-2-Oleoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphocholine) et (outre sa composition chimique) sont mis en lumière

[1]Ces molécules sont frustrées car une partie de la molécule va aimer l'eau (partie hydrophile) et que l'autre va la fuir (partie hydrophobe), et donc se précipitent aux interfaces air/eau ou huile/eau.

sa "tête" hydrophile et ses "queues" hydrophobes. La nomenclature classique est donnée dans la légende (nom chimique ainsi que la notation Cn :m, avec n nombre de carbones et m position de l'insaturation sur les chaînes, et PC pour phosphatidyl-choline, nom de la tête polaire). Nous n'utiliserons quasiment jamais le nom chimique de la molécule : la plupart des personnes travaillant avec ces composés utilisent leur nom abrégé (POPC) où les deux premières lettres donnent la longueur des chaînes et leur saturation (palmitoyl = 16 :0, oleyl = 18 :1) et les deux dernières le type de tête relié au noyau glycérol.

2.1.2 Auto-organisation des lipides

Très clairement, à l'énoncé d'une telle structure chimique, on pressent que ces molécules vont avoir tendance, si on les dissout dans de l'eau, à s'agréger afin de cacher leur partie hydrophobe en créant des zones d'où l'eau sera exclue.

En fait, cette agrégation ne commence que lorsque suffisamment de molécules sont présentes en solution, à partir d'une certaine concentration que l'on appelle la concentration micellaire critique (ou CMC). La CMC dépend bien sûr de l'importance relative des parties hydrophile et hydrophobe de la molécule (en anglais : *hydrophilic lipophilic balance* ou HLB). Pour les phospholipides possédant deux chaînes grasses tels que ceux utilisés dans ce travail, cette concentration est excessivement faible (de l'ordre de 10^{-10} M, [Israelachvili, 1992]). Les lipides sont donc essentiellement insolubles dans l'eau.

Dans une solution aqueuse, les molécules de lipide vont s'agréger en structures plus ou moins complexes dépendant de leur structure chimique, de leur concentration, de la température,... Dans le cas des phospholipides, la structure préférée est la bicouche (voir Fig.2.2A) car la forme globale des molécules est cylindrique (les queues et la tête polaire occupent une aire moyenne de 60Å^2). L'épaisseur d'une bicouche est de l'ordre de 5 à 6 nm.

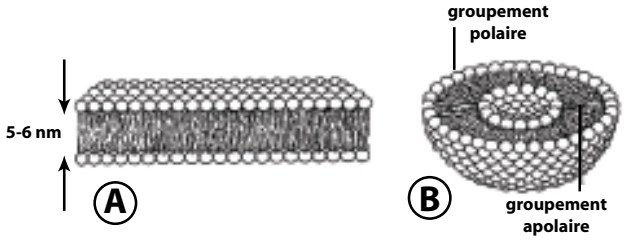

FIG. 2.2 – Les molécules de phospholipides s'auto-organisent afin de cacher leur partie apolaire à l'eau : A : bicouche plane ; B : bicouche fermée ou vésicule.

La structure de la bicouche varie en fonction de la température : c'est l'analogue de ce qui se passe avec les cristaux liquides lyotropes et leurs transitions de phase. En dessous d'une température dite de fusion des chaînes (T_m), l'ordre orientationnel des molécules est très important, et on a affaire à une phase dite "gel". Au dessus de cette température critique, les molécules sont désorganisées

dans la bicouche, et l'on parle de phase fluide (la bicouche est un fluide 2D). Au voisinage de T_m, on peut voir d'autres phases dites "ridées" (voir par exemple [Lipowski and Sackmann]). T_m varie beaucoup en fonction du type de chaînes hydrocarbonées : dès que l'on introduit une source de désordre de l'agencement moléculaire (par exemple une liaison double qui plie la chaîne, un groupement latéral,... tout ce qui diminue les possibilités de structuration des interactions hydrophobes entre chaînes) diminue cette température. Le type de tête polaire joue un rôle moins marqué sur T_m. Pour la plupart des lipides que nous avons utilisés (et qui généralement portent deux chaînes non saturées), la température de fusion des chaînes est inférieure à 0°C, et les bicouches sont fluides à température ambiante (à laquelle nos expériences sont menées).

Entre la phase gel et la phase fluide, les propriétés mécaniques sont différentes. Nous reviendrons sur ce point plus tard. Au niveau moléculaire, la différence la plus marquée est la forte augmentation du coefficient de diffusion d'un lipide au sein de la bicouche quand on dépasse T_m : dans la phase gel, il est de l'ordre de 10^{-8} à 10^{-5} μm^2/s, et il devient de l'ordre de 1 à 10 μm^2/s dans la phase fluide. Il y a "gel" des mouvements moléculaires en-deça de T_m.

Les bords de la bicouche sont instables (ils exposent le cœur hydrophobe du feuillet) et ont tendance à se refermer pour former un petit "sac" qui sépare un milieu intérieur (ou lumen) du milieu extérieur : c'est une vésicule (représentée en coupe sur la Fig. 2.2B). Comme nous l'avons déjà mentionné, plusieurs ordres de grandeur de taille sont possibles pour ces objets, allant de 50 nm à 100 μm de diamètre.

Ces objets auto-assemblés sont constitués d'un grand nombre de lipides : par exemple, pour une vésicule géante de 20 μm de diamètre, il y en a typiquement 2×10^9. On peut donc décrire la bicouche d'une telle vésicule de façon mésoscopique, c'est-à-dire de manière continue. Sa taille (quelques dizaines de μm) est très supérieure à l'épaisseur de la bicouche et à la taille des molécules. Ceci nous permet alors de la considérer comme un objet bidimensionnel, et d'utiliser les résultats de la physique des films minces.

2.2 Description mésoscopique d'une bicouche

Dans cette partie, nous allons très brièvement introduire une description continue de la bicouche constitutive des vésicules géantes, en particulier les paramètres permettant de décrire ses propriétés mécaniques, ainsi que d'établir les formes d'équilibres d'un tel système. Une description plus complète peut être trouvée dans [Lipowski and Sackmann].

Modes de déformation

Une bicouche lipidique est un objet élastique bidimensionnel. Elle peut être déformée de trois manières différentes : on peut l'étirer ou la compresser (en changeant son épaisseur), on peut la courber (en comprimant le feuillet "intérieur" et en étirant le feuillet "extérieur") ou bien la cisailler dans son plan. En fait, quelle que soit la contrainte à laquelle on soumet une telle "feuille", elle peut être décrite comme une combinaison de ces trois déformations élémentaires. Comme nous ne nous intéressons qu'aux bicouches fluides, on peut déjà négliger les contributions à l'énergie du système venant du cisaillement : les molécules pouvant se mouvoir dans le plan sans résistance, cela ne coûte pas d'énergie à la bicouche. Les deux autres types de contraintes, illustrées sur la Fig. 2.3, contribuent à l'énergie de la bicouche en fonction de son changement relatif de surface.

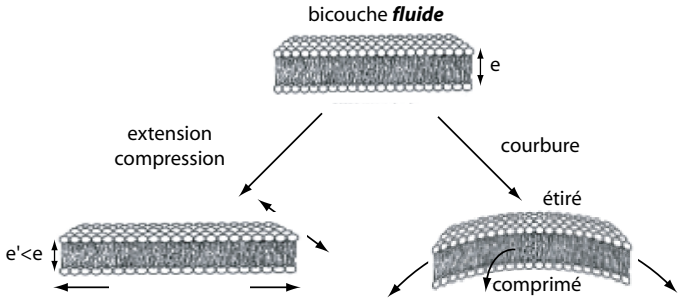

FIG. 2.3 – Modes de déformation d'une bicouche fluide : *extension* (ou compression) isotrope, associée au module χ et donc à la tension σ de la vésicule ; *courbure*, associée au module κ.

Energie libre d'une membrane fluide

Les composantes à l'énergie $\mathcal{F}$ (par unité de surface, pour une bicouche fluide supposée sans tension) correspondantes peuvent être exprimées, dans une première approche simplifiée, comme :

$$F_{\text{extension}} = \frac{1}{2}\chi\left(\frac{\Delta A}{A}\right)^2$$
$$F_{\text{courbure}} = \frac{1}{2}\left(\kappa(c-c_0)^2 + 2\kappa_G c_1 c_2\right)$$

où $\dfrac{\Delta A}{A} = \dfrac{A - A_0}{A}$ est la variation d'aire relative de la membrane lors de sa déformation à partir d'une aire initiale A_0. χ est le module de compressibilité de la bicouche (en fait cette partie de l'énergie n'est qu'une ré-écriture de la loi de Hooke), κ et κ_G sont les modules de courbure et de courbure gaussienne respectivement. On définit localement deux rayons de courbure R_1 et R_2 (et donc les courbures c_1 et c_2 correspondantes sont leurs inverses) : $c = c_1 + c_2$ est la courbure principale et $c_1 c_2$ la courbure gaussienne. c_0 est la courbure spontanée liée à la géométrie des molécules.

Une vésicule géante, sous l'objectif du microscope, se présente généralement comme une sphère. Lorsque l'on regarde un échantillon, on voit que, même si cette forme est majoritaire, il existe toute une zoologie de formes plus ou moins rares : on peut les décrire en minimisant $\mathcal{F}$. Si l'on se cantonne à des vésicules quasi-sphériques, un théorème de topologie (connu sous le nom de "de Gauss-Bonnet") permet d'éliminer, lors de l'intégration sur toute la surface de la vésicule, le terme de courbure gaussien.

On peut définir une tension de membrane σ comme étant $\partial\mathcal{F}/\partial A$. Les lipides sont insolubles (leur CMC est très faible) : ils minimisent leur surface par tête polaire ($\partial\mathcal{F}/\partial A = 0$), à l'équilibre, σ est donc nulle.

Fluctuations de la membrane

De part leur faible module élastique de courbure κ, les vésicules géantes sont *a priori* des objets très mous, et donc excessivement déformables. Ceci dépend néanmoins du rapport entre leur aire et leur volume. Une vésicule géante présente des fluctuations à toutes les échelles de taille (Fig. 2.4), certaines pouvant être observées en microscopie optique (Fig. 2.5A).

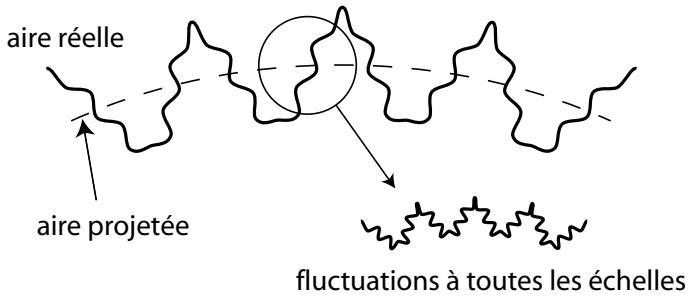

FIG. 2.4 – Différence entre l'aire réelle de la membrane, qui prend en compte ses fluctations à toutes les échelles, et l'aire projetée, accessible à l'observateur.

La bicouche se conduit comme une membrane semi-perméable, laissant passer les petites molécules comme l'eau mais pas les gros solutés comme les sucres ou les solutés chargés comme les ions. Suivant les pressions osmotiques de part et d'autre de la membrane, l'état de gonflement de la vésicule (et donc son état de tension) varie.

Lorsqu'une vésicule géante est à l'équilibre osmotique (les lipides étant insolubles, ils tendent à minimiser leur aire par tête polaire) ou bien lorsqu'elle a été dégonflée (on l'a par exemple plongée dans un milieu hyper-osmotique), elle est alors parcourue par d'intenses fluctuations (voir Fig. 2.5A) dont l'origine thermique a été démontrée sur le globule rouge [Brochard and Lennon, 1975] : le choc incessant des molécules d'eau de chaque côté de la paroi crée ce mouvement

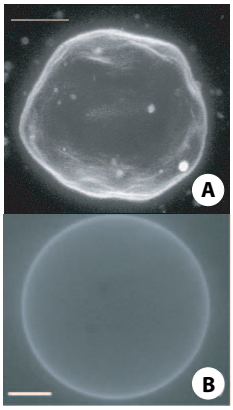

FIG. 2.5 – Fluctuations et état de tension de vésicules géantes "sous l'objectif du microscope de fluorescence" – A : vésicule molle : projection de différents plans de la même vésicule, montrant de larges fluctuations thermiques qui la froissent sur plusieurs échelles (image tirée de [Sandre, 2000]). On dit généralement que sa tension est (quasi)nulle. Les fluctuations de la membrane sont à l'origine de l'introduction de la force de répulsion entropique dite "d'Helfrich" ; B : vésicule tendue : forme très sphérique – Les barres représentent environ 10 μm

de battements. Ces fluctuations sont à l'origine de la répulsion de Helfrich, dont nous verrons une description dans les paragraphes suivants.

Lorsque le milieu interne est hyper-osmolaire par rapport au milieu extérieur (c'est-à-dire plus concentré en solutés non perméants que le milieu extérieur), de l'eau rentre dans la vésicule afin d'équilibrer les pressions osmotiques de part et d'autre de la membrane : la vésicule "gonfle" et sa forme est très sphérique (voir Fig. 2.5B). De même, une vésicule qui a subi un fort stress mécanique est tendue (elle peut avoir perdu une partie de ses lipides sous forme de petites vésicules). Ces vésicules sont très fragiles, explosant à la moindre mise sous contrainte.

Tension de la membrane [Helfrich and Servuss, 1984]

Les fluctuations de la membrane (considérée comme un carré d'aire A) peuvent être décrites par ses déplacements verticaux $u(\vec{r}) = z(x, y)$ autour d'un plan (x, y) moyen. On ne considère que les contributions venant de la composante de courbure à l'énergie libre de la membrane.

Si l'on suppose que les fluctuations ne sont pas de grande amplitude, alors on peut écrire que la pente de leur profil varie peu (soit $| \bigtriangledown u| \ll 1$). On peut alors décomposer les ondulations en modes suivant

$$u(\vec{r}) = \sum_{\vec{q}} u_{\vec{q}} \exp(i\vec{q} \cdot \vec{r})$$

avec des conditions périodiques au bord de la membrane.

On obtient ainsi l'énergie élastique associée aux modes $\vec{q}$ et $-\vec{q}$

$$A\kappa q^4 |u_{\vec{q}}|^2$$

On est amené à différencier une *aire réelle* de la membrane (que l'on suppose constante car le nombre de lipides ne varie pas), qui tient compte des fluctuations, et une *aire projetée* (notée A_p). La différence entre ces deux aires, notée $(\Delta A)_{\vec{q}}$,

est exprimable, pour les modes $\pm\vec{q}$ comme

$$(\Delta A)_{\vec{q}} = Aq^2|u_{\vec{q}}|^2$$

ce qui, en présence d'une tension de membrane σ, faible mais non nulle, conduit à un coût énergétique

$$\sigma(\Delta A)_{\vec{q}}$$

A partir du théorème d'équipartition, on extrait l'amplitude moyenne des modes de fluctuations (chaque paire de modes $\pm\vec{q}$ coûtant kT en énergie de déformation de la membrane). On arrive à

$$< |u_{\vec{q}}|^2 >= \frac{kT}{A(\kappa q^4 + \sigma q^2)}$$

On remplace la sommation discrète par une intégrale, pour calculer la différence d'aire totale, ΔA. On peut alors exprimer la variation d'aire relative de la membrane, $\Delta A/A$, lorsqu'elle est mise sous la tension σ :

$$\frac{\Delta A}{A} \simeq \frac{|\nabla u|^2}{2} = \frac{kT}{8\pi\kappa} \ln\left(\frac{a^2}{\pi^2\kappa}\sigma\right) + \frac{\sigma}{\chi}$$

où a est la distance entre deux molécules de lipide dans la bicouche ($\sim$ 5 Å). Deux régimes sont alors prédits et observés par les techniques de micropipettes [Evans, 1991] : aux faibles tensions, on observe une variation exponentielle de la tension mesurée en fonction de la variation d'aire, dit régime de dépliement des fluctations, alors qu'aux fortes tensions on sonde un régime linéaire, dit régime élastique. On peut ainsi décrire l'élasticité sur quatre ordres de grandeur de tension, de $10^{-7;-6}$ à $10^{-3;-2}$ N/m.

Néanmoins on note que l'observation des deux aires, projetée et réelle (et donc quelque part leur définition) dépend de l'échelle à laquelle on regarde la membrane : récemment une unification des deux régimes en un seul régime de dépliement des fluctuations, fonction de l'échelle des fluctuations dépliées, a été proposé pour décrire les expériences de micropipettes [Fournier et al., 2001].

La tension d'une membrane dans le cas de la vésicule géante est donc un paramètre délicat à définir théoriquement et à mesurer expérimentalement.

Modules élastiques et tension de lyse

Les valeurs typiques des modules de courbure et d'extension pour une bicouche lipidique fluide sont $\kappa \sim 10 - 20$ kT (soit $\sim 10^{-20}$ J à la température ambiante) et $\chi \sim 100 - 700$ mJ/m^2. Le module élastique d'une bicouche en phase gel est plus grand que la valeur présentée pour la bicouche fluide : une vésicule en phase gel est donc mécaniquement plus résistante qu'une vésicule fluide.

Pour ce qui est de la tension, comme nous le verrons par la suite, généralement, sa valeur est plus délicate à estimer...

Des mesures d'aspiration de vésicules géantes ont permi de remonter à la tension à laquelle une membrane fluide se rompt [Rawicz and Evans, 1990]. Cette tension de rupture σ_R est ~ 3 mN/m, ce qui permet, connaissant χ, d'estimer la dilatation maximale d'aire que peut supporter une membrane avant de se rompre, soit aux alentours de 5% de son aire initiale. La membrane est donc un fluide bidimensionnel presque incompressible et dont la cohésion est très forte.

Formes de vésicules à l'équilibre

Afin de déterminer les formes que les vésicules peuvent prendre à l'équilibre, on minimise l'énergie de courbure qui leur est associée. On prend, comme hypothèses, une vésicule dont la bicouche est symétrique en nombre de lipides, dont les deux feuillets se déforme de la même manière et qui est de forme globalement sphérique. Son aire A et son volume V sont supposés constants (voir les revues par U. Seifert *et al.* dans [Luisi and Walde, 2000, Lipowski and Sackmann]). Un paramètre unique est alors suffisant pour décrire les différentes formes : le volume réduit de la vésicule, $\nu = 3V/(4\pi \times (A/4\pi)^{3/2})$. Il caractérise l'état de gonflement de la vésicule : plus sa valeur est grande, plus la vésicule est gonflée. Elle peut alors prendre des formes allongées dont certaines ressemblent aux globules rouges (Fig. 2.6A).

Ce modèle ne permet pas de décrire les formes dont la courbure varie fortement et qui sont observées dans certains échantillons, comme par exemple l'"étoile de mer" [Wintz et al., 1996]. Il faut alors ajouter au modèle précédent le fait que les deux feuillets de la bicouche ne contiennent pas exactement le même nombre de lipides (le feuillet "extérieur" en contient plus) et qu'ils ne sont pas exactement dans le même état de déformation quand on courbe la membrane (le feuillet "extérieur" est étiré alors que le feuillet "intérieur" est comprimé, voir Fig. 2.3). On obtient alors un modèle dit *ADE* (pour *Area Difference Elasticity*) dans lequel les différentes contributions à l'énergie deviennent un peu plus complexes à écrire (voir [Mui et al., 1995]). Les formes accessibles se décrivent alors avec deux paramètres, le volume réduit de la vésicule ν et la différence d'aire effective entre les deux feuillets Δa_0 (voir Fig. 2.6B). Ainsi on accède à l'ensemble des formes observées.

Pour nous, désormais, une vésicule sera toujours un objet presque sphérique, que l'on qualifiera de "mou" ou de "tendu" suivant son état de tension, lequel est directement observable au microscope.

2.3 Interactions entre bicouches

Les vésicules géantes sont des objets mous, qui sont souvent considérés comme des modèles simplifiés des cellules, et ce malgrè l'absence de deux "entités" extrêmement importantes : (i) le cytosquelette sous-tendant la membrane cel-

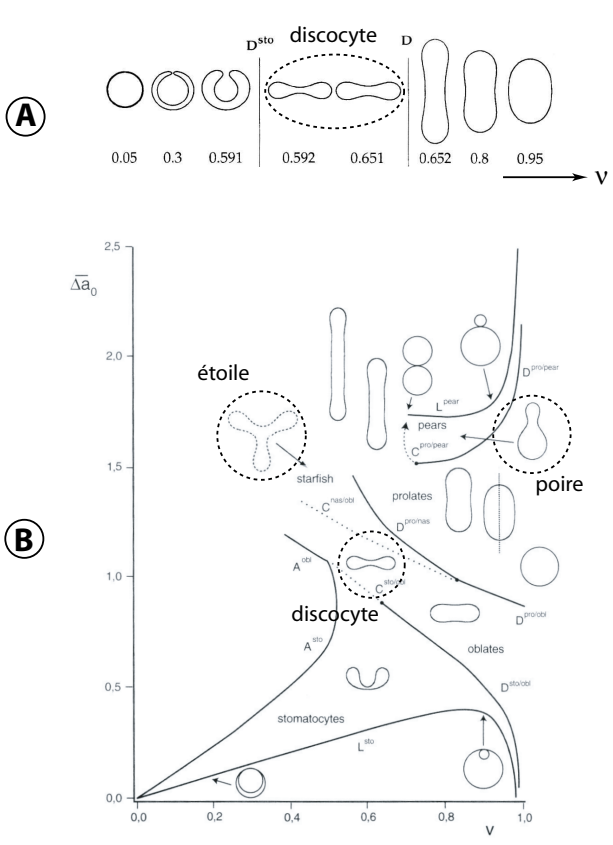

FIG. 2.6 – Diagrammes de phase des formes accessibles à une vésicule – A : si l'on considère que les deux feuillets ont le même nombre de lipides, le diagramme est à une dimension, en fonction du volume réduit ν (d'après [Seifert et al., 1991]) : certaines formes, appelées discocytes, ne sont pas sans rappeler la forme d'un globule rouge ; B : si l'on prend en compte l'asymétrie à la fois de composition et de déformation des deux feuillets, les formes (rares, mais observables) de poire (*pear*) et d'étoile de mer (*starfish*) peuvent être décrites et le diagramme devient bidimensionnel, fonction à la fois du volume réduit ν et de la différence d'aire entre les deux feuillets de la bicouche Δa_0 (d'après [Mui et al., 1995]).

lulaire et (ii) l'ensemble des cascades internes de signalisation et de rétroaction qui régulent l'aspect "actif" des comportements cellulaires, en réponse aux stimuli extérieurs.

Récemment, des efforts significatifs ont été portés sur l'introduction d'éléments biologiques dans ces systèmes modèles afin d'essayer de se rapprocher un peu plus des comportements du vivant. Par exemple, on peut citer les travaux du groupe de P. Bassereau (UMR 168 Institut Curie) sur l'inclusion de protéines actives (pompes ioniques) dans des vésicules géantes. Le groupe de E. Sackmann (E22, Univ. de Munich) a travaillé sur la décoration de tels objets, à l'aide de groupes d'acides aminés ou de protéines d'adhésion, afin d'étudier la statique et la dynamique des phénomènes d'adhésion engendrés.

Dans cette partie, nous allons décrire rapidement les différentes interactions pouvant exister lorsque deux bicouches (ou une bicouche et une surface autre) sont en regard, par exemple lorsque l'on cherche à utiliser ces bicouches comme systèmes modèles pour l'adhésion cellulaire. On peut les classer en deux sous-groupes, qui sont décrits ci-après.

Dans un premier temps, nous présenterons les interactions que l'on appelle

génériques ou non spécifiques qui regroupent les interactions attractives et répulsives classiques du monde des colloïdes : les interactions de van der Waals, électrostatiques, de déplétion (attractives), d'hydratation, et de gène stérique (répulsives). Nous introduirons un autre type d'interactions répulsives particulier aux vésicules géantes, les interactions de Helfrich, dues aux fluctuations de la membrane.

Dans un second temps, nous introduirons un nouveau type d'interaction venant de la possibilité de décorer la surface des vésicules avec des protéines (ou des fragments de protéines) d'adhésion biologique ou, plus généralement, avec des molécules "complémentaires". Ces interactions attractives sont dites *clef-serrure ou spécifiques* et sont la principale différence entre l'agrégation colloïdale (due aux interactions génériques) et l'adhésion cellulaire. Développées par les cellules, elles entraînent que l'adhésion cellulaire résulte d'un équilibre délicat, mettant en jeu des interactions à reconnaissance élevée entre une clef et une serrure moléculaires, et les interactions génériques (en particulier la répulsion stérique).

Nous essayerons ici de mettre en avant la portée moyenne de ces interactions et préciserons ce qu'il en est pour les systèmes qui nous intéressent ici. La plupart des informations ici résumées sont extraites de [Israelachvili, 1992].

2.3.1 Interactions non spécifiques

Deux types d'interactions, attractives ou répulsives peuvent avoir lieu entre objets (ici, des bicouches) immergées dans une solution aqueuse.

2.3.1.a Attractions non spécifiques

Elles vont avoir tendance à approcher les deux bicouches et/ou à les maintenir fixées l'une à l'autre.

Ces forces sont induites par la présence de dipôles cherchant à s'aligner pour minimiser leur énergie électrostatique, par la présence de charges complémentaires cherchant à se compenser ou par l'exclusion de petites molécules de l'espace inter-objet. On les a classées, autant que faire se peut, par portée croissante.

van der Waals Cette force apparaît quel que soit l'état de charge des deux bicouches. D'origine moléculaire et dipolaire, elle est toujours attractive entre objets de même nature chimique. Au vu de leur épaisseur, comparée à leur extension, les bicouches seront considérées comme des surfaces planes et non des matériaux massifs (la courbure de la membrane d'une vésicule est négligeable quand on regarde la zone d'interaction avec une autre membrane de très près). L'énergie (par unité de surface) d'interaction dipolaire entre deux bicouches libres est décrite par un potentiel qui dépend du rapport entre la distance les séparant, d, et leur épaisseur, e. Pour des distances d grandes devant e, il s'écrit $V_{\mathrm{vdW}}(d) \simeq -Ae^2/d^4$. A est la constante de Hamaker de la bicouche, reliée aux polarisabilités des différents partenaires (eau, lipides). Sa valeur est de $5{,}6\times10^{-21}$ J pour le lipide DOPC

[Moreaux et al., 1982]. Lorsque l'on trace ce potentiel, on s'aperçoit que sa portée est de l'ordre de 3 nm : au-delà de cette distance, son influence est faible.

Electrostatique Nous ne décrirons pas ici l'attraction entre surfaces chargées de signe opposé, car les systèmes que nous avons utilisés et qui seront décrits par la suite ne présentent pas de dissymétrie de charge : les surfaces mises en interactions seront très souvent exactement de même nature ou du moins auront des charges de même signe.

Cependant, il faut souligner ici un effet très proche d'une attraction électrostatique, dû aux ions divalents, en particulier le calcium (comme nous le verrons lors des expériences avec les fragments de cadhérine, nous serons forcés d'introduire dans le système du calcium afin d' "activer" ces protéines). Ce dernier joue un rôle de première importance dans la nature : il contrôle, par exemple, la conformation de certaines protéines (dont les cadhérines) et régule leur fonction. De plus, il peut interagir avec des bicouches d'une manière encore assez mal comprise : il peut s'adsorber sur les têtes des lipides et provoquer de l'adhésion (par pontage ?), parfois de l'(hémi)fusion ou des séparations de phases dans des mélanges de lipides. Ces effets ressemblent à une interaction électrostatique relativement forte entre lipides portant des charges de signe opposé [Sandre, 2000].

Déplétion Les vésicules géantes, peuvent se mettre à coller si elles sont plongées dans une solution contenant des macromolécules de poids moléculaire suffisamment grand (PEG, dextran,...) et ayant des interactions répulsives avec la membrane. Les chaînes de polymères sont exclues des zones entre vésicules, et la pression osmotique tend à coller les vésicules. Cette interaction de déplétion est fonction du type de macromolécule, de sa taille et de sa concentration. Elle est généralement réversible, mais des complications peuvent apparaître dans le cas des bicouches (hémifusion [Evans and Needham, 1988]).

2.3.1.b Forces répulsives

Les interactions, répulsives, vont avoir tendance à maintenir éloignées deux bicouches.

Quatre types d'interactions répulsives vont être décrites ici : (i) des interactions dites "à courte portée", (ii) des interactions électrostatiques, dues au fait que les compositions des bicouches en regard sont identiques et donc portent la même charge de surface, (iii) des interactions stériques lorsque les bicouches sont porteuses d'une chevelure polymérique et (iv) des interactions aussi stériques mais plus caractéristiques des bicouches, dues au fait que les bicouches ne sont pas des assemblages statiques de molécules (leur épaisseur peut fluctuer, ainsi que leur position dans l'espace, comme nous l'avons vu). De même que précédemment, on les a classées par portée croissante.

Interactions "de coeur dur" Lorsque la distance entre membranes tend vers zéro, il y a une répulsion stérique très forte. Elle est due à la répulsion des nuages électroniques des molécules à la surface.

Interactions "à courte portée" Cette répulsion peut avoir une intensité supérieure aux forces de la théorie DLVO (van der Waals + répulsion électrostatique), mais sa portée est excessivement faible. Elle est empiriquement décrite par un potentiel exponentiel avec une longueur de coupure de l'ordre du nm.

De plus, l'organisation des molécules d'eau au voisinage des têtes polaires des lipides (structuration en cages de solvatation par des liaisons H) entraine un coût énergétique important si l'on veut rapprocher les têtes de lipides au contact, c'est-à-dire en les déshydratant.

Néammoins cette origine que l'on peut qualifier "d'hydratation" est controversée, et on donne parfois à ces interactions à courte portée une origine dite "de fluctuation" des lipides : cette interaction serait alors d'origine stérique. L'épaisseur des bicouches peut osciller à cause de la saillie de lipides sous agitation thermique (mouvements hors du plan de la membrane). Ces modes dits "péristaltiques" conduisent à une répulsion de très courte portée, qui correspond à l'amplitude de sortie d'une tête de lipide hors de l'environnement "amical" des autres têtes hydrophiles, soit moins d'un nm.

Electrostatique Cette répulsion est aussi dite "de double couche". Au voisinage d'une surface chargée, les ions d'une solution électrolytique ne se comportent pas de la même manière suivant leur charge. Ils se structurent "en couches" afin de respecter une neutralité globale du système, dont l'organisation est de plus en plus lâche à mesure que l'on s'éloigne de la surface chargée. Il faut donc comprendre ces interactions comme étant de type osmotique entre les atmosphères ioniques entourant deux surfaces au voisinage l'une de l'autre. A partir des théories électrochimiques de Gouy-Chapmann et des équations de l'électrostatique, on peut calculer la distribution des ions dans ces couches et remonter au potentiel effectif ressenti ψ du fait de la présence de la surface chargée (de potentiel ψ_0), dont la charge est partiellement contrecarrée par la présence d'ions, à une distance x donnée de la surface. Pour de faibles potentiels de surface (c'est-à-dire des densités de charges de surface pas trop élevées), on aboutit à l'approximation de Debye-Hückel : $\psi(x) = \psi_0 \exp(-\kappa x)$.

Cette variation exponentielle de l'influence des charges de surface s'effectue avec une portée caractéristique κ^{-1} appelée longueur de Debye, qui dépend de la force ionique solution, I ($\kappa^2 = I/(\varepsilon_0 \varepsilon_r \mathrm{kT})$, avec $I = \Sigma_i z_i^2 e^2 c_i$). Plus il y a d'ions, et plus leur valence est élevée, plus cette portée diminue : dans le cas de l'eau pure, on a une concentration résiduelle en ions (monovalents) de l'ordre de 10^{-5} M, donc un κ^{-1} de l'ordre de 100 nm ; dans une solution de type physiologique (PBS, 150 mM NaCl), κ^{-1} est inférieur à 1 nm. Entre deux surfaces distantes de

d, le potentiel d'interaction est de la forme $V_{\rm el} = 2\sigma^2 \exp(-\kappa d)/(\kappa\varepsilon_0\varepsilon_r)$, où σ est la densité surfacique de charges.

Dans les solutions sucre/ Tris (c = 5 mM pH=8) que nous avons utilisées avec les cadhérines, la longueur de Debye peut être évaluée en reprenant les approximations développées dans [Tareste, 2003b] : le Tris se comporte comme un électrolyte monovalent de concentration $c/2$. En reprenant les formules classiques pour ces électrolytes, on obtient $\kappa^{-1} \sim 6$ nm. Dans notre cas, il faudrait en toute rigueur prendre aussi en compte la présence d'un sel divalent dans les expériences d'adhésion entre cadhérines, le $CaCl_2$: son effet est de diminuer la longueur de Debye. Il est présent à des concentrations de l'ordre du mM, donc voisines de celles du Tris. De plus, comme nous le verrons par la suite, le calcium se fixe *dans* la protéine : l'effet résultant sur les interactions électrostatiques n'est donc pas vraiment aisé à décrire. On se cantonnera donc à dire que dans nos expériences $\kappa^{-1} \leq 6$ nm.

Une membrane est rarement neutre : de par l'ionisation des têtes des lipides ou la présence d'impuretés, elle possède une charge de surface, même si elle est composée de lipides globalement neutres, comme le DOPC (zwiterrionique) [Pincet et al., 1999]. A ce stade, on estime souvent que pour ce lipide, qui est notre lipide diluant, on a présence d'une charge négative au plus pour quelques milliers de lipides.

Dans nos expériences d'adhésion, la charge *de la membrane* sera majoritairement due aux lipides chélatants [2] , ou aux lipides biotinylés [3]. Pour ce qui est des lipides chélatants, deux facteurs supplémentaires compliquent la détermination de la charge de surface des membranes : d'après [Tareste, 2003b], on sait que tous les lipides chélatants ne possèdent pas d'ion nickel ; de plus, à cause des différents équilibres de chélation mis en jeu, on ne sait pas combien de protéines sont fixées par rapport au nombre de sites disponibles. Enfin, on peut avoir présence d'ions nickel résiduels en solution : le "chargement des lipides" s'effectue en présence d'un grand excès d'ions. La quantification de ces interactions de systèmes "sandwitchs" en détail est très complexe et ne se sera pas effectuée ici.

Répulsion stérique Cette technique de protection consiste à décorer les surfaces avec des chaînes de polymères. Elle est inspirée de la présence du glycocalyx à la surface des cellules, véritable forêt de sucres et autres molécules glycosylées, qui crée une barrière stérique aux intéractions non spécifiques. Elle a été très largement utilisée en science des colloïdes, pour stabiliser des suspensions, ou en pharmacologie, pour éviter que les macrophages du corps humain ne "dévorent" des petites vésicules vecteurs de drogue (*stealth vesicles*).

[2] Avec le nickel, ils portent une charge moins contrebalancée par un ion sodium ou neutralisée par l'étiquette histidine des protéines ; sans le nickel, et suivant le pH, il peut porter jusqu'à trois charges moins, dues à ses trois groupes acides carboxyliques

[3] Au dessus de son point isoélectrique (pI=3) la biotine est négative

Dans le cas des vésicules (ou des émulsions) on dispose d'une panoplie de lipides dont la tête porte une chaîne plus ou moins longue de Poly(Ethylène Glycol) (ou PEG) qui est un polymère hydrophile. Suivant la longueur de la chaîne et la concentration des lipides greffés dans les bicouches, la conformation (champignon, brosse, voir Fig. 2.7) varie, entrainant une efficacité plus ou moins importante de la répulsion stérique (ces molécules sont chimiquement inactives) [Kenworthy et al., 1995]. Par exemple, pour le PEG que nous avons utilisé (formé de 45 monomères, soit une masse moléculaire de 2000 g/mol), à une concentration de 5% mol/mol, les chaines forment un tapis de "champignons" de rayons de giration voisin de 3,5 nm à touche-touche. Cette situation est très efficace pour protéger les surfaces.

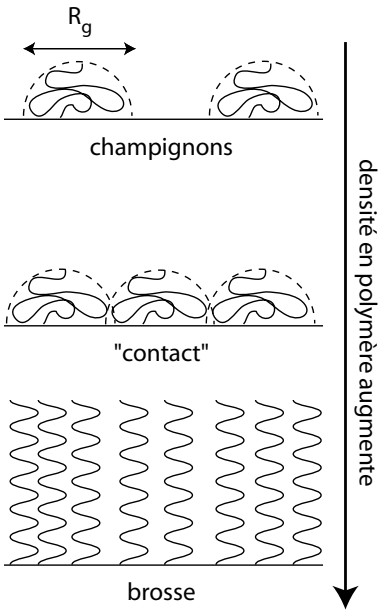

FIG. 2.7 – Régimes obtenus lors du greffage sur une surface d'un polymère de rayon de giration R_g : les régimes importants pour créer une répulsion stérique efficace sont le régime "de contact" où les globules de polymère sont à touche-touche, et le régime très concentré appellé "brosse". Dans ces deux régimes, les interactions non spécifiques entre les objets ainsi décorés sont éliminées. Les limites entre les régimes dépendent bien sûr de la taille du polymère et de sa chimie.

De même, une protéine greffée sur une bicouche peut aussi créer une répulsion stérique, si elle ne génère pas de comportement adhésif. Cela sera présenté de manière expérimentale plus avant dans ce manuscrit.

Fluctuations dites de "Helfrich" [Helfrich and Servuss, 1984] Les vésicules géantes libres peuvent avoir une membrane très fluctuante, avec des amplitudes de mouvement autour de sa position moyenne de l'ordre du μm (voir Fig. 2.5b).

Dès lors qu'une vésicule se rapproche d'une surface (une autre vésicule, une paroi de cellule d'observation), ces fluctuations voient leur amplitude diminuer de par l'existence d'un "mur" : l'entropie de configuration de la membrane est alors diminuée, ce qui crée une répulsion d'origine entropique. Cette répulsion a été introduite par Helfrich en 1978, et l'on se réfère souvent à elles comme aux

"interactions de Helfrich". Le potentiel résultant, lorsqu'une bicouche fluctuante approche une autre surface à une distance d, est de la forme $V_H \propto (kT)^2/\kappa d^2$. La portée de ces interactions est de l'ordre de grandeur de l'amplitude des fluctuations, soit $\sim$ 0,1-1 μm.

Bien entendu, la mise sous tension σ (voir Fig. 2.5B) diminue l'amplitude des fluctuations et, ce faisant, diminue la portée de ces interactions. Un raffinement de la théorie de Helfrich permet de prendre en compte ceci, et donne une variation du potentiel $V_H \propto d \times \exp(-2c\sqrt{\sigma/\mathrm{kT}} \times d)$ avec c un facteur numérique. Ceci définit alors une portée caractéristique augmentant avec T et diminuant avec σ, $\sqrt{\mathrm{kT}/\sigma}$ qui est alors inférieure au micron pour des tensions typiques de vésicules ($10^{-6} - 10^{-5}$ N/m).

Ces fluctuations, dans le cadre des expériences d'adhésion, sont ambivalentes : elles évitent, lorsqu'elles sont trop importantes, l'adhésion entre une vésicule et une surface, mais elles lui permettent aussi de sonder l'espace, afin de faire se rencontrer, par exemple, un ligand et un récepteur.

2.3.2 Attractions spécifiques "clef-serrure"

Ces interactions, à la différence des attractions dites non spécifiques que l'on vient de décrire, ne relèvent pas d'une vision (presque) continue de la chimie de surface des bicouches en regard : maintenant, nous allons parler de *sites d'interactions* pouvant décorer la surface d'une vésicule ou une bicouche supportée.

2.3.2.a Description globale

Ce type d'interaction est celui qu'ont développé les cellules vivantes afin de se ségréger, d'adhérer pour former des tissus ou se déplacer. A leur surface, d'innombrables protéines, appartenant à différentes classes (les intégrines, les cadhérines entre autres), sont présentent et interagissent à la fois avec le cytosquelette de la cellule et la matrice extracellulaire d'une cellule voisine ou la surface d'un vaisseau... un peu à la manière d'une clef et d'une serrure. Ces interactions sont *spécifiques* car elles nécessitent qu'une molécule d'un type particulier rencontre, sur un substrat, une molécule de même type (interactions dites *homotypiques*, comme dans le cas des cadhérines) ou bien d'un autre type *bien déterminé* (interactions *hétérotypiques*).

Plusieurs cas d'adhésion spécifique ont été étudiés : on peut décorer des vésicules avec des lipides se reconnaissant grâce à des liaisons H (bases A et T de l'ADN [Heuvingh, 2002, Pincet et al., 2001b]). On peut aussi travailler avec des lipides portant une petite vitamine, la biotine, capable de reconnaitre spécifiquement une protéine , la (strept)avidine [Noppl-Simson and Needham., 1996, Albersdörfer et al., 1997], ou encore utiliser un petit peptide, appelé RGD, lié à un lipide, capable de se lier à des intégrines adsorbées sur une surface [Hu, 2001, Boulbitch et al., 2001].

Enfin, on peut aussi utiliser une protéine d'adhésion homotypique, la csA, qui a le bon goût d'être liée, via un espaceur, à un lipide [Kloboucek et al., 1999].

Les interactions entre ces molécules (que l'on dénomme souvent par les termes *ligand* et *récepteur*) sont extrêmement complexes et difficiles à caractériser : interactions de type électrostatique entre groupes d'acides aminés, liaisons hydrogènes, contraintes géométriques de compatibilités,... les combinaisons sont légions. Il est alors difficile, très souvent, de représenter ce type d'interaction par un *profil énergétique de liaison* [Merkel et al., 1999], et encore plus difficile de l'établir expérimentalement.

Ce qui a motivé le travail présenté ici a été de décorer des vésicules géantes avec des fragments hydrosolubles de protéines d'adhésion : nous avons cherché à étudier les interactions *entre fragments terminaux de E-cadhérines*.

2.3.2.b Interaction entre fragments de cadhérines

Les cadhérines, leur importance biologique, les différentes hypothèses sur leur mode de fonctionnement ont été présentées succintement dans le Chapitre précédent. Le choix de travailler avec seulement les deux domaines les plus extracellulaires y est étayé par quelques arguments apportés par la structure de ces molécules et quelques arguments relevants d'expériences de biologie cellulaire. Le lecteur pourra s'y référer, si besoin est.

Les quelques lignes qui suivent vont essayer de proposer un schéma de la portée des interactions générées par ces fragments. On considèrera donc ces fragments comme une boîte noire, adhésive, de portée de l'ordre de la taille du fragment.

Remarque Dans les expériences d'adhésion suivies en microscopie interférentielle, il faut aussi prendre en compte la contribution (faible) due au fait que le poids des vésicules force le "contact". Ici, ceci ne sera pas explicitement décrit, on considèrera que le poids met les surfaces en contacts, mais de manière relativement "délicate" (on est très loin du "forçage" de contact comme dans les expériences de SFA).

2.3.3 Représentation d'une interaction spécifique

Sur la Fig. 2.8, on a représenté (de manière très qualitative) les portées des différentes interactions moléculaires à prendre en compte lors des expériences d'adhésion avec des fragments EC1-EC2 de E-cadhérine. Bien sûr, ce type de schéma peut être obtenu pour n'importe quel type d'interaction (par exemple biotine/streptavidine/biotine). Dépasser le stade qualitatif demande de connaître beaucoup de détails, à la fois sur l'interaction mise en jeu, la densité de clefs, de serrures sur les surfaces en regard, mais aussi la composition exacte des bicouches et de la solution. En particulier, l'intensité relative des interactions n'est pas accessible. A l'échelle des expériences que nous avons réalisé ici, cela est excessi-

vement complexe : cela est du aux incertitudes sur la composition des vésicules (en particulier la présence des ions nickels, et de la reconstitution), sur le taux de fixation des protéines, sur le rôle du calcium fixé sur la protéine et surtout sur le mode d'interaction protéine/protéine.

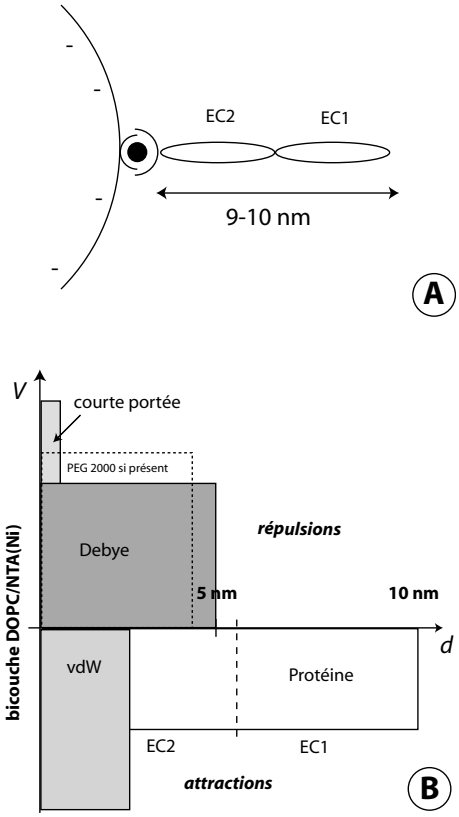

FIG. 2.8 – Représentation très schématique des interactions spécifiques cadhérine/cadhérine : A : représentation d'une membrane portant un fragment EC1-EC2 ; B : portées des interactions moléculaires correspondant au cas A. On ne peut définir clairement une distance d'équilibre membrane/membrane, mais on peut néammoins se convaincre que l'on peut sonder des interactions spécifiques cadhérine/cadhérine.

Cela nous permet de voir qu'une interaction entre cadhérines est envisageable avec un tel système. Néammoins, il faut bien garder à l'esprit que cette vision est très simplifiée : en particulier, si l'on a une couche très dense de protéines fixée sur la surface des vésicules, on doit prendre en compte les interactions de van der Waals dues à cette couche (la constante de Hamaker d'une couche de protéine doit être plus grande que celle d'une bicouche, dû fait de son épaisseur et du fait que sa polarisabilité est plus grande, une protéine possédant plus d'électrons qu'un lipide), les interactions électrostatiques dues à cette couche, etc... Ceci ici a été délibérément "caché" par l'utilisation d'une "boîte-protéine", dont les interactions, comme démontré par Ferracci *et al.* [Perret et al., 2002a] et Silberzan *et al.* [**?**], sont considérées comme globalement attractives.

Chapitre 3

Matériel et méthodes

Dans ce chapitre seront présentées les différents matériels utilisés dans le cadre des travaux que ce manuscrit présente, ainsi que les différentes méthodes d'obtention des objets (vésicules de grande et petite taille, bicouches supportées) et d'observation de ces derniers.

Après une présentation succinte des lipides utilisés et de leurs propriétés, nous aborderons la technique d'électroformation qui a été la voie suivie pour obtenir des vésicules géantes unilamellaires, ainsi que ses limitations. Puis la méthode de fabrication par ultra-sonication de petites vésicules sera décrite, ainsi que celle de fabrication de bicouches supportées par fusion de ces dernières avec une surface très propre. Enfin, les principes des techniques de microscopie de fluorescence (à un et deux photons) ainsi que la microscopie interférentielle seront exposés.

3.1 Les lipides

Les principales molécules de lipides utilisées au cours de ce travail de thèse vont être présentées ici, ainsi que leur rôle dans le système que l'on a cherché à construire.

3.1.1 Provenance et conservation

Tous les lipides ont été achetés sous forme de poudre chez Avanti Polar Lipids (Alabaster), et solubilisés dans du chloroforme à une concentration de 10 mg/mL. Ces solutions mères sont utilisées soit directement, soit diluées à 1 mg/mL pour faire les mélanges de lipides qui serviront de solutions de travail. Toutes les solutions de lipides sont conservées au congélateur à - 20°C, à l'abri de la lumière et de l'humidité, sous atmosphère d'argon, dans des petits flacons en verre de 2,5 mL avec un bouchon ayant un joint en Téflon (afin de ne pas polluer les solutions). Avant ouverture et utilisation, on laisse les flacons revenir à température ambiante pour éviter de condenser de la vapeur d'eau à l'intérieur. Les solutions

sont changées régulièrement, suivant leur fréquence d'ouverture, afin de limiter l'apparition de résidus de lyse dûs à une oxydation qui peuvent fragiliser les vésicules géantes, comme par exemple des lipides à une seule chaîne peuvent apparaître, les lysolipides. Ceux-ci ont une action comparable à celle de tensiactifs, perturbant l'organisation des bicouches [Zhelev, 1995, Zhelev, 1998]. Une solution peut être détectée comme contaminée dès lors qu'elle se trouble (formation de structures, en présence d'eau, qui diffusent la lumière).

3.1.2 Une matrice lipidique fluide

Nous avons choisi comme lipide matrice, c'est-à-dire comme lipide qui sera majoritaire et servira à "diluer" les lipides fonctionnels, le DOPC (ou Di Oleyl Phosphatidyl Choline, $M_w = 786.1$ g/mol, Fig. 3.1).

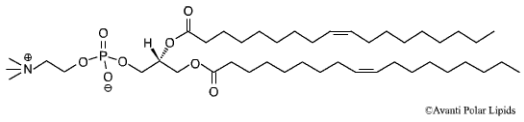

FIG. 3.1 – Di Oleyl Phosphatidyl Choline ou DOPC (Avanti Polar Lipids).

C'est un des composants principaux de la lécithine d' œuf. A température ambiante, ce lipide est fluide car ses chaînes de 18 carbones portent chacune une insaturation : on le note C18 :1. Sa "température de fusion des chaînes" T_m est de - 20°C. L'épaisseur de la bicouche qu'il forme est de l'ordre de 4 nm. Un coefficient de diffusion, D, typique d'une molécule de lipide dans le plan est $\sim 1\mu\text{m}^2/\text{s}$ alors que le passage d'une molécule de lipide d'un feuillet à l'autre de la bicouche par flip-flop est de l'ordre de quelques minutes à plusieurs heures, suivant la longueur de la chaine et la charge de la tête. Sa tête polaire est une choline, et est zwitterionique (aux pH ≥ 7, le groupe phosphate est ionisé positivement, ce qui donne une molécule globalement neutre). Néanmoins, il a été montré que de tels lipides contenaient, malgré toutes les précautions que l'on puisse prendre, une fraction de résidus de synthèse chargés négativement [Pincet et al., 1999].

Un des avantages les plus importants de ce lipide est qu'il "marche bien" pour la méthode d'électroformation que nous allons présenter : les vésicules qu'il permet d'obtenir sont de grande taille (plusieurs dizaines de microns) et bien unilamellaires.

De plus, de nombreux lipides fonctionnalisés ont été synthétisés avec des queues du même type (C18 :1). Le mélange entre ces derniers et le DOPC sera *a priori* relativement bon : on aura peu/pas de séparation de phases due à des incompatibilités de structure.

3.1.3 Les lipides chélatants

Comme nous l'avons vu lors de la présentation, les fragments de cadhérine que nous allons utiliser dans nos expériences portent un hexapeptide d'histidine qui reconnait spécifiquement les ions nickel.

Pour les coupler à nos objets, nous avons cherché à utiliser un lipide chélatant commercial, le DOGS-NTA [1] vendu vide ou pré-chargé en nickel (Fig. 3.2A et B). Le couplage, ainsi que les compétiteurs, qui permettent de contrôler le relargage d'une protéine capturée sont rappelés sur la Fig. 3.2C.

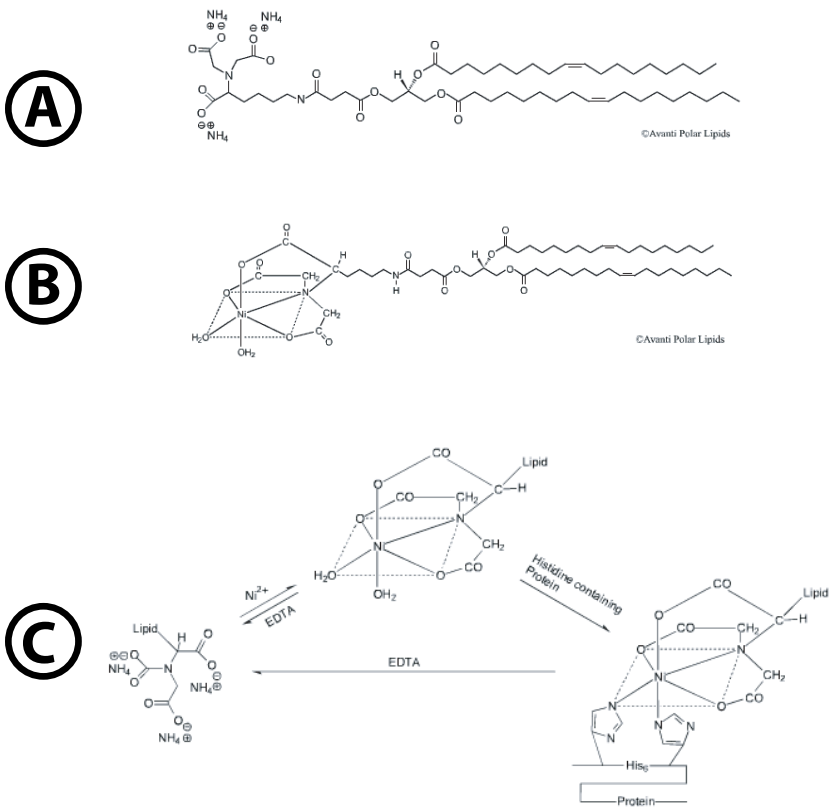

FIG. 3.2 – DOGS-NTA sans (A, $M_w = 1015,40$ g/mol) ou avec (B, $M_w = 1057,02$ g/mol) nickel ; C : chélation d'une protéine à étiquette 6 histidine et compétiteurs (Avanti Polar Lipids).

La longueur de la tête polaire est de 1,5 nm, soit 0,5 nm de plus que celle d'un DOPC : cela est dû à la fois à la présence de la tête de chélation et à un petit bras espaceur permettant une meilleure accessibilité du site, ainsi qu'une relativement bonne mobilité latérale des protéines fixées. Lorsqu'il ne porte pas d'ion nickel, à pH $\geq$ 7, les trois acides carboxyliques de la cage de chélation

[1] ou 1,2-Dioleoyl-sn-Glycero-3-([N(5-Amino-1-Carboxypentyl)iminodi Acetic Acid]Succinyl)

sont ionisés, et de fait, ce lipide porte trois charges moins, compensées par des ions sodium. Dès lors qu'un ion nickel est engagé, il ne reste plus qu'une charge résiduelle négative. Il faut ici noter que cette tête, bien que capable de chélater d'autres ions divalents (en particulier le cuivre), ne peut fixer l'ion calcium : lors des expériences avec les cadhérines, ce dernier ne sera pas un compétiteur à prendre en compte [Schmitt et al., 2000].

De par sa queue C18 :1, il s'insère à priori bien dans la matrice de DOPC et peut y diffuser à loisir. Comme nous le verrons plus loin, le fait qu'il porte une charge limitera à 10% la quantité que l'on peut inclure dans des vésicules en utilisant la méthode d'électroformation.

3.1.4 Les lipides "polymères"

Afin d'introduire une composante de répulsion stérique dans les systèmes d'adhésion spécifique, on utilise des lipides sur la tête desquels est greffé un polymère hydrophile (généralement du Poly(Ethylène Glycol) ou PEG) de longueur variable : de quelques monomères pour les plus courts, à quelques dizaines de monomères.

Ce mode de protection des surfaces, par une chevelure créant une gène stérique empéchant le contact entre deux surfaces, est bien connu du monde des colloïdes. L'efficacité de la protection stérique est bien sûr conditionnée par la longueur du polymère, mais aussi par la façon dont il est relié à la surface (greffage ou adsorption) et par la quantité de polymère présent.

Dans notre cas, le polymère est greffé sur la surface par un seul point. Suivant la concentration et la longueur de la chaîne polymérique, on peut être dans un régime dit "champignon", où l'espace occupé par une chaîne correspond plus ou moins à celui donné par son rayon de giration R_g, ces champignons étant de plus en plus serrés les uns contre les autres au fur et à mesure que la concentration augmente. Pour des densités importantes, on peut avoir un régime dit "brosse", où les chaînes sont dans une configuration étendue : la portée de la protection étant alors de l'ordre de la longueur de la chaîne [de Gennes].

Lors du travail présenté ici, nous avons utilisé des lipides dont les queues étaient relativement bien miscibles à la matrice de DOPC (Fig. 3.3) : un lipide insaturé et un lipide saturé (miscibles au DOPC aux % faibles), portant un PEG de masse moléculaire 2000 g/mol, formé de 45 monomères. Son rayon de giration est $\sim$ 3.5 nm, et introduit à 5% mol/mol, il est dans un régime à la limite brosse/champignons. Ceci est relativement efficace pour la protection des surfaces [Lasic, 1993, Kenworthy et al., 1995].

3.1.5 Décoration avec de la "super-glue" moléculaire

Enfin, une autre façon d'introduire des clefs et des serrures à la surface des vésicules est d'utiliser des lipides portant sur leur tête une petite vitamine, la

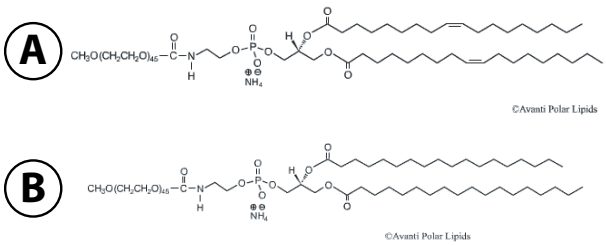

FIG. 3.3 – Lipides portant un Poly(Ethylène Glycol) (PEG) de 45 monomères (PEG_{2000}) A : chaînes non saturées (DOPE-PEG, $M_w = 2801,5$ g/mol) ; B : chaînes saturées (DSPE-PEG, $M_w = 2805,5$ g/mol) (Avanti Polar Lipids).

biotine, au bout d'un bras espaceur plus ou moins long (Fig. 3.4A à C). Leur queue C18 :1 ou C18 :0 leur permet de bien s'inclure dans une matrice DOPC.

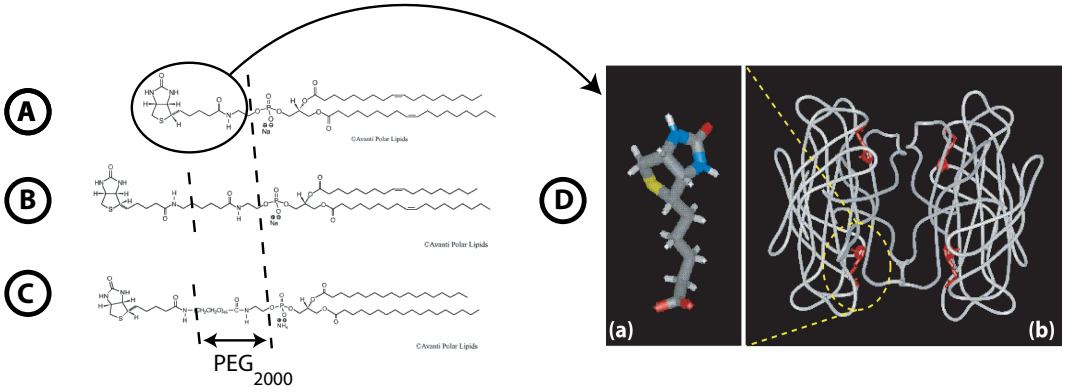

FIG. 3.4 – Lipides biotinilés avec différentes longueurs d'espaceur (A, $M_w = 992,3$ g/mol) biotine (B, $M_w = 1105,5$ g/mol) cap-biotine (C, $M_w = 3016,8$ g/mol) PEG_{2000}-biotine (Avanti Polar Lipids) - D-a : biotine ; D-b, insertion dans une des quatre poches de la (strept)avidine ($M_w \sim 70000$ g/mol).

Cette petite vitamine (Fig. 3.4D-a) peut s'inclure dans une des quatre poches hydrophobes d'une protéine appelée l'avidine ou la streptavidine (Fig. 3.4D-b). Cette liaison est la liaison non covalente la plus forte connue à ce jour (~ 40 kT) et la plus résistante (une fois établie, le temps de demi-vie d'une liaison est de l'ordre de plusieurs dizaines d'heures).

Chaque protéine possède deux sites par face et on peut donc créer des couples adhérents en fonctionnalisant une surface avec de la biotine, puis avec de la streptavidine, et en la mettant en contact avec une surface biotinylée. On peut aussi s'en servir comme "pièce intermédiaire" pour fixer quelque chose d'autre qui est biotinylé (on peut fixer dessus des ADN double brin biotinylés à une extrémité, que l'on visualise par marquage avec YOYO-1). Néammoins, ces constructions à plusieurs "étages" sont délicates avec les vésicules géantes de par les manipula-

tions nombreuses qu'elles imposent et qui fragilisent la membrane.

3.1.6 Isothermes de compression

Dans l'idée d'effectuer des dépôts de Langmuir-Blodgett sur des surfaces de verre, nous avons mesuré les isothermes des différents lipides ou mélanges de lipides auxquels nous nous sommes intéressés au cours de cette étude. Nous allons présenter ces données rapidement.

Des solutions de lipides à 1 mg/mL sont préparées dans du chloroforme pur. La cuve de Langmuir utilisée est une cuve Nima (équipe Rondelez, UMR 168), que l'on remplit d'eau milliQ et qu'on laisse s'équilibrer, en enlevant les poussières et les bulles d'airs résiduelles par aspiration à l'aide d'une trompe à eau. Puis 50 μL de lipides sont répandus à l'aide d'une seringue Hamilton à la surface de l'eau. Le système est laissé se stabiliser pendant une demi heure, afin de permettre au solvant de s'évaporer. La compression de la monocouche s'effectue alors à des vitesses variant entre 20 et 100 cm^2/min, à 20°C. La vitesse de compression n'a pas influencé les mesures présentées ici, comme on a pu le vérifier en comprimant la même monocouche avec des vitesses croissantes : il n'y a pas d'éjection notable de lipides ou de collapse de la monocouche.

Sur la Fig. 3.5 sont présentées les isothermes de DOPC et de mélanges de lipides binaires de DOPC et des divers lipides fonctionnalisés dont on a parlé précédemment. Lorsque l'on effectue ces isothermes sur des mélanges ternaires de lipides (c'est-à-dire DOPC + lipide chélatant ou biotinylé + un lipide PEG), on constate que la morphologie de la courbe se rapproche de celle observée avec les mélanges de lipides binaires contenant du PEG (il y a un plateau, voir la légende de la Fig. 3.5C).

3.2 Solutions utilisées

Comme nous le verrons, l'utilisation de la technique d'électroformation impose d'utiliser comme milieu de fabrication, des solutions de sucre, que l'on encapsule dans les vésicules.

La membrane des vésicules est semi-perméable à l'eau : l'utilisation de solutions de sucre de concentration connue lors de la fabrication permet d'éviter ou de forcer le passage de l'eau entre l'intérieur et l'extérieur de la vésicule. Si la concentration (on parle plutôt d'osmolarité, mesurée en mOsm/kg, à l'aide d'un osmomètre à point de fusion) de la solution interne et celle de la solution externe sont les mêmes, alors il y a équilibre. Si l'une est plus concentrée que l'autre, l'eau passe dans le sens visant à "diluer" le côté le plus "concentré" : si l'intérieur est plus concentré que le dehors, alors la vésicule se gonfle, parfois jusqu'à éclater ; dans le cas contraire, elle se dégonfle. De plus la fabrication de vésicules dans un sucre et la resuspension dans une solution de sucre de densité différente per-

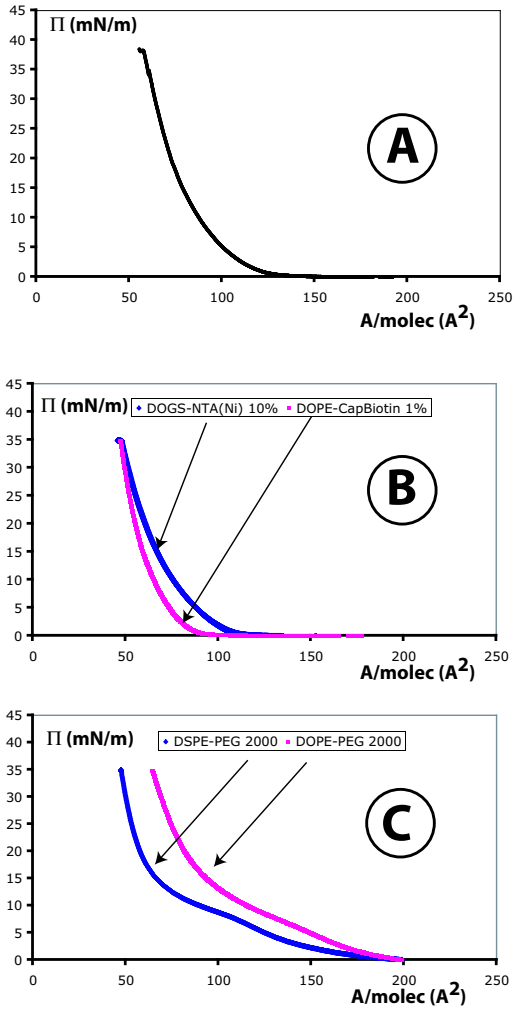

FIG. 3.5 – Isothermes des différents lipides et mélanges binaires utilisés : A : DOPC seul ; B : DOPC avec 1% de lipide DOPE-CapBiotin ou 10% de lipide DOGS-NTA(Ni). On note que la pente de la montée est plus forte avec ce dernier lipide, sûrement dû à un effet de charge de la tête des molécules ; C : DOPC avec 5% de lipide PEG2000, saturé (DS, C18 :0) ou non (DO, C18 :1). Avec les deux lipides on aperçoit un plateau, signe de transition de phase à la compression. On peut attribuer cela à un changement de conformation des PEG lorsque compressés, de champignons à brosse. On note de plus que ce plateau est plus marqué pour les lipides non saturés, car il y a de plus une incompatibilité des chaînes avec le DOPC d'autant plus marquée que l'on force les lipides à se rapprocher.

met de faire crémer ou sédimenter au choix les vésicules, afin d'en augmenter le nombre, de les transférer d'un milieu dans un autre par sédimentation, ou tout simplement de les rapprocher d'une surface afin de les localiser et d'observer leur contact avec cette même surface. Cela marche aussi avec des solutions salines, qui ont une densité inférieure à celle de solutions de sucre de même osmolarité.

Les solutions de sucre qui ont été utilisées le plus couramment dans cette étude sont des solutions de sucrose ($M_w = 341,2$ g/mol, Sigma : le "sucre lourd") et de glucose ($M_w = 182,6$ g/mol, Sigma : le sucre "léger"), avec des concentrations autour de 300 mM soit 300 mOsm. L'astuce que nous avons utilisée est de fabriquer les vésicules dans un mélange 1 :1 (v/v) de sucrose et glucose : ainsi on peut faire "monter ou descendre" la même population de vésicule, suivant qu'on la resuspend dans du glucose (sédimentent) ou du sucrose (crèment). Souvent, on a utilisé des solutions de resuspension d'osmolarité supérieure (310 ou 330 mOsm) afin de permettre aux vésicules de se rééquilibrer . Parfois, en particulier dans le

cas des expériences en présence de protéines, nous avons ajouté un tampon, le Tris (pH=8 à 25°C, Sigma, preset tablets) à des concentrations entre 5 et 45 mM, aux solutions de sucre. Dans d'autre cas, nous avons utilisé du Phosphate Buffer Saline (ou PBS : tampon phosphate + NaCl, pH=7,4, Sigma, preset tablets) dont l'osmolarité est voisine de 280 mOsm, en accomodant l'osmolarité de la solution de fabrication des vésicules à 270 mOsm.

Afin d'avoir des solutions bien plus visqueuses que l'eau, on peut utiliser des mélanges de solution de sucre/glycérol (par exemple, avec 66,6% en volume de glycérol, on atteint une viscosité de 32 cP). Les conditions de fabrication de vésicules sont alors légèrement changées, comme on le verra.

3.3 Méthodes d'obtention de vésicules géantes

Plusieurs méthodes, ayant chacune ses partisans, permettent d'obtenir des vésicules géantes unilamellaires, chacune avec plus ou moins de rendement (c'est-à-dire donnant plus ou moins de vésicules grosses et unilamellaires par rapport aux agrégats et vésicules multilamellaires que peut contenir une suspension de vésicules). Nous n'en décrirons que deux ici : la méthode dite "du schlieren" (ou méthode "corse", ou "gonflement spontané"), et la méthode dite d'"électroformation" mise au point par M. Angelova. Au cours de cette thèse, les deux méthodes ont été essayées, avec plus ou moins de succès...

3.3.1 Méthode "corse"

Le principe de la méthode est le suivant. On effectue un dépôt de lipides à partir d'un solvant organique (usuellement le chloroforme) avec une seringue Hamilton en verre sur une pastille de Téflon rendue rugueuse par frottement avec un papier de verre fin. Cette pastille est placée dans un bécher très propre, que l'on scelle avec du parafilm, en laissant un petit trou. Le tout est placé toute une nuit au four à vide à température ambiante afin d'éliminer les résidus de solvant restant. Puis, on réhydrate pendant une heure à l'aide d'un flux d'azote humide le film, avant d'introduire quelques millilitres de la solution à encapsuler dans le bécher. Enfin, on scelle le tout (cette fois-ci sans fuite) et on place dans une étuve à 37°C pendant plusieurs heures. On contrôle de temps à autre, et on observe la formation d'une corolle trouble au dessus de la pastille : elle contient les vésicules géantes (et autres structures) formées par gonflement spontané des multicouches de lipides déposées, agitées par des fluctuations thermiques.

L'avantage de cette méthode est qu'elle est très douce pour les lipides qui ne sont pas trop dégradés. Les vésicules sont jugées plus "résistantes" pour les micromanipulations avec des pipettes (dixit E. Evans). On peut aussi encapsuler des sels peu concentrés plus facilement qu'avec l'électroformation. Le principal désavantage est que cette méthode produit très peu de vésicules unilamellaires,

la rendant inutilisable dès lors que l'on ne "choisit" pas ses vésicules avec une pipette, par exemple pour des expériences de RICM ou d'adhésion "en bulk", donc pour nous...

3.3.2 Electroformation

Cette méthode mise au point il y a quelques années [Angelova et al., 1992, Rosoff, 1996] et s'est depuis répandue dans de nombreux laboratoires. Elle repose sur un principe différent de la méthode précédente : en effet, partant d'un dépôt de lipides sur une électrode de platine ou de verre recouvert d'un oxyde d'étain et d'indium conducteur et transparent (ou ITO), on le fait gonfler dans une solution en présence d'un champ électrique alternatif, qui fait se mouvoir perpendiculairement au plan de l'électrode les feuillets lipidiques. Ceux-ci sont hydratés par la solution grâce aux défauts présents sur le dépôt (rayures lors du "coloriage" de l'ITO avec la solution de lipides). Pour une explication très en détails de cette méthode, on pourra se référer à la thèse d'O. Sandre [Sandre, 2000].

Le protocole de la méthode est présenté sur la Fig. 3.6. Quelques détails sont apportés ci-dessous.

Les cellules utilisées sont "faites maison" à partir de lames recouvertes d'ITO (gracieusement fournies par M.-A. Guedeau-Boudeville, Collège de France), sur lesquelles on fixe un contact électrique de la manière suivante : on dépose une laque contenant des sels métalliques sur l'ITO, et on en enrobe un cable électrique dénudé ; après séchage, on noie ce contact dans une colle époxy à deux composants qui est isolante. A chaque étape, on vérifie les contacts au multimètre. Enfin, on réunit deux lames en soudant leurs cables à une prise coaxiale, afin de pouvoir brancher la cellule sur un générateur basses fréquences.

Le dépôt de lipides se fait avec une seringue Hamilton, en faisant des zig-zag sur la surface de l'ITO afin de ne pas faire des dépôts trop épais. Cela permet aussi de rayer la surface du dépôt pour permettre son hydratation plus rapide et plus en profondeur. Pour éviter une évaporation trop rapide des solvants (et donc la formation de "gros paquets" de lipides qui s'hydrateraient mal), on utilise des solutions de lipides de faible concentration (1 mg/mL) contenant 2/3 (en volume) de chloroforme et 1/3 de méthanol, au lieu de chloroforme pur. Lors du dépôt, il vaut aussi beaucoup mieux être à des températures inférieures à 20°C sinon l'évaporation du solvant est trop rapide, ce qui conduit à des dépôts très inhomogènes. Les dépôts réalisés font une centaine de bicouches d'épaisseur, à en juger par l'irisation qu'ils présentent.

Le scellement de la cellule se fait avec un boudin de pâte à hématocrite (Critoseal – Fischer Scientific) qui enserre un espaceur de Téflon et doit être bien étanche. Le remplissage se fait sous champ, afin de limiter le gonflement spontané parasite. La sortie des vésicules, que l'on laisse relaxer quelques heures au frigidaire, se fait avec une aiguille de gros diamètre pour les cisailler le moins possible.

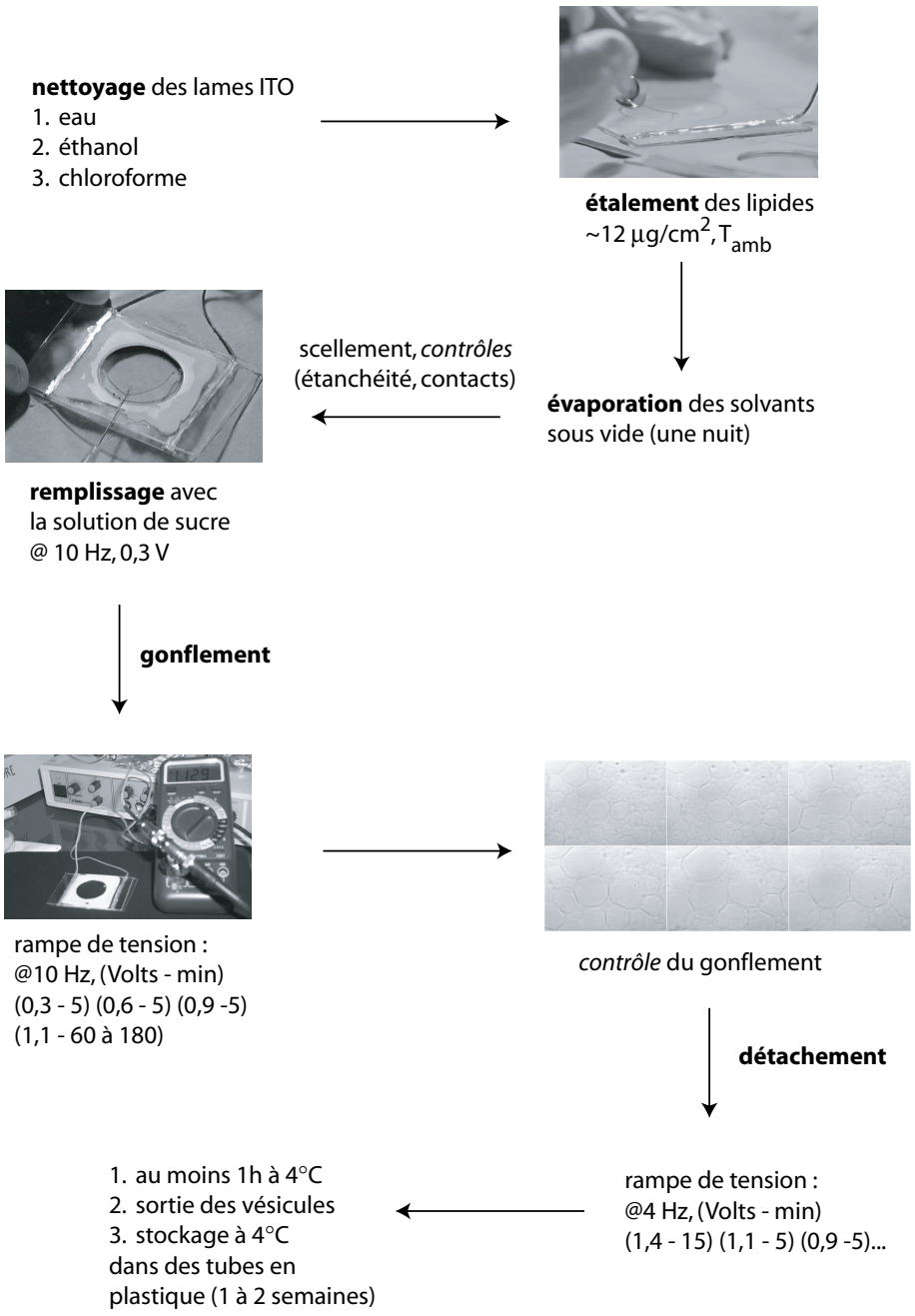

FIG. 3.6 – Synoptique d'une électroformation – photos : O. Sandre/H. Guitouni.

Le temps pendant lequel on laisse le palier de tension dépend de la viscosité de la solution de gonflement : entre 1 et 3 h pour des solutions de sucre, plus de 6 h pour des solutions contenant du glycérol.

Les conditions de tension, de fréquence, de durée peuvent être adaptées aux différents types de lipides et de solutions que l'on utilise [Sandre, 2000, Abkarian, 2002].

Le grand avantage de cette méthode est son fort rendement en vésicules de grande taille (plus de 20 μm de diamètre) et bien unilamellaires. Peu d'agrégats et de vésicules multilamellaires sont obtenus. Mais, du fait de l'utilisation d'un champ électrique, tout ce qui contient des charges peut poser problème (lipides ou solutions salines) : il faut alors tester la méthode au cas par cas. La question est toujours de savoir si l'on reconstitue bien ce que l'on dépose comme composition en lipides dans les vésicules... Comme critère raisonnable on peut prendre que si une électroformation fournit beaucoup de grosses vésicules, avec des morphologies non pathologiques, alors on a de très fortes chances d'avoir reconstitué à peu près la composition du dépôt. Néanmoins, seule une étude statistique des phénomènes que l'on observe peut lever cette incertitude...

Précautions

Dès lors que l'on prélève des vésicules avec une micropipette Gilson, il faut couper l'embout en plastique afin d'éviter de cisailler les vésicules : en effet, si on les soumet à un tel "traumatisme", on finit par sélectionner les vésicules les plus tendues, les plus grosses et fluctuantes se rompant.

Toute manipulation doit être "douce et délicate" pour respecter l'intégrité fragile des vésicules géantes (prélèvement, marquage, injection, sédimentation...)...

3.4 Fabrication de bicouches supportées

Afin de décorer une surface hydrophile avec une bicouche lipidique, plusieurs techniques peuvent être utilisées.

3.4.1 Les différentes méthodes

Tout d'abord, la "méthode historique", dite de Langmuir-Blodgett (et ses variantes comme les techniques de Langmuir-Schaeffer) [Israelachvili, 1992] est basée sur le fait de faire traverser deux fois à la lame une interface eau/air où l'on a déposé et mis sous pression latérale une monocouche de lipides. Cette méthode est néammoins délicate, car elle implique de monter toutes les cellules d'observation sous l'eau afin de ne pas détruire la bicouche déposée par démouillage. De plus, avec le matériel disponible au laboratoire (une très grande cuve Nima), la mise en place était longue et fastidieuse pour obtenir une lame utilisable. Après quelques semaines d'essais infructueux, nous avons abandonné cette voie.

Vient ensuite une méthode dite "par solvant organique" : on dépose sur un côté de la surface à décorer un amas de lipides, un peu comme pour la méthode "corse" et on laisse sécher, puis on monte la cellule d'observation et on réhydrate les lipides en introduisant une solution. Si les conditions sont favorables, une bicouche se met alors à s'étaler sur la surface progressivement [Rädler et al., 1995, Cremer and Boxer, 1999]. Un gros désavantage de cette méthode est qu'il reste un réservoir de lipides d'un côté de la cellule, qui peut produire des objets parasites par gonflement spontané.

Enfin, et c'est la méthode qui a été utilisée ici, on peut fabriquer une bicouche supportée sur du verre très hydrophile par fusion de petites vésicules. Elle a été remise au goût du jour depuis quelques années, avec l'avènement des techniques de lithographie molle et de "microstamping", qui permettent de décorer des surfaces de manière relativement simple dans le principe tout en les intégrant dans des dispositifs de microfluidique. L'intérêt principal de cette méthode est que l'on peut fabriquer une bicouche de manière très simple, et surtout *in situ*, c'est-à-dire dans une cellule déjà fabriquée [Yang et al., 2001].

La littérature est extrêmement abondante sur les méthodes et les applications de bicouches supportées fabriquées ainsi, chaque laboratoire ayant ses "recettes" pour obtenir et vérifier la présence des bicouches[2].

Cette technique permet de décorer des surfaces hydrophiles, billes, lames, lamelles, de manière simple et relativement rapide, avec une bicouche fluide. Au cours de cette thèse, on a même pu décorer des billes de PDMS avec une bicouche fluorescente.

3.4.2 Fabrication par fusion de petites vésicules

Nous allons détailler ici le protocole qui a été mis au point afin de décorer la surface de lames et de lamelles de verre d'une bicouche fluide via la fusion de petites vésicules. La validation de ce protocole sera abordée de manière plus détaillée dans les Chapitres suivants.

[2]Ainsi, la fusion de petites vésicules a servi pour étudier par AFM les séparations de phases de lipides [Rinia, 2001] ou la structure de complexes de protéines membranaires [Scheuring, 2000]. Ses mécanismes, dépendant du type de surface (verre, or,...), ont été décrits par des expériences de résonnance de plasmons de surface (ou SPR) [Reimhult et al., 2003] ou par fluorescence [Johnson et al., 2002, Cremer and Boxer, 1999]. A l'aide des techniques de microlithographie et de stamping, des bicouches patternées ont pu être déposées sur des substrats, soit par fusion sélective sur des zones libres [Kung et al., 2000], soit par peeling de zones de la bicouche [Hovis and Boxer, 2000]. Avec des marqueurs lipidiques fluorescents chargés, on a pu mettre en évidence des phénomènes d'électrophorèse à l'intérieur de la bicouche [Groves et al., 2000]. Avec de l'ADN "rampant" sur la surface, on a pu réaliser des séparations [Olson et al., 2001]. En combinant l'électrophorèse, le patterning et l'utilisation de flux dans des canaux de microfluidique, on a pu effectuer des électrophorèses avec récupération d'une partie de la bicouche, à l'aide de surfactants [Kam and Boxer, 2003]. En décorant à la fois des billes et des surfaces planes avec des lipides de charge opposé, de l'hémifusion a pu être observée [Sapuri et al., 2003]

3.4.2.a Nettoyage des surfaces de verre et fabrication des cellules

La première étape consiste à obtenir des lames et des lamelles très propres et très hydrophiles. Une manière simple de réaliser ceci consiste à laver les surfaces dans une solution diluée d'un tensioactif ionique (Hellmanex ou Micro90), et ce à chaud. Les lames et lamelles maintenues sur un portoir sont ainsi placées pendant plus d'une demi-heure dans une solution de détergent à une température entre 60 et 100°C, puis rincées soigneusement, encore chaudes, alternativement dans un bain d'eau milliQ et à la pissette. Elles sont ensuite séchées sous flux d'argon et stockées (pas plus de quelques heures) dans une boite de petri.

A ce stade là, les surfaces sont déjà relativement hydrophiles, et on peut les utiliser pour réaliser des cellules d'observation scellées par plusieurs épaisseurs de parafilm, comme décrit dans [Sandre, 2000]. Afin de contrôler l'épaisseur (et donc le volume) de nos cellules, nous avons choisi d'utiliser des cellules soit moulées en PDMS (Sylgard 184, Dow Corning) à partir de plusieurs épaisseurs de ruban adhésif commun ($4 \approx 200$ μm, Fig. 3.7), soit avec des parois faites avec des films de PDMS commerciaux d'épaisseur calibrée.

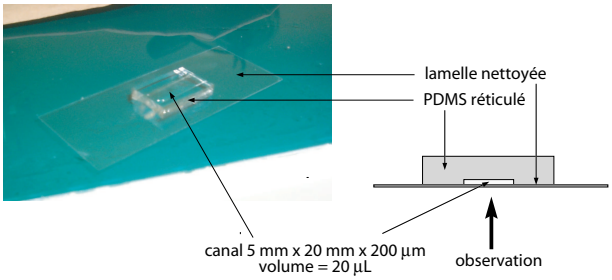

FIG. 3.7 – Cellule utilisée lors d'expériences avec des bicouches supportées et des vésicules géantes. Elle est présentée ici scellée au plasma. Elle peut être fermée en utilisant une pâte inerte (Critoseal ou Vitrex)

Afin de sceller fermement ces cellules, on passe les lames précédentes ainsi que les pièces de PDMS au nettoyeur à plasma à air résiduel, pendant 1 min à l'intensité maximale. Les surfaces du verre et du PDMS sont alors oxydées et débarassées de tout résidu organique. Elles collent alors l'une à l'autre de manière irréversible (pour plus de détails sur ces procédés, [Rossier, 2003] en contient une revue assez exhaustive). Ainsi, en une étape, on rend la surface du verre très propre et hydrophile et on étanchéifie la cellule.

Les cellules sont alors conservées dans une boîte de petri et utilisées dans la demi heure qui suit pour la fusion de petites vésicules.

3.4.2.b Fabrication de petites vésicules

On nettoie au tensioactif (comme pour les lames) un petit flacon en verre. Après un séchage à l'argon, on le met sous vide afin d'éliminer les résidus d'eau de rinçage pendant au moins une heure.

On introduit ensuite le ou les lipides désirés afin d'obtenir une suspension qui contiendra à peu près 1 mg/mL de lipides. On évapore les solvants sous flux

d'argon en faisant tourner le flacon, pour recouvrir les parois d'une fine pellicule irisée (multicouches de lipides comme les dépôts sur l'ITO). On élimine alors les restes de solvant par mise sous vide pendant une nuit.

On réhydrate le dépôt par ajout de la quantité nécessaire de solution (glucose 300 mM, Tris 5 mM, pH=8, NaCl 50 mM). Cette solution a été choisie pour être dans la bonne gamme de pH et de salinité, selon [Cremer and Boxer, 1999]. On agite pendant une minute et on place à 4°C pendant au moins une heure afin de laisser les agrégats de lipides s'hydrater.

On agite de nouveau pendant une minute, et on sonique sur glace fondante avec un sonicateur à pointe pendant un quart d'heure. La suspension de vésicules de petite taille (typiquement entre 50 et 100 nm, Fig. 3.8A) et très tendues est alors conservée à 4°C pendant au plus une semaine, et resoniquée pendant au moins une minute avant usage.

3.4.2.c Fabrication de la bicouche

Usuellement, les petites vésicules préparées ne comportent pas de marqueur fluorescent. On peut alors les marquer à 2% v/v en utilisant le Di6-ASPBS qui sera décrit au paragraphe suivant, en évaporant d'abord l'éthanol, puis en agitant quelques secondes la suspension. Après 5 à 10 minutes, les vésicules sont introduites dans une cellule qui vient juste d'être construite et sont laissées pendant 20 min au contact de la surface. La fusion a lieu suivant le mécanisme schématisé sur la Fig. 3.8B : une petite vésicule tendue approche de la surface et de par sa tension, elle adhère et éclate sur la surface, formant un patch de bicouche qui va fusionner avec les patches voisins.

Une cellule faisant 20 μL est alors rincée délicatement avec 5×100 μL de tampon sucre/Tris 5mM, pH=8, en aspirant le liquide avec un papier, sans démouiller la cellule. On peut alors contrôler la présence de la bicouche en observant un fond de fluorescence continu et/ou des petits défauts en entrée et sortie de la cellule ou au bord de bulles d'air (voir chapitre "résultats").

La même méthode est appliquée pour avoir une bicouche supportée sur du mica fraîchement clivé, excepté pour la phase de marquage. Sur la Fig. 3.8C on peut voir une image obtenue lors d'une fusion courte (moins de 10 minutes) de vésicules contenant 10% de DOGS-NTA(Ni). Nous reviendrons plus loin sur ce type d'expériences et les renseignements qu'il nous fournit.

3.5 Les microscopies de fluorescence (MF)

De par leur taille les vésicules géantes sont des objets observables avec les microscopies optiques traditionnelles. Comme le montre l'image de microscopie de transmission présente sur la Fig. 3.6, la membrane des vésicules n'a pas une épaisseur suffisante pour être bien résolue par cette méthode : on utilise

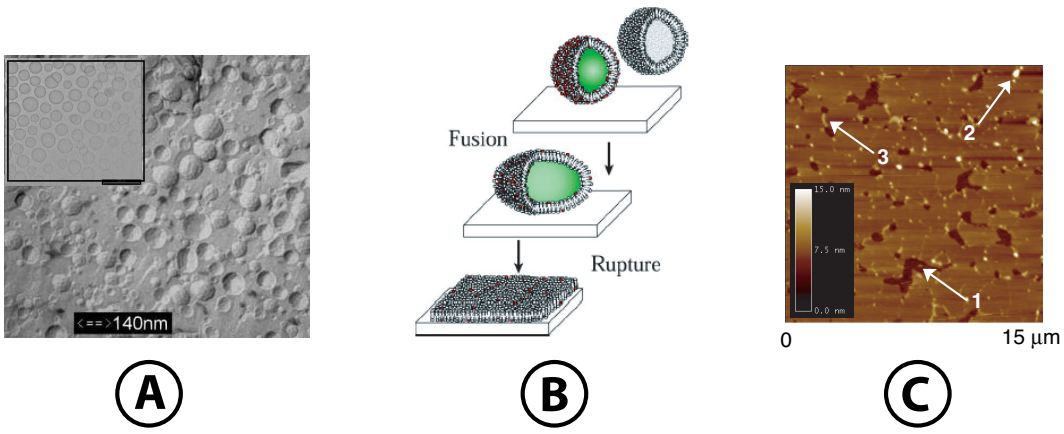

FIG. 3.8 – Fabrication d'une bicouche par fusion de petites vésicules : A : freeze-fracture d'une suspension de petites vésicules ; B : principe de l'adhésion suivie d'une rupture des petites vésicules sur une surface (d'après [Cremer and Boxer, 1999]) ; C : image d'AFM d'une bicouche supportée sur du mica. On peut voir (1) des trous (2) des vésicules ou agrégats subsistant (3) des jonctions de vésicules explosées.

préférentiellement des méthodes permettant d'exploiter le gradient d'indice dû à la différence entre les solutions interne et externe (méthodes de contraste d'indice).

Nous avons choisi d'utiliser une méthode d'observation très facile à mettre en œuvre, et relativement performante pour des objets aussi fins : la microscopie de fluorescence.

Pour résumer très brièvement cette technique : il faut qu'il y ait une *molécule sonde*, qui soit capable d'absorber à une certaine longueur d'onde et de se désexciter en émettant de la lumière à une autre longueur d'onde. Tout le travail est de construire une telle molécule et de l'incorporer dans le système que l'on désire observer, et ensuite d'extraire de la lumière d'excitation la lumière réémise.

Avec un système comme les vésicules géantes et les bicouches supportées, la sonde doit être une molécule lipophile qui va s'insérer dans les membranes : on dit qu'elles vont "marquer" ces dernières. La Fig. 3.9 montre les deux types de molécules portant un groupement fluorescent qui ont été utilisées au cours de cette étude : un lipide portant sur une de ses chaînes un groupement NBD (Sigma) et une sonde amino(styrylpyrydium) non commerciale (Di6-ASPBS, synthétisée par le groupe de M. Blanchard-Desce, Univ. de Rennes). Ces deux types de molécules ont une gamme d'excitation et d'émission proche de celle de la fluorescéine [Sandre, 2000, Moreaux, 2002]. Le Di6-ASPBS a une section efficace beaucoup plus grande que celle du NBD, grâce à l'effet de transfert de charge qui existe de par sa structure. Il est aussi sensible à son environnement proche : il est plus

efficace lorsqu'il est inclus dans une membrane et son spectre d'émission change (*blue shift*).

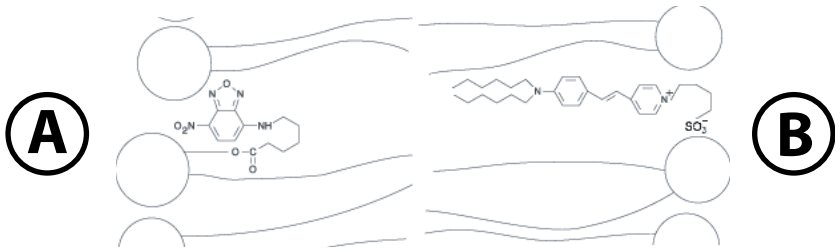

FIG. 3.9 – Colorants fluorescents et leur insertion dans une membrane (d'après [Sandre, 2000]) : A : lipide NBD marqué en queue. Le groupe fluorescent est parallèle à la membrane. Cette sonde doit être incluse lors de la fabrication des vésicules ; B : sonde lipophile Di6-ASPBS. Son groupe fluorescent est perpendiculaire à la membrane. Cette sonde peut être incluse pendant ou après la fabrication des vésicules. Son bleaching est plus lent que celui de A.

Le schéma de principe d'un microscope de fluorescence est présenté sur la Fig. 3.10. Le microscope que l'on utilise est un microscope droit Polyvar MET (Reichert/Leica) équipé d'un objectif à immersion à eau 60×, NA=0,95 (Leica), avec comme source une lampe à vapeur de mercure. L'acquisition des images se fait grâce à une caméra CCD (Cohu 4910) reliée à un magnétoscope S-VHS et un moniteur, avec un système doubleur de signal, relié à un PC équipé d'une carte d'acquisition Scion Corporation. Les images sont numérisées à l'aide de cette carte pour être analysées, manuellement ou grâce à des fonctions de calculs (ou macros) que l'on peut programmer dans un langage proche du Turbo Pascal.

L'éclairage est dit "épiscopique" car les lumières incidentes et émises passent toutes deux à travers l'objectif. Pour le cube de fluorescence que nous utilisons (en correspondance avec les sondes présentées précédemment), le filtre d'excitation est un filtre passe-bande 455-490 nm, le seuil du miroir dichroïque est 500 nm et le filtre d'arrêt est un passe-haut à 515 nm.

3.5.1 Incorporation des colorants dans les membranes

Suivant la nature du colorant, la méthode d'insertion de la molécule dans les membranes est différentes.

Les sondes qui sont des lipides à longues chaînes portant un groupement fluorescent doivent être mélangées à des concentration de l'ordre de quelques % mol/mol aux lipides *avant* la fabrication des vésicules géantes ou non. L'électroformation ou la sonication, ainsi que la conservation des vésicules, doivent alors se faire à l'abris de la lumière pour éviter le phénomène de photoblanchiement des molécules fluorescentes (ou *bleaching* ; ce sont les réactions photochimiques, dues à la lumière

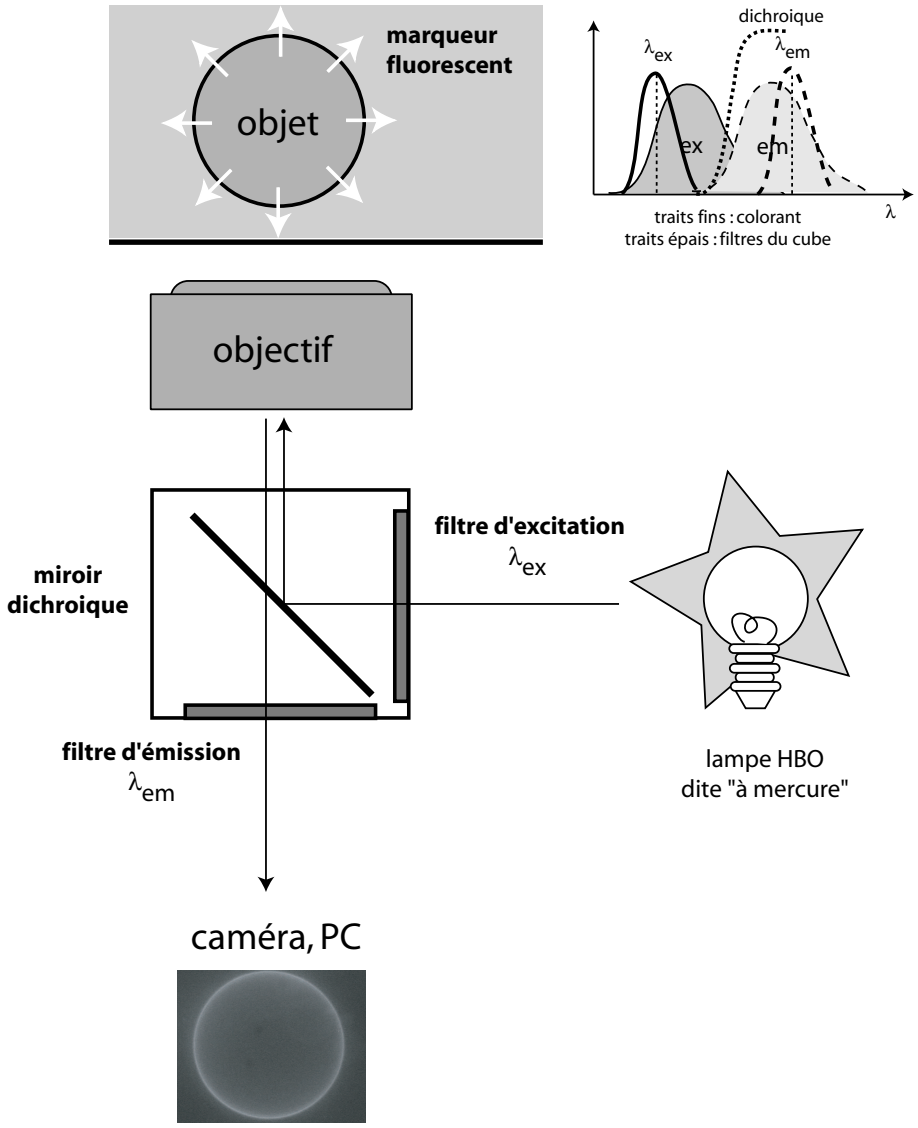

FIG. 3.10 – Principe de la microscopie de fluorescence avec éclairage épiscopique (c'est-à-dire à travers l'objectif). Le petit encart en haut à droite montre les différents spectres des composants et du colorant pour qu'un tel montage puisse fonctionner.

d'excitation ou simplement la lumière environnante, qui conduisent à la dégradation des molécules fluorescentes et qui donc se traduit par une diminution de l'intensité de fluorescence émise au cours du temps).

Pour les sondes lipophiles comme Di6-ASPBS, elles peuvent être inclusent de la même manière, soit, comme elles sont un peu plus solubles que les molécules précédentes du fait de leur chaînes courtes, on peut effectuer un *marquage par perfusion* des vésicules, à partir d'une solution alcoolique de ces molécules (à 560 μM dans EtOH). 1 à 2 % en volume de cette solution sont ajoutés délicatement à une suspension de vésicules à l'interface air/solution, et on laisse l'alcool s'évaporer pendant quelques minutes. Par diffusion en quelques dizaines de minutes, une corolle de vésicules est alors marquée. On ne peut vraiment donner de taux d'incorporation de ce type de colorant avec certitude avec cette méthode (des vésicules peu marquées ou très marquées coexistent). Une méthode évitant de perturber les vésicules avec l'éthanol contenant le colorant est d'introduire le colorant en premier dans un eppendorf et d'évaporer sous flux d'argon l'éthanol (un peu comme lors de la préparation des petites vésicules), puis d'ajouter la suspension de vésicules : les plus marquées sont alors au fond. Une image de vésicule marquée avec Di6-ASPBS par perfusion est présentée sur la Fig. 3.10.

Nous utiliserons cette microscopie de fluorescence comme moyen facile et rapide de "trouver" des vésicules dans un échantillon, pour vérifier la présence d'une bicouche,...

3.5.2 Microscopie de fluorescence à deux photons et par génération de seconde harmonique

La microscopie de fluorescence à deux photons a pour principal avantage d'exciter les molécules de colorant dans un volume focal très restreint : cette microscopie est dite "scannée" et l'efficacité de l'absorption d'énergie par les molécules de colorant est $\propto I^2$. On utilise un laser pulsé infrarouge (TiSa 80 fs 80 MHz) afin d'avoir suffisamment de photons corrélés dans l'espace (qui frappent la même molécule) et dans le temps. Un avantage majeur de ceci est que les molécules de colorant situées hors du spot d'excitation ne sont pas excitées, ce qui fait qu'elles ne sont pas détectées (meilleur rapport S/N) et aussi qu'elles ne subissent pas de photoblanchiment. On ne peut observer un phénomène en temps réel à cause du mode d'acquisition des images.

Le Di6-ASPBS est un colorant spécialement synthétisé pour pouvoir être excité à deux photons. De par sa structure, comportant un groupe accepteur (ammonium) et un groupe donneur (doublet libre de l'azote) séparés par un "bras de levier électronique" qui permet une délocalisation des charges très importante (effet de "push pull", Fig. 3.9B), il peut aussi subir un processus de diffusion non linéaire, appellé "génération de seconde harmonique" (ou SHG). La molécule excitée à une fréquence ω diffuse un photon à la fréquence double 2ω (Fig. 3.11B).

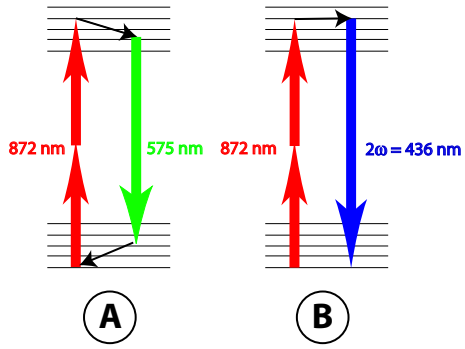

FIG. 3.11 – Principe de : A : la microscopie de fluorescence à deux photons (TPEF) ; B : de la génération de seconde harmonique (SHG). Les longueurs d'onde indiquées sont celles utilisées couramment pour Di6-ASPBS.

La fluorescence à deux photons (ou TPEF) et la SHG sont deux phénomènes pouvant exister simultanément dans un échantillon, si les sondes sont bien choisies : les deux phénomènes se produisent indépendamment. Elles peuvent être découplées au point de vue de la détection, car on peut les séparer spectralement. De plus, la première peut être détectée par réflection, et la seconde se propage dans la direction du faisceau incident, selon deux lobes excentrés par rapport à cette même direction [Moreaux et al., 2001]. La réalisation d'un microscope permettant d'imager à la fois en TPEF et en SHG des objets, ainsi qu'une étude approfondie des propriétés en solution et en membrane du Di6-ASPBS peut être trouvée dans [Moreaux, 2002]. Une image (un peu saturée...) acquise sur ce montage est présentée sur la Fig. 3.12.

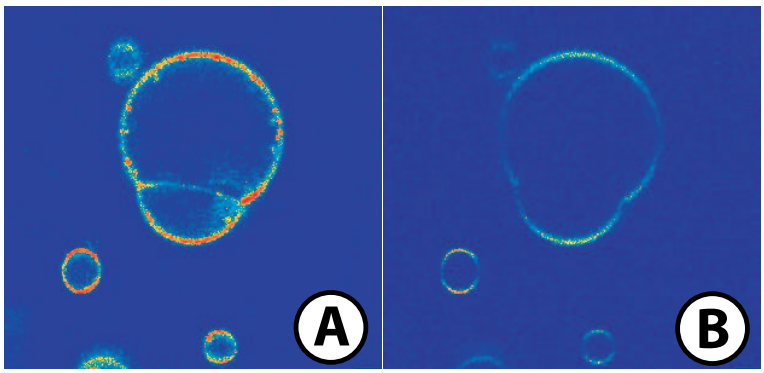

FIG. 3.12 – Deux vésicules biotinylées pontées par de la streptavidine, dont la membrane est marquée avec Di6-ASPBS : A : image de fluorescence à deux photons, toute la membrane des vésicules est imagée ; B : image prise simultanément par génération de seconde harmonique, où la zone d'adhésion, où les molécules de colorant sont proches et tête-bèche, n'apparait pas.

Nous avons voulu exploiter quelques caractéristiques (avec l'aide indispensable de L. Moreaux et T. Pons, Lab. Neurophysiologie et Nouvelles Microscopies, ESPCI) de ces deux types de microscopie.

La SHG présente une caractéristique générale aux phénomènes non linéaires d'ordre pair : elle est sensible à la symétrie locale de ce qui la crée, c'est-à-dire les sondes. C'est une microscopie cohérente, donc les rayonnements émis par deux chromophores interfèrent : s'il y a opposition de phase (molécules tête-bèche et suffisamment près), les interférences sont destructrives, et on n'observe pas de SHG (Fig. 3.12). On peut même utiliser ces interférences pour remonter à des informations de distance entre les membranes [Moreaux et al., 2001], mais la distance où "s'allume" la SHG est de l'ordre de 300 nm (elle est reliée à la taille du spot laser, Fig.3.13).

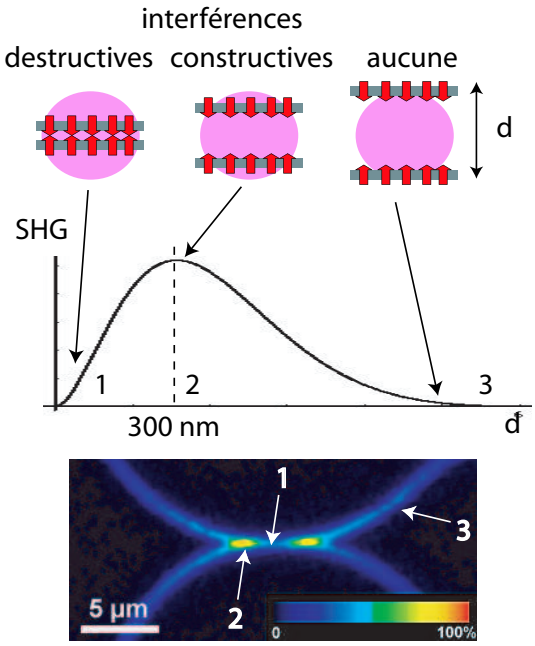

FIG. 3.13 – Utilisation des interférences de la SHG pour mesurer des distances. La zone circulaire représente la zone excitée, et les flèches les molécules de colorants dans les bicouches, orientées. La courbe au centre montre comment varie, en fonction de la distance entre les bicouches, d, l'intensité de la SHG. Les trois différentes configurations sont illustrées par une image de ces interférences (d'après [Moreaux, 2002]).

Un exemple astucieux de l'utilisation de cette sensibilité à la symétrie est celui de l'étude du flip-flop des molécules de Di6-ASPBS : le marquage par perfusion entraîne une incorporation non symétrique des sondes dans les deux feuillets de la membrane, c'est-à-dire majoritairement dans le feuillet extérieur. Les sondes ont donc tendance à rééquilibrer leurs populations par translocation entre les deux feuillets, appelée flip-flop. Ceci entraine une symétrisation du marquage et donc une diminution de la SHG. On a pu ainsi mesurer le temps caractéristique du flip-flop de cette molécule : de l'ordre d'une heure et demi à deux heures dans du DOPC, à 20°C [Moreaux, 2002]. Si l'on veut utiliser cette caractéristique de la SHG pour imager des zones d'adhésions, il faut que le temps total de l'expérience, marquage compris, soit inférieur à ce temps là.

3.6 La microscopie interférentielle

L'autre microscopie qui a été couramment utilisée au cours de cette étude est une méthode d'interférométrie bien connue à l'échelle macroscopique (franges du coin d'air, anneaux de Newton) : ici, les deux interfaces créant les interférences sont la surface d'un objet de taille microscopique et une lamelle de verre dont il est proche. On la nomme microscopie interférentielle en réflection (ou RIM pour *Reflection Interference Microscopy*) ; depuis certaines améliorations et une remise au goût du jour par l'équipe de E. Sackmann [Radler and Sackmann, 1993], on un ajoute un "C" (RICM), pour *contraste*. Nous allons en décrire ici les bases et les applications principales. C'est une technique très largement utilisée, en biologie, en science du mouillage,... car facile en mettre en œuvre et combinable à loisir avec la microscopie de fluorescence, avec du transfert de fluorescence (ou FRET)...

3.6.1 Principe et réalisation pratique

La microscopie interférentielle s'appuie sur l'illumination d'un objet proche d'une surface avec une lumière monochromatique (usuellement l'une des raies du mercure, le plus souvent celle à 546,1 nm – raie verte). Si la lumière est suffisamment cohérente, on observe des franges d'interférence (pour un objet sphérique, on observe des anneaux), dont la position et le contraste permettent de remonter au profil de distance entre la surface de l'objet et la lamelle en regard.

Dans notre cas, il s'agit d'une vésicule au voisinage d'une lamelle de verre décorée ou non. Le principe général de cette microscopie et une image de vésicule au voisinage d'une surface sont présentés sur la Fig. 3.14. Cette microscopie s'effectue sur le même montage que la microscopie de fluorescence (à un photon) décrite précédemment. Il suffit de remplacer le cube de fluorescence par un filtre passe bande étroit à 546 nm, de fermer le diaphragme de champ et de diminuer l'intensité incidente. On focalise alors sur la surface. On passe ainsi continuement d'une vésicule que l'on a trouvé et observé en fluorescence à l'observation de sa "zone de contact" avec la surface au voisinage de laquelle elle se trouve.

3.6.2 Observations

Des vésicules géantes sédimentant au voisinage d'une surface de verre, traitée ou non, présentent des signatures très différentes en microscopie interférentielle suivant leur état de tension ainsi que suivant leurs interactions avec la surface.

Sur la Fig. 3.15 sont présentés quatre cas de figure, qui seront très souvent rencontrés au cours des différentes études réalisées ici. On peut facilement différencier les vésicules tendues ou molles, à l'aspect général des franges d'interférences : de beaux anneaux circulaires, d'intensité fixe dans le temps, dans le cas tendu (Fig. 3.15A) ; des franges d'intensité fortement changeante dans le temps (Fig.

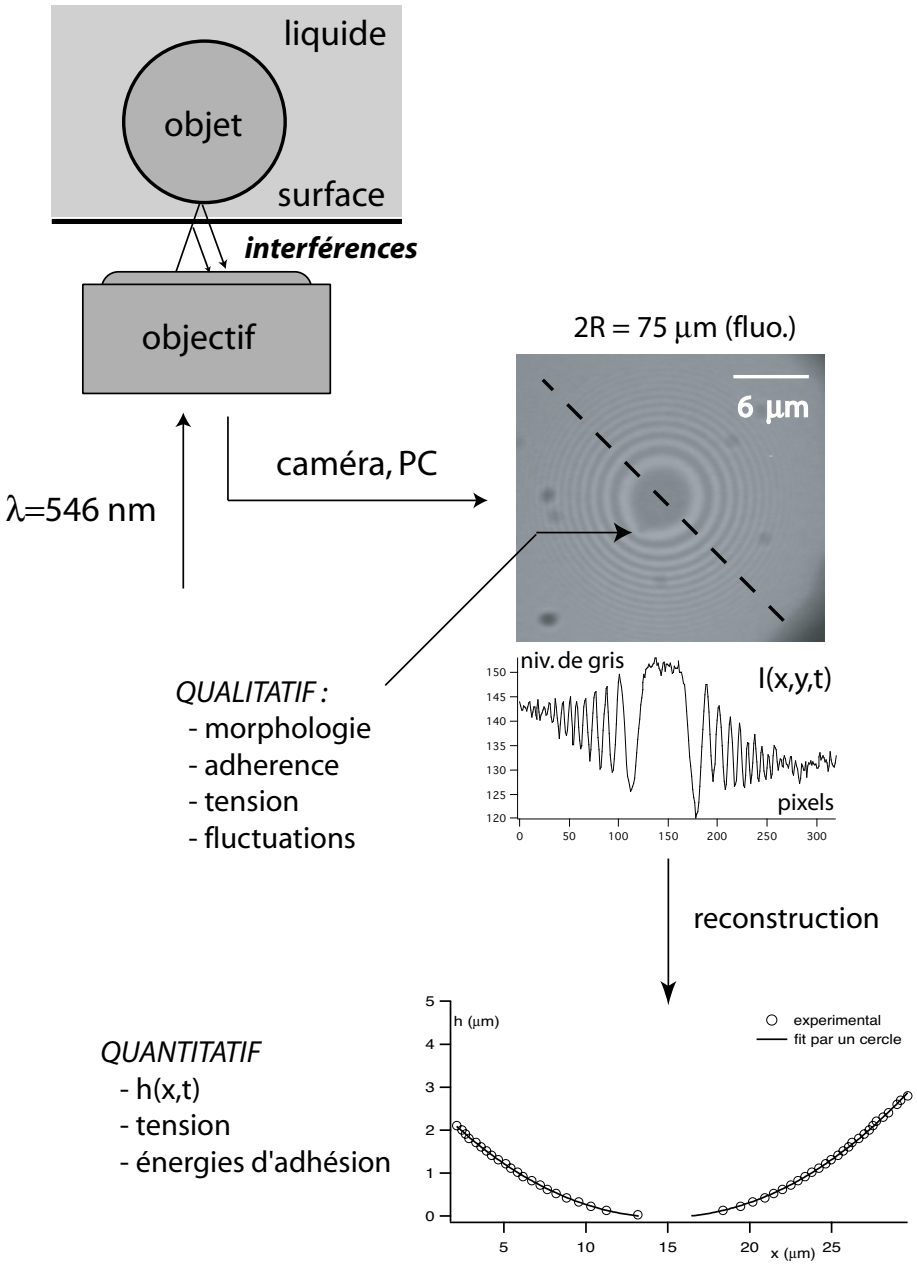

FIG. 3.14 – Principe de la microscopie interférentielle et potentialités.

3.15C). Si l'on effectue une moyenne sur plusieurs images dans le premier cas, on améliore la qualité des franges vues, alors que dans le second cas, on obtient un niveau de gris "brouillé" par la superposition, à la même position, de niveaux de gris différents. Ensuite, l'état d'adhérence est aussi facilement observable : un ou plusieurs zones de niveau de gris "moyen" sont présentes et sont, dans le cas d'une vésicule fluctuante, bien mieux vues sur une image moyenne (effectuée sur quelques images), leur niveau de gris ne changeant pas au cours du temps (Fig. 3.15A et B : le niveau de gris central sur B est "moyen" par rapport à celui sur A ; Fig. 3.15C et D : les points adhérents sont visibles au milieu de franges "brouillées").

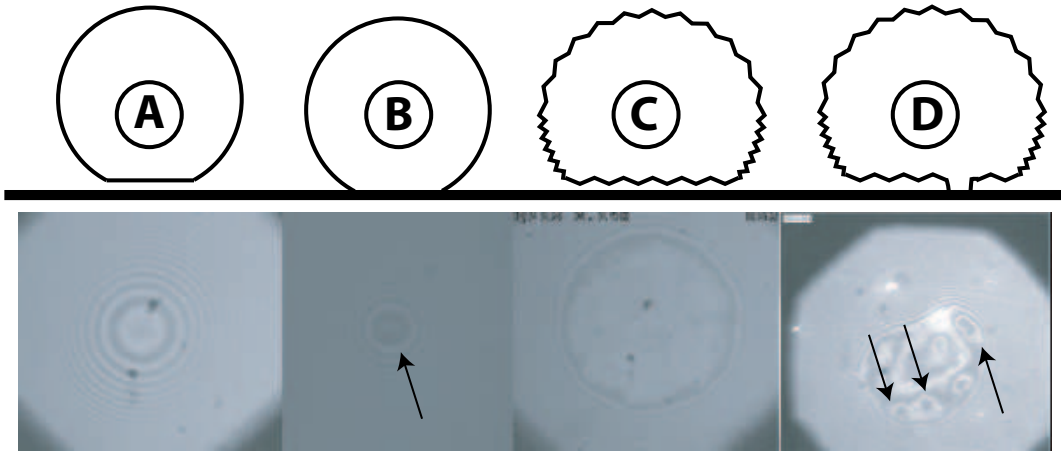

FIG. 3.15 – Vésicules géantes observées en microscopie interférentielle, ainsi que le schéma correspondant à chaque situation : A : vésicule tendue, mais n'adhérent pas/peu ; B : vésicule tendue avec une zone d'adhésion forte au centre de la figure d'interférences (flèche) ; C : vésicule fluctuante au voisinage de la surface ; D : vésicule fluctuante, adhérant par de petites zones (flèches).

3.6.3 Reconstruction du profil d'une vésicule

La formation d'une image en microscopie interférentielle est schématisée sur la Fig. 3.16. On envoie sur l'objet au voisinage d'une surface une lumière monochromatique (I_0, $\lambda = 546{,}1$ nm). En premier lieu, cette lumière est réfléchie à l'interface entre la lamelle (ou substrat) et la solution qui entoure les vésicules. On obtient ainsi un rayon I_1. La seconde interface qui va réfléchir le faisceau incident est celle entre la solution et la membrane de la vésicule. On a alors un rayon I_2 qui va pouvoir interférer avec I_1. La figure d'interférence produite s'observe alors en focalisant au niveau de la couche de liquide intercalée.

Comme présenté sur la Fig. 3.14, on peut alors, à partir de l'analyse en intensité des franges de la figure d'interférence remonter au profil de distance entre la

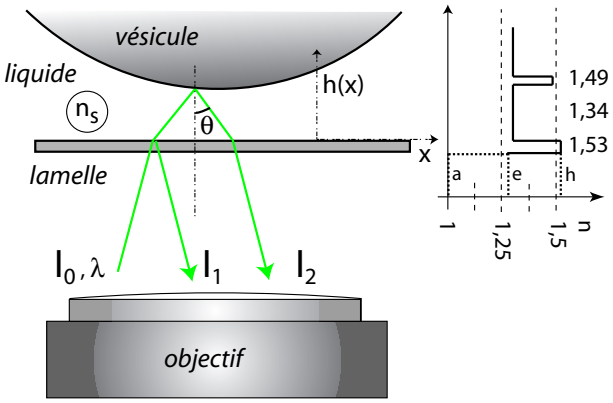

FIG. 3.16 – Principe de formation d'une image par microscopie interférentielle en réflexion : une lumière monochromatique est envoyée sur un objet au voisinage d'une surface. Il y a formation d'interférences. En encart, profil d'indice après la traversée de la lamelle ; avant la lamelle, l'indice dépend du type d'objectif utilisé (à huile (h, $n = 1,5$), eau (e, $n = 1,3$) ou air (a, $n = 1$)).

vésicule et la surface, avec un modèle simple de superposition des ondes réfléchies. Ceci se fait bien pour des géométries simples de vésicules (au voisinage d'une zone d'adhésion, ou pour une vésicule tendue et donc sphérique).

En effet, le déphasage géométrique entre I_1 et I_2 s'écrit (avec les notations introduites dans la Fig. 3.16) :

$$\phi = \frac{2\pi}{\lambda} \times 2n_s h(x) \times \cos\theta$$

en considérant que l'angle θ est petit. Comme l'indice de la membrane (de l'ordre de 1,49) est supérieur à celui de la solution qui entoure la vésicule (entre 1,33 (eau) et 1,47 (glycérol pur)), on doit prendre en compte un déphasage supplémentaire de π.

On obtient alors que l'intensité $I(x)$ résultant de la superposition des deux ondes réfléchies est donnée par :

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

avec $i = \lambda/2n_s$ l'interfrange ($\sim$ 200 nm dans nos conditions expérimentales). On peut donc accéder via la variation sinusoïdale de l'intensité des franges d'interférences à la hauteur $h(x)$ de l'objet par rapport à la surface. La zone centrale apparait d'un niveau de gris sombre et uniforme (voir l'image d'une vésicule tendue présentée sur la Fig. 3.14) : il existe une couche d'eau intercalée (un "coussin" [de Gennes et al., 2003, Puech and Brochard-Wyart, 2003]), dont l'épaisseur dépend des interactions entre la vésicule et la surface, et de la tension de la membrane.

Ainsi, après avoir imagé une vésicule en microscopie interférentielle, on extrait, à l'aide d'un logiciel de traitement d'image le profil d'intensité (niveau de gris codé sur 256 valeurs *vs.* x en pixels) sur une section de la figure d'interférence

(Fig. 3.14). On peut alors, connaissant la longueur d'onde d'illumination, λ, et l'indice du milieu dans lequel sont plongées les vésicules, n_s, remonter au profil $h(x)$ à l'aide d'une macro de reconstruction de proche en proche, à partir des positions des extrema d'intensité, et de la monotonie supposée du profil. Cette fonction de calcul (sous M$Excel) a été programmée par J. Clain au sein de l'équipe Brochard.

On obtient alors un ensemble discret de points qui permettent de tracer $h(x)$, comme présenté sur la Fig. 3.14. La résolution en x est d'origine optique (limite de diffraction), soit $\pm 0,2$ μm. Celle sur $h(x)$ provient de différentes sources (ouverture angulaire du faisceau, capacité à coder les niveaux de gris,...) et peut être estimée à quelques nm. Entre deux extrema de niveau de gris des franges, on a un changement de hauteur de $i/2$ soit de l'ordre de 100 nm. Ainsi, si le niveau de gris central d'une vésicule tendue passe de noir (Fig. 3.14) à blanc, alors cette dernière s'est éloignée de la surface de 100 nm. Cela permet de mesurer des distances relatives ou des changements de distance entre la vésicule et la surface, mais pas, tant qu'elle n'est pas adhérente, de donner des élévations absolues au dessus de la surface.

Nous verrons comment à partir de $h(x)$ obtenu on peut extraire la tension de la membrane ainsi qu'un énergie d'adhésion, due aux interactions entre cette dernière et la surface au voisinage de laquelle elle se trouve.

3.6.4 Comment jouer sur le contraste des franges

Le contraste des franges dans le modèle simplifié utilisé ici peut être exprimé en fonction des extréma d'intensité de celles-ci :

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

L'écriture des intensités réfléchies, en fonction des coefficients de réflexion de Fresnel (qui dépendent des indices optiques des différents milieux) montre que C est augmenté lorsque l'on recouvre la surface du verre avec une couche diélectrique (du fluorure de magnésium (MgF_2), d'indice 1,39, par exemple [Radler and Sackmann, 1993]) : on diminue l'intensité réfléchie I_1, car on rapproche l'indice de la lame de celui de la solution entourant les vésicules. Ainsi, on fait artificiellement tendre I_1 vers I_2. Le principal problème est que ce traitement rend aussi la surface fortement adhésive pour les vésicules... [Manneville, 1999].

Une autre méthode, appelée technique "Antiflex" repose sur l'ajout d'une lame quart d'onde au niveau de l'objectif, ainsi que de deux polariseurs de directions croisées, un sur le trajet du faisceau incident, l'autre sur le trajet de la lumière réfléchie [Radler and Sackmann, 1993]. Cela permet d'introduire un contraste supplémentaire (le "C" de RICM), en éliminant la lumière réfléchie directement par la lamelle et les autres réflexions parasites : la lumière polarisée linéairement après traversée du premier polariseur, et polarisée circulaire-

ment par la lame quart d'onde, puis subit un retournement de polarisation lors de sa réflexion par la vésicule. Seuls ces rayons, ayant interféré avec la lumière réfléchi, pourront alors traverser le deuxième polariseur, après retraversée de la lame quart d'onde qui donne alors une lumière polarisée à la perpendiculaire de la lumière incidente [Radler and Sackmann, 1993]. Cette technique est un peu chère, et peut être avantageusement remplacée par un traitement d'image "on-line" (type boitier Hamamatsu de pré-processing, qui effectue une soustraction du fond) [Clain, 2003].

Au cours de l'étude présentée ici, nous n'avons pas utilisé de traitement de surface de type diélectrique, ni utilisé la technique Antiflex. Nous nous sommes contentés de faire de la microscopie interférentielle classique, étant donné que nous avions déjà des images de relativement bonne qualité.

3.6.5 Tension et énergie d'adhésion

Lorsque l'on travaille avec des vésicules libres, pour regarder des interactions entre vésicules ou entre une vésicule et une surface, il existe une inconnue de taille qui est la tension de la membrane. Qualitativement, à partir d'une image de microscopie DIC ou de fluorescence, on peut dire si la vésicule est très flasque ou au contraire très tendue, selon qu'elle présente des fluctuations thermiques de grande amplitude ou une forme très sphérique. On peut qualitativement gonfler ou dégonfler une vésicule en ajustant de manière *ad hoc* l'osmolarité de la solution externe. On ne contrôle aucunement la tension de la membrane, à la différence des expériences de micropipettes présentée en introduction [Evans, 1991].

Dans les paragraphes qui vont suivre vont être décrites deux manières d'estimer la tension d'une vésicule au voisinage d'une surface, selon qu'elle est adhérente ou juste "posée" sur cette dernière. D'autres méthodes, utilisant une analyse des modes de fluctuation observés en microscopie DIC ne seront pas détaillées ici et pourront être trouvées dans [Girard, 2003, Pécréaux, 2003, Solon, 2003]. On détaillera aussi comment obtenir une estimation de l'énergie mise en jeu lors de l'adhésion d'une vésicule sur un substrat.

3.6.5.a Vésicule adhérente : méthode "λ"

Au voisinage d'une zone d'adhésion (Fig. 3.17A), la reconstruction à partir d'une figure d'interférences permet d'accéder au profil détaillé près de la ligne de contact (Fig. 3.17B).

Dans [Albersdörfer et al., 1997] est proposé d'analyser un tel profil en termes d'équilibre mécanique de la ligne de contact de la zone d'adhésion de la vésicule.

Le profil près de la ligne de contact n'est pas un coin caractérisé par l'angle de contact θ. L'énergie de courbure de la membrane s'oppose à une discontinuité de la pente sautant de 0 à θ à la ligne. Le profil est adouci, et l'angle passe de 0 à θ sur une longueur caractéristique, λ, que l'on va calculer.

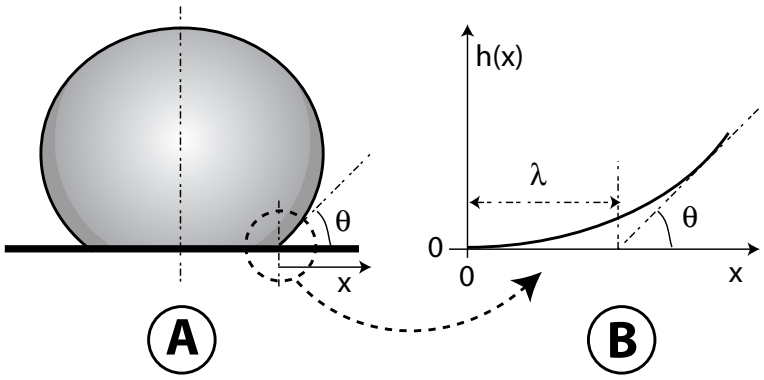

FIG. 3.17 – Vésicule en adhésion forte sur un substrat : A : vue schématique de l'adhésion ; on note l'analogie avec le comportement d'une goutte peu mouillante ; B : profil au voisinage de la zone d'adhésion, reconstruit d'après l'image de microscopie interférentielle ; y sont présentés la longueur de coupure λ et l'angle de contact θ (adapté de [Albersdörfer et al., 1997]).

Soient σ la tension de la membrane, θ l'angle de contact défini sur la Fig.3.17 et W l'énergie d'adhésion par unité de surface, c'est-à-dire le travail à fournir pour détacher une unité de surface de la membrane de la surface. L'équilibre des forces capillaires s'écrit alors, par analogie avec la loi de Young-Dupré

$$W = \sigma(1 - \cos\theta)$$

Si on se limite aux cas des angles faibles ($\theta \leq 20°$), on peut alors écrire que $W \simeq \sigma\theta^2/2$. θ se relie, par un argument géométrique, à la taille de la zone d'adhésion, a, et au rayon de la vésicule, R_0, par $\theta R_0 \simeq a$. Le profil s'obtient en minimisant l'énergie de bord. Dans un modèle simplifié à une dimension, comme schématisé Fig. 3.17B [Albersdörfer et al., 1997], on a :

$$\frac{\Delta G}{2\pi a} = \int_0^\infty \left(\frac{1}{2}\kappa \frac{d^2h}{dx^2} + \frac{1}{2}\sigma \left(\frac{dh}{dx} \right)^2 \right) dx - \int_{-\infty}^0 W(x)dx$$

On minimise alors cette énergie, et le profil près de la zone de contact est déterminé par

$$\sigma \frac{d^2h}{dx^2} - \kappa \frac{d^4h}{dx^4} = 0$$

Cette équation fait intervenir une longueur caractéristique $\lambda^2 = \kappa/\sigma$. Pour $\kappa \simeq 10$ kT, on a $\lambda \simeq$600 nm pour une tension $\sigma = 10^{-7}$ N/m (resp. 60 nm pour 10^{-5} N/m).

Une solution satisfaisante est obtenue avec

$$\begin{cases} h(x) & = \theta x - \theta\lambda(1 - \exp(-x/\lambda)) \quad (x > 0) \\ \\ h(x) & = 0 \qquad\qquad\qquad\qquad\qquad\quad (x \leq 0) \end{cases}$$

car le profil est alors linéaire pour x grand, et $h(x) = 0$ au niveau du contact.

On a donc deux méthodes permettant d'extraire θ et λ : (i) on ajuste un cercle de même rayon que la vésicule sur le profil déterminé expérimentalement et on en déduit graphiquement ces deux grandeurs qui correspondent à la déviation à la sphère due à l'adhésion [Sandre, 2000] ou (ii) on ajuste le profil expérimental avec l'équation donnée ci-dessus, en vérifiant que la valeur obtenue pour le rayon de la vésicule est compatible avec celle mesurée.

De λ on en tire alors σ, si l'on a une valeur assez correcte de κ (par exemple, par mesure à l'aide de pipettes). On rappelle ici que pour des lipides fluides courants (type DOPC), on a $\kappa \sim 10$kT. Ainsi, en ayant θ et σ, on est capable d'estimer la valeur de l'énergie d'adhésion W de la vésicule sur le substrat.

Les valeurs de σ et de W obtenues par cette méthode sont de l'ordre de 10^{-7} à 10^{-4} N/m et de 10^{-8} à 10^{-5} J/m^2 respectivement, pour le couple d'adhésion streptavidine/biotine *au voisinage de points d'adhésion* [Albersdörfer et al., 1997]. Pour le couple peptide RGD /intégrine, l'énergie W est de l'ordre de 10^{-7} à 10^{-6} J/m^2 [Hu, 2001, Boulbitch et al., 2001]. Pour la protéine homophilique csA (contact site A), l'énergie estimée varie entre 10^{-9} à 10^{-6} J/m^2 suivant la concentration utilisée (plus elle est élevée, plus W est grande)[Kloboucek et al., 1999].

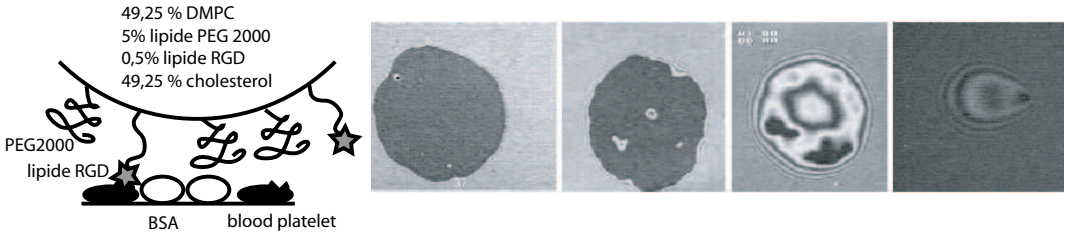

FIG. 3.18 – Morphologies de zones de contact entre une vésicule portant des lipides RGD, qui reconnaissent spécifiquement des "blood platelets" adsorbés sur la surface du verre, d'après [Hu, 2001]. Elles contiennent la même quantité de clefs, ainsi que des lipides PEG (la composition des vésicules est résumée sur le schéma), et la quantité de "blood platelets" adsorbés a été variée en changeant la concentration de la solution d'incubation des surfaces. De gauche à droite : 100 μg/mL, 1 μg/mL, 0,1 μg/mL et 0,01 μg/mL. La surface entre les protéines est passivée avec de la BSA pour prévenir les interactions non spécifiques.

De plus les morphologies des zones de contact sont très différentes suivant la concentration des ligands et récepteurs, ainsi que suivant la présence ou non de lipides polymères introduisant une répulsion stérique. Pour de faibles adhésions (ou des ligands en faible concentration), la zone de "contact" entre la vésicule portant les clefs et la surface portant les serrures présente de petits points d'adhésion, immobiles au milieu des fluctuations de la membrane, ou des pincements de la bordure [Hu, 2001, Kloboucek et al., 1999]. Lorsque la concentration augmente, de

tels points d'adhésion peuvent être plus grands, et évoluer au cours du temps vers une seule et unique zone adhérente [Albersdörfer et al., 1997]. Une séparation de phase en présence des lipides polymères a été proposée comme moyen de recréer des îlots d'adhésion similaires aux zones focales d'adhésion observées avec des cellules vivantes adhérant sur un substrat : l'adhésion entre deux molécules déforme la brosse de polymère, induisant par là des interactions attractives entre couples clef/serrure.

3.6.5.b Vésicules non adhérentes : méthode "$\vec{g}$ "

On utilise la gravité pour que les vésicule se posent sur la surface. En l'absence d'adhésion, la vésicule est sur un coussin d'épaisseur e_0 discuté au Chapitre 4. En présence d'adhésion, ce coussin sera finalement instable et des zones de contact adhésif vont se former et grandir.

On ne peut utiliser la méthode "λ" dans le cas de figure où la vésicule n'est pas adhérente : cela conduit pour des vésicules tendues à estimations de valeurs de tension 100 fois trop petites (de l'ordre de $10^{-8;-7}$ N/m, ce que l'on attribue généralement plutôt à des vésicules très fluctuantes [Pécréaux, 2003]).

En étudiant la déformation de la vésicule due à son poids avant toute adhésion, posée sur son coussin, on peut mesurer directement σ. Cette méthode, que l'on nommera "$\vec{g}$" pour "sous l'effet de son propre poids" est l'objet du Chapitre suivant.

Chapitre 4

Mesure de la tension de vésicules lourdes

Une méthode simple pour mesurer la tension σ d'une vésicule posée sur une surface est inspirée de la capillarité : la vésicule se déforme sous l'effet de son propre poids [Puech and Brochard-Wyart, 2003], comme une gouttelette d'eau dans de l'huile posée sur une surface en mouillage nul ($\theta_E = 0$). Le contraste de densité $\Delta\rho$ entre la solution encapsulée et la solution externe ($\sim$ 1–10 kg/m^3) va fixer la force qui s'exerce sur la vésicule..

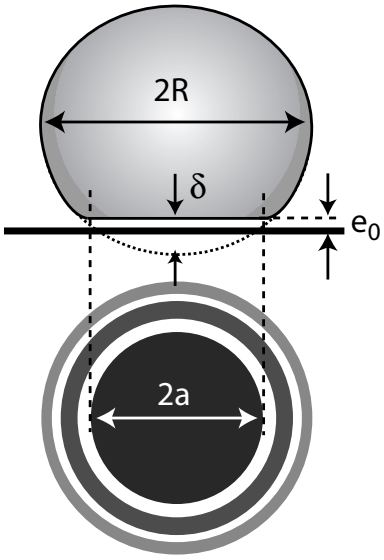

FIG. 4.1 – Vésicule posée sur un substrat, et écrasant un coussin de liquide d'épaisseur e_0 : une vue en fluorescence ou en DIC permet de mesurer R, le rayon de la vésicule, et une vue en microscopie interférentielle donne a, le rayon du méplat formé à cause de la pression imposée par le contraste de densité $\Delta\rho$ entre l'intérieur et l'extérieur de la vésicule. δ est la déformation par rapport à la sphère (enfoncement).

4.1 Vésicules lourdes posées : détermination de la tension

Sous l'effet de son poids, corrigé de la pression d'Archimède, la vésicule s'aplatit. Pour calculer la taille du méplat, on va assimiler la forme de la vésicule à une sphère tronquée.

L'abaissement de son centre de gravité, δ, est relié au rayon a de la zone déformée

$$a^2 = 2R\delta \ .$$

Si R_0 est le rayon de la sphère avant qu'elle ne se dépose sur la surface, et R celui après déformation, la conservation du volume donne

$$R = R_0 \left(1 + \frac{\theta^4}{16}\right) \ ,$$

avec, d'après la géométrie du système, $\theta = \dfrac{a}{R}$. L'augmentation de surface est alors

$$\Delta\mathcal{S} = 4\pi R_0^2 \left(1 - \frac{\theta^4}{16}\right) - 4\pi R_0^2 = 4\pi R_0^2 \frac{\theta^4}{16} \ .$$

Le gain d'énergie gravitationelle s'écrit alors

$$\mathcal{F} = 4\pi R_0^2 \frac{\theta^4}{16} \times \sigma - \frac{4}{3}\pi\Delta\rho g R_0^3 \times \delta \simeq \pi\sigma\delta^2 - \frac{4}{3}\pi\Delta\rho g R_0^3 \times \delta \ .$$

En minimisant $\mathcal{F}(\delta)$, on tire que

$$\delta = \frac{2}{3}\frac{\Delta\rho g}{\sigma} R_0^3 \ .$$

Enfin, en posant $\mathcal{K}^2 = \dfrac{\Delta\rho g}{\sigma}$ et $\delta = \dfrac{1}{2}\dfrac{a^2}{R_0}$, on arrive à $a^2 = \dfrac{4}{3} R_0^4 \mathcal{K}^2$. Ainsi, la mesure de a et R permettent d'estimer la tension σ via

$$\sigma = \frac{4}{3}\Delta\rho g \frac{R_0^4}{l^2}$$

En fait le profil n'est pas celui d'une sphère tronquée, mais plus lisse et le préfacteur numérique n'est pas exact. Les lois d'échelles sont valables, et la constante numérique est $\simeq 1$. On peut alors estimer une valeur de σ via

$$\begin{cases} \sigma & \simeq \Delta\rho g \dfrac{R_0^4}{a^2} \\ \\ a & = (\mathcal{K} R_0) \times R_0 \end{cases}$$

Usuellement, $a \sim \mu$m et $\delta = (\mathcal{K}R_0)^2 \times R_0 \sim 0,1\ \mu$m.

En fait la vésicule repose sur un coussin de liquide d'épaisseur e_0, représenté sur la Fig.4.1. Pour qu'une telle discussion ait un sens, il faut que $e_0 \ll \delta$[1].

Si les vésicules reposant sur la surface avaient une tension rigoureusement nulle, e_0 serait donnée par l'équilibre entre la pression hydrostatique

$$\Delta p \simeq 2\Delta\rho g R$$

et la pression due aux interactions de Helfrich

$$\left.\frac{\partial F}{\partial h}\right|_{h\simeq e_0} \simeq \frac{(kT)^2}{\kappa e_0^3} \quad .$$

Dans ce cas là, la valeur de e_0 serait de l'ordre du micron. En pratique, la tension d'une vésicule géante (à cause de cisaillements lors des manipulations ou bien à cause d'un léger gonflement osmotique) n'est pas nulle. Même si elle est relativement faible, elle supprime les fluctuations de large amplitude de la membrane.

Les interactions de Helfrich sont alors gommées au dessus de $h_0 = \sqrt{\frac{kT}{\sigma}}$ (pour une tension de 10^{-6} N/m, $h_0 \sim 1000$ Å). L'épaisseur du coussin de liquide est alors donnée par l'équilibre des pressions précédemment écrit, mais où l'on utilise la forme des interactions d'Helfrich en présence d'une tension faible [Helfrich and Servuss, 1984]

$$\frac{A}{h_0^3}\exp\left(-\frac{h}{h_0}\right) = 2\Delta\rho g R \quad ,$$

ce qui conduit à $e_0 \simeq h_0$, en négligeant les termes logarithmiques correctifs.

Les forces de surface, même très faibles, sont capables de contrecarrer l'action de la gravité car le module de courbure de la membrane est très faible (c'est un objet très mou) : la vésicule est donc sphérique, sauf au voisinage de la surface, où elle est déformée, avec un raccord ressemblant à celui d'une goutte non mouillante ($\theta \sim 180°$), à cause de son poids [Mahadevan and Pomeau, 1999].

4.2 Résultats

Des vésicules géantes contenant 1% de lipide Cap-Biotine dans une matrice fluide de DOPC sont électroformées dans un mélange sucrose/glucose 300 mOsm, et resuspendues (après marquage avec Di6-ASPBS) dans une cellule d'observation dont le verre n'a subi aucun traitement particulier et contenant du glucose 300 mOsm.

[1] Pour une vésicule de 20μm de rayon, ayant une tension de 10^{-6} N/m, on trouve que $e_0 \simeq$ 0,1μm et $\delta \simeq 0,5\mu$m

On les laisse reposer au voisinage de la surface de verre et on image la population de vésicules une par une. On enregistre une image à l'équateur en microscopie de fluorescence, qui permet de mesurer le rayon de la vésicule R, ainsi qu'une image de microscopie interférentielle, qui permet de mesurer l'extension de la zone déformée sous l'action de la gravité, a (ici, $\Delta\rho \sim$ 6-7 kg/m^3). On peut ainsi estimer à l'aide des équations précédentes la tension de la vésicule.

4.2.1 Sur une population de vésicules

Dans un premier temps, comme le montre la Fig. 4.2, on peut observer dans un même échantillon deux populations distinctes de vésicules. Une partie d'entre elles, majoritaire, présente un aspect tendu et l'on observe pas de fluctuations ni de la membrane vue en fluorescence, ni de la zone de contact avec la surface. Ces vésicules ont une tension qui varie entre 10^{-7} et 10^{-4} N/m. Plus la vésicule est grosse, plus son poids peut la déformer et la mettre légèrement sous tension. On observe que la tension mesurée varie approximativement comme le carré du rayon de la vésicule[2]. La deuxième sous-population est constituée de vésicules très molles, ayant de larges fluctuations thermiques. En mesurant toute la zone de contact (qui fluctue) pour obtenir une valeur de a, on observe que leur tension est très faible (de l'ordre de 10^{-7} N/m, ce qui semble cohérent avec le fait qu'elles aient de larges fluctuations, et relativement indépendante de leur taille.

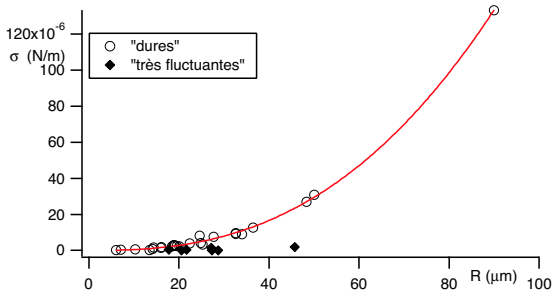

FIG. 4.2 – Mesure de la tension d'une population de vésicules reposant sur une lamelle de verre. Deux populations sont observées : des vésicules n'exhibant pas de fluctuations, pour lesquelles la tension varie comme $\sim R^2$, et des vésicules très fluctuantes dont la tension est indépendante de la taille.

4.2.2 Dégonflement doux d'une vésicule

En laissant la cellule d'observation ouverte, on peut effectuer un changement doux d'osmolarité du milieu externe aux vésicules : l'eau s'évaporant, on concentre

[2]D'après [Rossier, 2003], une vésicule soumise à un flux de vitesse U subit une mise sous tension $\sigma \sim \eta U$. Cette mise sous tension peut perturber fortement les vésicules, comme décrit dans [Abkarian, 2002]. Si cela est du à la sédimentation, on a, pendant celle-ci, $\sigma \sim \eta U R \simeq \Delta\rho g R^3$, ce qui entraîne que $\sigma \sim R^2$.

la solution extérieure en sucre, ce qui entraîne le passage d'eau de l'intérieur de la vésicule vers l'extérieur (Fig. 4.3A). Ce phénomène est relativement rapide (l'eau a un coefficient de perméabilité de l'ordre du μm/sec [Bernard et al., 2002]). Ce changement quasistatique d'osmolarité perturbe peu la vésicule, qui se "ramollit" : elle récupère de l'excès de surface car son volume diminue. On peut estimer l'osmolarité après un temps t d'observation en mesurant le volume de liquide restant dans la cellule d'observation[3].

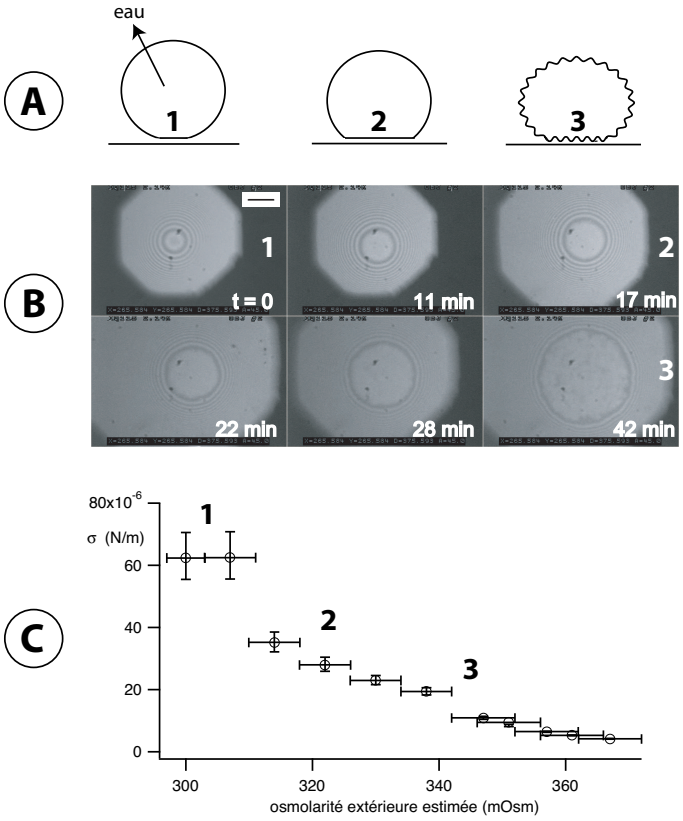

FIG. 4.3 – Variation de la tension mesurée par microscopie interférentielle pour une vésicule en train de se dégonfler doucement (la cellule d'observation laissée ouverte permet à la solution externe de s'évaporer doucement et de se concentrer en sucre) – A : schéma du dégonflement ; B : la zone de contact s'agradit au fur et à mesure que la vésicule se dégonfle, et des fluctuations de grande amplitudes apparaissent ; C : tracé de la tension en fonction de l'osmolarité estimée à partir de la variation du volume de solution dans la cellule au cours du temps.

On peut ainsi, en suivant la variation de l'image en microscopie interférentielle d'une vésicule, initialement tendue, suivre l'abaissement de sa tension lors de ce phénomène (Fig. 4.3B). Tout d'abord, la zone déformée grandit (Fig. 4.3B1 à 2) mais reste de teinte homogène, puis, après une trentaine de minute, elle se met aussi à exhiber de très fortes fluctuations de niveau de gris (Fig. 4.3B3), ce qui nous indique que les fluctuations de hauteur (donc de la membrane) dépassent la centaine de nm. On mesure alors la tension de la vésicule en fonction du temps, et on peut convertir cela en tension en fonction de l'osmolarité extérieure (Fig. 4.3C). La tension décroit comme prévu, et se stabilise à une valeur voisine de celle observée pour les vésicules très fluctuantes du cas précédent.

[3]La cellule a une forme de rectangle, et on mesure à l'aide d'un réglet la longueur de liquide restant

4.2.3 Mise sous tension photoinduite

Des résultats précédemments publiés [Sandre, 2000] ont montré que l'on peut mettre sous tension des vésicules dont la composition est proche de celle que nous utilisons, et ce de manière très simple : en les éclairant avec la lumière utilisée pour exciter le colorant inclu dans la membrane (Fig. 4.4A).

Une vésicule, que l'on a choisi très fluctuante initialement, est mise sous tension par "application" de cette lumière en continu. Pour ce faire, on a introduit des vésicules dans une cellule, que l'on a laissée ouverte environ 15 min afin de profiter du dégonflement osmotique précédemment étudié. Puis la cellule est fermée, et on choisit la vésicule adéquate. Après avoir imagé sa zone de contact initialement et mesuré son rayon, on l'illumine fortement et en continu, en prenant des images à des instants choisis de sa zone de contact (Fig. 4.4B). On peut ainsi suivre la variation de sa tension au cours du temps, au fur et à mesure qu'elle se met sous tension. La Fig. 4.4C montre cet augmentation de la tension, de 10^{-7} à 10^{-5} N/m. On observe les phénomènes inverses de ceux décrits précédemment : disparition des fluctuations, puis réduction de la zone déformée. Aucun pore transitoire n'est observé, étant donné que l'on se trouve en milieu peu visqueux.

On peut aussi suivre l'intensité de fluorescence de la membrane au cours du temps, ainsi que son rayon. On observe (représenté sur la Fig. 4.4D en unités réduites) que lorsque la vésicule commence à se tendre, son rayon diminue et le colorant commence à subir un photoblanchiement notablement. Tout comme dans [Sandre, 2000] se pose la question de comment cette mise sous tension s'effectue, en particulier si elle est due à une éjection de lipides dégradés lors des phénomènes de photoblanchiment en lysolipides (par exemple) dans la solution, ce qui correspondrait pour la vésicule à une perte d'aire à volume constant, d'où une mise sous tension.

Sur la Fig. 4.5, on montre une telle expérience où l'on a mesuré la tension de la vésicule avant et après pulse lumineux, ainsi que le retour (la re-diminution) de cette tension lorsque la vésicule est remise dans le noir. Cette relaxation est sans doute due à la perméation de l'eau sous l'effet de la pression de Laplace.

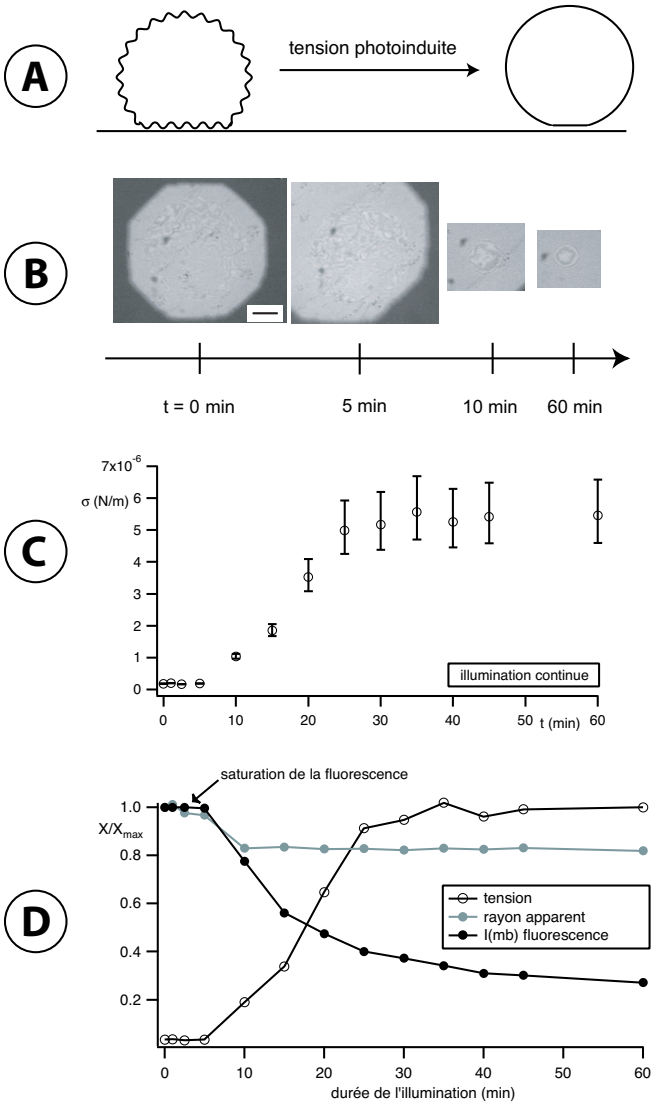

FIG. 4.4 – Mise sous tension d'une vésicule sous l'effet de la lumière d'excitation de fluorescence. La vésicule est observée en continu en fluorescence et la mesure de la tension s'effectue en prenant des images de microscopie interférentielle à différents instants. A : principe de l'expérience ; B : évolution de la zone de contact au cours du temps ; C : variation de la tension mesurée au cours du temps ; D : superposition en unité réduite de la variation de la tension, du rayon apparent de la vésicule et de l'intensité de fluorescence de la membrane au cours du temps

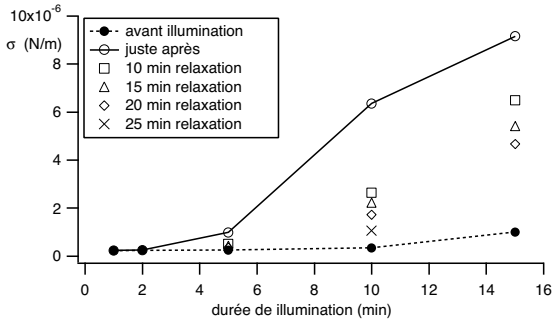

FIG. 4.5 – Mise sous tension d'une vésicule par éclairements continus de fluorescence de durées de plus en plus longues et relaxation de la tension.

Chapitre 5

Vésicules en adhésion faible, décorées par des fragments de cadhérines

Dans ce chapitre, nous allons présenter les expériences d'adhésion de vésicules géantes décorées avec des fragments de *E*-cadhérine. Nous détaillerons deux études de la statistique d'adhésion de tels objets, soit entre eux, soit sur une surface.

Nous décrivons tout d'abord l'obtention de vésicules géantes "décorables" par incorporation d'un lipide chélatant, ainsi que les limitations rencontrées. Nous aborderons alors une étude qualitative de l'adhésion non spécifique de ces vésicules, due aux ions calcium[1], ainsi que les différentes méthodes de protection des vésicules ou des surfaces de verre pour la contrer. Puis, nous présenterons une étude semi-quantitative par microscopie de fluorescence de la résistance de la chélation d'une protéine sur les vésicules. Enfin nous caractériserons, par microscopie de fluorescence et microscopie à force atomique, la décoration d'une surface par une bicouche fluide capable de chélater une protéine ayant une étiquette histidine.

Dans un second temps, nous présenterons une étude statistique des contacts fugaces entre vésicules géantes décorées, avant de nous tourner vers l'adhésion de telles vésicules sur les surfaces décorées que l'on vient de citer.

Enfin, nous apporterons quelques éléments de discussion sur les résultats de ces expériences et présenterons quelles pourraient être les suites à donner à ce travail.

[1] Le calcium est nécessaire à l'adhésion spécifique entre cadhérines

5.1 Préparation de vésicules géantes "décorables"

Plusieurs modes de couplages de protéines à des vésicules (quelle que soit leur taille) peuvent être envisagés : ancres lipidiques greffées (par exemple des céramides [Kloboucek et al., 1999]), groupes réactifs portés par un lipide (souvent à l'extrémité d'un PEG : par exemple, un groupe maléimide ou NHS qui peut réagir avec des NH_2 de surface de la protéine [Perret et al., 2002b]), couplage via le "sandwich" biotine (sur un lipide)/(strept)avidine/biotine (sur la protéine), "sandwiches" anticorps :antigènes [Heath et al., 2003],... les possibilités sont légions.

Nous allons présenter un couplage par chélation : la protéine portant une étiquette histidine, elle peut se fixer sélectivement sur un lipide capable de chélater un ion divalent, Ni^{2+}.

5.1.1 Décoration par chélation

Les fragments de cadhérine que nous utilisons sont purifiés biochimiquement avec fusion d'une extension en extrémité C-terminale : un hexapeptide d'histidine (6His) . Afin de conserver leur fonctionnalité et de leur donner une orientation préférentielle, nécessaire à leurs interactions, on a choisi d'utiliser la capacité de cette étiquette à reconnaitre l'ion nickel +II. Celui-ci peut être piégé entre les feuillets du mica [du Roure, 2003] ou chélaté par un groupe NTA [Goldstein et al., 1990, Schmitt et al., 1994, Dorn et al., 1998b, Tareste, 2003b, Sandre, 2000].

La chélation de la protéine est un équilibre chimique qui peut être défini par une constante d'association $K_a \sim 3$ μM [Dorn et al., 1998a]. Elle est donnée par

$$K_a = \frac{[\text{protéine-6His}][\text{NTA(Ni)}]}{[\text{complexe}]}$$

pour l'équilibre défini sur la Fig. 5.1.

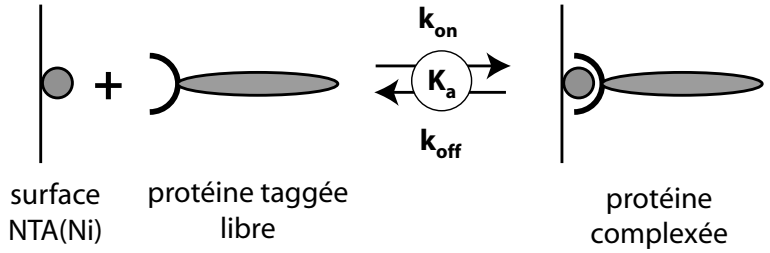

FIG. 5.1 – Schéma de l'équilibre de chélation d'une protéine marquée histidine par une surface portant des groupemement NTA(Ni).

Il faut donc *a priori* se trouver à une concentration supérieure à 3 μM (dans

la solution) pour que cet équilibre soit déplacé vers la fixation des protéines[2].

Afin de réaliser le couplage des protéines-6His avec nos vésicules, nous avons utilisé un lipide commercial (Avanti Polar Lipid, Alabaster), le DOGS-NTA(Ni) , livré préchargé en nickel. Sa version sans nickel est aussi disponible pour comparaison. Sa description a été effectuée dans le chapitre "Matériel et méthodes générales".

Nous allons présenter les différents tests réalisés pour obtenir par électroformation des vésicules chélatantes en grand nombre, de grande taille et majoritairement unilamellaires.

5.1.2 Variation du % de lipide chélatant

On a d'abord vérifié que l'électroformation permet d'obtenir, avec le "lipide matrice" (le DOPC), des vésicules géantes avec un très bon rendement. Une "bonne" électroformation conduit à obtenir de nombreuses vésicules de taille moyenne supérieure à 20 μm de diamètre, à la fois durant l'électroformation (par transmission) et après sortie des vésicules de la cellule (par fluorescence, après incubation 15-30 min avec 1% (v/v) de di6-ASPBS (560 μM dans EtOH)). C'est le critère que nous avons appliqué au cours de cette étude.

On a ensuite effectué des mélanges contenant du DOPC et le lipide chélatant commercial DOGS-NTA(Ni) à différents %.

5.1.2.a Observations

Les observations, réalisées au moins sur trois électroformations, sont reportées dans la Table 5.1

Il faut noter que le lipide DOGS-NTA(Ni) , lorsqu'il ne fixe pas une protéine, se comporte comme un lipide chargé, de charge -1 : les résultats de la Table 5.1 sont relativement semblables à ceux obtenus avec un lipide chargé négativement, comme le DOPS (des tests effectués ont montré que l'on peut en inclure jusqu'à 10 ou 20 % au plus). De plus, même si l'on obtient quelques vésicules pour les % de DOGS-NTA(Ni) les plus élevés, il faut rester prudent quant à la composition finale de celles-ci. Dès lors que l'électroformation ne produit pas un grand nombre d'objets, répartis à peu près uniformément dans la "cellule de pousse", on peut questionner l'homogénéité de la composition des vésicules présentes – une démixion peut s'être produite, ou le mélange peut ne pas donner de vésicules... – chose que l'on a pas réellement la possibilité de vérifier directement et qui peut varier d'une vésicule à l'autre[3].

[2]Cette définition est inspirée du cas "en solution". Dans notre système, un des composant (le NTA(Ni) est immobilisé sur une surface [Hochuli, 1999]. Le phénomène qui limite la fixation est alors la diffusion : il faut que la protéine puisse aller au contact de la surface pour se chélater.

[3]Des études (par mesure de l'énergie d'adhésion par micropipettes) permettent de penser que si l'on obtient des vésicules nombreuses à la fois avec la méthode dite "corse" et

% DOGS-NTA(Ni)	observations
0	vésicules très nombreuses
0.1	idem
0.5	idem
2	idem
5	idem
10	idem
20	vésicules peu nombreuses
30	presque pas de vésicules

TAB. 5.1 – Résultats des électroformations à différents % de DOGS-NTA(Ni) : les observations sont réalisées pendant l'électroformation et dans un échantillon (milieux : glucose 300 mM, sucrose 300mM).

Une incertitude demeure à ce stade et est très difficile à lever : quel est le taux réel de lipide fonctionnel, c'est-à-dire chélatant un ion nickel ? Des expériences d'adhésion (en SFA et avec la technique de micropipettes) effectuées avec des lipides ayant une tête NTA(Ni) censés être tous fonctionnels , mettent en évidence l'existence d'une fraction de lipides ne possédant pas d'ion nickel [Tareste, 2003a, Tareste, 2003b]. Cette fraction risque de jouer un rôle important par la suite, et peut varier d'un lot de lipides à l'autre. Aucun moyen n'a encore été trouvé pour "doser" *in situ* une vésicule c'est-à-dire connaître sa composition réelle. *Seule une étude statistique d'un phénomène,* pour nous l'adhésion*, fera sens, afin de s'affranchir de cette inconnue.*

5.1.2.b % de DOGS-NTA(Ni) nécessaire

On va calculer en ordre de grandeur, la quantité de NTA(Ni) nécessaire pour recouvrir de manière dense la surface des vésicules avec une protéine 6His.

On considére la proteine (EC1-EC2 ou GFP) comme un cylindre de $\sim$ 3-4 nm de diamètre [Nagar et al., 1996] se collant sur la surface. Elle occupe une surface de l'ordre de 20×10^{-18} m^2.

Pour une vésicule de diamètre 20 μm (surface 120×10^{-11} m^2), si l'on considère qu'une tête de lipide occupe environ 60×10^{-20} m^2, on a sur la couche externe 2×10^9 lipides. 10% sont des lipides NTA-Ni, si l'électroformation s'est idéalement passée. On présente donc aux protéines lors de l'incubation environ 2×10^8 sites de chelation.

l'électroformation, on reconstitue bien dans les vésicules la composition du film lipidique déposé au départ [Pincet, 2003, Bagatolli et al., 2000]. Cela a été validé pour des lipides chargés négativement, comme le DOPS ou les lipides à tête NTA(Ni) aux % qui ont "bien marché" à l'électroformation.

Au close-packing, on peut fixer environ 10^8 protéines, soit 5 pour 10 sites, ou encore 5 pour 100 lipides (1 protéine "couvre" une vingtaine de lipides). Ainsi, si la fixation était "100%" efficace, on serait encore proche du close-packing entre 2 et 5% de NTA-Ni[4].

A 10% en lipide NTA-Ni, Les cadhérines sont à touche-touche, et des sites NTA-Ni libres subsistent.

Nous avons donc utilisée cette composition lipidique (sauf précision). Elle correspond au maximum de protéines que l'on peut espérer mettre à la surface des vésicules, compte tenu de l'utilisation de l'électroformation et des imperfections des lots de lipides. L'absence de lipide chélatant fluorescent n'a pas permis d'effectuer de dosage du lipide *in situ* .

5.1.2.c Ajout d'un lipide décoré PEG

Les tests d'électroformation ont été effectués avec des compositions variables en lipide NTA(Ni) et en lipide portant un Poly(Ethylène Glycol) (PEG) greffé. Les lipides utilisés sont des C18 :n, donc ayant *a priori* une bonne miscibilité avec la matrice DOPC (DOGS-NTA(Ni) , DSPE-PEG_{2000} , DOPE-PEG_{2000}).

Les électroformations ont été réalisées tout d'abord avec le DOPC et les lipides PEG (entre 0,01 et 10 %). Les échantillons obtenus contiennent des vésicules plus grosses en moyenne que dans le cas sans PEG, unilamellaires et nombreuses, ce qui est compatible avec ce qui a été reporté dans la littérature (effets d'écartement des lamelles). Nous nous sommes alors concentrés sur l'obtention de vésicules de composition ternaire, c'est-à-dire comportant des lipides NTA(Ni), des lipides PEG avec une matrice de DOPC.

Nous avons observé qu'avec 10% de DOGS-NTA(Ni) et 5% de lipide PEG (DSPE-PEG_{2000} ou DOPE-PEG_{2000}), les électroformations conduisent à des vésicules de grande taille (plus de 20 μm de diamètre) et à très peu d'agrégats multilammellaires.

A cette concentration de 5%, les lipides PEG sont dans un régime proche du régime "champignon" [de Gennes, Kenworthy et al., 1995]. Pour 45 monomères, c'est-à-dire une masse molaire de 2000 g/mol, la taille du champignon (qui correspond au rayon de giration de la chaîne) est $\sim$ 3,4 nm.

5.1.2.d Limitations du milieu d'électroformation

Comme nous l'avons vu, l'électroformation dans des solutions de sucre est limitée par la charge négative portée par les têtes chélatantes des lipides DOGS-NTA(Ni) . Ceci est sûrement dû à un effet d'écrantage de la charge de surface induite par le courant alternatif que l'on impose à la cellule d'électroformation. Les lamelles ne peuvent être mises "en mouvement" électriquement de manière efficace.

[4]Ces calculs ne tiennent pas compte d'éventuels flip-flops ou séparations de phase des lipides.

Nous avons effectué des essais pour encapsuler différents tampons (nécessaires à la "survie" des protéines) à base de Tris, pH=8 , avec des quantités de sel variables et avec/sans EDTA (0 ou 1 mM). Nous avons tenté d'électroformer nos mélanges d'intérêt (10% NTA(Ni) et 10% NTA(Ni)/5% DSPE-PEG ou DOPE-PEG) dans ces solutions afin d'avoir nos vésicules déjà suspendues dans le tampon voulu. Que ce soit dans du TBE (Tris Borate 45 mM EDTA 1 mM) ou dans des solutions contenant Tris 10 mM ou 45 mM et du sucrose (comme complément à 300 mOsm), le résultat a été très décevant : peu de vésicules géantes, elles mêmes très sales (présence de tubes, d'agrégats, contenant des vésicules plus petites).

5.1.3 Conclusions

Par électroformation dans des solutions de sucre d'osmolarité contrôlée, nous avons donc réussi à obtenir des vésicules géantes nombreuses, de grande taille (>10 μm de diamètre), unilamellaires et propres, contenant des lipides fonctionnalisés. Nous n'avons pas réussi à les obtenir directement dans une solution tamponnée à base de Tris, pH=8 saline ou non : il faut donc les transférer dans une telle solution avant incubation avec des protéines, afin d'éviter la dénaturation de ces dernières.

5.2 Adhésion non spécifique due au calcium

Le calcium est un élément déterminant de l'adhésion médiée par les cadhérines : sans lui, pas d'adhésion. Cet ion est néanmoins un "trouble-fête" car il entraine l'adhésion non spécifique des membranes. Ce phénomène est assez bien décrit dans la littérature [Arnold, 1995], mais son mécanisme est encore assez mal connu. Une explication possible de cette adhésion non spécifique est que l'ion calcium peut ponter les têtes de lipides. Cette adhésion est relativement forte, elle peut même conduire à une hémifusion des membranes.

De plus, elle peut aussi avoir lieu entre la membrane et le verre car celui-ci est négatif aux pH où l'on se place.

5.2.1 Vésicules "nues"

Nous avons effectué des tests en microscopie de fluorescence, avec des cellules d'observation fermées dont les surfaces de verre sont nues. Les concentrations en calcium utilisées varient de 1 à 10 mM (dans des solutions de sucre non tamponnées), pour des vésicules soit composées uniquement de DOPC soit comportant 10% de NTA-Ni. Pour des raisons de facilité d'observation, celles-ci sédimentent dans la cellule et sont donc situées au voisinage d'une des parois de verre.

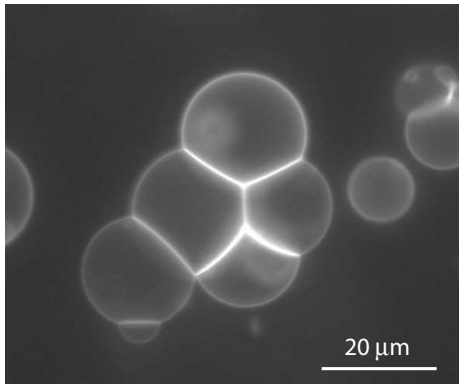

FIG. 5.2 – Mousse de vésicules de DOPC seul, en présence de calcium 6 mM.

Sans calcium, l'occurence de doublets de vésicules peut être considérée comme nulle. Il n'y a que très peu de multiplets : ceux-ci semblent venir des imperfections de l'électroformation. Les vésicules n'adhèrent pas au verre, comme le montrent des observations en microscopie interférentielle.

Pour 1 mM et 2 mM, les doublets de vésicules sont en nombre non négligeable et des vésicules éclatent sur le verre. Les doublets peuvent présenter des invaginations [Sandre, 2000] ou non.

Pour des concentrations supérieures à 5 mM, on voit apparaître des mousses d'une dizaine de vésicules (voir la Fig. 5.2). Les explosions sur le verre nu sont excessivement nombreuses. Les vésicules ne peuvent "survivre" que si elles sont sur un tapis de vésicules ayant déjà explosé : le calcium adsorbé charge les membranes positivement et elles se repoussent. Les vésicules éclatées apparaissent comme des "flaques" fluorescentes sur le verre.

De plus, pour une raison encore obscure, une partie des vésicules explosent sur le verre nu lorsqu'elles sont transférées dans un mélange Tris, pH=8 5 mM, 10 mM ou 45 mM / sucre (même légèrement hyperosmolaire).

Il apparaît donc qu'il faut, *au moins pour des densités de protéine faibles*, ajouter au système une répulsion (par exemple, stérique),

- au niveau des vésicules, pour éviter les interactions non spécifiques membrane/membrane médiées par les ions calcium ;
- au niveau du verre, pour éviter de perdre des vésicules par explosion ;

ou au moins trouver une expérience de contrôle permettant de s'affranchir des composantes non-spécifiques de l'adhésion entre cadhérines, existant à cause du calcium.

5.2.2 Vésicules "chevelues"

Une des méthodes couramment utilisées pour se prémunir contre des interactions non spécifiques entre colloïdes est d'adsorber ou de greffer sur leur surface un polymère à une densité telle que la "chevelure" créée, de par un effet stérique, préviendra l'approche à des distances trop faibles des surfaces [Israelachvili, 1992]. Ceci peut permettre de stabiliser une émulsion ou une suspension [Israelachvili, 1992]. Plus récemment, cette protection a été appliquée avec succès, moyennant l'utilisation de lipides greffés PEG, aux *stealth vesicles* (les "vésicules furtives"), vecteur breveté de drogues [Lasic, 1993] : leur "corona" de polymère leur permet de "survivre" dans la circulation sanguine, sans être détruites par les lymphocytes.

Nous avons vérifié que la présence de DOPE-PEG_{2000} ou de DSPE-PEG_{2000} à des concentrations où la répulsion est supposée efficace (déterminé d'après [de Gennes, Kenworthy et al., 1995]) permet de diminuer les interactions non spécifiques dues au calcium. Les résultats de nos observations, en cellules fermées avec des surfaces de verre nu, sont résumés dans la Table 5.2. Les conditions sont similaires à celles en 5.2.1.

$[Ca^{2+}]$ mM	100 :0 :0	95 :5 :0	90 :0 :10	85 :5 :10
0	rien	rien	rien	rien
1-2	doublets, explos°	peu d'explos°	doublets, explos°	peu d'explos°
6	mousses, explos° (+)	peu d'explos°	mousses, explos° (+)	peu d'explos°

TAB. 5.2 – Comparaison des différentes compositions de vésicules vis-à-vis des interactions non spécifiques dues au calcium – les compositions sont données par les % relatifs : DOPC :PEG_{2000} :DOGS-NTA(Ni)

Il apparait donc que le PEG réussit relativement bien à protéger les vésicules et à empêcher les adhésions des membranes entre elles, ainsi qu'à éviter les interactions avec le verre des cellules. Les résultats obtenus permettent aussi de vérifier que le lipide PEG s'incorpore bien dans les bicouches.

Nous avons choisi de travailler avec des vésicules libres densément recouvertes de protéines, sans "corona" de polymère. Les premiers tests ont montré que l'on perd néanmoins des vésicules. Nous avons donc cherché à développer un moyen de protection des surfaces de verre qui soit simple et efficace, afin d'éviter que les vésicules n'explosent.

5.2.3 Protection des parois de la cellule d'observation

Nous avons essayé divers traitement de surface sur verre très propre, à la fois en abscence et en présence de calcium. Il s'agit dans tous les cas de recouvrir la surface du verre d'une couche de molécules créant une répulsion stérique et/ou électrostatique empêchant les vésicules de s'approcher trop près du verre et d'y

adhérer (puis exploser). Les résultats sont présentés dans la Table 5.3 ci-dessous. Les observations ont été faites en fluorescence et en microscopie interférentielle.

traitement	mode de fixation	observations
poly-L-lysine [Sandre, 2000]	adsorption 0,01% ; 0,001% – 15 à 30 min	éclatements même sans Ca^{2+}
BSA [Sandre, 2000]	adsorption 5-10 mg/mL, eau – 15 à 30 min	"pompe à lysolipides" (tend les vésicules) surface très inhomogène
caséine [Roux et al., 2002]	adsorption 5 mg/mL, tampon Imidazole – 15 à 30 min	bonne protection des surfaces attention : compétiteur avec 6-His
PEG [du Roure, 2003]	silanisation + greffage	très peu d'explosions avec Ca^{2+}

TAB. 5.3 – Traitements de surface et leur efficacité en regard des interactions non spécifiques engendrées par le calcium – un traitement efficace empêche l'adhésion (suivie généralement de l'explosion) des vésicules géantes sur le verre.

5.2.4 Conclusions

Nous avons observé l'effet du calcium sur les vésicules géantes nues, c'est-à-dire sans "décoration protéique". Pour les faibles concentrations en calcium (de l'ordre du mM), il y a peu d'interactions non spécifiques, mais des vésicules éclatent sur le verre de la cellule d'observation. Pour des concentrations importantes, des mousses apparaissent et les vésicules éclatent aussi.

Nous avons cherché à nous prémunir de ces interactions non spécifiques avec le substrat qui perturbent grandement le système en nous faisant "perdre" des vésicules. Ceci est très défavorable lors de nos études d'interactions entre vésicules libres (moins on a de vésicules, moins on a de chances de voir des interactions entre elles – La Palisse n'aurait pas dit mieux !). Pour ce faire, différents traitements de surface ont été évalués. Un des plus simples (et efficace, bien sûr) a été retenu : l'adsorption de caséine[5].

Nous avons aussi montré que l'inclusion de 5% de lipide PEG_{2000} (saturé ou non) permet de lutter efficacement contre les interactions non spécifiques. Le fait de pouvoir inclure ainsi une répulsion de type stérique nous donne la possibilité de mimer le glycocalyx. Néammoins, pour de faibles concentrations en calcium et des densités de cadhérines importantes à la surface des vésicules, on a montré qu'il ne s'avère pas nécessaire, dans un premier temps, d'ajouter cette répulsion : la protéine, si elle ne présente pas d'interactions avec le verre, pourra jouer elle-même un rôle de répulsion stérique.

[5]Prudence... le tampon imidazole contient un compétiteur à la fixation de protéines 6His sur des groupes NTA : le rinçage de la cellule avant usage doit être soigneux, pour ne pas entraîner de décrochage de la protéine.

5.3 Chélation de protéines à "étiquette 6-His"

Afin de tester les capacités de chélation du lipide commercial d'Avanti Polar Lipids, le DOGS-NTA(Ni) , nous avons fixé sur des vésicules géantes une protéine fluorescente et possédant une étiquette 6His[6] : la *Green Fluorescent Protein* – 6His (ou GFP-6His). Sa masse molaire est voisine de celle des fragments de cadhérine (∼25 kDa). Nous avons aussi effectué quelques tests avec une cadhérine marquée en fluorescence.

5.3.1 Visualisation de la fixation

5.3.1.a A l'aide de la GFP-6His

Le fait d'utiliser une protéine 6His intrinsèquement fluorescente nous a permis de visualiser de manière simple sa fixation spécifique sur des vésicules portant le lipide chélatant chargé en ion nickel. La Fig. 5.3A présente le principe de la fixation orientée de la GFP : cette protéine, que l'on peut se représenter comme un "tonneau", a un groupe 6His à une de ses extrémités, et peut donc se fixer perpendiculairement à la membrane. L'orientation moyenne de son chromophore est connue : il est perpendiculaire à l'axe du tonneau, donc parallèle localement à la membrane.

Protocole Les vésicules sont obtenues avec la composition désirée dans un mélange sucrose :glucose (1 :1 v/v – 300 mOsm) par électroformation. 100μL sont transférés dans un tube eppendorf contenant 400 μL d'un mélange Tris, pH=8 / glucose (305-310 mOsm). La sédimentation dure de 30 min à 1 h.

Une fois le surnageant prélevé de façon à ne laisser qu'un volume de 25 μL contenant bon nombre de vésicules, la GFP est introduite à la concentration finale de ∼10 μM. Ceci permet d'être sûr de déplacer l'équilibre de chélation vers la fixation[7].

L'incubation dure 45 min, puis une partie des vésicules est prélevée (au fond de l'eppendorf) et resuspendue dans une cellule remplie de Tris, pH=8 / glucose légèrement hyperosmolaire pour ne pas fragiliser les vésicules. L'observation se fait alors par microscopie de fluorescence classique ou par microscopie de fluorescence à deux photons dès lors que la cellule est scellée.

Observations Sur la Fig. 5.3B est présentée une image typique de fluorescence classique obtenue avec des vésicules contenant 10% de lipide DOGS-NTA(Ni) : la membrane apparaît plus brillante que le fond, signe qu'il y a bien une fixation

[6]grâcieusement fournie par F. Amblard (Institut Curie, UMR 168)

[7]L'incubation s'effectue sans EDTA : cette molécule chélate les ions divalents, comme le calcium et le nickel. Elle représente un danger car elle peut extraire le nickel des cages de chélation, les rendant inactives.

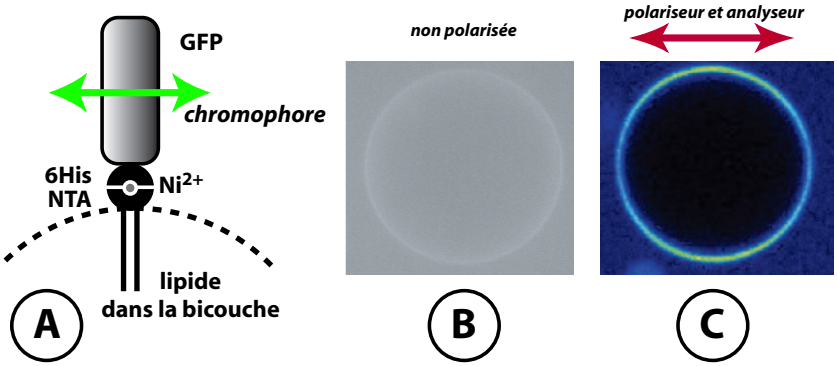

FIG. 5.3 – A : Schéma de la fixation orientée de la GFP-6His sur une bicouche contenant des lipides NTA(Ni) ; B : images de fluorescence (filtre FITC) ; C : images de fluorescence biphotonique avec polarisation (la direction de polarisation et d'analyse des lumières incidentes et émises est représentée par la flèche).

de la protéine. Le fond est lumineux, dû à un excès de protéine en solution. L'intérieur de la vésicule, très souvent noir ou tout du moins plus sombre que l'extérieur, montre que les vésicules ne se sont (pas trop) perméabilisées lors des différentes étapes de la préparation, surtout pendant l'incubation. Lorsque l'on utilise 10 % de lipide DOGS-NTA (sans nickel), ou bien si l'on ne met pas de lipide chélatant (DOPC seul), la fluorescence de la membrane est beaucoup plus faible. Il reste une fluorescence faible qui la fait ressortir du fond, signe qu'il y a quand même un peu d'adsorption non spécifique.

La Fig. 5.3C, réalisée en microscopie de fluorescence biphotonique polarisée, confirme ce qui vient d'être dit : les vésicules sont intègres (intérieur noir), marquées en surface par la GFP. L'analyse de la lumière émise en polarisation parallèle permet d'apporter un élément de plus : les pôles apparaissent plus brillants que l'équateur. Connaissant l'orientation moyenne du chromophore dans la protéine, on en déduit que la protéine fixée sur la membrane est majoritairement orientée perpendiculairement à celle-ci (Fig. 5.3A). La fluorescence résiduelle autour de l'équateur peut être due à l'existence d'une faible adsorption non spécifique (la protéine couchée sur la bicouche émet avec une polarisation aléatoire) ainsi qu'au mouvement des protéines fixées par leur groupe 6His autour de leur axe. Sans l'ion nickel, ce contraste entre pôles et équateur est très faible.

Des expériences préliminaires ont montré que si l'on ajoute 5% de lipide PEG_{2000}, les résultats sont similaires aux précédents, mais il est très difficile de comparer les quantités fixées en comparant les intensités de fluorescence... La présence du PEG pourrait empêcher ou du moins ralentir la fixation des protéines en cachant les sites NTA(Ni).

5.3.1.b A l'aide de fragments de cadhérine fluorescents

Des fragments de cadhérines, marqués en fluorescence avec de l'Alexa 546 (Molecular Probes Inc.) ont été utilisés pour décorer des vésicules comportant 10% de lipide NTA(Ni).

Le marquage de la cadhérine, effectué par H. Feracci (Institut Curie, UMR 144), est délicat et consomme énormément de protéines, pour un rendement relativement médiocre (1 Alexa pour 3 à 6 protéines). De plus, ce marquage, qui s'effectue par couplage avec des NH_2 de surface des fragments protéiques, peut jouer sur la fonctionnalité de ceux-ci et leur résistance au "stockage" (leur dénaturation, lorsqu'élués peut être plus rapide). Ceci explique le peu d'expériences menées avec de tels fragments fluorescents. Le marquage est censé ne pas interagir avec l'étiquette 6His et donc ne pas jouer sur la fixation des fragments.

Au cours d'une expérience d'adhésion vésicule/vésicule, une incubation menée à ~ 1 μM nous a permis de conclure que ces fragments se fixaient bien (Fig. 5.4).

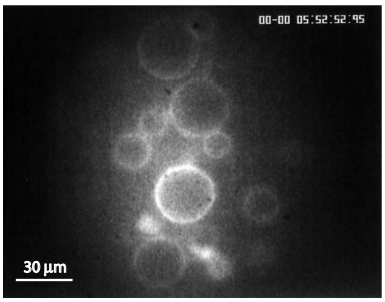

FIG. 5.4 – Image de fluorescence de E-cadhérines-Alexa 546 décorant la surface de vésicules géantes portant 10% de lipide chélatant, obtenue avec une caméra intensifiée.

Le faible rendement du marquage et la difficulté à effectuer un dosage en imageant la fluorescence des vésicules ne permettent pas d'effectuer une quantification de la protéine présente à la surface des vésicules (voir le paragraphe 5.3.2).

5.3.2 Effet du % de lipide chélatant

D'après les calculs en ordre de grandeur présentés plus haut, nous savons qu'avec 10% de NTA-Ni les protéines sont au close-packing, si la fixation est efficace à 100%. Nous avons essayé d'effectuer un dosage relatif par fluorescence de la quantité de NTA-Ni en surface des vésicules en faisant varier sa concentration à partir de celle correspondant à cette densité maximale de couverture.

5.3.2.a Protocole et résultats

Les vésicules ont été préparées avec les compositions DOPC :DOGS-NTA(Ni) données dans la Table 5.4 (seul le % de NTA-Ni est indiqué). Pour l'incubation, le même protocole qu'au cours des expériences précédentes à été suivi. Les

résultats qualitatifs des observations sont consignés dans la Table 5.4. Ils résultent de l'observation de plusieurs vésicules dans chaque échantillon à différentes positions dans l'échantillon. La comparaison quantitative des images de fluorescence est assez délicate (fond variable, potentiellement % de NTA(Ni) variable entre vésicules d'un même échantillon,...).

% NTA(Ni)	signal de la membrane par rapport au fond
10	très marqué
5	faible comparé à celui à 10 %
2	presque imperceptible
0.5	idem
0.1	idem

TAB. 5.4 – Variation du signal de la membrane par rapport au fond en fonction du % de DOGS-NTA(Ni) dans les vésicules.

Ce qu'il y a d'étonnant ici, c'est que les estimations les plus "pessimistes" donnent qu'à 2% on devrait encore être proche du close-packing, et donc avoir un signal peu différent de celui à 10%. Il semble donc qu'une partie des lipides, supposés être chargés en nickel ne le sont peut être pas.

5.3.2.b Taux de charge en nickel des lipides

Des expériences d'électrophorèse sur gel des lipides après électroformation ont été effectuées par A. Fery avec D. Levy (Institut Curie, UMR 168). Les lipides étant déposés directement sur les électrodes et la tension appliquée étant supérieure au potentiel rédox du couple Ni II/Ni 0, on peut réduire l'ion nickel, qui peut alors se "dé"-chélater.

Après avoir électroformé des vésicules avec 10 % de DOGS-NTA(Ni) dans du glucose 50 mM, nous avons plongé la suspension (1 mL) dans de l'azote liquide. Nous les avons "lyophilisées" en pompant sous vide pendant plusieurs heures. Puis le reliquat a été resolubilisé dans du chloroforme, afin de se débarasser le plus possible du sucre. On a effectué une électrophorèse comparative avec du DOGS-NTA(Ni) seul.

Il n'est pas apparu de bandes séparées attribuables sans conteste à DOGS-NTA(Ni) et DOGS-NTA , car ces deux lipides sont en trop faible quantité par rapport au DOPC dans notre préparation (voir Fig. 5.5) : cette méthode de lyophilisation ne permet en effet que de récuperer une fraction des 150 μg de lipides déposés (ceux ayant donné des vésicules, soit au plus 10 à 30 %). De plus, des sucres peuvent rester et perturber l'observation (ils ne migrent pas sous champ).

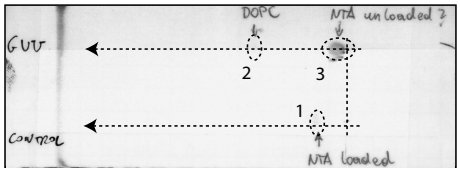

FIG. 5.5 – Gel d'électrophorèse des lipides après électroformation et lyophilisation : en haut, le reliquat après électroformation, en bas le témoin à partir de DOGS-NTA(Ni) concentré. La tâche 1 est celle du NTA(Ni) de contrôle. Les tâches 2 et 3 ne sont pas attribuables de manière précise à un lipide ou un autre.

Des essais de rechargement en nickel, directement sur des vésicules contenant 10% de NTA(Ni), ont aussi été réalisés.

Les vésicules électroformées sont mises en contact avec une solution de sucre contenant 1 mM de chlorure de nickel, pendant quelques dizaines de minutes. Elles sont ensuite dialysées une nuit (avec des boudins de dialyse classiques, le volume étant proche de 200 μL) contre la même solution de sucre, dépourvue de nickel. Celles qui ont survécu (assez peu...) sont mises en contact avec de la GFP-6His et le niveau de fluorescence a été comparé à celui de mêmes vésicules n'ayant pas subi ce rechargement. On ne note pas d'accroissement significatif de la fluorescence des membranes. De plus, on a vérifié que le nickel n'entraine pas (pour ces concentrations) d'adhésion entre vésicules ou sur le verre, lorsqu'il est introduit directement dans une cellule d'observation.

5.3.2.c Conclusions

Des différentes expériences menées, on déduit que l'on peut fixer des protéines sur des vésicules contenant 10% de lipides chélatants chargés en nickel. Cette fixation semble bien spécifique et orientée (on reverra ce point dans les expériences sur bicouches supportées en AFM). Mais on ne peut préciser la quantité de protéines fixées en regard du % de lipide chélatant inclu dans les bicouches par électroformation. Il se peut qu'elle varie d'une vésicule à l'autre, d'un échantillon à l'autre... Les études d'adhésion seront donc essentiellement statistiques pour incorporer la variabilité de composition des vésicules.

Au final, on a choisi d'utiliser les lipides Avanti [8] sans les recharger. Cela permet d'éliminer une étape dans les protocoles des expériences d'adhésion : plus il y a d'étapes, plus on fragilise les objets et on en diminue le nombre.

[8]Des lipides non commerciaux ont été testés lors d'une collaboration avec le laboratoire de physique statistique de l'ENS et avaient un taux de charge apparemment inférieur à celui des lipides utilisés ici [Tareste, 2003b]

5.3.3 Résistance de la chélation

Même si l'on ne peut pas doser par fluorescence la quantité de protéine présente à la surface des vésicules, nous avons essayé d'utiliser la GFP-6His pour visualiser la "résistance" de la fixation par chélation à la dilution.

L'adhésion des cadhérines étant homophilique, il faut *a priori* se prémunir contre les interactions entre cadhérines fixées sur la surface des vésicules et les cadhérines libres subsistant en solution. Il faut donc analyser ce qu'il se passe lors d'une dilution forte de la concentration résiduelle en cadhérines du milieu où se trouvent les vésicules, ceci pouvant entraîner la désorption des protéines. Cette dilution est comparable à l'élimination des protéines excédentaires.

Tout est alors question de cinétique : soit le décrochage est rapide, et l'on risque de perdre ce que l'on avait fixé avant même de voir un effet d'adhésion ; soit il est relativement lent, et on peut avoir le temps de faire l'expérience d'adhésion avant de perdre trop de protéines.

Pour éclaircir ce point, nous avons effectué deux types d'expériences de fluorescence. Pour diluer fortement le milieu extérieur, nous avons choisi de passer de 10 μM lors de l'incubation (c'est-à-dire $> K_a$) à $\ll 1$ μM lors de l'observation (c'est-à-dire $\ll K_a$), soit par rinçage en continu en chambre à flux, soit par simple dilution.

5.3.3.a Microscopie de fluorescence classique

En chambre à flux Nous avons tout d'abord utilisé une cellule à flux inspirée de celle utilisée par H.-G. Dobëreiner et l'équipe de P. Bassereau à l'Institut (voir Fig. 5.6A).

Les vésicules contenant 10% de DOGS-NTA(Ni) sont sédimentées dans un mélange Tris, pH=8 / sucre iso-osmolaire avec la solution de sucre interne et incubées avec la GFP-6His (voir protocole précédent). La cellule est remplie avec le même tampon Tris, pH=8 / sucre. Les vésicules sont alors introduites et observées. On en choisit une de taille respectable, dont on distingue clairement la membrane du fond environnant[9].

Après avoir imposé un débit de tampon/sucre tel que la vésicule ne bouge pas trop dans le champ du microscope (de l'ordre du ml/h), on observe en continu la vésicule en fluorescence pendant plusieurs minutes. Le fond de fluorescence du à la GFP excédentaire diminue comme on rince la cellule. La variation de l'intensité de la membrane est présentée sur la Fig. 5.6B : elle diminue au cours du temps. Cette expérience délicate n'a pu etre menée que sur très peu de vésicules.

Afin de vérifier si cette décroissance est due au décrochement de la protéine, du

[9]Nous avons envisagé d'utiliser cette cellule pour étudier l'adhésion entre vésicules via les cadhérines en modifiant les conditions expérimentale (en calcium) *in situ* [du Roure, 2003]. Cela aurait pu induire des contacts ou les rompre. Malheureusement, sa difficulté de mise en œuvre (l'introduction de vésicules géantes est très délicate) nous a conduit à écarter ces expériences.

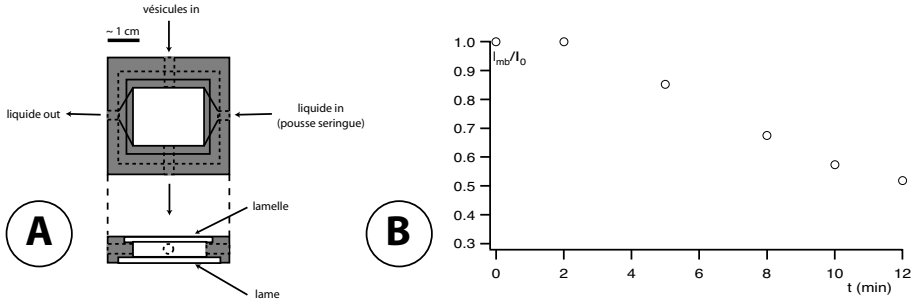

FIG. 5.6 – A : Schéma de la cellule à flux en Téflon – l'échelle donnée n'est qu'approximative (le diamètre des trous est de l'ordre du mm, volume de l'ordre de 500 μL). Le scellement des parties en verre est effectué à la graisse à vide (pour le collage sur le Téflon) et des joints sont faits avec une colle silicone ; B : exemple de variation de l'intensité (normalisée) de fluorescence de la GFP fixée sur la membrane, lors d'une expérience en chambre à flux.

à la dilution du milieu extérieur jusqu'au rinçage total, nous avons procédé alors à une série de tests plus simples à mettre en œuvre, avec une cellule d'observation scellée comme celle utilisée dans les tests d'adhésion au calcium.

Par effet de dilution Il s'agit, lorsque l'on introduit les vésicules dans la cellule d'observation, d'induire une dilution de la protéine telle que l'on passe en deça de la concentration limite correspondant à K_a.

Protocole Les vésicules (10% de NTA(Ni)) sédimentent d'abord dans un tampon Tris, pH=8 5 mM / sucre adéquat, puis sont incubées avec la GFP à 10 μM pendant 45 min. 1 à 5 μL d'entre elles sont introduites dans une cellule de 50 μL que l'on scelle. L'observation débute après 5 à 10 min d'attente (les vésicules sédimentent et sont alors plus faciles à repérer).

Observations Un exemple de suivi en continu de la fluorescence du fond et de la membrane sont présentés sur les Fig. 5.7A et B.

Une première analyse naïve des expériences préliminaires, basée sur la variation de la différence entre les intensités de fluorescence de la membrane et du fond (Fig. 5.7A et B) peut faire penser que l'on a bien un lent mais quantitatif décrochage de la protéine. Mais il faut considérer que l'on compare en fait une protéine "à deux dimensions" (sur la membrane) et une protéine "à trois dimensions". Le phénomène de bleaching peut alors ne pas être le même (la protéine libre pouvant elle diffuser, en quelque sorte se "renouveller" localement). Nous

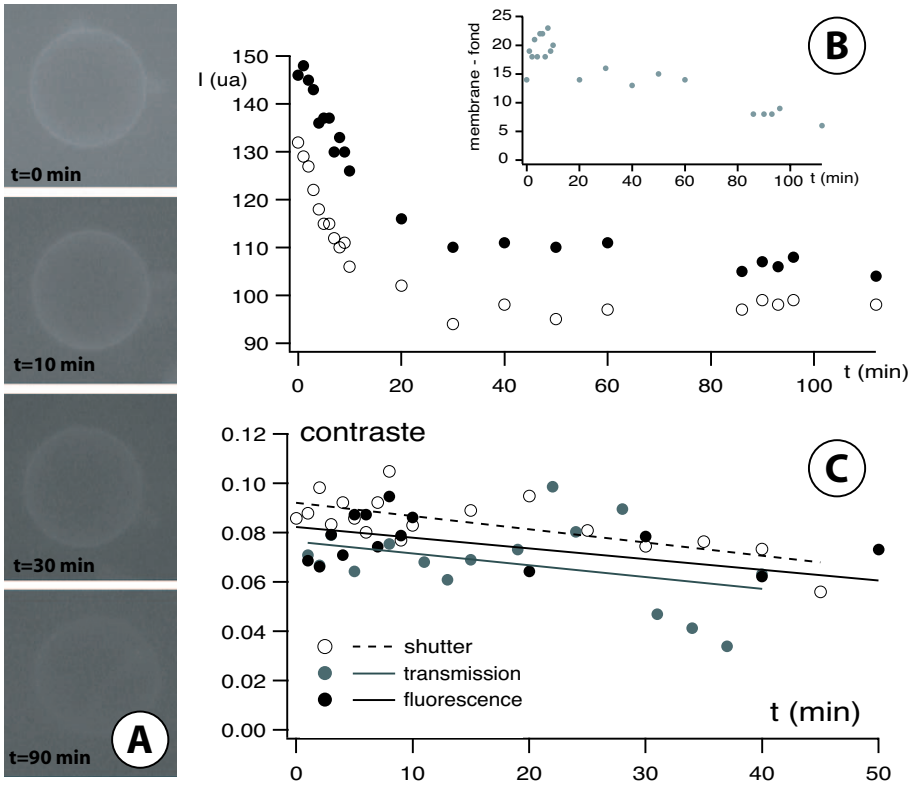

FIG. 5.7 – Résistance de la chélation par effet de dilution : A images en fluorescence de la GFP-6His décorant une vésicule qui porte 10% de NTA(Ni) ; B : • fluorescence de la membrane ◦ fluorescence du fond (en encart, différence des deux) en fonction du temps, en fluorescence continue ; C : pour trois vésicules dans trois préparations différentes, on a tracé l'évolution du contraste de la membrane au cours du temps : (noir) suivi de la vésicule en fluorescence continue, (blanc) imagée en fluorescence + suivi de la vésicule en transmission entre deux images, (gris) imagée en fluorescence + mise dans le noir entre deux images (“shutter manuel”). La décroissance du contraste s'avère faible.

avons suivi le contraste de la membrane par rapport au fond défini par

$$\text{contraste} = \frac{I_{\text{membrane}} - I_{\text{fond}}}{I_{\text{membrane}} + I_{\text{fond}}}$$

afin de réellement nous affranchir du bleaching, indépendamment du lieu où se trouve la protéine. Nous avons réalisé trois types d'expériences : (i) observation en fluorescence en continu en éclairant avec la lampe à mercure ; (ii) observation discontinue en fluorescence, avec suivi intermédiaire de la vésicule en transmission afin de ne pas la perdre ; (iii) observation discontinue en fluorescence sans suivi intermédiaire ("shutter manuel"). La complexité de l'expérience varie de (i) à (iii)... La prise d'image en fluorescence pour les méthodes (ii) et (iii) dure 5 à 10 secondes. Des courbes obtenues de ces trois manières sont présentées sur la Fig. 5.7C.

La tendance globale est bien à une diminution du contraste, mais cette diminution est très faible (on a fait figurer sur la Fig. 5.7C des tendances linéaires de décroissance pour faciliter la lecture), et ce quelle que soit la méthode utilisée, sur environ une heure d'expérience.

Cette discussion est très qualitative du fait des incertitudes sur l'homogénéité des vésicules dans un même échantillon et sur le taux de charge réel des lipides en ion nickel. Elle ne prend pas en compte d'éventuels décrochages de protéines photoblanchies–réaccrochages de protéines intactes, dues à l'équilibre existant entre la solution et la surface de la vésicule.

Nous pouvons tirer de ceci que le décrochage peut avoir lieu (lors d'un rinçage des surfaces, ou d'une forte dilution), mais qu'il est sûrement *cinétiquement* défavorisé. Ceci est confirmé par les biologistes qui utilisent des billes NTA(Ni)[10] pour stocker leurs fragments de cadhérines et on mesuré le relargage au cours du temps [Feracci, 2003], ainsi que par les autres membre du laboratoire s'étant penchés sur la question [Silberzan, 2003, du Roure, 2003]. Les variations de signal observées ne sont donc dues (majoritairement) qu'au bleaching de la protéine utilisée.

5.3.3.b Microscopie de fluorescence biphotonique

Afin de corroborer la conclusion précédente, nous avons effectué un autre type d'expériences "de dilution" semblables à celles du paragraphe 5.3.3.a, mais dans lesquelles le bleaching de la GFP est en principe quasi-inexistant.

Le suivi des vésicules est différent : on les observe en microscopie de fluorescence à deux photons. Cette méthode est bien connue pour, intrinsèquement, générer moins de bleaching dans les échantillons observés et permettre une meilleure localisation des protéines due à une meilleure localisation spatiale de l'excitation.

[10]Les billes poreuses présentent une grande surface de capture ("un grand nombre de sites") comparativement à nos vésicules.

Entre deux prises d'image (qui durent de l'ordre de 2 secondes), l'échantillon n'est pas éclairé. L'intensité incidente est maintenue constante. Une courbe typique du contraste d'intensité de la membrane est présentée sur la Fig. 5.8. On observe que le contraste est meilleur que dans les expériences précédentes, résultant d'une excitation plus localisée et d'une détection plus sensible (par photomultiplicateur). Le contraste de la membrane n'a pas, dans ce type d'expérience, varié

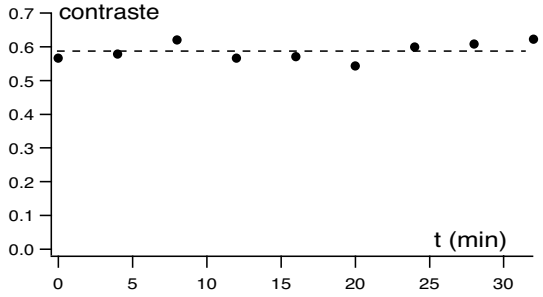

FIG. 5.8 – Résistance de la chélation par effet de dilution : observation en fluorescence à deux photons non polarisée (les intensités sont normalisées) – entre chaque image, la fluorescence n'est pas excitée.

en intensité de fluorescence de manière notable au cours du temps : cela confirme l'idée que la décroissance du signal observée précédemment en microscopie de fluorescence classique est due au bleaching.

5.3.4 Conclusions

On peut donc fixer de manière orientée, spécifique, des protéines ayant un groupe 6His, dont les fragments de cadhérine qui nous intéressent, à la surface de vésicules géantes portant des sites de chélation au nickel. Cette fixation apparait comme cinétiquement favorisée, et résiste (du moins sur des temps de l'ordre de l'heure, ce qui correspond à nos durées d'expériences) à une raréfaction de la protéine libre.

5.4 Décoration des surfaces de verre avec des protéines à "étiquette" histidine

Afin d'étudier l'adhésion des vésicules géantes sur des surfaces, via nos fragments de cadhérine marquées 6His, nous avons développé une méthode de fonctionnalisation de la surface du verre par des groupements capables de chélater des ions nickels.

Des essais préliminaires, utilisant du mica clivé [du Roure, 2003], entre les feuillets duquel des ions nickels peuvent s'intercaler, ont donné des images de microscopie interférentielle de piètre qualité. Nous avons donc choisi de déposer une bicouche par fusion de petites vésicules, contenant des lipides NTA(Ni) sur

du verre très hydrophile. Ceci permet en outre de conserver une possible *mobilité* des espèces en surface.

Ce qui suit présente la visualisation, par différentes techniques (fluorescence, AFM), de la présence et de la fonctionnalité de la bicouche déposée.

5.4.1 Microscopie de fluorescence

Nous avons vérifié la présence de la bicouche déposée en utilisant les microscopies de fluorescence à un et deux photons. Nous verrons dans les paragraphes suivants des arguments permettant de dire qu'il s'agit bien d'une seule bicouche.

5.4.1.a Fluorescence classique

Nous avons imagé en fluorescence à un photon, à l'aide d'une caméra intensifiée, des défauts dans la bicouche, lorsqu'elle est marquée soit par un lipide NBD ou par Di6ASPBS. Ces défauts peuvent être la limite entre le bord de la cellule et la partie du verre fonctionnalisée, la limite d'une bulle d'air, des rayures sur le verre, ou bien la limite entre une zone démouillée intentionnellement et la partie non démouillée (le type de défaut varie avec la vitesse de démouillage des zones).

Avec plus ou moins de contraste [11], nous avons pu observer des zones non brillantes se détacher d'un fond continu de fluorescence (Fig. 5.12A et B). En incubant une bicouche non marquée avec de la GFP-6His (typiquement dans les mêmes conditions que les vésicules géantes), on a observé que l'on pouvait révéler la zone décorée (Fig. 5.12)C). On a aussi observé que, si les petites vésicules ne sont pas suffisamment soniquées, des amas de lipides présents forment des points brillants, parfois des fils, sur les bicouches.

5.4.1.b Deux photons (T. Pons, ESPCI)

Les mêmes expériences ont été reproduites avec le microscope à deux photons. Nous avons imagé des bicouches homogènes en fluorescence, qui ne présentent pas de gros défauts visibles, en utilisant un marquage avant formation des petites vésicules (NBD) ou après (Di6ASPBS). Des images sont présentées sur la séquence de la Fig. 5.10A.

Nous avons, de plus, pris des séries d'images à différentes altitudes autour de la lamelle où la bicouche est déposée après rinçage de la cellule, afin de vérifier l'efficacité de celui-ci. La fluorescence est très confinée au voisinage de la lamelle, il n'en reste plus en solution.

A l'aide d'un montage contenant un composant électro-optique, nous avons effectué des expériences de "retour de fluorescence après photoblanchiement" (FRAP). On bleache localement les chromophores, pendant 5 sec typiquement,

[11] L'orientation moyenne du groupe chromophore par rapport au plan de polarisation de la lumière incidente est un paramètre important.

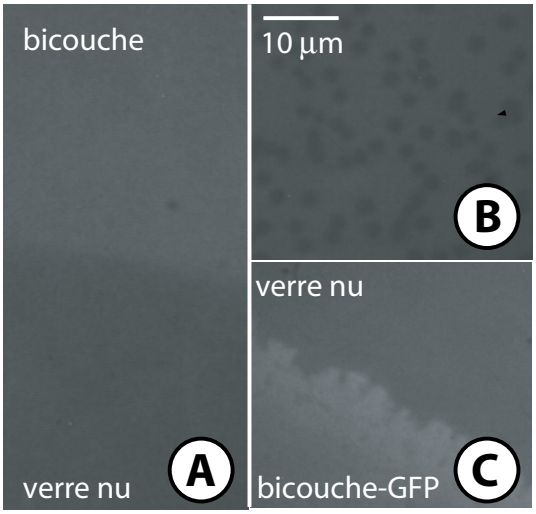

FIG. 5.9 – Images de fluorescence à un photon de bicouches déposées par fusion de petites vésicules : A : bicouche démouillée partiellement, marquée avec Di6ASPBS ; B : zone de défauts, lors d'un démouillage/remouillage très rapide ; C : bicouche partiellement démouillée, visualisée par fixation de GFP-6His

et on regarde leur retour par diffusion. Une séquence d'images est présentée Fig. 5.10A, où une zone en forme de "⊃" a été photoblanchie. La fluorescence revient relativement rapidement. On peut alors tracer la cinétique de retour de fluorescence, pour un petit carré de quelques centaines de μm^2, suivant que le colorant est un lipide NBD ou Di6-ASPBS (donc dans la bicouche) ou bien la GFP-6His attachée sur la tête d'un lipide (Fig. 5.10C).

On observe que le retour est plus lent dans le cas de la protéine. Connaissant la taille d du carré photoblanchi et le temps t de retour à une intensité de fluorescence homogène, on peut en tirer un ordre de grandeur du coefficient de diffusion D des espèces colorées par $d^2 \sim 2Dt$, ce qui donne pour le lipide NBD $D \sim 70\mu\text{m}^2/\text{s}$, et pour la protéine $D \sim 10\mu\text{m}^2/\text{s}$. Ces valeurs sont un peu élevées par rapport aux données de la littérature ($D \sim 1\mu\text{m}^2/\text{s}$ pour un lipide classique), mais la technique utilisée ne permet pas de mesurer des coefficients de diffusion avec une très grande précision (scanning + intégration sur toute la zone, plutôt que suivi d'un front).

5.4.1.c Conclusion

On peut dire qu'une bicouche est bien déposée sur le verre. Elle est fonctionnelle et fluide : les lipides (et les protéines qui y sont attachées via des lipides) peuvent y diffuser plus ou moins librement.

5.4.2 Microscopie à force atomique

Nous avons visualisé par microscopie à force atomique (ou AFM), avec l'aide de S. Scheuring (UMR168, PCC/IC), une bicouche supportée fabriquée par fusion de petites vésicules. La technique utilisée ne sera pas décrite en détails ici, mais peut être trouvée dans [Scheuring, 2000, Rinia, 2001]. Très brièvement, une pointe

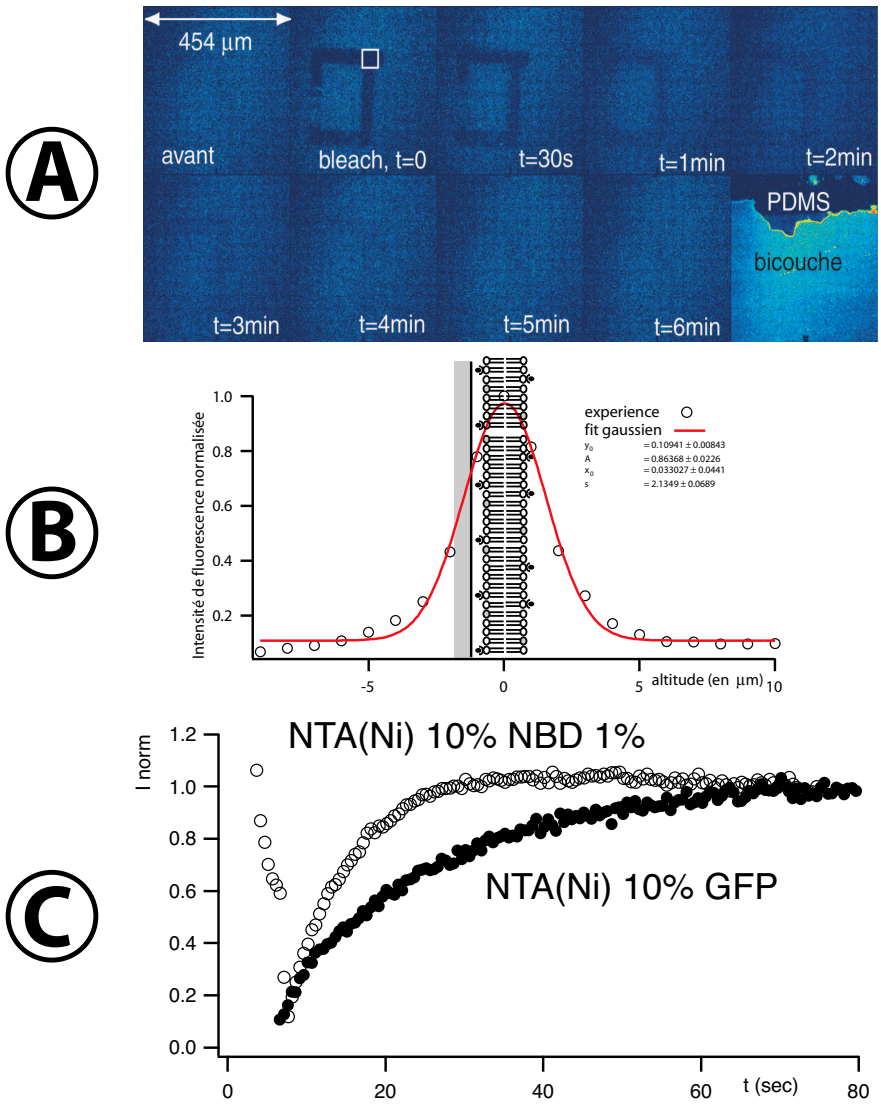

FIG. 5.10 – Images de fluorescence à deux photons de bicouches déposées par fusion de petites vésicules : A : sur la dernière image de la séquence, on voit la limite entre la bicouche marquée avec un lipide NBD et le bord de la cellule ; les autres images montrent une séquence de "FRAP" : on photoblanchit une zone, et la fluorescence revient par diffusion de la molécule fluorescente, la bicouche est donc bien fluide ; B : tracé de l'intensité observée lors d'un balayage en z de la cellule ; la fluorescence est localisée autour de la lamelle, la cellule est donc bien rincée ; le retour de la fluorescence via la fusion de vésicules restant en suspension est écarté ; C : Tracés de cinétiques de retour d'intensité de fluorescence lors d'expériences de "FRAP", avec un lipide marqué NBD ou de la GFP chélatée par les lipides NTA(Ni)

fine est utilisée pour balayer la surface d'un échantillon. Sa déformation due à la topologie de la surface est suivie par déflexion d'un faisceau laser.

Le microscope utilisé est un Nanoscope E équipé d'une chambre à liquide, fonctionnant en mode contact à force constante. La fréquence typique de balayage est de 5 Hz et la cale piézoélectrique a une course de 150 μm (cale J). Les pointes sont des pointes Olympus de 100μm ayant une raideur de 0,1 N/m. Le tampon d'observation est composé de 10 mM de Tris HCl, pH=7,5 150 mM KCl.

5.4.2.a Protocole

Une surface de mica fraîchement clivée est mise en contact avec une goutte de suspension de petites vésicules contenant 10% de DOGS-NTA(Ni) . Le volume de la goutte est ajusté de façon à ce que le rapport surface disponible/volume de vésicules soit similaire à celui employé lors des expériences de fluorescence. Les vésicules fusionnent avec la surface pendant 15 à 20 min, puis la surface est rincée soigneusement avec le tampon de mesure. La tête de l'AFM est alors montée et on image la bicouche. On éloigne la pointe de la surface et on introduit *in situ* la GFP-6His à une concentration voisine de 5 μM et on laisse incuber pendant 35 min. Après un rinçage soigneux, on image alors la surface. On éloigne de nouveau la pointe et on introduit alors *in situ* une solution d'imidazole à 250 mM similaire à celle utilisée lors du décrochage de protéines 6His d'une colonne de séparation NTA(Ni). Après 15 à 20 min, on rince soigneusement la cellule et on image la surface, en mesurant la hauteur de ce que l'on observe, à l'aide de défauts présents. La zone imagée lors de ces trois étapes est donc la même.

5.4.2.b Observations

Lors de la première étape (Fig. 5.11A), on observe que l'on a une hauteur moyenne assez homogène sur la zone parcourue (ce qui se traduit par une "couleur" moyenne assez homogène). On aperçoit quelques zones noires, qui font $\sim$ 1 μm de diamètre, et qui correspondent à des trous. Grâce à eux, on peut donc dire que l'on a bien déposé quelque chose sur la surface du verre. En grossisant une zone et en analysant un profil de hauteur avec un trou (Fig. 5.11D et E), on mesure l'épaisseur de ce qui a été déposé, soit 4-5 nm, ce qui correspond bien à une bicouche avec une couche d'eau intercalée. Par analyse de l'image, on peut estimer la fraction de surface non couverte à ce stade par les lipides, soit $\sim$7%.

Dans la deuxième étape,la topologie observée est assez homogène sur la zone observée, même là où des trous avaient été vus dans la bicouche. La couche de protéine semble donc assez dense, et on mesure une augmentation de hauteur, compatible avec la présence d'une protéine GFP perpendiculaire à la bicouche (de l'ordre de 10 nm) . On ne peut imager les protéines individuellement. Le rinçage de la protéine excédentaire se fait de manière assez drastique pour éviter des interactions génantes avec la pointe : on a éliminé quasi-totalement la protéine

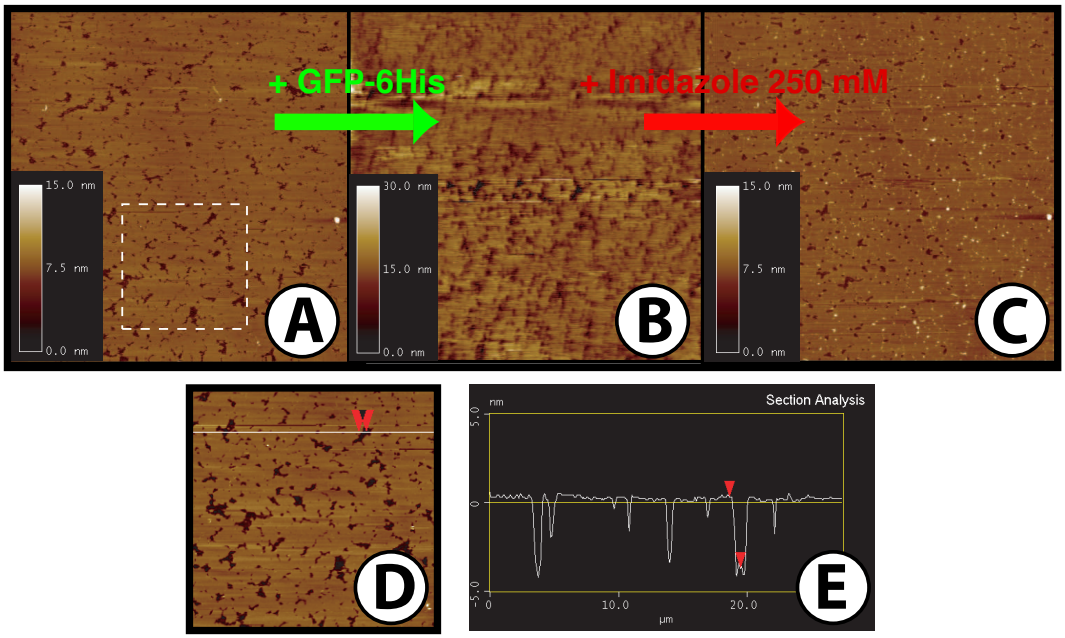

FIG. 5.11 – Images en AFM de bicouches déposées par fusion de petites vésicules : A : bicouche contenant 10% de DOGS-NTA(Ni) après rinçage (la zone fait 50μm $\times$50μm , l'échelle de hauteur (en nm) en niveaux de couleur est à gauche pour chaque image – il y a moins de 10% de la surface qui sont sans membrane). On voit quelques petits trous qui apparaissent en noir ; B : même zone, imagée après incubation 35 min avec de la GFP-6His. La hauteur moyenne mesurée a augmenté d'une dizaine de nm, ce qui correspond à une protéine "debout" et la topologie de la surface est différente, signe que l'on a bien ajouté quelque chose sur la bicouche ; C : après incubation 20 min avec une solution à 250 mM d'imidazole pour décrocher les protéines et rinçage. On a décroché la protéine et on image de nouveau la bicouche. Certains trous se sont scellés ; D : zoom sur la zone encadrée dans A ; E : profil de hauteur obtenu par un scan le long de la ligne dessinée sur D : on mesure une hauteur moyenne de la bicouche grâce au défaut, de l'ordre de 4-5 nm, ce qui est compatible avec l'épaisseur d'une bicouche supportée avec une couche d'eau intercalée.

en solution. On réussit à imager (et ce plusieurs fois de suite, afin de prendre des sections et des images) une couche de protéines relativement dense après rinçage, ce qui est en faveur d'une fixation de la protéine résistant au lavage sur des échelles de temps de l'heure.

La troisième étape, où l'on re-image la bicouche (par comparaison des hauteurs relatives), montre que la fixation de la protéine sur la surface est essentiellement spécifique, via l'étiquette 6His. De plus, on observe que certains trous se sont scellés, ce qui est compatible avec les observations de [Rädler et al., 1995, Cremer and Boxer, 1999] lors de création de défauts dans une bicouche.

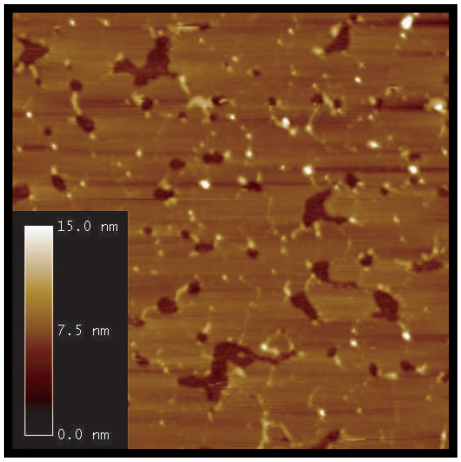

FIG. 5.12 – Image AFM d'une zone de 15μm $\times$15μm de bicouche, avec présence de défauts ("trous"). On aperçoit presque les bordures entre zones de fusion de vésicules, ce qui correpond bien à un mécanisme par adhésion et explosion de vésicules, puis fusion des différentes zones pour former une bicouche unique.

5.4.2.c Conclusions

On dépose donc par fusion de petites vésicules portant un lipide chélatant une bicouche unique qui est relativement continue. Ses défauts sont capables de cicatriser si on laisse un excès de vésicules en suspension ou bien le temps aux lipides de mouiller la surface. Elle est fonctionnelle et la décoration par des protéines ayant un groupe 6His se fait de manière spécifique et orientée, et résiste bien au lavage de la protéine libre en solution.

5.5 Adhésion entre vésicules géantes : contacts fugaces

Ayant pour acquis le fait que les vésicules géantes portant des lipides DOGS-NTA(Ni) peuvent chélater de manière robuste des protéines 6His, nous nous sommes tournés vers l'étude de l'adhésion entre vésicules géantes décorées avec les fragments $EC12$ de E-cadhérine marquées histidine.

Des expériences préliminaires ont montré l'occurence de rares doublets de vésicules décorées en présence de 1 mM de calcium, mais il était relativement difficile de distinguer les cas adhésifs (avec calcium) et non adhésifs (sans calcium). De plus, des études portant sur ces protéines à l'échelle de la molécule unique [Perret et al., 2002a] montrent que les interactions entre les fragments choisis sont de *courte durée* et de *faible force*.

Nous avons donc choisi d'effectuer une étude statistique du nombre de multiplets au cours du temps au sein de populations de vésicules décorées par $EC12$, en présence ou non de calcium. Les vésicules sont libres et peuvent se rencontrer ainsi de manière aléatoire (effet de convection). Si elles interagissent, on devrait voir de plus en plus de doublets et de structures plus complexes, bougeant de concert, au cours du temps.

5.5.1 Réalisation de l'expérience

Nous allons présenter ici le principe d'une telle expérience, les conditions qui doivent être réalisées pour l'effectuer et le protocole développé.

5.5.1.a Principe

Il s'agit de recenser dans un échantillon les "éléments" adhérents d'une population de vésicules. Pour ce faire, on prend des photos (en microscopie de fluorescence classique, non moyennées) de différentes zones de la préparation. Chaque zone est prise en photo 10 à 15 fois à des intervalles de temps de l'ordre de la seconde. On prend une (ou plusieurs) zones en photo toutes les 20 minutes, depuis l'introduction des vésicules dans la cellule, sur des durées allant jusqu'à l'heure.

La première succession d'images (toutes les secondes, sur le même site) permet de prendre en compte des "couples" transitoires de vésicules perdurant plus que la durée supposée de la liaison cadhérine-cadhérine ($\sim$ 1 sec [Perret et al., 2002a]). La deuxième (différents sites au cours du temps) permet d'établir une statistique de contacts au cours du temps : il a en effet été mis en lumière que l'action du calcium sur l'adhésion des fragments sur billes était optimale après un certain temps (de l'ordre de la demi-heure, [Feracci, 2003]).

Si les protéines génèrent de l'adhésion entre vésicules, le nombre d'objets composés de plusieurs vésicules devrait augmenter au cours du temps et on devrait finir par avoir de nombreux agrégats.

5.5.1.b Comptage

La méthode comptage est inspirée des techniques classiques de comptage de billes en biologie, avec la difficulté supplémentaire de ne pouvoir vraiment contrôler facilement les densités de vésicules dans les cellules d'observation et le

fait que les vésicules sont des objets très polydisperses en taille et en tension de surface.

Deux comptages sont effectués simultanément, celui du "nombre d'objets" et celui du "nombre de vésicules". Le premier est obtenu en considérant qu'une vésicule "célibataire" compte pour un objet, tout comme un "doublet" qui apparait adhérent, ou un multiplet d'ordre supérieur. On dénombre ainsi de manière différenciée les singulets, les doublets, les triplets et les ensembles $n > 3$ vésicules. La somme donne le nombre d'objets "adhérents" dans la photo, N_{obj}. Par des multiplications idoines et une sommation, on obtient (sans double comptage) le nombre de vésicules présentes dans la photo, N_{ves}. Une illustration de cette méthode est présentée sur la Fig. 5.13.

On porte alors en fonction du temps le rapport $n = \frac{N_{obj}}{N_{ves}}$, qui permet de voir si une tendance se dégage, en fonction de la présence de calcium, du temps d'incubation avec ce dernier, ou de la composition de surface des vésicules.

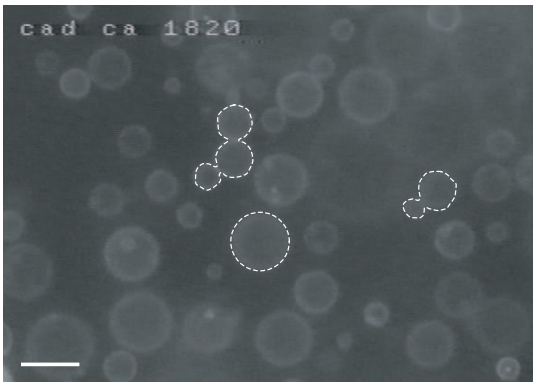

FIG. 5.13 – Photographie d'une zone : on a entouré trois cas, un singulet, un doublet et un triplet ; à ce point du comptage, le nombre d'objets est $N_{obj} = 1 + 1 + 1 = 3$ et le nombre de vésicules est $N_{ves} = 1 + 2 + 3 = 6$. La barre mesure 15 μm.

Un des problèmes liés à cette méthode est le choix du critère d'adhésion : la fluorescence n'apporte pas de critère absolu à ce niveau là. On peut penser que deux vésicules sont suffisamment proches pour coller lorsqu'au niveau de la zone présumée de contact la fluorescence est voisine de la somme des intensités de fluorescence des deux vésicules séparées. C'est le critère qualitatif que l'on a utilisé. Cependant, on n'a aucune vraie évidence de ce qui se passe dans la zone de contact.

Un autre problème est le choix d'une expérience témoin : on a choisi d'effectuer une expérience de comptage avec et sans calcium, en tout points identiques (c'est-à-dire avec le même lot de protéines), et de les comparer entre elles, pour chaque % de lipide chélatant.

5.5.1.c Conditions

Afin de réaliser ces expériences, il est primordial d'avoir beaucoup de vésicules. Il faut les faire sédimenter de manière très efficace, les manipuler avec beaucoup

de délicatesse, afin d'en conserver le plus grand nombre. Il faut aussi travailler avec des électroformations s'étant déroulées de manière optimale. De plus, il faut protéger la surface du verre avec un traitement *ad hoc* afin de ne pas perdre de vésicules par éclatement ou les empêcher de diffuser les unes vers les autres à causes d'interactions, dues au Tris ou au calcium, avec la surface. Il faut aussi choisir des zones où les vésicules sont nombreuses, mais pas trop, afin d'établir une statistique avec beaucoup d'objets tout en évitant d'avoir des objets en close-packing. Cette dernière situation ne permet pas de dire s'ils collent ou sont simplement compressés les uns avec les autres. Au final, on prend des zones telles que celle présentée sur la Fig. 5.13. Les vésicules font en moyenne 5 à 15 μm de diamètre.

5.5.1.d Protocole

Les vésicules géantes sont préparées par électroformation dans une solution sucrose :glucose (300mOsm) et contiennent 10% ou 0,1% de DOGS-NTA(Ni) . 200 μL de cette suspension sont sédimentées dans 800 μL de glucose/Tris 5mM pH=8 (305-310 mOsm) une nuit entière à 4°C dans un tube eppendorf fermé. On a observé que les vésicules supportent assez bien cette étape. Une fois 950 μL de surnageant prélevé, le culot, qui contient la quasi-totalité des vésicules, est marqué par perfusion avec 2% (v/v) de Di6ASPBS (560 μM , dans EtOH) pendant 15 à 30 min. Les protéines, qui ont été transférées par dialyse dans le même mélange glucose/Tris, sont alors introduites de façon à être à la concentration finale de 10 μM . L'incubation dure 45 min.

Une cellule d'observation est réalisée avec 4 épaisseurs de parafilm collées par chauffage entre une lame et une lamelle (ESCO, verre flotté ultra propre) [Sandre, 2000]. Son volume est $\sim 50\mu$L . Une solution de caséine (5 mg/mL dans un tampon imidazole) fraîchement réalisée est introduite, et laissée incuber 20 min. Elle est ensuite rincée très soigneusement avec plusieurs fois son volume en glucose/Tris. Dans de telles cellules traitées, des vésicules nues en présence de 1 mM de calcium n'éclatent pas sur le verre, et des vésicules décorées avec de la GFP-6His peuvent y être conservées quelques heures.

Le calcium est introduit après incubation dans le tube contenant les vésicules (afin d'avoir un milieu relativement homogène) à une concentration finale de 1 mM. Après 1 à 2 min, on introduit l'intégralité ($\sim 50\mu$L) de la suspension dans la cellule passivée, que l'on scelle avec une pâte inerte. Les vésicules sédimentent alors en quelques minutes au voisinage de la surface inférieure de la cellule, ce qui facilite leur observation. On n'a pas cherché à éliminer les cadhérines excédentaires présentes en solution sur les conseils d'H. Feracci car on se trouve en deça de la concentration limite ($\sim$40 μM) où elles s'aggrègent en solution [Chappuis-Flament et al., 2001, Feracci, 2003].

5.5.2 Résultats des expériences

Pour chaque temps qui apparaît dans les graphiques présentés, au moins 500 à 600 vésicules ont été comptées *à la main*, en pointant chaque objet sous PhotoShop. La procédure de détection est presque impossible à automatiser (il est facile de détecter le contour d'une vésicule, mais pas de détecter, sur une population hétérogène en taille et en signal de fluorescence, les multiplets... voire de compter des singulets, sachant que seule la membrane, fine, fluoresce).

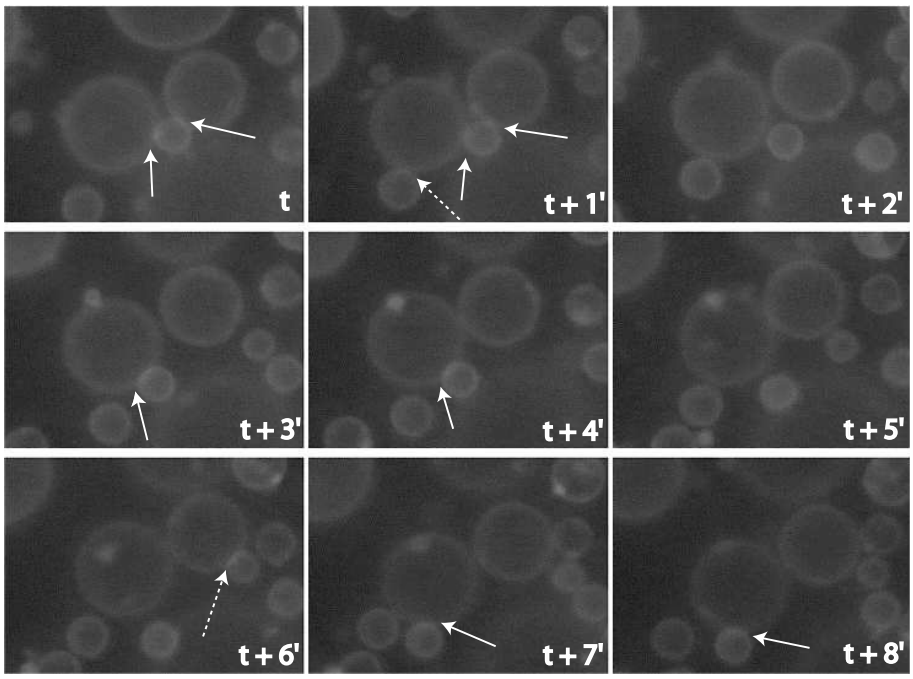

FIG. 5.14 – Visualisation des contacts furtifs, en présence de calcium.

Les résultats sont présentés sur la Fig. 5.15 pour deux compositions (10% et 0,1%) en lipide chélatant, avec les valeurs obtenues pour deux ensembles d'expériences en présence de calcium ayant eu lieu deux jours successifs (avec le même lot de cadhérine), ainsi que sans calcium. Les barres d'erreur ont été estimées à raison d'une erreur de comptage d'une vésicule au plus par image.

Aucune tendance n'apparaît (Fig. 5.15A et B). On ne note pas d'évolution notable au cours du temps du paramètre suivi, pour chacun des cas. Les doublets vus sur une image, n'apparaissent généralement plus sur la suivante, soit une seconde après. On ne note pas non plus de différence entre les cas avec et sans calcium, ou d'influence d'un vieillissement de la protéine entre les expériences menées en calcium à un jour d'intervalle. *A ce stade, on ne peut donc dire avoir vu une adhésion médiée par les cadhérines dans ces interactions entre vésicules libres.*

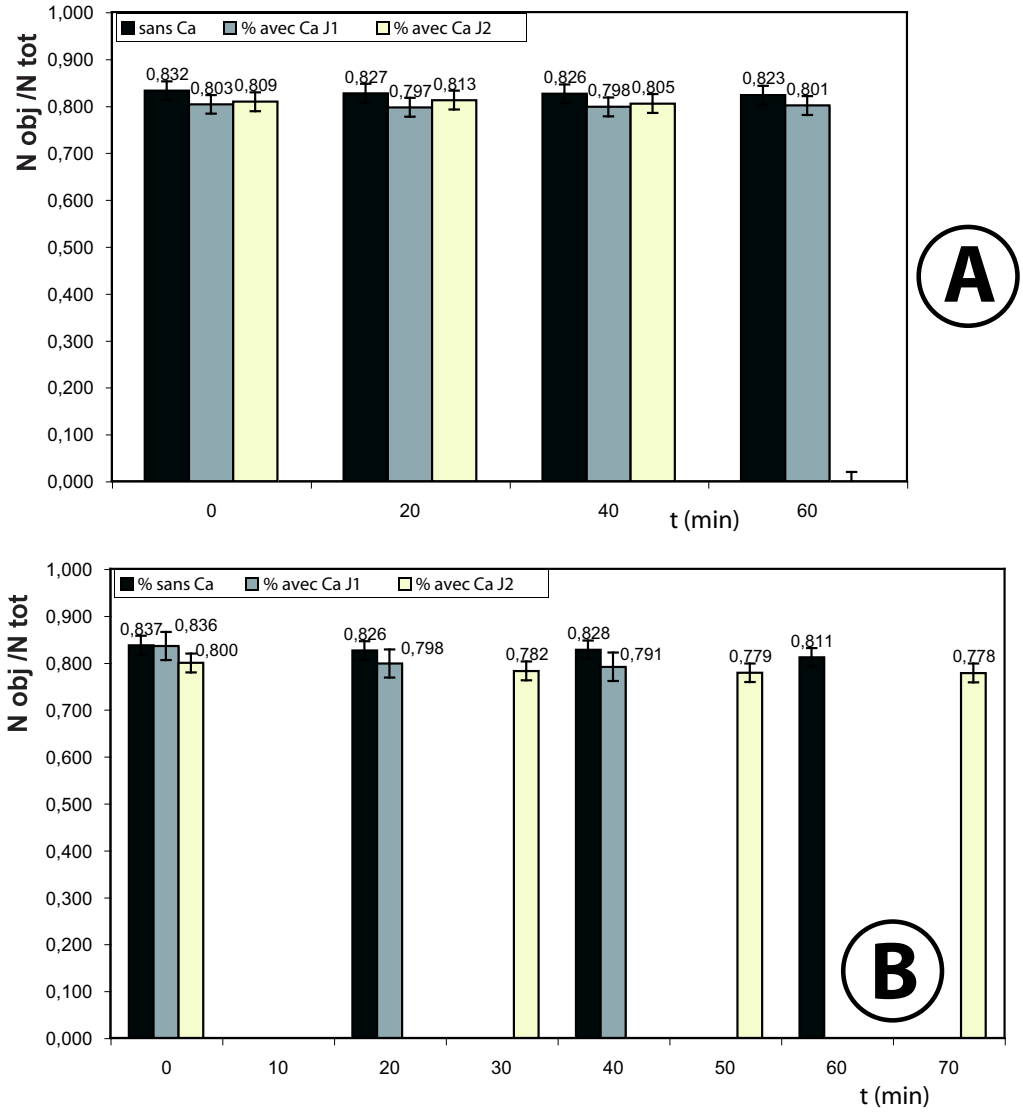

FIG. 5.15 – Résultats des comptages de contacts furtifs, en présence ou non de calcium, entre vésicules décorées par les fragments $EC12$ de E-cad. On a porté $n = \dfrac{N_{obj}}{N_{ves}}$ au cours du temps. A : avec 10% de DOGS-NTA(Ni) ; B : avec 0,1% .

L'étude de deux compositions relativements différentes en DOGS-NTA(Ni) permet d'écarter l'encombrement moléculaire des surfaces comme source possible de cette non-adhésion (pas assez de protéines entrainent peut être moins d'adhésion, mais trop de protéines peuvent les empècher de s'interpénétrer suffisamment pour que les interactions aient lieu). On ne note aucune différence entre les comportements des deux populations de vésicules de composition différente comme le montre la Fig. 5.16.

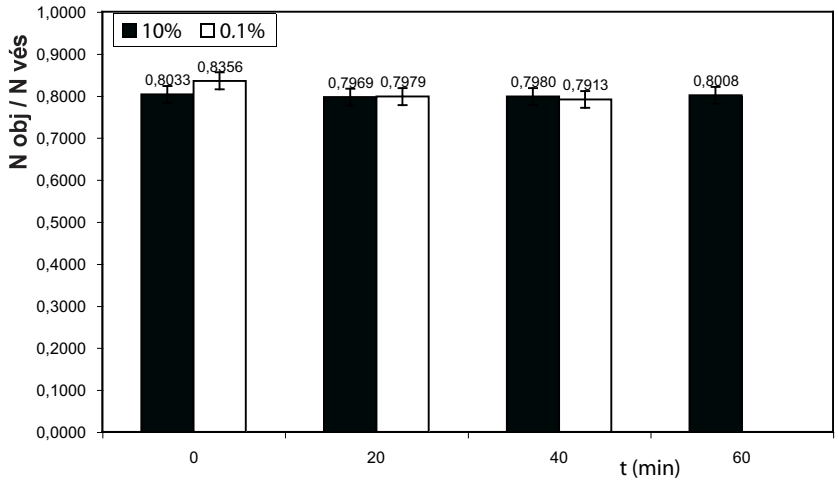

FIG. 5.16 – Résultats des comptages de contacts furtifs, en présence de calcium pour les deux compositions de vésicules.

5.5.3 Conclusions

En effectuant des statistiques sur l'interaction entre vésicules libres, décorées de fragments de cadhérine, nous n'avons pas observé de réponse à l'ion calcium au cours du temps. Nous n'avons pas observé d'effet de la composition des vésicules géantes, ce qui exclue un effet d'encombrement moléculaire des interfaces.

Des problèmes intrinsèques aux vésicules de grande taille sont apparus, par exemple le mouvement en z des vésicules géantes "de petite taille" qui perturbe le comptage (elle sortent du plan focal entre deux images), l'inhomogénéité des tensions des objets (certains fluctuent, d'autres sont tendus), et surtout l'obligation d'utiliser un critère d'adhésion somme toute approximatif. Des expériences similaires en microscopie électronique avec des petites vésicules doivent être menées par un laboratoire de Paris VII au sein du Programmme Incitatif et Coopératif "Adhésion".

Nous avons donc abandonné ce type d'expérience. Il nous est apparu que les protéines n'avaient peut-être pas le temps de s'organiser afin de créer des liens suffisamment forts pour résister à la séparation des objets par les fluctuations de la membrane et le mouvement brownien des objets eux mêmes.

Nous nous sommes donc tourné vers des expériences d'interaction entre vésicules et surfaces décorées de manière complémentaire. Les vésicules sont amenées au voisinage de la surface par la gravité. Elles peuvent y demeurer longtemps, et ceci peut laisser le temps à des interactions faibles de se construire. Nous allons détailler ces expériences dans les paragraphes qui vont suivre.

5.6 Adhésion entre vésicules géantes et surfaces décorées : points d'adhésion

Nous allons décrire les expériences d'adhésion entre une bicouche supportée et des vésicules géantes, décorées par des fragments de cadhérine. La zone d'interaction entre les vésicules et la surface est suivie en microscopie interférentielle.

5.6.1 Réalisation des expériences

5.6.1.a Protocole

Des vésicules soniquées et des vésicules géantes sont préparées suivant les méthodes indiquées dans la partie "Matériels et méthodes". Elles ont la même composition et contiennent 10% mol/mol de DOGS-NTA(Ni) .

Les vésicules géantes sont préparées dans un mélange sucrose/glucose 1 :1 (300 mOSm). Deux échantillons (de travail, 200 μL et de contrôle, 100 μL resp.) sont marqués par perfusion à 2% v/v avec une solution éthylique de Di6ASPBS à 560 μM pendant une demi heure. On ajoute alors délicatement quatre fois leur volume de glucose/Tris 5mM pH=8 (315-320 mOsm), et on laisse sédimenter les vésicules pendant au moins une heure. Puis on élimine le surnageant, de façon à ne garder que 20 à 25 μL qui contiennent la plupart des vésicules. L'échantillon de contrôle permet alors de s'assurer de la présence de vésicules géantes et de leur état en microscopie de fluorescence. Si ce contrôle s'avère concluant, on ajoute alors dans l'échantillon de travail le volume nécessaire de protéines (qui ont été dialysées dans le même mélange glucose/Tris) pour avoir une concentration à l'incubation de 10 μM . L'incubation dure 45 min.

Des bicouches supportées sont réalisées par fusion des petites vésicules sur verre très hydrophile dans des cellules moulées en PDMS, scellées après passage au plasma, et ont un volume de $\sim$20 μL , comme précédemment décrit. Les petites vésicules sont marquées préalablement avec 2% v/v de Di-6ASPBS (on évapore l'alcool sous flux d'argon, on introduit la suspension juste soniquée et on vortexe légèrement). On laisse incuber les surfaces pendant 20 min, puis on rince très

délicatement avec 5×100μL de glucose/Tris. On contrôle alors la présence de la bicouche par fluorescence, puis on introduit 40μL de protéines à 10 μM dans la cellule. L'incubation dure 45 min.

On rince alors la cellule avec le tampon d'observation (5×50 μL de sucrose/Tris 5mM, pH=8, 330 mOsm, 0 ou 1,5 mM de $CaCl_2$), puis on introduit 7μL de vésicules, afin d'avoir une concentration finale en calcium de 0 ou 1 mM. On scelle avec une pâte inerte et on attend 15 min (pour que le calcium ait le temps de diffuser partout et de "fonctionnaliser les protéines" [Feracci, 2003]) avant de débuter les observations. Ce temps d'attente est respecté même dans les expériences sans calcium : il permet, entre autres, de laisser le temps aux vésicules de venir au contact avec la surface fonctionnalisée.

Les vésicules sont alors repérées en microscopie de fluorescence et leur état d'adhérence avec la surface observé en microscopie interférentielle. On peut donc choisir des vésicules de tailles et de tension différentes dans l'échantillon afin d'étudier l'influence de ces paramètres sur l'adhésion. L'observation d'un échantillon s'effectue alors pendant 1h à 1h30 suivant la densité de la population en vésicules de l'échantillon.

5.6.1.b Choix d'une expérience témoin

Nous avons comparé les expériences avec et sans calcium. Ce dernier étant nécessaire à l'activité biologique des cadhérines. Nous avons aussi disposé d'un mutant des fragments $EC12$ de cadhérine construit par l'équipe d'H. Feracci. Ce mutant, appellé W2A pour "remplacement du tryptophane 2 (W) par une alanine (A)", a été montré comme étant, sinon totalement non adhésif, moins adhésif que les fragments $EC12$ *wild-type* (dits "fonctionnels") [Perret et al., 2002a]. L'utilisation de ces fragments mutés nous permet alors d'effectuer des comparaisons entre deux protéines dont l'activité est *a priori* différente avec très peu de variations de structure entre elles (seul un acide aminé est différent). Cela permet aussi d'effectuer des comparaisons entre expériences faites avec la même force ionique[12]. Nous comparerons donc à la fois des expériences avec/sans calcium pour un type de protéine, ainsi que des expériences avec la même salinité, mais entre protéines d'activité différente.

5.6.2 Résultats des expériences

Les résultats obtenus sont essentiellement statistiques. Les raisons en sont détaillées dans le paragraphe suivant.

[12]On a très peu de sel dans nos solutions tamponnées afin d'éviter d'avoir trop d'interactions non spécifiques. L'introduction du calcium a donc un rôle non négligeable sur ce paramètre, même à 1 mM

5.6.2.a Observations préliminaires

La Fig. 5.17 présente certaines zones de contacts observées, en présence et en absence de calcium, lors des expériences avec $EC12$.

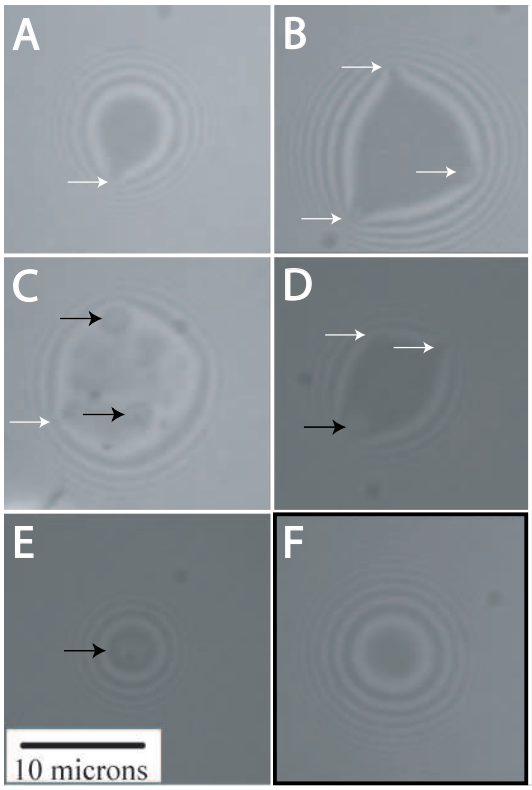

FIG. 5.17 – Zones de contacts observées lors d'expériences d'adhésion entre des vésicules géantes et une bicouche supportées, toutes deux décorées de fragments de cadhérines. Des pincements de la figure d'interférence (flèches blanches) et des zones adhérentes (flèches noires) sont vues en grand nombre dans les expériences avec $EC12$ en calcium (A à E), majoritairement des pincements simples (A), alors qu'on en voit très peu sans calcium (F). Néammoins, de nombreuses vésicules ne présentant pas de déformation de la figure d'interférences sont aussi vues en présence de calcium : *une étude statistique du phénomène s'impose*

La figure d'interférences, correspondant à la zone de contact entre la vésicule et la bicouche décorées par les fragments fonctionnels, en présence de calcium, présente parfois des "pincements" (Fig. 5.17A). De manière encore plus sporadique (moins d'une vésicule sur dix), elle peut présenter plusieurs points (il en a été observé 2 à 3 au plus, disposés souvent de manière relativement symétrique (Fig. 5.17B)). Parfois, une ou plusieurs zones clairement identifiables comme des zones adhérentes sont observées (Fig. 5.17C, D et E, ce dernier cas étant très rare). Un bon nombre de vésicules n'exhibe cependant pas ce type de comportement en présence de calcium. Sans calcium, les pincements sont excessivements rares.

Dans la littérature, on trouve que des zones de ce type là ont déjà été observées avec d'autres systèmes d'adhésion et sont très souvent présentées comme des signatures d'adhésion très faibles, ou pour des molécules d'adhésion présentes en très faible quantité à la surface de vésicules [Albersdörfer et al., 1998, Hu, 2001]. Nous déclarerons donc de telles vésicules *adhérentes*.

Nous avons réalisé *une étude statistique du phénomène* : dans les différentes

expériences (avec/sans calcium, protéine fonctionnelle ou mutant), nous avons recensé les vésicules observées en fonction de leur taille et de la morphologie de leur figure d'interférences.

5.6.2.b Comptage

Nous avons donc procédé au comptage des vésicules adhérentes dans nos échantillons. Nous avons toujours essayé, lorsque cela était possible, d'observer le plus possible de vésicules de tailles différentes, en balayant l'échantillon de manière à minimiser les risques de doubles comptages [13]. On a recencé les objets en fonction de leur taille, présentant un pincement ou une zone d'adhésion, deux ou plus de deux, et porté le % de vésicules présentant au moins une de ces particularités (le taux de vésicules en présentant plus d'une étant très faible, $< 10\%$).

Nous avons choisi de présenter ces résultats de deux manières, soit en détaillant suivant les différentes gammes de tailles observées, soit de manière globale. Nous soulignerons le fait que considérer de manière globale l'adhésion dans un type de préparation peut cacher des problèmes inhérents à des effets de taille des objets sur l'adhérence.

Les expériences présentées ont fait l'objet de différentes campagnes de mesures, par groupe de trois expériences à chaque fois (2 en calcium, 1 sans), pour $EC12$, c'est-à-dire la protéine fonctionnelle, et pour W2A, le mutant. On a donc utilisé à chaque fois un lot de protéines différentes.

5.6.2.c Comparaison EC12 *vs.* W2A

Nous présentons sur la Fig. 5.18 les distributions de taille observées sur les différents ensembles d'expériences effectuées avec les deux types de protéine, avec et sans calcium. Le nombre total de vésicules comptées varie avec le type de préparation, de manière assez aléatoire, suivant la qualité des électroformations, l'efficacité des transferts, la résistance des vésicules et l'expérience de l'expérimentateur... A ce stade, les nombres de vésicules comptées sont compris entre 100 et 300 ($EC12$/Ca : 243 ; $EC12$/sans Ca : 103 ; W2A/Ca : 318 ; W2A/sans Ca : 164).

Malgré la présence plus ou moins importante de petites vésicules de diamètre inférieur à 20 μm , on observe que la majeure partie des vésicules ont un diamètre entre 21 et 50 μm . Ceci correspond aux taille typiques de vésicules géantes rencontrées au cours de la plupart des types d'expériences menées sur ce type d'objets. La présence de très gros objets (de taille supérieure à 51 μm de diamètre) est très aléatoire.

[13] Cela demande de "reconnaître" les vésicules déjà observées, ce qui permet aussi d'observer parfois une "cinétique" des phénomènes, et demande de l'expérience...

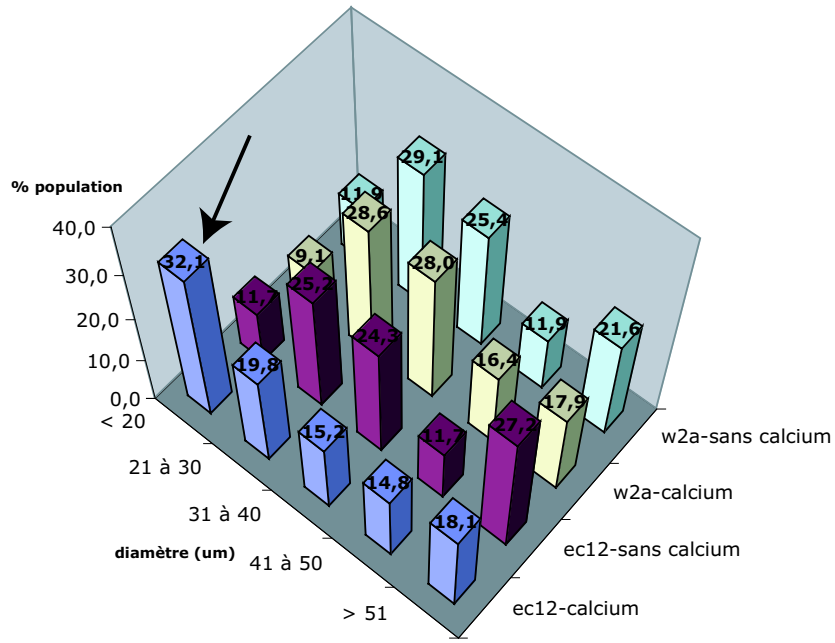

FIG. 5.18 – Distribution de taille des vésicules observées au total, dans les expériences effectuées avec la protéine fonctionnelle ou le mutant, avec ou sans calcium. On note la forte présence de petites vésicules (de diamètre < 20 μm) dans les expériences avec la protéine fonctionnelle et en calcium — Nombre de vésicules comptées : $EC12$/Ca : 243 ; $EC12$/sans Ca : 103 ; W2A/Ca : 318 ; W2A/sans Ca : 164

Si l'on considère maintenant le % de vésicules, pour chaque gamme de taille, qui présente au moins un pincement de la figure d'interférences c'est-à-dire le % de vésicules adhérentes, on obtient la Fig. 5.19.

On voit que les vésicules de diamètre inférieur à 20μm sont quasiment toutes *non adhérentes*, ce qui est compatible avec le fait qu'elles semblent beaucoup bouger verticalement dans la chambre d'observation. Leur poids ne leur permet pas de reposer au voisinage de la surface sans être trop soumises au mouvement brownien. Il apparait aussi clairement que plus les vésicules sont de grande taille, plus il y en a qui adhèrent.

De plus, on constate une très forte différence entre les cas avec calcium et sans calcium, qui ne dépend pas de la taille. Les vésicules collent en présence de calcium, ce qui est logique car il est censé réguler le caractère adhésif des protéines.

Enfin, on note une différence notable d'activité entre les deux types de protéines, en présence de calcium : le mutant, qui doit coller moins, respecte ses engagements... (Fig. 5.20A).

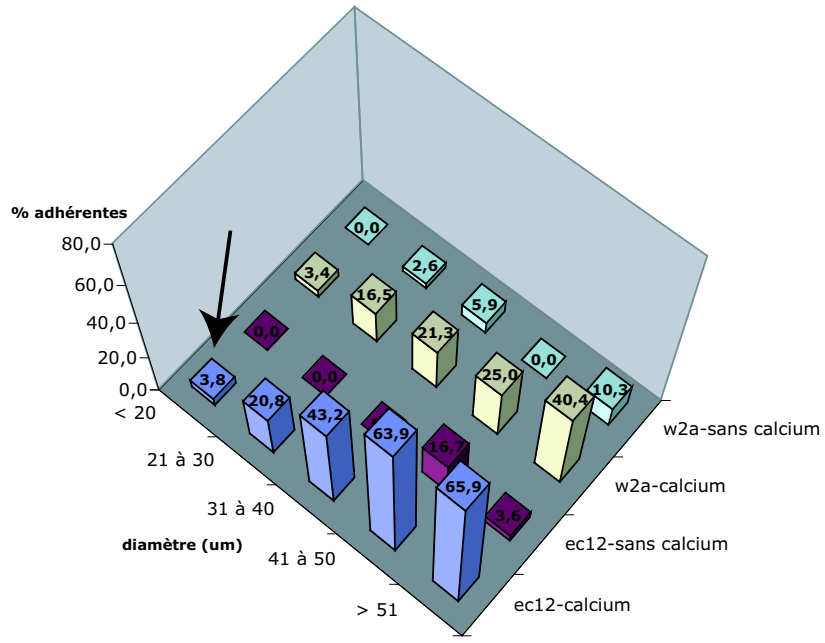

FIG. 5.19 – Distribution du caractère adhérent ("avec pincement") en fonction de la taille des vésicules observées au total, dans les expériences effectuées avec la protéine fonctionnelle ou le mutant, avec ou sans calcium. On note le très faible caractère adhérent des petites vésicules (de diamètre $< 20\mu$m) dans les expériences avec la protéine fonctionnelle et en calcium, qui perturbe la statistique globale.

5.6.2.d Comparaisons globales - effets de taille

Afin de comparer les différents types d'expériences menées de manière plus globale, nous avons calculé le % total d'objets exhibant un caractère adhésif (indépendamment de leur taille). Après avoir comparé les distributions des tailles et du caractère adhésif en fonction de la taille (Figs. 5.18 et 5.19), nous avons choisi de ne pas prendre en compte les vésicules de moins de 20 μm de diamètre dans ce calcul. En effet, elles sont très présentes dans l'expérience avec $EC12$ en présence de calcium (plus d'une sur trois), bien plus que dans les autres cas de figure, et elles sont non adhérentes. Elles conduisent à sous estimer le poids des autres vésicules observées pour cette expérience.

On a ainsi obtenu le graphe global présenté sur la Fig. 5.20B. Il permet une comparaison directe et simple entre les différents cas expérimentaux. On observe que presque une vésicule sur deux présente au moins un pincement de sa figure d'interférence dans le cas *a priori* le plus favorable à l'adhérence par des cadhérines (protéines fonctionnelles en présence de calcium). La protéine mutée censée être moins adhérente n'entraine ce comportement que pour une vésicule

sur 5. Sans calcium, et quelle que soit la protéine, l'adhérence est très faible (< 5 %).

5.6.2.e Expérience avec sel

Afin de vérifier que ce n'est pas le manque de sel dans le tampon qui est responsable du peu d'adhésion observée, nous avons réalisé une série d'expériences avec la protéine fonctionnelle, en présence et absence de calcium, dans une solution de glucose/Tris/50 mM NaCl (à osmolarité conservée = 330 mOsm). Cette quantité permet de s'assurer que le contraste de densité entre l'intérieur et l'extérieur des vésicules est à peu près le même que dans les expériences précédentes, mais il est de signe opposé : les vésicules sédimentent... Il a donc fallu changer de microscope pour observer les échantillons.

Sur les Fig. 5.21A et B sont présentées les distributions en taille et en adhérence (en fonction de la taille des vésicules) pour les expériences réalisées. Ceci met encore en lumière le caractère problématique des petites vésicules : elles ne sont pas observées dans un type d'expériences. Si on ne les prends pas en compte, le résultat global des expériences est montré sur la Fig. 5.22. Il y a très peu d'écart entre les cas avec et sans calcium, ce qui montre que les interactions sont ici surement non spécifiques. On peut même voir des mousses entre grosses vésicules, ce qui n'avait jamais été observé avec les échantillons sans NaCl ajouté (Fig. 5.23).

5.6.3 Discussion

L'effet prévu du calcium est bien mis en évidence. Sans lui, l'adhésion n'est pas possible. Mais, étant donné que ce calcium modifie les interactions non spécifiques, il est plus judicieux de comparer les effets obtenus en changeant la protéine : le mutant se révèle bien moins efficace que la protéine fonctionnelle, ce qui est compatible avec les données de molécule unique obtenues en chambre à flux [Perret et al., 2002a].

De plus, nous avons effectué des tests qualitatifs supplémentaires. Si l'on met, en présence de calcium, des vésicules décorées de fragments fonctionnels de cadhérine au dessus d'une surface de verre nu, on n'observe ni présence de points d'adhésion sur les vésicules, ni d'éclatements. Ceci est compatible avec un effet stérique dû à la protéine, qui protège la membrane. Ce test n'a pu être effectué qu'une fois, avec un "reste" de vésicules. Si l'on remplace les cadhérines sur les vésicules et la bicouche supportée par de la GFP, qui n'entraine pas d'adhésion en présence de calcium. On n'observe pas non plus ni points d'adhésion, ni d'explosion sur verre nu. La mise en présence de vésicules NTA(Ni) non décorées de protéine avec une bicouche de même composition dans du sucrose/Tris n'a pas montré d'adhésion de même que la mise en présence de vésicules NTA(Ni) avec une bicouche contenant le même % de lipide, mais non chargé en ion nickel.

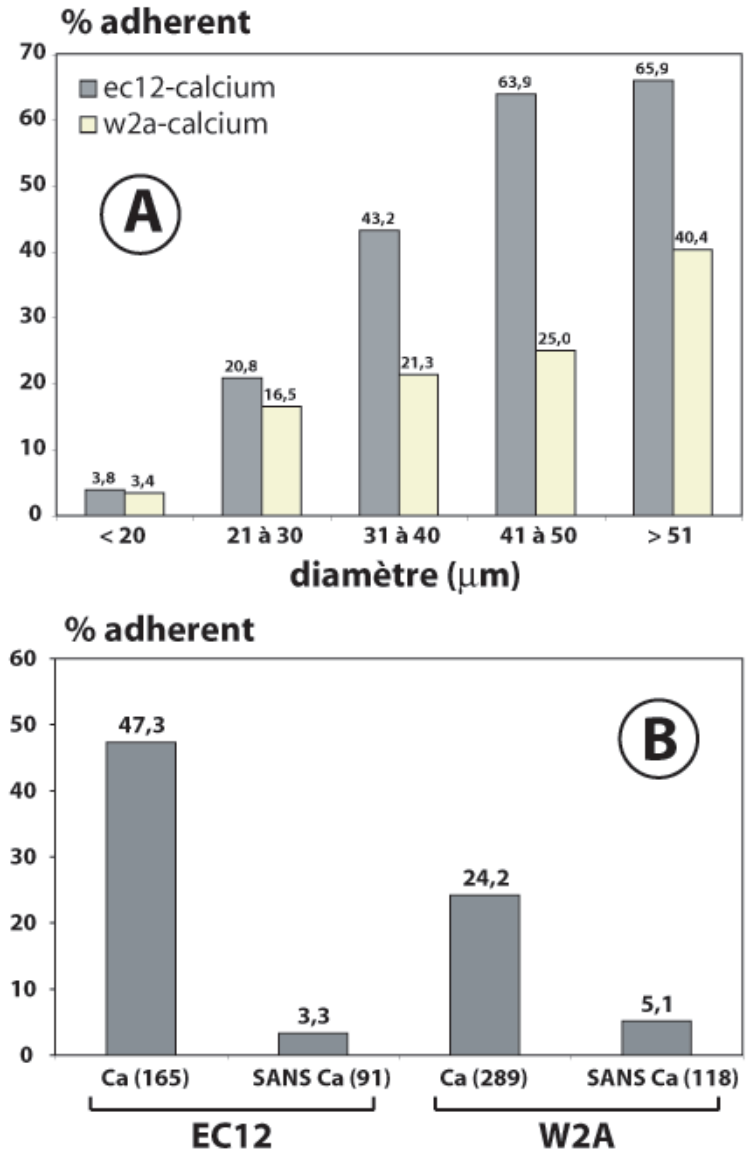

FIG. 5.20 – A : Effet de la taille des vésicules entre deux types d'expériences à salinité constante, avec la protéine fonctionnelle et le mutant. Quelle que soit la taille, ce dernier "colle" moins bien que la protéine fonctionnelle. Les petites vésicules ne participent que très peu au débat. B : Comparaison globale, toutes tailles confondues, des différentes expériences. Comme décrit dans le texte, on a exclu les vésicules de diamètre $< 20\mu$m qui entrainaient un fort biais dans la statistique. Le nombre de vésicules prises en compte est donné sur le graphe, avec les conditions (protéine/sel). On voit un effet spectaculaire du calcium, mais qui peut contenir une composante non spécifique. Cette composante est "éliminée" par comparaison, à salinité constante, entre la protéine fonctionnelle et le mutant.

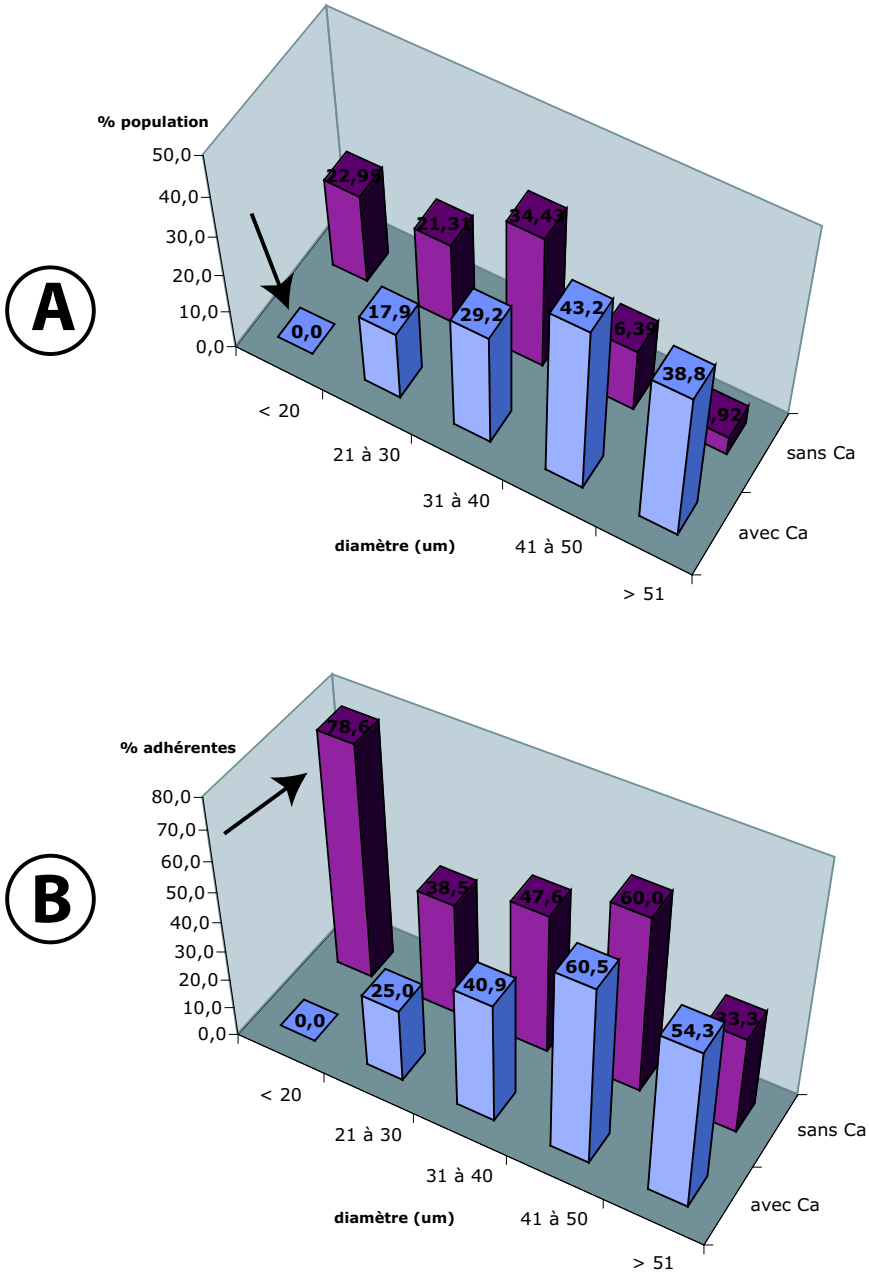

FIG. 5.21 – A : Distribution des tailles de vésicules observées dans des expériences avec la protéine fonctionnelle, en présence de 50 mM de NaCl supplémentaires dans la solution. On note l'absence de petites vésicules dans le cas avec calcium. B : Distribution du caractère adhérent des vésicules observées. On note une fois de plus la perturbation que causent par les petites vésicules.

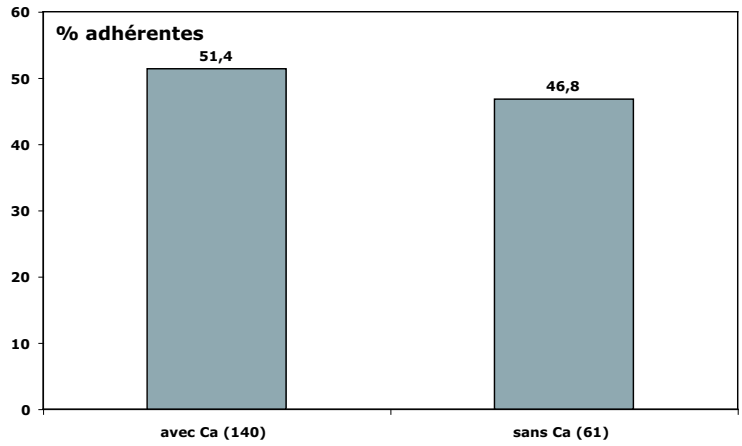

FIG. 5.22 – Comparaison globale des expériences avec 50 mM de NaCl : il n'y a pas de différence notable entre les cas avec et sans calcium : on a une adhérence majoritairement non spécifique (on a éliminé les petites vésicules, et le nombre d'objets pris en compte est indiqué sur le graphique).

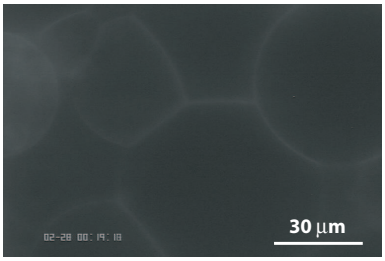

FIG. 5.23 – Mousse avec des vésicules décorées de la protéine fonctionnelle, en présence de calcium, avec 50 mM NaCl : interactions majoritairement non spécifiques ?

On a de manière assez nette (voir Figs. 5.18 et 5.19) un effet de la taille des vésicules. Plus elles sont grosses, plus elles ont tendance à adhérer si les conditions de fonctionnalité de la protéine et de présence du calcium sont réunies. La force qui les appuie sur la surface est leur poids. Par exemple, une vésicule de 10 μm de diamètre, présentant un contraste de densité de 3 kg/m^3 avec le milieu l'entourant, a un poids de l'ordre de 16 pN, alors que pour une vésicule de 60 μm de diamètre, il est 200 fois supérieur, soit 3,4 nN (Fig. 5.24). Ceci peut "forcer" l'adhésion.

Les petites vésicules bougent en z, car souvent le niveau de gris de leur tâche centrale "clignote", signe d'un changement d'altitude de plusieurs dizaines de nm. Les vésicules de plus de 20 μm de diamètre ont toutes le même niveau de gris sombre de la zone centrale dans leur figure d'interférence. Ceci permet de dire que la séparation entre la membrane et la surface est à peu près la même.

De plus, les vésicules de grande taille proposent une surface de contact plus grande, pouvant favoriser la statistique de contacts efficaces. Les vésicules présentant

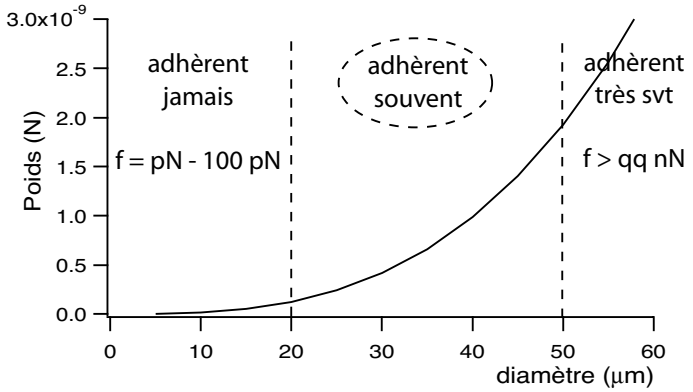

FIG. 5.24 – Influence de la taille de la vésicule sur son poids, et mise en évidence d'une différence de caractère adhérent des vésicules. Les toutes petites collent aussi peu que s'il n'y avait pas de calcium, les très grosses collent très souvent (2 sur 3). Les vésicules intermédiaires sont celles sur lesquelles on distingue le mieux l'effet du changement de la protéine (Fig. 5.20A), donc celles qui contiennent le plus d'informations. La force appliquée via leur poids est de quelques centaines de pN.

plus d'une zone ou d'un point d'adhésion sont souvent celles de grande taille.

L'origine de la présence de points d'adhésion majoritairement en périphérie de la zone de contact entre la vésicule et la surface est dû à la formation d'une fossette (ou "dimple") [Martin, 1997, de Gennes et al., 2003]. Cette déformation est aussi observée lors du démouillage d'un film de liquide intercalé entre une bille de caoutchouc et une surface de verre. Les bords de la zone de contact sont plus proches de la surface, et l'apparition de points adhésifs se fait au bord du méplat.

L'effet de l'ajout de sel a été testé, et semble augmenter l'adhésion non spécifique : on n'arrive même plus à différencier les cas avec et sans calcium.

Dans les expériences sans NaCl, on a essayé de suivre les pincements observés, afin de les voir évoluer au cours de l'expérience. On a suivi des vésicules en continu sur plusieurs minutes ou même, en choisissant des vésicules ayant un défaut reconnaissable, sur le temps de l'expérience, en revenant plusieurs fois sur les mêmes. Le système a très rarement évolué. Il faut noter que les vésicules, ayant été manipulées un grand nombre de fois (pipetages successifs, transferts de milieux, introduction dans la cellule d'observation) sont relativement tendues, ce qui diminue les surfaces en contact. Ce que l'on a pu observer néanmoins est la résistance de ces points aux fluctuations de la membrane, tant que celles-ci n'étaient pas trop importantes et leur rupture sous un faible cisaillement, produit par une infiltration d'eau dans un échantillon "en fin de vie". Très rarement, on a pu voir le phénomène que présente la Fig. 5.25 (apparition de points adhérents

supplémentaires ou croissances de zones adhérentes).

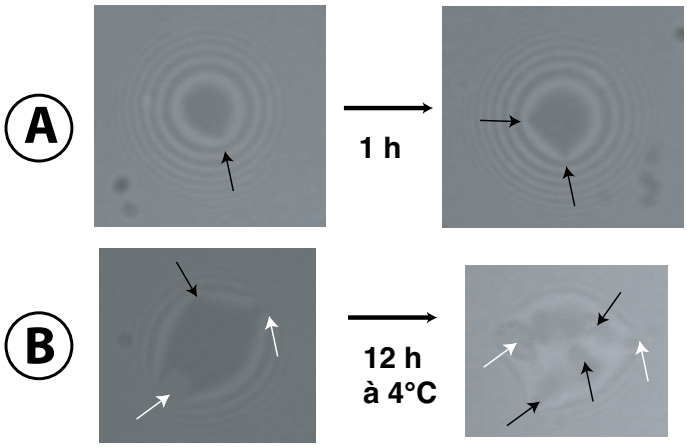

FIG. 5.25 – Evolution au cours du temps de l'adhésion de vésicules décorées avec $EC12$ en présence de calcium : A : sur la durée de l'expérience (1 h) un deuxième point est apparu ; B : après une nuit à 4°C, on voit que le nombre de pincements a augmenté (flèches noires) et que les zones d'adhésion ont grandi (flèches blanches). Le changement d'orientation de l'image est du au repositionnement de l'échantillon sous l'objectif. La vésicule s'est dégonflée, car le milieu extérieur s'est légèrement évaporé. La largeur de la zone de contact dans le premier cas est de l'ordre de 5 μm et dans le second de l'ordre de 20 μm

Chapitre 6

Vésicules en adhésion forte : électrostatique et spécifique

Nous allons présenter dans ce chapitre l'interaction de vésicules géantes avec des surfaces pour des interactions relativement fortes. Dans un premier cas nous étudierons l'adhésion forte entre une vésicule chargée négativement et une surface recouverte d'un polycation. Nous examinerons la formation de "blisters" non adhérents apparaissant dans la zone d'adhésion lorsque l'on change le pH de la solution : on modifie l'adhésion en modifiant le taux de charge du polyélectrolyte. Dans un second cas, nous étudierons l'adhésion spécifique de vésicules géantes décorées à l'aide d'un lipide biotine sur des surfaces décorées par une bicouche supportée contenant le même lipide biotinylé et fonctionnalisées avec de la streptavidine. Nous interprèterons les lois cinétiques observées dans ce dernier cas, ainsi que l'effet de différents paramètres (tension de la vésicule, densité de clefs et de serrures, présence ou non d'une répulsion stérique via des lipides à tête polymère).

6.1 Interactions électrostatiques et "blisters"

Les vésicules géantes formées de DOPC portent une charge résiduelle négative, dues à des résidus de synthèse ou de dégradation de ces lipides. On peut augmenter la densité de surface des charges présentes en incluant lors de l'électroformation des lipides dont la tête est clairement porteuse d'une charge négative, comme la sérine du lipide DOPS.

Ainsi, nos membranes modèles des vésicules géantes sont chargées négativement, tout comme les membranes naturelles.

Une méthode utilisée par les biologistes cellulaires pour fixer des cellules à des fins d'observation sur des lames de verre est d'utiliser un polycation, comme la poly(lysine) qui va créer une adhésion forte de la cellule sur le substrat. Récemment, la cinétique d'une telle adhésion a été étudiée par [Pierres et al., 2003]

par microscopie interférentielle. Pour des vésicules géantes, l'adhésion ressentie est tellement forte qu'elle peut conduire à l'explosion des objets ou à une mise sous tension telle que des pores s'ouvrent [Sandre et al., 1999b]

Nous avons réalisé une expérience utilisant le poly(allylamine) (ou PAH, [Fery et al., 2003]), un autre polycation, afin de coller des vésicules géantes sur des surfaces et de modifier leur état d'adhésion en modifiant le taux de charge du polycation en changeant le pH de la solution dans laquelle l'adhésion a lieu.

6.1.1 Action du pH sur le polycation PAH

Le PAH est composé d'un motif simple : sa chaine carbonée est linéaire et porteuse de groupes amines. Le pK_a d'une amine est de l'ordre de 9-10. Si le pH dépasse cette valeur, on change la densité de charges du polymère, et ce faisant on change l'interaction entre les membranes négatives et la surface.

6.1.2 Cinétique d'adhésion et instabilité du contact

Nous allons décrire dans ce qui va suivre la réalisation de ces expériences, ainsi que les observations qui ont été faites.

Protocole Afin de pouvoir changer de manière continue le pH de la solution entourant les vésicules, les expériences ont été réalisées avec une chambre à flux dont les fenêtres sont une lame coupée au couteau à verre et une lamelle. Ces lames sont nettoyées avec un tensioactif dilué puis montées après rinçage et séchage, avec de la graisse à vide et de la colle epoxy. La chambre à flux montée est présentée sur la Fig. 6.1.

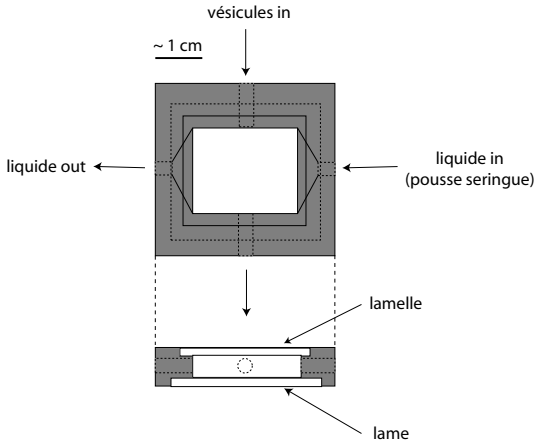

FIG. 6.1 – Cellule à flux usinée dans du PVC ou du Teflon. Elle est fixée sur la platine du microscope à l'aide de deux pattes vissables assurant sa stabilité. Elle est connectée à un pousse-seringue qui permet d'échanger les solutions de manière douce.

La surface du verre est incubée avec une solution de PAH ($\sim$ mg/mL dans de l'eau) pendant quelques minutes. La cellule est alors rincée de manière abondante

(plusieurs fois son volume) avec une solution de glucose 300 mM (le pH d'une telle solution est aux alentours de 6).

Des vésicules de DOPC pur, préparées dans du sucrose 300 mM, sont marquées à 2% v/v avec Di6-ASPBS pendant 15 min. Une fraction d'entre elles sont introduites dans la cellule. Elles sédimentent puis adhèrent sur la surface. Après quelques minutes, on les image en microscopies de fluorescence et interférentielle. Beaucoup de vésicules ont survécu à l'adhésion et se présentent sous la forme d'hémisphères ayant une zone de contact adhérente continue : imagées verticalement, on voit qu'elles ont une forme aplatiee. D'autres ont explosé et les patches fluorescents résultant sont observés sur le verre.

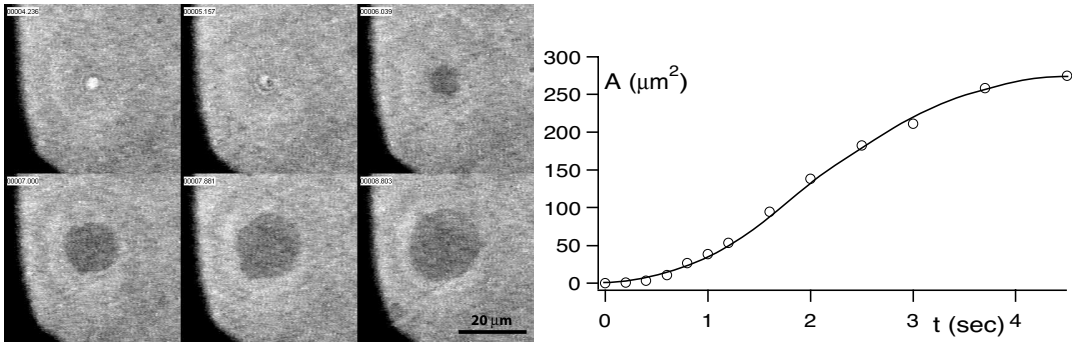

FIG. 6.2 – Adhésion d'une vésicule géante sur une surface recouverte de PAH observée en microscopie interférentielle et tracé de A(t) correspondant

On effectue alors un ou plusieurs changements de pH à l'aide d'une solution de sucrose/NaOH de pH=11 et de la solution de sucrose non modifiée. On image les modifications apportées à l'adhésion des vésicules sur le substrat en combinant les deux méthodes citées précédemment. Il faut noter ici qu'un changement de pH est forcément couplé à une augmentation légère de l'osmolarité du milieu externe aux vésicules (les membranes sont "étanches" aux ions), ce qui a tendance à les dégonfler.

Observations Dès que l'on introduit la solution basique dans la cellule, on commence à observer sur les vésicules un changement de morphologie de la zone d'adhésion. Des petites "cloques" (ou blisters) semblent se décoller et fusionner entre elles pour minimiser l'énergie de courbure que coûte leur existence (Fig. 6.3). La zone d'adhésion diminue un peu de taille, comme si le bord de cette zone s'était décollé. Ces phénomènes sont relativement rapides. En fluorescence, les cloques apparaissent comme de petites vésicules à l'intérieur de la vésicule adhérente, au voisinage de la surface du verre (Fig. 6.4A-B).

Au final, les cloques fusionnent en une seule de grande taille (Fig. 6.4C-D).

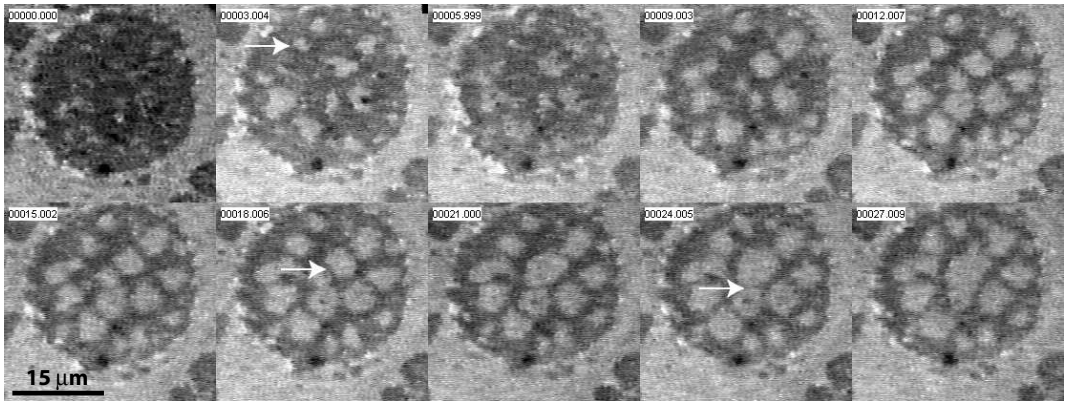

FIG. 6.3 – Effet d'un changement de pH de 6 (glucose seul) à 11 (glucose/NaOH) : des blisters de membrane se décollent et fusionnent (flèches blanches), au fur et à mesure que la charge positive du PAH diminue. Le temps (en sec) est indiqué en encart.

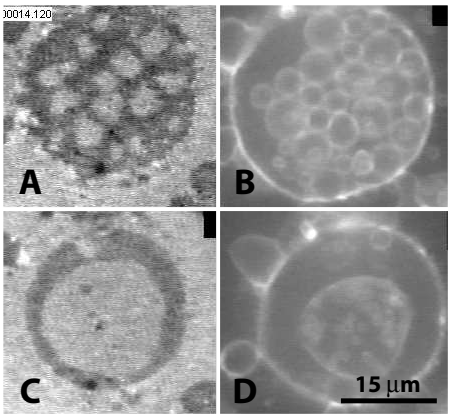

FIG. 6.4 – Blisters observés en microscopies interférentielle et de fluorescence, en cours d'apparition et après fusion sous la forme d'un seul gros blister, ce qui représente l'état final du système.

Discussion Le polycation PAH rend la surface du verre très positive et donc très attractive pour les vésicules géantes qui portent une charge résiduelle négative [Pincet et al., 1999]. L'utilisation de tels polyélectrolytes génère une adhésion très forte qui peut mettre sous tension les vésicules de manière si importante que des pores peuvent s'ouvrir et la vésicule exploser [Sandre et al., 1999b]. Il est donc relativement difficile d'obtenir des surfaces telles que les vésicules restent intègres avec de tels composés. La cinétique de l'adhésion électrostatique générée est très rapide, de l'ordre de quelques secondes. A la fin, soit la vésicule éclate, soit elle conserve une forme hémisphérique, et présente des blisters, déjà observés par [Nardi et al., 1997] avec un autre système.

Si l'on retrace pour la vésicule de la Fig. 6.2 l'aire de contact, $A(t)$, en échelles logarithmiques, on observe deux régimes (Fig. 6.5). Aux temps courts, on peut caractériser l'étalement par une loi de puissance $A(t) \sim t^n$. On trouve un exposant

valant ~ 2. Aux temps plus longs, cinétique d'adhésion se ralentit, et l'aire de contact atteint une taille d'équilibre.

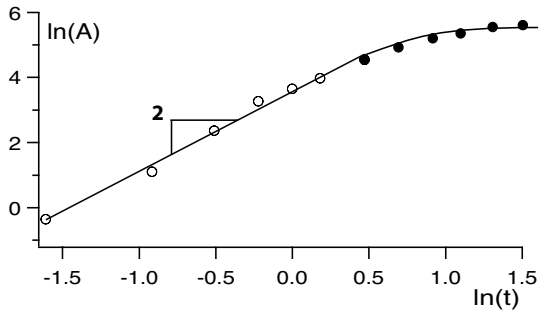

FIG. 6.5 – Tracé du logarithme de l'aire d'adhésion en fonction du logarithme du temps pour la cinétique d'adhésion induite par le PAH de la vésicule de la Fig. 6.2. Deux régimes sont visibles (voir texte).

La forme de la zone d'adhésion, très circulaire, permet de définir un rayon R de la zone de contact, qui varie alors comme $t^{n/2}$. Dans le cas des temps courts, le rayon varie de manière linéaire. Le ralentissement de l'adhésion aux temps longs peut être imputé à la mise sous tension de la membrane.

Nous n'avons pu répéter de nombreuses fois le type d'expériences présenté ici, en particulier les mesures de cinétique d'adhésion au vu de leur très grande vitesse. A chaque observation d'une vésicule ayant (sûrement pour des raisons de tension de membrane faible avant l'adhésion) survécu, nous avons pu observer le phénomène de bourgeonnement.

Le changement de pH change la charge de surface du verre et change donc l'adhérence de la vésicule sur ce dernier. Les blisters peuvent être vus comme des zones où, du fait du changement de charge local du PAH, la charge de surface de la vésicule n'est plus compensée, ce qui est contrebalancé par le développement de blisters, à l'image des travaux de Nardi *et al.* [Nardi et al., 1997]. Ils fusionnent pour minimiser le coût énergétique de courbure de la membrane et leurs pressions de Laplace. Néanmoins, cette explication est encore sujette à discussion.

En essayant de revenir à un pH de 6, c'est-à-dire de retourner à un état de charge initial du PAH, nous avons réussi à recoller partiellement la zone d'adhésion, mais les vésicules sont généralement assez abîmées par le premier changement de pH, et survivent assez mal à l'application d'un second flux.

6.2 Adhésion spécifique forte

Afin d'étudier une adhésion spécifique bien caractérisée, nous avons choisi d'utiliser le couple streptavidine/biotine qui a été présenté succintement dans le chapitre "Matériel et méthodes". La biotine est une petite vitamine qui peut aller se loger dans une des quatre poches que présente, deux par face, une protéine, la streptavidine. On peut moduler alors, suivant le % de lipide biotintylé que l'on incorpore dans les membranes la "force" des interactions et la densité de clefs et de serrure, jouant par là sur la capacité à diffuser de ces molécules.

Dans ce qui va suivre, nous allons présenter quelques expériences réalisées avec ce système, à la fois pour étudier l'adhésion entre deux vésicules, ou entre une vésicule et une surface décorée. Dans le premier cas, nous avons tenté d'utiliser la microscopie de fluorescence à deux photons, parfois couplée à la génération de seconde harmonique pour tenter d'observer une structuration de la zone d'adhérence. Dans le second cas, nous avons utilisé la microscopie intéferentielle pour suivre la dynamique de croissance des zones d'adhérence.

6.2.1 Adhésion vésicule/vésicule

Nous avons majoritairement utilisé deux compositions de vésicules pour observer leur adhésion médiée par intercalation de la streptavidine : lors de l'électroformation, nous avons incorporé 1% de lipide cap-biotine (voir Chapitre 3) qui a un petit bras espaceur, et parfois 5% de lipide DOPE-PEG_{2000}. Des essais préliminaires avec un lipide biotinylé sans ce petit bras espaceur avaient montré que l'adhésion était moins efficace, sûrement pour les raisons d'accessibilité mentionnées précédemment. Les % utilisés sont ceux censés donner (i) de l'adhésion spécifique de manière notable (% cap-biotine), (ii) une répulsion stérique convenable (% PEG) et (iii) des plaques d'adhésion évoluant lentement quand le lipide-PEG est introduit [Albersdörfer et al., 1997, Albersdörfer et al., 1998].

6.2.1.a Observation par microscopie de fluorescence

Nous avons cherché à créer des mousses de vésicules géantes spécifiquement collées par de la streptavidine, afin d'avoir un système nous permettant de visualiser, par transfert au microscope "deux photons", la structure des zones d'adhésion.

Protocole Des vésicules biotinylées sont sédimentées, parfois après marquage avec Di6-ASPBS, dans du PBS (la solution de sucre encapsulée a une osmolarité de 270-280 mOsm, et le PBS utilisé a été mesuré à 280 mOsm). L'adhésion marche en effet un peu moins bien dans un milieu non tamponné.

Elles sont alors introduites dans une cellule dont la surface a été passivée avec de la caséine (sinon les vésicules adhèrent sur le verre) contenant une solution de PBS à 0,001, 0,01, 0,1, 1 mg/mL de streptavidine (Extravidine ou Extravidine-Cy3 (fluorescente), Sigma). On observe alors l'échantillon, soit avec un cube FITC (pour visualiser les membranes, grâce à Di6-ASPBS), soit avec un cube RITC (pour visualiser la streptavidine fluorescente quand elle est utilisée). Les deux colorants ne sont pas très bien séparés spectralement (Fig. 6.6). Néanmoins, ces expériences montrent que l'on peut décorer les vésicules avec de la streptavidine.

Remarque Nous avons aussi tenté d'obtenir des vésicules "streptavidinées", c'est-à-dire d'incuber des vésicules biotinylée avec de la streptavidine concentrée

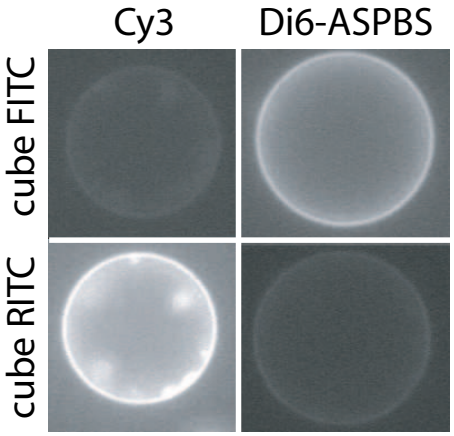

FIG. 6.6 – On image des vésicules, marquées soit par Di6-ASPBS (membrane), soit par Cy3 (porté par la streptavidine). On observe ainsi la fixation de la streptavidine sur les vésicules qui ont des lipides biotinylés (des vésicules n'en ayant pas, ne fluorescent pas dans les mêmes conditions)

(: *sim*1 mg/mL) afin de saturer la surface biotinylée[1]. Le principal problème à résoudre consiste alors à éviter que les vésicules ne se collent entre elles en sédimentant, et ensuite à éliminer totalement la streptavidine résiduelle : des essais, par simple sédimentation, par dialyse et par centrifugation se sont révélés très insatisfaisants : beaucoup de doublets ou de mousses sont déjà observables après cette première étape et les vésicules célibataires restantes sont généralement porteuses de nombreux défauts (tubes, agrégats...). Nous avons donc abandonné rapidement cette voie pour nous tourner vers la méthode d'introduction de streptavidine directement dans le milieu.

Observations Tout d'abord, avec les plus hautes concentrations en protéine utilisées (0,1–1 mg/mL) nous n'avons pas réussi à observer des mousses de grande taille c'est-à-dire composées de nombreuses vésicules. On sature les surfaces des vésicules en streptavidine, ne laissant plus aucune possibilité de pontage des surfaces (Fig. 6.7B).

Pour les concentrations les plus faibles ($< 0{,}1$ mg/mL), nous avons obtenu des mousses d'une dizaine de vésicules semblables à celles obtenues par adhésion non spécifique par pontage des membranes par l'ion calcium (Fig. 6.8). Néanmoins le comportement est assez peu homogène dans la cellule d'observation : dans certaines zones, de nombreuses mousses sont visibles ; dans d'autres les vésicules sont séparées les unes des autres, alors que la solution est homogène en protéine.

On observe le même phénomène avec des particules colloïdales sur lesquelles s'adsorbent des polymères :

- à forte concentration, les couches sont saturées et les colloïdes se repoussent ;
- à faible concentration, des sites réactifs demeurent ("starved layer") et le polymère peut ponter les particules qui floculent en formant des agrégats.

[1] L'idée est alors de marquer "en rouge" (Cy3) les vésicules portant la streptavidine et celles n'en ayant pas "en vert" (lipide NBD ou Di6-ASPBS)

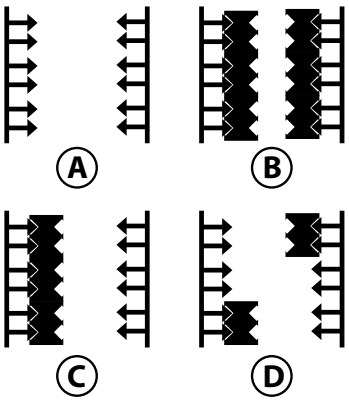

FIG. 6.7 – Adhésion entre deux surfaces biotinylées par intercalation de molécules de streptavidine : A : pas d'adhésion car pas de streptavidine ; B : pas d'adhésion car trop de streptavidine ; C : cas d'une surface saturée en streptavidine face à une surface biotinylée : l'adhésion est très favorisée. Ce cas correspond à celui où l'on aurait deux populations de vésicules décorées de manière complémentaire ; D : cas où les deux surfaces portent les deux molécules : ce cas est adhésif, et l'adhésion dépend du taux de couverture en protéine des deux surfaces. On a dans ce dernier cas un système "statistiquement" adhésif. Ce cas correspond à celui où l'on introduit de la streptavidine en solution à des concentrations suffisamment faibles.

Nous avons aussi testé des vésicules contenant divers % de lipides biotinylés (de 0,01% à 10 %), avec deux types d'espaceur pour la biotine (Fig. 3.4A et B). Les mousses de vésicules ont été observées en plus grand nombre avec le lipide ayant le bras espaceur le plus long, et lorsque l'on augmente le % de clefs. Ceci qui confirme l'importance de la présence d'un espaceur pour améliorer la reconnaissance (la clef a plus de chances de trouver la serrure car elle peut sonder un espace plus grand et l'insertion dans les poches de la streptavidine peut se faire plus aisément).

Ce type de comportement a été observé à la fois avec des vésicules seulement biotinylées et des vésicules à la fois biotinylées et pégylées. Nous avons alors concentré nos efforts sur l'observation de ces mousses en microscopie à deux photons afin de visualiser la structure de la zone d'adhésion.

6.2.1.b Observation au microscope à deux photons

Avec le microscope à deux photons auquel nous pouvons accéder (Laboratoire Neurophysiologie et Nouvelles Microscopies, dir. S. Charpak, ESPCI), deux expériences peuvent être envisagées : visualiser la zone de contact avec la microscopie de génération de seconde harmonique (laquelle est sensible à la symétrie de la distribution des marqueurs entre les deux membranes qui adhèrent et à leur distance : on verrait alors des zones allumées et d'autres éteintes suivant que les membranes sont suffisamment éloignées ou adhérentes), ou localiser une protéine fluorescente avec une bonne résolution spatiale.

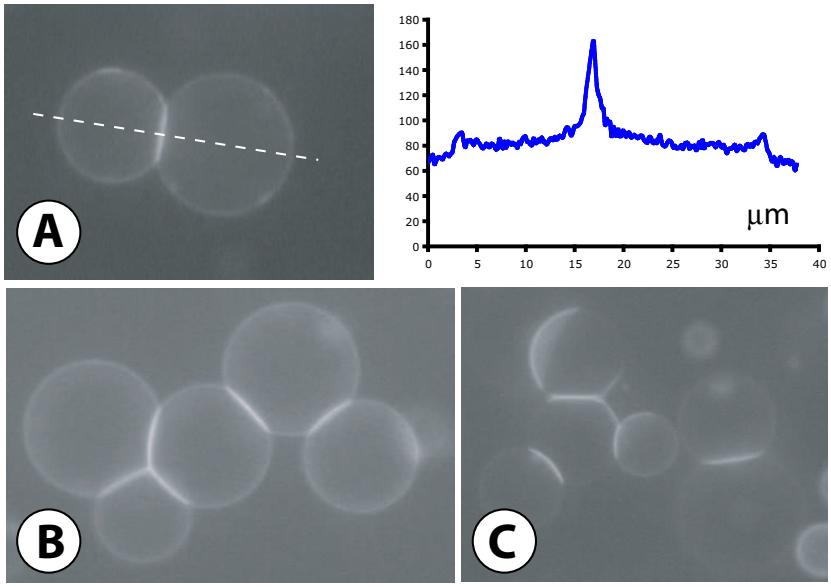

FIG. 6.8 – Mousses "à la streptavidine" - le colorant est Cy3, porté par la streptavidine et est observé en microscopie de fluorescence classique ; A : doublet de vésicules adhérentes et tracé de l'intensité (en niveaux de gris) le long de la ligne : la streptavidine s'accumule au niveau de la zone d'adhésion ; B : mousse impliquant plus de vésicules, qui ressemble à s'y méprendre à une mousse de bulles ; C : évolution de mousses après 30 min à 1 h : presque toute la streptavidine se trouve dans la zone de contact. Ces observations sont cohérentes avec ce que décrit [Noppl-Simson and Needham., 1996].

Microscopie par génération de seconde harmonique Ici, les vésicules sont marquées avec le colorant membranaire Di6-ASPBS avant introduction dans une cellule d'observation contenant une solution de streptavidine dans du PBS. Grâce au microscope à deux photons mis en place par l'équipe de J. Mertz à l'Institut Curie, puis à l'ESPCI, qui permet d'obtenir simultanément des images de fluorescence à deux photons et par génération de seconde harmonique on peut localiser aisément des vésicules et observer leur adhésion.

Nous avons cherché à observer, par imagerie de génération de seconde harmonique couplée à de la microscopie de fluorescence à deux photons, la structure des zones d'adhésion entre vésicules contenant 1% de lipide cap-biotine et entre vésicules contenant de plus 5% de lipide PEG2000. Malheureusement, que ce soit dans des solutions de sucre ou dans du PBS, nous n'avons pas réussi à trouver une concentration de streptavidine en solution nous permettant d'obtenir à coup sûr de très nombreuses mousses. Les quelques mousses éparses obtenues n'ont pas exhibé de différence notable pour les deux compositions. Nous avons observé des adhésions entre vésicules présentant une zone de contact "homogène" : le

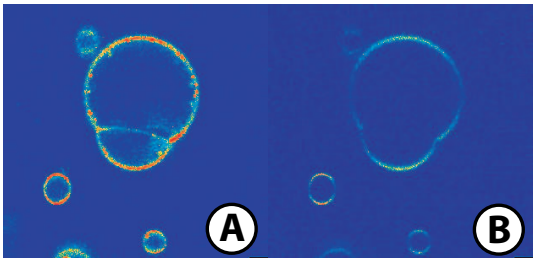

FIG. 6.9 – Mousses "à la streptavidine" entre vésicules contenant un lipide biotinylé, la membrane étant marquée par Di6-ASPBS. A : image de fluorescence à deux photons ; B : image simultanée par génération de seconde harmonique : les vésicules adhèrent de manière continue, du moins à l'échelle de résolution de cette technique (distance entre membranes ∼100 nm).

signal de génération de seconde harmonique est éteint le long de cette zone (Fig. 6.9B). A priori, elle est donc "continue", c'est-à-dire ne présentant pas de patches d'adhésion décelables par la comparaison de ces deux techniques d'imagerie.

Dans [Albersdörfer et al., 1997], des vésicules, contenant 5% de PEG_{2000} et jusqu'à 1% de lipide biotinylé avec un petit espaceur, interagissent avec une bicouche supportée de même composition, fonctionnalisée avec de la streptavidine. Elles exhibent des patches d'adhésion de quelques microns, séparés par des zones non adhérentes, et qui semblent stationnaires. Les auteurs proposent comme explication une séparation de phase entre les lipides responsables de l'attraction spécifique (biotine) et ceux responsables de la répulsion (polymère) [Bruinsma and Sackmann, 2001].

Les vésicules que nous avons observé, adhérentes ou non, sont relativement tendues et ne présentent pas de fluctuations géantes, à cause des multiples manipulations qu'on leur a fait subir. Les membranes, lorsqu'accolées par endroits par l'adhésion, ne peuvent pas s'éloigner l'une de l'autre grâce à des fluctuations de grande amplitude, et ne peuvent donc être séparées qu'au plus de quelques nm (la taille du polymère) dans les zones non adhérentes. Ainsi, on doit être non résolutif, en termes de distance avec les interférences de la SHG, pour distinguer les zones adhérentes et non adhérentes.

Afin de contourner ceci, nous avons tenté d'utiliser la grande résolution spatiale de la fluorescence à deux photons, cette fois-ci en imageant non plus la membrane, mais directement une streptavidine marquée.

Utilisation d'une streptavidine fluorescente Pour ce faire, nous avons effectué des tests similaires à ceux du paragraphe précédent avec de l'Extravidine (Sigma), marquée avec Cy3. L'idée est de localiser les endroits où se concentre la protéine, afin de voir si l'on peut imager les zones d'adhésion des membranes, séparées par des zones libres où se concentreraient les lipides PEG.

Le colorant Cy3, comme le montre la Fig. 6.10 s'avère ne pas être adapté (en termes de section efficace à deux photons, sur laquelle nous n'avons pas de

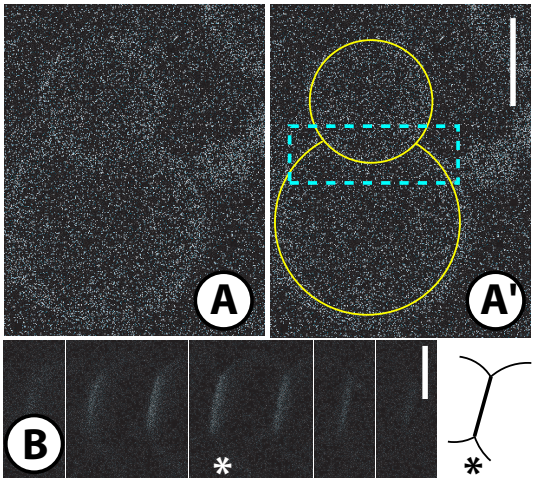

FIG. 6.10 – Mousse "à la streptavidine" observée en fluorescence excitée à deux photons, à l'aide du colorant Cy3 présent sur la protéine. A : on constate un très faible contraste ; A' : on a souligné la position des membranes et de la zone de contact ; B : zoom sur une zone d'adhésion entre deux vésicules, en prenant différentes coupes en z de la zone, autour du focus dénoté par une astérisque et schématisé à côté – entre deux images il y a 2 μm de différence d'altitude. Les barres mesurent 5 μm .

données) à ce type de microscopie. On repère quelques mousses en microscopie à transmission, et leur observation en fluorescence (en ayant bien sûr adapté la longueur d'onde d'excitation fournie par le laser) est décevante. La membrane est marquée par la protéine, mais on n'a pas énormément de signal de fluorescence. On ne peut même pas vraiment dire s'il y a plus de protéine dans les zones de contact.

6.2.2 Adhésion vésicule/surface décorée

Nous nous sommes donc tourné une fois de plus vers la microscopie interférentielle, afin de suivre les cinétiques d'adhésion entre une surface décorée par une bicouche fluide décorée par de la streptavidine et des vésicules portant de la biotine, avec ou sans présence de PEG [Boulbitch et al., 2001]. Pour ce faire, plusieurs approches sont envisageables : adsorption d'une protéine biotinylée ou greffage d'une couche auto-organisée biotinylée, que l'on fonctionnalise par la suite avec de la streptavidine.

Ces deux modes de décoration ont comme principal désavantage d'immobiliser la protéine sur la surface (elle ne peut diffuser), ce qui mime moins une surface biologique qu'un capteur de type "puce" (à ADN, à protéines). Certes, la clef (la biotine) peut diffuser sur la vésicule de manière libre.

Afin d'introduire la possibilité que les deux partenaires de cette adhésion spécifique puissent diffuser, nous avons choisi ici de décorer, à l'instar de ce qui a été décrit dans le chapitre précédent, la surface du verre avec une bicouche supportée contenant un lipide biotinylé, que l'on fonctionnalise par incubation à la streptavidine. Si l'on choisit bien la concentration de lipides fonctionnels, on peut contrôler la densité et la capacité à se mouvoir de la protéine sur la surface.

6.2.2.a Décoration des surfaces

Vésicules Les vésicules géantes sont produites par électroformation, dans un mélange sucrose/glucose 1 :1 (v/v) 270 mOsm. On a testé ce processus pour les compositions suivantes : matrice de DOPC, avec jusqu'à 5% de lipide biotine ou cap-biotine, ainsi que des mélanges DOPC/(cap)biotine contenant jusqu'à 5% de DOPE-PEG2000. Via le processus d'obtention on peut donc *a priori* contrôler le rapport entre les composantes de répulsion stérique et d'attraction spécifique.

Remarque Lors des expériences, le milieu choisi est le PBS : les vésicules sédimentant, nous avons donc utilisé un microscope inversé (pour faire de la microscopie interférentielle) ou un microscope droit (auquel cas, on fait de la "trans"-microscopie interférentielle, au travers de l'objet). Si l'on faisait de la vraie "RICM", avec technique Antiflex, les zones d'adhésion devraient changer de "couleur" lorsque l'on passe d'une technique à l'autre... noires dans le premier cas, blanches dans le second, car l'ordre des indices lors des réflexions ajoute un déphasage de $\pi/2$. Comme nous le verrons sur les images, nous ne sommes pas sensibles à ce déphasage.

Bicouches supportées

Cellules Les cellules d'observation sont constituées d'une lame et d'une lamelle de verre ESCO séparées par un film de PDMS solide d'épaisseur contrôlée, commercial (Gel Pack, épaisseur 200 μm) ou obtenu par spin-coating d'un volume connu de PDMS liquide (le même que celui que l'on a décrit précédemment pour réaliser les cellules d'observation de très petit volume par moulage – son épaisseur est alors voisine de 200 μm).

Les surfaces de verre sont nettoyées dans une solution diluée de tensioactif alcalin (Micro 90) à plus de 60°C pendant au moins 30 min, puis rincées à l'eau milliQ de manière très soigneuse alors qu'elles sont encore chaudes. Elles sont ensuite séchées sous flux d'argon et stockées à l'abris de la poussière.

Les espaceurs de PDMS sont découpés dans les films, et la cellule est montée après passage de la lame et des espaceurs au plasma à air résiduel pendant une minute, puis passage de la lame sur laquelle sont collées les bandes de PDMS et de la lamelle dans le même dispositif. Les cellules sont alors mises en contact avec une suspension de petites vésicules dans la demi-heure qui suit son montage.

Petites vésicules et bicouche supportée Des petites vésicules contenant 1% de lipide cap-biotine sont obtenues par sonication sur glace dans un mélange sucre/tris/NaCl comme décrit dans le chapitre "Matériel et méthodes", et conservées à 4°C pendant au plus 5 jours. Elles sont re-soniquées une à cinq minutes avant usage.

On les met en contact, après marquage avec Di6-ASPBS, avec la surface propre des cellules juste montées. l'incubation dure alors 20 min. Comme précédemment mentionné, le rinçage doit être abondant et soigneux (ici on le conduit avec du PBS 280 mOsm). On peut alors incuber la surface avec de la streptavidine, puis rincer avec du PBS (500 μL).

Nous avons constaté que pour une incubation durant 30 minutes, il vaut mieux travailler avec une concentration en protéine de l'ordre de 0,1 mg/mL dans du PBS : l'adhésion, lorsqu'une telle incubation est menée avec moins de protéine est plus aléatoire.

On peut alors introduire des vésicules géantes, et observer leur adhésion, en utilisant à la fois la microscopie de fluorescence (elles sont elles aussi marquées par perfusion avec Di6-ASPBS) et la microscopie interférentielle.

Vérification de la présence de la bicouche Les test décrits dans le chapitre précédent (visualisation de défauts en microscopie de fluorescence, confirmation du caractère fluide de la bicouche par FRAP sur un lipide marqué ou sur Di6-ASPBS en deux photons, observation et mesure de l'épaisseur en utilisant des petits défauts par AFM) ont été réalisés avec la composition DOPC :cap-biotine 99 :1 et montrent que l'on réussi bien à obtenir une bicouche fluide continue sur le verre, d'épaisseur voisine de 5 nm. Les tests de FRAP sur une protéine marquée ont été effectués sur de la streptavidine Cy3, mais se sont montrés très peu probants à cause du mauvais rendement en deux photons de ce colorant. Nous n'avons pu tenter, pris par le temps, d'autre colorant, comme la FITC qui aurait peut être mieux convenu.

D'après [Albersdörfer et al., 1997], pour le % de biotine utilisé, la streptavidine est à la limite de la compacité en surface et a une mobilité réduite.

6.2.2.b Etude de la cinétique de l'adhésion

Nous avons effectué quelques études préliminaires de cinétiques d'adhésion de vésicules contenant 1% de lipide Cap-biotine sur des surfaces décorées par des bicouches de même composition, fonctionnalisée par de la streptavidine. Nous avons observé une différence de comportement relativement marquée en fonction de l'état de tension initial des vésicules. Nous allons présenter ici quelques résultats tirés de ces expériences.

De nouveau, comme dans le cas de l'adhésion électrostatique, les adhésions observées sont très différentes en morphologie et cinétique de celles observées avec les cadhérines.

Tests préliminaires Nous avons préalablement vérifié que l'adhésion ne se produit qu'en présence de streptavidine sur la bicouche. La forte salinité du PBS fait éclater les vésicules sur le verre nu, lorsqu'il vient d'être passé au plasma, mais dès lors que la bicouche est présente (ou que l'on a passivé les lames avec de la

caséine ou de la BSA), ce phénomène n'est plus observé : les vésicules n'adhèrent pas sur la bicouche. Si l'on a fonctionnalisé celle-ci avec de la streptavidine, des patches d'adhésion, que l'on décrira dans le paragraphe suivant, sont observés et après un certain temps, toutes les vésicules ont adhéré sur la surface, prenant une forme d'hémisphère (on peut défocaliser en microscopie de fluorescence et suivre leur forme).

6.2.2.c Cas des vésicules tendues [Askovic, 2003]

Comme nous l'avons déjà expliqué, on a très souvent des vésicules très tendues dans un échantillon, même si l'on essaye de régler les osmolarités de façon à induire un léger dégonflement osmotique des vésicules. Leur zone de contact, observée en microscopie interférentielle, présente des anneaux réguliers.

Observations Lorsqu'une telle vésicule est en train d'adhérer sur la bicouche fonctionnalisée de manière complémentaire, on observe (Fig. 6.11) une zone d'adhésion unique, circulaire, ayant un niveau de gris différent des anneaux l'entourant, qui grandit lentement au cours du temps. Nous n'avons pas réussi à imager les débuts d'une telle adhésion. Les vésicules se mettent progressivement sous une tension de plus en plus grande, et parfois explosent après plusieurs minutes de développement d'adhésion. On note que les anneaux d'interférence s'affinent puis disparaissent au cours du temps, signe d'une augmentation de l'angle de contact de la membrane au bord de la zone d'adhésion : la vésicule initialement sphérique devient hémisphérique, ce qui augmente sa surface et par conséquent sa tension.

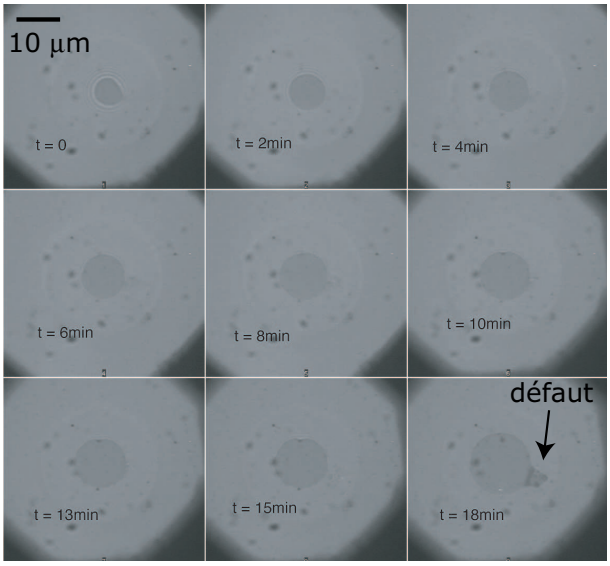

FIG. 6.11 – Exemple d'adhésion d'une vésicule tendue. Il n'y a qu'une seule zone d'adhésion, relativement circulaire qui grandit avec le temps (entre deux images, il y a deux minutes). On mesure $A(t)$ relativement aisément sur une telle séquence. On note cependant qu'un défaut apparaît sur la dernière image, peut-être dû à une inhomogénéité sur la surface.

A l'aide d'une procédure relativement simple de traitement d'images (Fig. 6.12), on peut mesurer l'aire de la zone de contact au cours du temps, et suivre

ainsi la cinétique du phénomène (Fig. 6.13A).

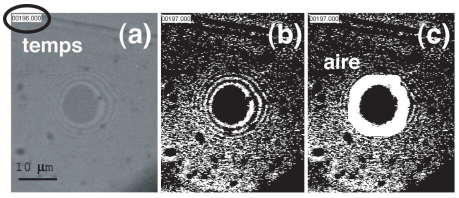

FIG. 6.12 – Mesure d'aire de contact (a) on numérise les images en prenant soin de les indexer en fonction du temps (encart entouré) ; (b) on les seuille et on les binarise ; (c) on extrait l'aire à l'aide d'une macro de ScionImage.

On note (i) que l'aire atteint vite une valeur finie (on arrive jamais à voir les premiers instants de l'établissement du contact) et (ii) que la croissance suit, ensuite, une loi en $R \sim t^{0,2}$.

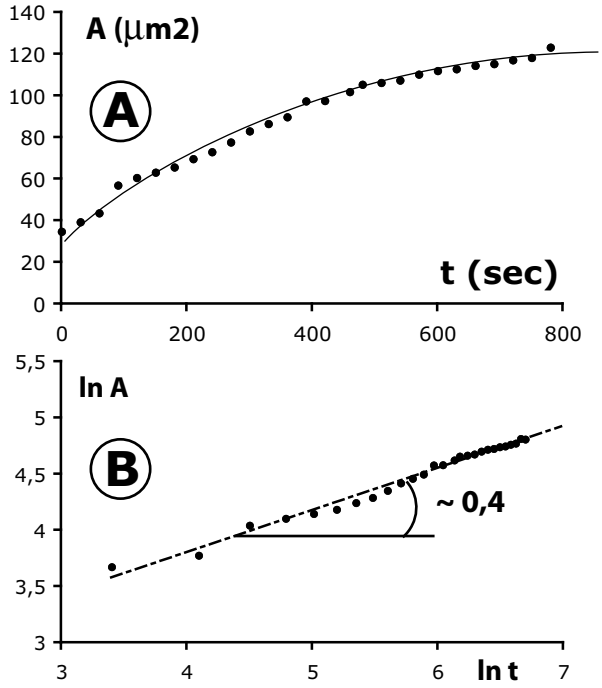

FIG. 6.13 – A : Aire de la zone d'adhésion de la vésicule de la Fig. 6.11 au cours du temps. On note un ralentissement du phénomène, lié à la mise sous tension de plus en plus importante de la membrane (signalée par un reserrement des franges d'interférences : la pente de la membrane au voisinage de la surface augmente) ; B : extraction d'une loi de puissance caractéristique des vésicules tendues. On obtient $A \sim t^{0,4}$ soit, grâce à la géométrie du phénomène, $R \sim t^{0,2}$ pour le rayon de la zone adhésive.

Remarque : malgré que 1% puisse apparaître comme dilué en biotine, cette quantité est en fait "intermédiaire" : les biotines peuvent diffuser à la surface de la vésicule, mais sur la bicouche supportée, on a à peu près 5 biotines pour une streptavidine... Par manque de temps, nous n'avons pas pu effectuer d'expériences avec des quantités plus faibles de biotines.

Interprétation (P.-G. de Gennes) : étalement et diffusion La croissance se fait en deux étapes.

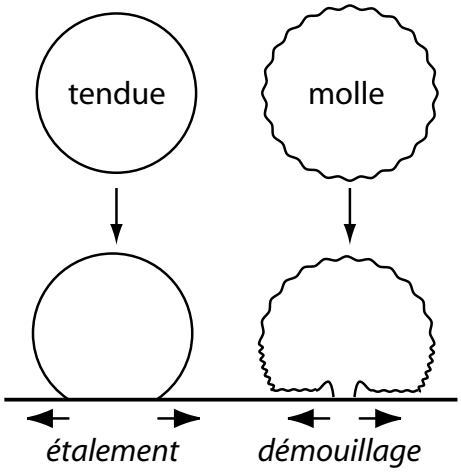

FIG. 6.14 – Mécanismes d'adhésion attendus pour des vésicules recouvertes de biotine, sur des surfaces portant des streptavidines : quand la vésicule est tendue, on a un phénomène d'étalement ; si elle est molle, la croissance de la zone d'adhésion se fait par démouillage du coussin de liquide sur lequel elle repose (le bourrelet qui s'élimine a été représenté).

1. *Aux temps courts*, les biotines n'ont pas le temps de diffuser. L'énergie d'adhésion a une valeur W fixée, proportionnelle à la concentration initiale des biotines sur la vésicules, Γ_0 : $W \simeq \Gamma_0 kT$. Il lui correspond un angle de contact à l'équilibre θ_E tel que

$$W = \sigma(1 - \cos\theta_E) \simeq \sigma\theta_E^2/2$$

   Mais le système n'est pas encore à l'équilibre capillaire : il réalise un angle $\theta < \theta_E$ et un rayon de contact $R = R_v\theta$, où R_v est le rayon de la vésicule.
   L'équation d'avancée de la ligne de contact a la forme classique [deGennes et al., 2001]

$$\frac{dR}{dt} \simeq \frac{\sigma}{\eta}\theta(\theta_E^2 - \theta^2)$$

   qui donne un temps de montée t_m défini par

$$\frac{1}{t_m} = \frac{\sigma}{\eta R_v}\theta_E^2$$

   Ce temps est court (secondes)

2. *Aux temps plus élevés*, la diffusion se met en marche. A l'intérieur de la plaque d'adhésion, on a une concentration Γ_{int}. Le bilan de diffusion est le suivant : au temps t sont entrés dans la plaque un nombre $\pi R^2(\Gamma_{int} - \Gamma_0)$ de biotines. Ce nombre doit correspondre a ce qui a été enlevé à l'extérieur, et qui est de l'ordre de Γ_0 sur une surface Dt.
   Ainsi,

$$R^2(\Gamma_{int} - \Gamma_0) \simeq Dt\Gamma_0$$

   Ici l'angle de contact $\theta(t) = R(t)/R_v$ est, à chaque instant, la valeur d'équilibre associée à Γ_{int}

$$\frac{1}{2}\sigma\theta_E^2 = \Gamma_{int}kT$$

Avec les deux équations précédentes, on obtient une équation d'évolution de θ,

$$\theta^2(\theta^2 - \theta_E^2) = \frac{Dt}{R_v^2}$$

avec θ_E la valeur définie par la toute première équation de cette discussion

$$\theta_E^2 = \frac{2\Gamma_0 kT}{\sigma} \equiv \varepsilon$$

L'équation de variation de θ montre que cet angle croit au cours du temps : il démarre à la valeur θ_E correspondant à la fin de la première étape, et croit ensuite assez lentement : pour $\theta \gg \theta_E$, $\theta \sim t^{1/4}$. Ceci entraine donc une variation de R comme $t^{1/4}$.

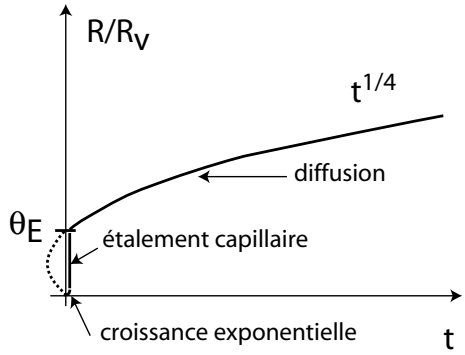

FIG. 6.15 – Variation de l'angle au bord de la zone d'adhésion, suivant le modèle proposé par P.-G. de Gennes, en deux étapes. Une première étape très rapide, aux temps courts, crée une zone de contact finie, qui croit ensuite de manière assez lente, selon une loi en $t^{1/4}$.

Conclusions D'après le cas représenté sur la Fig. 6.13, la croissance de la zone de contact se fait lentement, à partir d'une aire de contact finie observée dès le départ (après introduction des vésicules). Le régime de temps courts, c'est-à-dire l'établissement du contact, n'a jamais été observé : il doit être rapide. La croissance aux temps plus longs, à laquelle nous avons accès, se fait selon une loi $R \sim t^{0,2}$ très proche de la loi obtenue dans le modèle précédent ($1/4 \simeq 0,2$). Ces observations correspondent au modèle que nous venons de décrire.

6.2.2.d Cas des vésicules molles

Avoir des vésicules très fluctuantes, afin de se placer dans la condition "de tension presque nulle" qui est la plus facile à modéliser, est plus délicat. Il faut laisser s'évaporer tout doucement de l'eau du milieu extérieur aux vésicules, avant qu'elles n'adhèrent, puis bloquer l'évaporation en scellant, une fois la vésicule trouvée, la cellule. Nous avons néanmoins réussi à observer quelques cas de vésicules très molles, et à suivre la cinétique de leur adhésion.

Observations La morphologie de la zone de contact est très différente de celle observée avec les vésicules tendues : elle est fluctuante, et l'adhésion ne se développe que très rarement en un seul point. De nombreuses petites zones d'adhésion, que l'on repère car elles sont "immobiles" sur des images moyennées, apparaissent, grandissent et fusionnent (Fig. 6.16). Souvent, ces points démarrent à la périphérie de la zone de contact, ce qui pourrait s'expliquer par la présence d'une fossette (ou"dimple") déformant la membrane [Martin, 1997, de Gennes et al., 2003]. Au final, une seule zone d'adhésion, résultant de la fusion des petites subsiste.

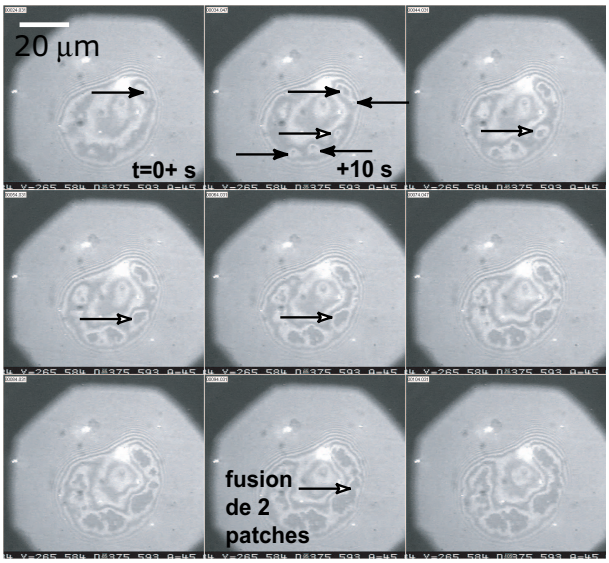

FIG. 6.16 – Séquence d'adhésion typique d'une vésicule très molle et fluctuante : le coussin d'eau intercalée est percé par de petites zones d'adhésion (signalées par des flèches) qui grandissent quasiment de manière circulaire et qui fusionnent entre elles. Entre deux images il y a 10 sec. Les patches d'adhésion sont séparés par des zones de membrane fortement fluctuantes. Au final, un seul grand patch subsiste.

La mesure des aires des patches d'adhésion se fait de la même manière que pour les vésicules tendues, mais est plus délicate, du fait de leur faible taille. On peut alors tracer soit l'aire totale adhérente au cours du temps (Fig. 6.17A) ou celle des patches au cours du temps (Fig. 6.17A, insert). La première n'est que la somme des aires de tous les patches.

Si l'on veut comparer la loi de puissance associée au cas des vésicules molles avec celle du cas des vésicules tendues, il faut considérer la cinétique de croissance d'un patch isolé, avant qu'il ne fusionne avec un autre. Ainsi, en considérant qu'un patch grandit à peu près de manière circulaire, on peut extraire une loi $R \sim t^{0,5}$. Cette loi a été vérifiée pour plusieurs petits patches.

On notera qu'à cause de la fusion des petits patches, on ne dispose souvent que de peu de points de mesure, ce qui entraîne une grande imprécision sur la mesure de l'exposant caractéristique de la dynamique. Très vite, on ne suit plus qu'une seule grande zone adhérente (qui correspond à l'"aire totale" des petits patches). Son aire suit une loi en $t^{\sim 2}$, que l'on peut ramener à la croissance d'un rayon de contact R variant comme t.

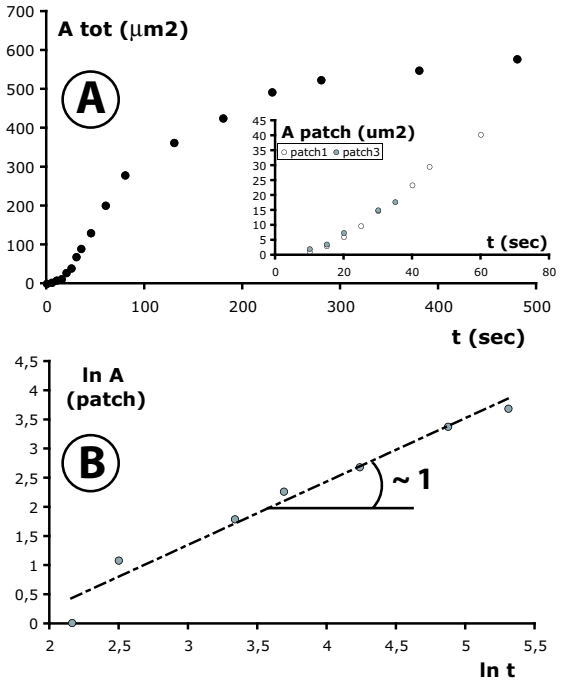

FIG. 6.17 – A : Tracé de l'aire totale adhérente de la vésicule de la Fig. 6.16 en fonction du temps – en encart, tracé de l'aire de deux patches au cours du temps. On note une différence notable de comportement ; B : extraction d'une loi de puissance pour la croissance d'un patch unique, conduisant à $A \sim t^1$ soit, grâce à la géométrie du phénomène, $R \sim t^{0,5}$ pour le rayon d'une petite zone adhésive.

Interprétation (F. Brochard) : démouillage Aux temps très courts, les arguments sont les mêmes que dans le cas des vésicules tendues : les biotines n'ont pas le temps de diffuser et l'on définit de la même manière un angle de contact θ_E par $W \simeq \sigma\theta_E^2$. La croissance du contact se fait par démouillage du coussin sur lequel repose la vésicule. Le liquide est récupéré dans un bourrelet. La force motrice qui tire sur le bourrelet est W. La force de friction qui s'y oppose est dominée par le coin de liquide et est [deGennes et al., 2001]

$$f_v = \eta \frac{v_d}{\theta_E}$$

où $v_d = dR/dt$ est la vitesse de démouillage ($\simeq \mu$m/s, d'après la Fig. 6.17). L'équilibre entre force motrice et force visqueuse conduit à

$$v_d \sim \frac{\sigma}{\eta}\theta_E^3$$

Aux temps semi-courts ($R^2 < Dt$), les biotines commencent à diffuser dans le contact. Dans la limite $R^2 < Dt$, on retrouve le bilan de diffusion vu dans le cas des vésicules tendues

$$R^2(\Gamma_{int} - \Gamma_0) \simeq Dt\Gamma_0$$

soit, en utilisant la relation $\Gamma_{int} kT = \sigma\theta^2/2$,

$$\theta^2 - \theta_E^2 = \frac{Dt}{R^2}\frac{kT}{\sigma}\Gamma_0 \simeq \frac{Dt}{R^2}\theta^2$$

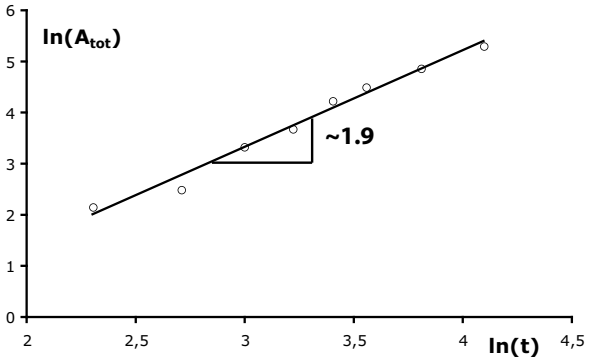

FIG. 6.18 – Tracé du logarithme de l'aire totale adhérente de la vésicule de la Fig. 6.16 en fonction du logarithme du temps : on extrait sur la zone de croissance de l'aire de contact que $A_{tot} \sim t^{1,9}$, donc que le "rayon associé" à cette aire totale varie $\sim t$.

La vitesse de démouillage est alors donnée par

$$v_d = \frac{\sigma}{\eta}\theta_E^3 \left(1 + \frac{Dt}{R^2}\right)^{3/2}$$

Si $R^2 < Dt$, on trouve alors une loi de croissance

$$\dot{R}R^3 \sim \frac{\sigma}{\eta}\theta_E^3 D^{3/2} t^{3/2}$$

soit

$$R \sim t^{5/8}$$

La croissance des petits patches d'adhésion, comme nous l'avons vu, se fait avec une loi de puissance ayant un exposant de 0,5, ce qui est voisin de la valeur de 5/8≃0,63. Cette étape initiale de l'adhésion est relativement bien décrite par ce modèle.

La croissance du contact est trop rapide pour que les stickers diffusent vers elle, et l'on entre vite dans le régime $R^2 \gg Dt$. Ce cas est discuté en détail au paragraphe 4.2 de [de Gennes et al., 2003]. On trouve alors que Γ_i sature à une valeur voisine de Γ_0. La vitesse aux "temps longs" est alors constante, $v_d \sim$ quelques $v_{d,0}$. R varie alors en t, ce que l'on observe pour l'aire totale de la zone adhérente (Fig. 6.18).

6.2.2.e Conclusions et perspectives

Ces expériences montrent que la tension initiale influence grandement les cinétiques observées. Pour une "vésicule tendue", on attend un étalement. Pour une "vésicule molle", on prévoit que la croissance du contact se fasse par démouillage du coussin (Fig. 6.14). Les modèles proposés permettent de rendre relativement bien compte des observations expérimentales, mais la description de la dynamique entière d'une adhésion se révèle être souvent délicate.

Dans le cas détendu, le démouillage nuclée à plusieurs endroits. La cinétique est difficile à suivre (peu de points, donc des exposants relativement peu précis pour les croissances de patches uniques). Le suivi de l'aire totale apporte une façon "de moyenner" les erreurs de mesures...

Dans un cas voisin d'établissement de contact d'un objet mou (une bille d'élastomère) sur un substrat mouillé, le démouillage spontané conduit à des zones multiples de croissance difficiles à analyser [Martin, 1997]. Les lois de croissance ont pu être mises en évidence en plaçant un nucléateur au centre du méplat et en suivant la croissance d'un méplat unique. Pour tirer des informations quantitatives et solides sur l'adhésion de vésicules très molles, il faudra de la même façon nucléer un contact unique au centre du coussin avant que le film liquide ne "craque" spontanément.

Afin d'introduire une répulsion stérique dans le système, des essais (très) préliminaires ont été effectués avec des vésicules portant 1% de cap-biotine et 5% de PEG2000, sur des bicouches contenant 1% de cap-biotine. La cinétique d'adhésion est ralentie en présence de PEG, conformément à ce qui a été vu avec un autre système [Boulbitch et al., 2001], même si le PEG n'est présent que d'un côté.

Enfin, dans le cas des cellules où les densités de molécules clefs sont très faibles, la constitution des zones adhésives est conditionnée par la diffusion des protéines. Malheureusement, par manque de temps, nous n'avons pu explorer les régimes de très faibles concentrations qui correspondent aux cas étudiés théoriquement [de Gennes et al., 2003].

Chapitre 7

Phénomènes de transport : pores transitoires et fusion membranaire

Lorsque deux cellules adhèrent entre elles pour former un tissu, il existe une jonction "de communication" qui, comme son nom l'indique, permet aux dites cellules de communiquer (voir le chapitre "Adhésion cellulaire et cadhérines"). Que cela signifie-t-il ? Communiquer, à ces échelles là, c'est échanger des molécules, les faire passer entre compartiments de la cellule ou entre deux cellules. Ces molécules peuvent être des ions, des protéines, de l'ADN, de l'ARN... Pour permettre ces échanges, il y a plusieurs solutions : des molécules-canaux, fonctionnant avec ou sans ATP, ou bien simplement des "trous" dans la membrane, appelés pores lipidiques.

Nous allons présenter succintement dans ce chapitre comment cela se passe au niveau des membranes biologiques, et nous détaillerons une étude de pores lipidiques géants et transitoires observés sur des vésicules géantes placées dans un milieu très visqueux et éclairées de manière intense. Nous utiliserons l'étude initiale effectuée au laboratoire par O. Sandre lors de sa thèse pour rappeler que ces pores géants constituent un "tensiomètre de ligne" et par quel biais on accède à ce paramètre critique de la membrane. Nous montrerons ensuite comment on peut abaisser la tension de ligne, par adjonction de molécules "edge-actives", qui peuvent s'accumuler au bord du pore. Enfin nous montrerons que ces agents de ligne favorisent la fusion membranaire.

Les résultats nouveaux, obtenus au cours de cette thèse, ont été l'aboutissement du travail réalisé à l'occasion du stage de DEA de N. Borghi [Borghi, 2002] et leurs interprétations et discussions ont été menées avec l'aide d'Olivier Sandre (Paris VI) et Erdem Karatekin (IBPC, Paris).

7.1 Transport à travers une membrane

Une bicouche lipidique, comme la membrane cellulaire ou la membrane nucléaire, constitue une barrière lipidique difficilement franchissable pour des molécules chargées ou de grande taille entre deux compartiments aqueux. Il faut donc des "passages" connectant ces derniers entre eux. Nous allons discréminer deux modes de connexion, soit via des protéines spécifiques enfichées au travers de la membrane, soit juste par des trous la perçant.

7.1.1 Dans les systèmes biologiques [Alberts et al., 2002]

La nature a dessiné, pour les cellules, un ensemble de protéines transmembranaires qui permettent à des solutés chargés ou non de traverser la bicouche, sans devoir dépasser une barrière énergétique énorme du fait de la présence de la zone hydrophobe de la membrane. Ces protéines sont appelées canaux (si elles ne consomment pas d'énergie pour faire passer les objets) ou pompes (s'il leur faut consommer de l'ATP pour pouvoir le faire). Les Fig. 7.1A et B montrent des exemples de ces protéines qui peuvent être une protéine unique, comme la valinomycine (petit canal pour ions K^+), la bactériorhodopsine (pompe à protons) ou la calcium ATPase (pompe à Ca^{2+}), ou bien des assemblages plus complexes de plusieurs protéines, comme les jonctions de communication dans les complexes adhérents entre deux cellules d'un tissu ou les pores nucléaires par lesquels transitent le message génétique.

D'autres structures de communication, lors de l'exocytose[1], en particulier, ne sont pas encore bien décrites : s'agit-il d'une structure simple, comme un pore essentiellement lipidique (un "trou") ou une structure plus complexe, formée par rassemblement de protéines (Fig. 7.2) ?

7.1.2 Observation de pores lipidiques

Lorsque l'on veut faire entrer des molécules dans des cellules, comme des fragments d'ADN afin de leur faire produire des protéines particulières, on utilise une technique appelée "électroporation". Par application d'un champ électrique sur les cellules, on les rend plus perméables... D'une utilisation très large, le fonctionnement de cette technique n'est encore pas entièrement comprise.

L'existence de pores purement lipidiques ne fait aujourd'hui plus de doutes (comme le souligne [Sandre, 2000] dans la revue qu'il fait sur ces structures), car ils ont été visualisés sur des systèmes naturels, par microscopie électronique ([D.C.Chang et al., 1992], Fig. 7.3A), ou sur des systèmes artificiels en microscopie optique ([Zhelev and Needham, 1993], Fig. 7.3B). Dans le cas des systèmes

[1]Phénomène qui permet à de petites vésicules de se décharger de leur contenu à l'extérieur de la cellule, dont un cas extrêmement important est la communication entre les neurones au niveau des synapses par relargage de neurotransmetteurs

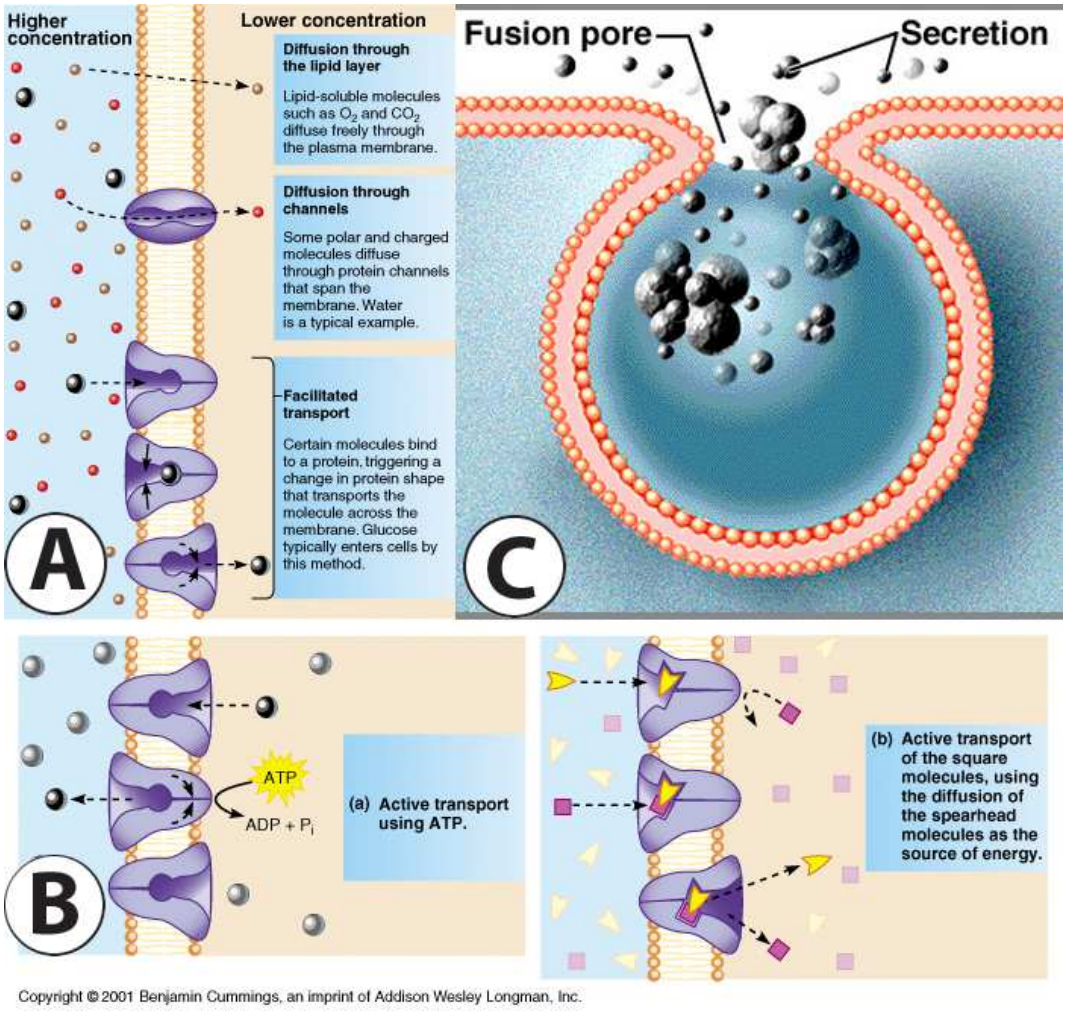

FIG. 7.1 – Exemple de phénomènes permettant de faire passer des molécules à travers une membrane. A : passifs : diffusion due à un gradient de concentration ou molécules canaux ; B : actifs : molécules pompes, consommant de l'énergie par le biais d'une transformation chimique d'une molécule (ATP ou autre) ; C : pore au niveau d'une synapse, permettant à une petite vésicule de relarger son contenu, après que les membranes aient été "attachées" l'une à l'autre par des molécules spécifiques (SNAREs).

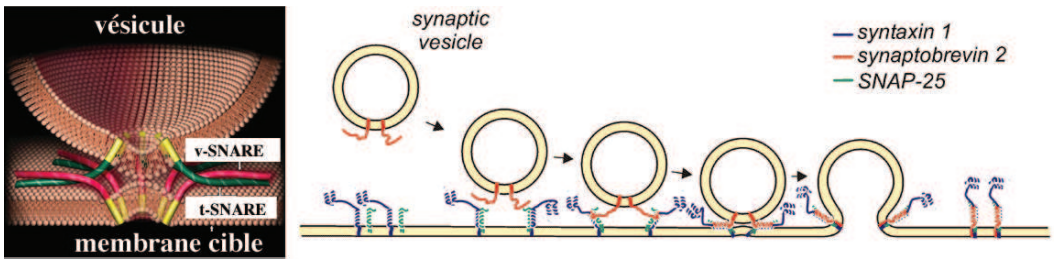

FIG. 7.2 – Fusion d'une vésicule avec une membrane, dans le processus de communication synaptique. Des protéines, les SNAREs, sont capables d'attacher les deux membranes de manière spécifique, afin de favoriser la fusion. Mais quel est leur rôle dans la structure du pore qui est formé à la suite ? (d'après le site web de J. Rothman, Sloan-Kottering Research Center, NY).

naturels, on a observé que ces pores se cicatrisent, ce qui correspond à l'observation faite que des cellules survivent à l'électroporation et même peuvent se diviser.

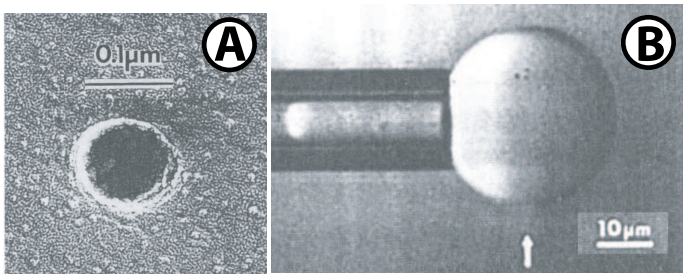

FIG. 7.3 – Pores lipidiques obtenus par électroporation, A : observés en microscopie électronique par cryofracture sur la membrane de globules rouges ; B : observé (flèche) en microscopie optique sur une vésicule géante pressurisée par aspiration dans une micropipette (pour les références, voir texte). On note la différence de taille entre les pores suivant la complexité et la résistance des structures.

Outre ces expériences, des pores lipidiques ont été "visualisés" sur des membranes lipidiques supportées (ou *Black Lipid Membranes*) : ils se traduisent par une diminution de la résistivité mesurée entre les deux compartiments que la membrane sépare.

Enfin, la mise sous tension, par adhésion sur une surface [Sandre et al., 1999b] ou par illumination intense [Sandre, 2000] a permis de nouveau d'observer des pores géants qui causent la destruction de la vésicule dans le premier cas, mais qui sont transitoires, c'est-à-dire s'ouvrant et se refermant, dans le deuxième. Ce sont ces derniers que nous allons présenter plus en détails dans ce qui va suivre.

7.2 Pores photo-induits : un tensiomètre “de ligne”

En observant des vésicules marquées avec une sonde fluorescente, préparées dans un milieu très visqueux (un mélange 1 :2 de sucrose et de glycérol, trente fois plus visqueux que l'eau), O. Sandre a d'abord constaté que ces vésicules, très souvent fortement fluctuantes quand on commence à les observer, se tendent au bout d'une demi-heure d'illumination continue. Soudain, un pore géant, de plusieurs microns de diamètre s'ouvre très rapidement (quelques fractions de seconde), puis se referme lentement (quelques secondes) et se scelle pour finir. Sur la Fig. 7.4, on peut voir une séquence typique de mise sous tension suivie de

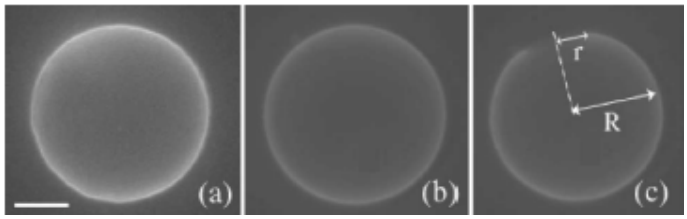

FIG. 7.4 – Séquence conduisant à l'apparition d'un pore transitoire dans une vésicule géante : a-b : mise sous tension d'une vésicule molle, en à peu près une demi-heure ; c : pore géant ouvert. La barre représente 10 microns. (extrait de [Puech et al., 2003]).

l'apparition d'un pore. Sur la Fig. 7.5, on peut voir un bel exemple de fermeture de pore, d'après [Karatekin et al., 2003b].

7.2.1 Système expérimental

Les vésicules géantes de DOPC sont préparées par électroformation dans un mélange 2 :1 sucrose 300 mOsm et de glycérol. Le mélange final contient 100 mOsm de sucre et a une viscosité de 32,1 cP, soit plus de trente fois celle de l'eau [Sandre, 2000]. Le plateau de tension de l'électroformation dure 6 h à température ambiante. Excepté ce point particulier, et un repos des vésicules à 4°C pendant une nuit, le reste de la procédure est similaire à celui présenté dans le chapitre “Matériel et méthodes”. Les vésicules, une fois extraites de la cellule d'observation sont marquée par perfusion (durant au moins une heure) à 1 ou 2 % v/v avec une solution de Di6-ASPBS (EtOH, 560 μM), puis sédimentées quelques heures dans une solution glucose/glycérol de mêmes osmolarité et viscosité. Elles sont introduites dans une chambre d'observation qui est ensuite scellée. Pour plus de détails, le lecteur pourra se reporter à [Sandre, 2000, Karatekin et al., 2003b, Puech et al., 2003].

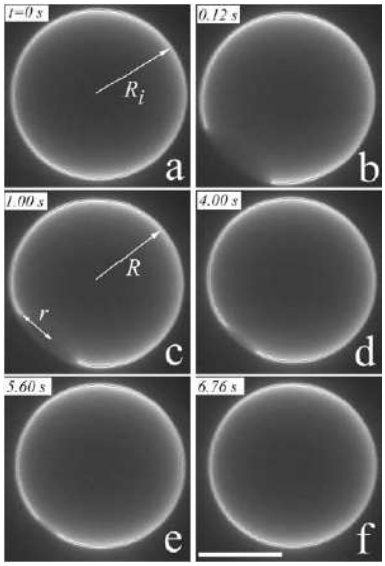

FIG. 7.5 – Fermeture d'un pore géant transitoire dans une vésicule (extrait de [Karatekin et al., 2003b, Sandre, 2000]). L'ouverture a lieu entre les deux premières images : elle est très rapide. La fermeture quant à elle prend plusieurs secondes : c'est l'étape de la vie du pore qui est la plus facile à suivre et à exploiter, en particulier dès lors que le pore se situe à l'équateur de la vésicule. La barre représente 10 microns.

Une vésicule fluctuante, isolée des autres est alors choisie par observation en microscopie de fluorescence, et elle est suivie et éclairée en continu. Généralement, la mise sous tension prend une demi-heure et le premier pore surgit alors. Il est suivi par une cascade de pores qui apparaissent à intervalles de temps réguliers ($\sim$ min). Chaque vésicule fait un grand nombre de pores (jusqu'à plusieurs dizaines) avant de se détruire. On peut donc accumuler bon nombre de résultats sur la dynamique de ces pores.

7.2.2 Modèle

Afin de décrire la vie complète des pores transitoires observés, un modèle a été développé. Il est exposé en détails dans [Brochard-Wyart et al., 2000]. Nous ne donnerons ici que les étapes nécessaires à la compréhension de la modélisation du phénomène et insisterons surtout sur la loi de fermeture des pores qui donne accès à la tension de ligne.

Si un pore s'ouvre, c'est que la membrane de la vésicule est mise sous tension σ. L'énergie de surface est alors diminuée car l'aire de la membrane diminue. σ est la force motrice de l'ouverture d'un pore.

La réorganisation des lipides au bord d'un pore coûte de l'énergie à la membrane. Par unité de longueur, c'est la tension de ligne τ. Une membrane n'aime donc pas avoir de bords : la tension de ligne tend à cicatriser les trous de la membrane. τ est la force motrice de la fermeture. En dimension, $\tau \sim \kappa/e$, où e est l'épaisseur de la bicouche.

L'énergie de la membrane trouée s'écrit

$$\mathcal{F} = \mathcal{F}_0 - \pi r^2 \sigma + 2\pi r \tau$$

Si l'on trace $\mathcal{F}(r)$, on a un maxima pour un rayon de nucléation $r_c = \tau/\sigma$. La hauteur de la barrière énergétique à franchir est $U = \pi\tau^2/\sigma$ ($U/kT \sim 10^4 - 10^6$). La nucléation sera donc toujours hétérogène. Une poussière, un agrégat de colorant ou de lipide vont nucléer les trous dans la membrane. On va voir que certains tensioactifs, ayant une grosse tête hydrophile, s'adsorbent sur les bords du trou, et peuvent faire chuter τ d'un facteur 100. L'énergie de barrière U chute d'un facteur 10^4, et la membrane devient “perméable” : l'apparition des pores est alors très favorisée et les implications à la fusion membranaire seront décrites à la fin de ce Chapitre.

Pour décrire la vie des pores transitoires (ouverture/fermeture), on écrit que le gain d'énergie lorsque r ($> r_c$) augmente est perdue en dissipation visqueuse dans la membrane :

$$\sigma r - \tau = 4\pi\eta_S \dot{r}$$

Cette équation décrit aussi bien l'éclatement d'une bulle visqueuse. Mais dans le cas des vésicules, il y a une complication supplémentaire. Dès que le pore s'ouvre, deux mécanismes de relaxation font chuter la tension de la membrane :

(i) l'ouverture du pore diminue la surface projetée de la membrane. On appelle r_c le rayon où $\sigma = 0$ ($r_c \simeq \mu$ms) ;

(ii) la vésicule sous tension est un ballon gonflé. Dès qu'on le perce, le liquide fuit et le rayon de la vésicule, R, diminue, relaxant aussi σ. Dans l'eau, le “leak-out” est rapide, et dès qu'un trou s'ouvre, σ chute et le pore se referme à des tailles si petites qu'il est invisible. Dans des mélanges visqueux eau/glycérol, le “leak-out” est très ralenti, et le pore s'ouvre presque jusqu'à r_c : on observe alors des pores “géants”.

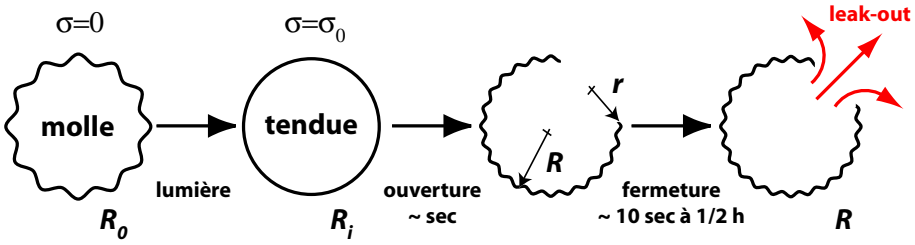

FIG. 7.6 – Dans un milieu visqueux, le pore s'ouvre avant que le liquide n'ait eu le temps de fuir. Mais il ne peut se refermer sans “leak-out”. La fermeture est lente.

La tension $\sigma(r, R)$ est fonction de la taille du trou, r, et du rayon de la vésicule, R :

$$\frac{\sigma}{\sigma_0} = 1 - \frac{r}{r_C} - 4\frac{R_i^2 - R^2}{r_C^2}$$

avec R_i le rayon de la vésicule tendue avant que le pore ne s'ouvre, r_c le rayon du pore qui relaxerait totalement la tension en l'absence de fuite du liquide interne et σ_0 la tension initiale (Fig. 7.6). Le "leak-out" vide la vésicule et change son rayon. L'équation pour R est celle d'un ballon qui fuit, et fait intervenir la pression de Laplace dans le ballon, σ/R, et la viscosité ambiante, η_0

$$-4\pi R^2 \dot{R} = \frac{2\sigma r^3}{3\eta_0 R}$$

On peut ainsi décrire la vie entière (ouverture très rapide, fermeture lente et scellement rapide) d'un pore dans une vésicule géante à l'aide du système de 3 équations différentielles couplées ci-dessus. Des simulations numériques, utilisant comme paramètre libre $(3\pi\eta_0 R_0^2)/(8\eta_S r_C)$ qui jauge la rapidité de la fuite de liquide au travers du pore, ont montré un très bon accord de ces équations et des variations du rayon du pore et de la vésicule mesurées par traitement d'images sur des séquences expérimentales. On pourra trouver le détail des calculs dans [Brochard-Wyart et al., 2000].

Le régime le plus accessible expérimentalement est celui de la fermeture lente du pore (plusieurs secondes). Cette cinétique est donc facilement observable. La mesure des rayons du pore et de la vésicules peuvent être automatisés, dans le cas de pore à l'équateur, grâce à la géométrie cylindrique du problème.

Lorsque l'on considère cette étape, avec un rayon de vésicule, R, qui varie très lentement (ce que l'expérience montre et justifie comme approximation) et une tension qui varie peu (ce que confirment les simulations numériques), on arrive analytiquement à une loi simple décrivant cette étape de fermeture lente

$$\dot{r} = -\frac{2}{3\pi\eta_0}\tau \times \frac{r}{R^2}$$

qui s'intègre facilement :

$$R^2 \ln(r) = -\frac{2}{3\pi\eta_0} \times \tau \times t + cst$$

On a donc une méthode simple qui donne accès à la tension de ligne, (presque...) sans effort ! Il suffit juste de mesurer $R(t)$ et $r(t)$, ce qui dans le cas des pores se présentant sur l'équateur (comme ceux des Figs. 7.4 et 7.5) se fait en utilisant des fonctions programmées pour ScionImage.

De telles données sont présentées sur la Fig. 7.7.

7.2.3 Lipides seuls

Pour des vésicules composées de DOPC seul, sans modification de leur environnement, la valeur de la tension de ligne est de l'ordre la dizaine de piconewtons. En fait, elle dépend du fournisseur de lipides... en effet, comme nous

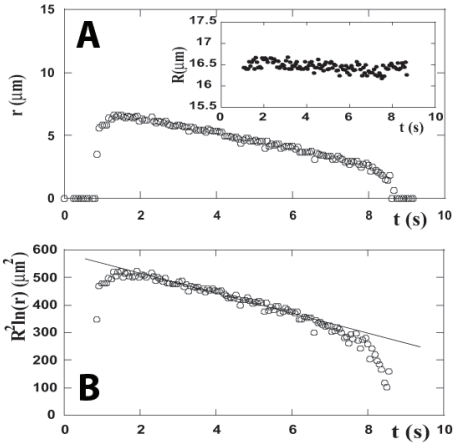

FIG. 7.7 – Fermeture d'un pore géant transitoire dans une vésicule (extrait de [Puech et al., 2003]). A : tracé du rayon du pore au cours du temps (insert : rayon de la vésicule, quasi-invariant) ; B : tracé de $R^2 \ln(r)$ qui montre bien que l'on a une droite dans le régime de fermeture lente. C'est à partir de l'ajustement de cette zone par une méthode de moindres carrés que l'on peut, via la pente, obtenir une mesure de la tension de ligne τ.

le verrons, certains produits de dégradation (comme les lysolipides, qui sont les résidus d'oxydation des phopholipides) peuvent jouer très fortement sur la tension de ligne. Pour les lipides les plus purs (et les plus chers, par conséquent), ceux d'Avanti Polar Lipids, $\tau = 20{,}7 \pm 3{,}5$ pN, alors que pour des lipides que l'on peut considérer comme moins purifiés, ceux de chez Sigma, $\tau = 6{,}9 \pm 0{,}42$ pN [Karatekin et al., 2003b]. Comme on le voit, la tension de ligne est très sensible... aux molécules perturbant la bicouche. Dans chaque étude comparative présentée par la suite, nous avons toujours pris garde d'utiliser des lipides provenant du même fournisseur, et si possible, du même lot.

Il faut noter que l'on ne voit qu'un pore unique sur une vésicule, et que dans un champ d'observation contenant plusieurs vésicules, on peut voir qu'après à peu près la même durée d'éclairement, les vésicules sont toutes tendues et se mettent à faire des pores en simultané. De tels pores n'apparaissent pas dans l'eau : la fuite du liquide interne est trop rapide, car sa viscosité est faible, et le pore ne peut atteindre de grande taille [Brochard-Wyart et al., 2000] : on peut parfois, avec des vésicules extrêmement tendues (par adhésion) en voir, mais leur “vie” ne dépasse pas quelques images à cadence vidéo, soit quelques dizaines de ms.

Que se passe-t-il une fois que le pore s'est refermé ? La vésicule a alors une membrane légèrement froissée, comme schématisé sur la Fig. 7.6. Si l'on continue à l'éclairer, elle se remet alors sous tension en quelques minutes (de l'ordre de une à cinq minutes) et un autre pore s'ouvre, très souvent au voisinage du même endroit que le premier. Le système peut ainsi “cycler”... et la vésicule présente une succession de pores, réguliers dans le temps. On peut ainsi, sur une seule vésicule, montrer que la tension de ligne varie peu au cours du temps et sans tendance particulière. On peut alors comparer plusieurs tensions de ligne sur plusieurs vésicules différentes, et la barre d'erreur expérimentale est comparable à celle obtenue sur différents pores de la même vésicule. O. Sandre a réalisé une étude détaillée de cette succession de pores [Sandre, 2000], que l'on retrouve dans [Karatekin et al., 2003b].

Nous verrons dans le paragraphe suivant quelques idées sur l'origine de la mise sous tension des vésicules. Une question que l'on se pose naturellement est comment nucléer un pore.

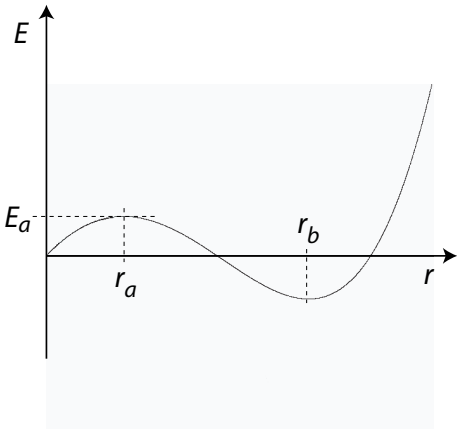

FIG. 7.8 – Diagramme énergétique d'un pore en fonction de son rayon, r, en ne prenant en compte que la tension de ligne et la relaxation de la tension de la membrane due à l'ouverture du pore (frippement). Pour expliquer qu'un pore ayant dépassé le rayon critique r_a ne demeure pas stationnaire avec un rayon r_b, il faut introduire la fuite lente du liquide interne comme deuxième mode de relaxation de la tension σ.

La barrière d'énergie $E_a = \pi\dfrac{\tau^2}{\sigma}$ est de l'ordre de 10^4kT pour des valeurs raisonnables de τ ($\sim$ 10 pN) et de σ (1 à 10 $\times 10^{-6}$ N/m) : le processus de nucléation du pore ne peut donc être qu'hétérogène. Un défaut présent dans la membrane (poussière, agrégat de colorant ou de lipides dégradés,...) est le nucléateur qui permet l'ouverture du pore.

7.2.4 Tension photo-induite : quel mécanisme ?

Une des grandes énigmes restantes autour des pores transitoires est la nature exacte du phénomène de *tension photo-induite* des vésicules. Nous allons examiner les pistes proposées par [Sandre, 2000] à la lumière des expériences réalisées depuis.

La première piste est celle d'une **réaction photochimique**, induite par la lumière, **au niveau des lipides**, via les molécules de colorant (les lipides n'ont pas de bande d'absorption là où le colorant absorbe) : nous avons tenté de réaliser l'expérience consistant à illuminer fortement, avec la lumière d'excitation de la fluorescence utilisée dans les expériences classiques, des vésicules non marquées. Dans les mélanges de sucre/glycérol utilisées, le contraste entre la solution interne et la solution externe se révèle être trop faible pour pouvoir observer quoi que ce soit. Nous ne pouvons pas amener avec ces expériences d'information supplémentaire.

La seconde piste concerne l'**expulsion des sondes** de la membrane, mais n'a pas été l'objet de nouvelles expériences, si ce n'est que des pores transitoires ont été observés en changeant de colorant (RH237) et même en utilisant un lipide marqué NBD (qui est à priori plus stable dans la membrane car ayant des chaînes plus longues).

La troisième piste est liée à une **photo-isomérisation des colorants** et à leur **agrégation**.

La photoisomérisation de Di6-ASPBS a été étudiée récemment [Pons et al., 2002] : il est possible d'induire le flip-flop des molécules de colorant en appliquant un faisceau laser (celui du microscope à deux photons utilisé dans les expériences des chapitres précédents) sur une vésicule marquée. Ce phénomène est visualisé par l'observation conjointe en SHG et TPEF des vésicules. Il est lié à l'isomérisation de la double liaison qui joint les deux cycles du chromophore de la molécule (chapitre “Matériel et méthodes”). C'est un phénomène non linéaire, que l'on ne peut engendrer par illumination avec notre lampe à mercure.

L'agrégation des colorants dans la membrane, pour des concentrations importantes de colorant peut être signalé par le quenching, pour des molécules de type pyridium (voir [Sandre, 2000]). Utilisant Di6-ASPBS lors d'expériences de marquage “sous l'objectif”, en utilisant de manière simultanée l'imagerie en SHG et en TPEF des vésicules, nous avons observé (avec T. Pons de l'ESPCI) que l'intensité de fluorescence de la membrane augmente puis diminue au cours du temps, alors que la SHG ne fait qu'augmenter (Fig. 7.9). Le nombre de molécules dans le feuillet externe augmente donc, mais leur fluorescence diminue. Ceci reste encore à interpréter de façon claire, mais pourrait expliquer la présence d'agrégats de colorant dans la membrane, sites potentiellement nucléateurs des pores.

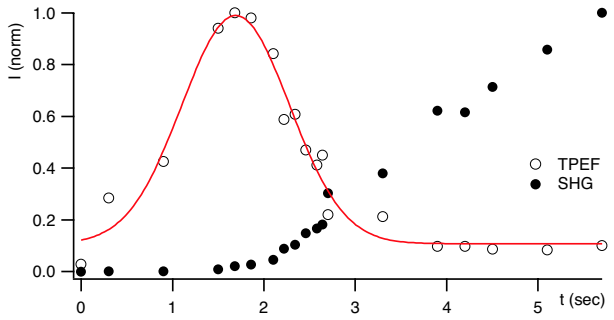

FIG. 7.9 – Marquage “on line” d'une vésicule avec Di6-ASPBS : la SHG (•) ne cesse de croitre, alors que la TPEF (∘) chute (intensités normalisées).

Enfin, l'hypothèse de **transition de phase des lipides** n'a pas été réexaminée. Nous avons essayé de voir cependant si l'élévation de température au niveau du focus de l'objectif pouvait être une source de perturbation importante de la membrane (que l'on peu “blesser” avec un laser [Bar-ziv et al., 1995]). La Fig. 7.10 montre qu'elle n'est que de quelques degrés. A température ambiante, on est loin de la température de fusion des chaînes du DOPC ($T_m < 0$) : cet échauffement modeste ne doit pas perturber la bicouche de manière importante.

Une hypothèse plus plausible est la dégradation des lipides. Les queues de DOPC portent chacune une insaturation. Si l'on casse une de ces doubles liaisons, le lipide ne possède plus qu'une queue hydrophobe, et devient plus soluble. Il peut alors partir en solution, mettant ainsi la vésicule sous tension.

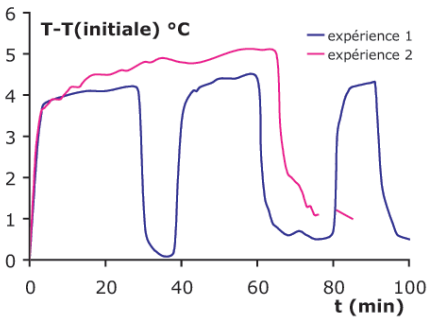

FIG. 7.10 – Variation de T locale due à la focalisation de la lumière d'excitation de fluorescence à son intensité maximale, mesurée à l'aire d'une sonde PT100, dans un mélange sucrose/glycérol 66%. Deux expériences ont été menées, une semblable en temps à la mise sous tension d'une vésicule géante (30 min), l'autre semblable à une expérience d'observation de pore (1h30). La variation reste inférieure à 5°C.

7.2.5 Autres méthodes de mise sous tension

Afin de mettre sous tension une vésicule, on peut aussi la faire adhérer. L'observation de la rupture de vésicules géantes par adhésion sur des surfaces planes de verre a été étudiée ailleurs [Sandre et al., 1999b]. Ici, nous allons présenter rapidement la mise sous tension de ces mêmes objets par adhésion sur des colloïdes. Les détails expérimentaux pourront être trouvés dans [Fery et al., 2003]. Ce travail a été réalisé sous la direction de A. Fery lors de son stage post-doctoral au laboratoire.

Des billes recouvertes d'un polycation, le PAH, celui-là même qui nous a servi à faire adhérer des vésicules sur des surfaces de verre dans le chapitre précédent, sont mises en présence de vésicules géantes marquées qui portent une légère charge négative.

Afin de ralentir les processus de diffusion et de convection, l'expérience a lieu, comme pour l'observation des pores, dans un milieu visqueux. Une bille est capturée à l'aide d'une pince optique et amenée près d'une vésicule, sans que le faisceau laser ne touche la membrane. L'adhésion de la vésicule, fluorescente, sur les billes, initialement non fluorescentes, est suivie en vidéomicroscopie. La Fig. 7.11 montre deux exemples d'adhésion, avec mise sous tension de la vésicule [Fery et al., 2003, Karatekin et al., 2003b]. Parfois, il est aussi possible de voir un recouvrement d'une deuxième bille apportée en renfort, mais cela depend de l'excès de surface de la vésicule observée.

Afin de rendre l'adhésion plus spécifique, nous avons envisagé d'utiliser des billes (de 2 microns) recouvertes de streptavidine, et de les mélanger en solution avec des vésicules portant quelques % de cap-biotine. La Fig. 7.12 montre de telles billes adhèrant sur des vésicules. Malheureusement, le montage de pinces optiques ayant été déménagé en Allemagne entre temps, nous n'avons pas pu pousser plus loin cette étude. En marquant différemment deux populations de vésicules et en les mélangeant, on peut mettre sous tension une seule des deux populations en introduisant des billes la reconnaissant spécifiquement. On peut

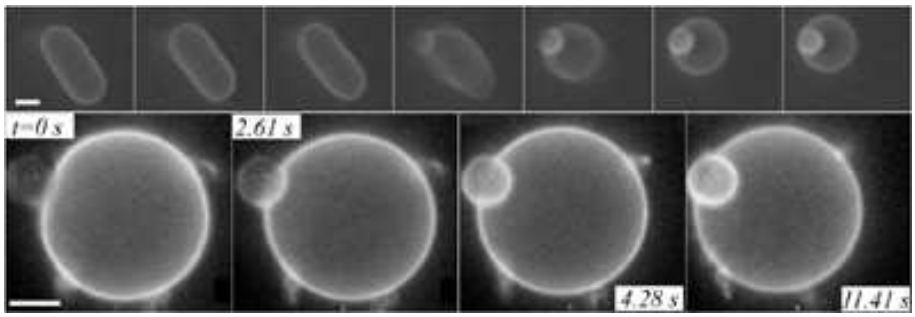

FIG. 7.11 – Adhésion de vésicules sur des colloïdes chargés, manipulés avec des pinces optiques. Elles sont molles au départ, puis se tendent au fur et à mesure que la membrane "mouille" la surface des billes. Les barres correpondent à 3 microns. Pour la première rangée, la séquence dure 3,4 sec (d'après [Fery et al., 2003]).

de la même façon fagociter des billes dans le cas d'adhésion forte, et de façon sélective, ce qui peut être intéressant en pharmacologie ("drug delivery").

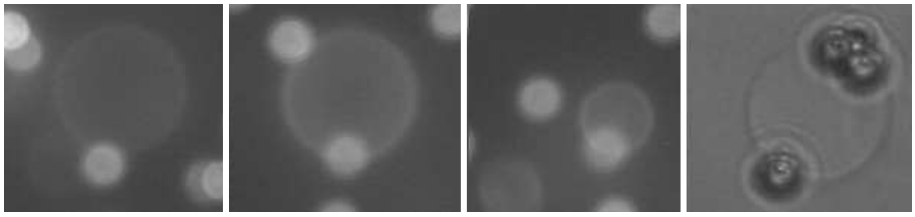

FIG. 7.12 – Adhésion de vésicules biotinylées sur des billes (taille 2 microns), recouvertes de streptavidine, dans une solution de sucre peu visqueuse. L'expérience est réalisée en mélangeant simplement les solutions de billes et de vésicules. A cause de la présence de petites vésicules, résiduelles de l'électroformation, et d'agrégats de lipides, beaucoup de billes sont fluorescentes car inactivées : leurs sites sont déjà passivés par ces objets parasites. On peut néammoins voir des adhésions spécifiques (en microscopie de fluorescence ou en transmission) car les billes bougent le long de la membrane et ne s'en décollent pas.

7.3 Modification de la tension de ligne

Comment peut-on jouer sur la tension de ligne ? Nous avons vu qu'elle est très sensible à la présence de molécules modifiant les propriétés des bicouches, comme des produits de dégradation des lipides (les lysolipides par exemple). Contrôler la tension de ligne est essentiel : cela permet de favoriser ou d'empêcher la formation de pores dans la membranes. L'autoriser permet de délivrer facilement un principe

encapsulé. L'interdire permet de rendre la membrane peu faillible (ce qui pour nos cellules est essentiel).

Nous avons donc choisi d'introduire dans le système des molécules capables de stabiliser ou de déstabiliser le bord du pore. Ces molécules doivent être amphiphiles pour s'intégrer dans la membrane. Selon leur HLB (Balance hydrophobe/hydrophile) elles ont une partie hydrophile plus ou moins encombrante. Les molécules qui vont être capables de s'insérer au bord du pore ont une grosse tête hydrophile (HLB > 8).

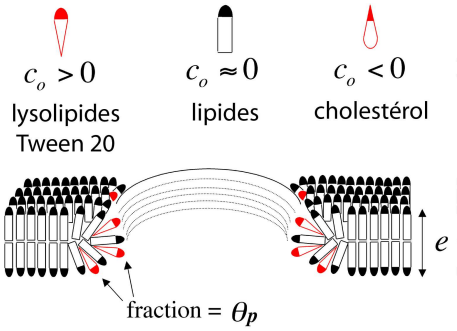

FIG. 7.13 – Courbure spontanée et géométrie des molécules : inclusion au niveau de la bordure du pore, qui a une géométrie presque cylindrique. Les détergents ont usuellement une forme conique (courbure positive) et les lipides ont une forme presque cylindrique (courbure nulle). D'autres molécules peuvent avoir une courbure négative (cholestérol) – adapté d'après [Karatekin et al., 2003b]

On peut considérer le bord du pore, de rayon r, comme une déformation élastique de la bicouche d'épaisseur e, composée de lipides dont la courbure spontanée est nulle ("de forme cylindrique") [Chernomordik et al., 1985]. Si l'on y inclue une faible fraction θ de molécules ayant une courbure spontanée différente de zéro ("de forme conique"), c_0, positive ou négative, on peut alors en faisant l'hypothèse que les différentes contributions sont additives, obtenir la contribution moyenne de ces molécules à la courbure moyenne, soit θc_0. La bicouche ayant un module élastique κ et les molécules au niveau du pore se réorganisant de la manière indiquée sur la Fig. 7.13 (bourrelet hémicylindrique), on peut écrire son énergie de courbure intégrée sur toute la surface du bord du pore, soit

$$E_{\text{bord}} = \frac{\kappa}{2}\left(\frac{2}{e} + \frac{1}{r} - \theta c_0\right)^2 \pi^2 e r$$

En l'égalant à l'énergie que coûte le pore, soit

$$E_{\text{pore}} = 2\pi r \tau$$

et en remarquant que $r \gg e$ et $\theta \ll 1$ (pour des inclusions diluées), on arrive à [Chernomordik et al., 1985]

$$\tau \simeq \frac{\pi\kappa}{e}(1 - \theta_p c_0 e)$$

La fraction de molécules ici, θ_p, est celle qui est inclue au bord du pore et peut différer de celle présente dans le reste de la bicouche, en particulier dans le cas où

les molécules “aiment” le pore et viennent s'y concentrer, ou bien le “détestent” et s'en excluent. Un exemple extrême de ceci est une protéine qui ne se localise qu'au bord du pore : la taline [Saitoh et al., 1998].

On peut donc voir sur cette équation comment varie *a priori* la tension de ligne en fonction de la molécule amphiphile ajoutée. Si elle a une courbure spontanée positive, c'est-à-dire une grosse tête polaire et une petite queue hydrophobe, elle aura tendance à aller cicatriser le pore et à diminuer la tension de ligne plus sa concentration sera grande dans la membrane. A l'inverse, si sa courbure est négative, c'est-à-dire une petite tête polaire et une grosse partie hydrophobe, alors la tension de ligne devrait augmenter linéairement (au moins pour le régime dilué) avec la quantité de molécules présentes.

Nous allons présenter dans ce qui suit l'étude de la modification de la tension de ligne, mesurée à l'aide des pores transitoires, par ajout de molécules ayant une courbure négative (cholestérol) ou négative (famille des Tween). Nous montrerons comment les mesures effectuées sont interprétables dans un premier temps à partir de l'équation précédente, et nous apporterons des explications plus moléculaires pour la famille des Tween.

7.3.1 Courbure négative : le cholestérol (O. Sandre)

Le cholestérol est un composant central de la régulation des propriétés de nos cellules. On lui attribue un rôle important dans leur résistance mécanique.

Cette molécule, représentée sur la Fig. 7.14, peut être modélisée comme ayant une forme de cône inversé, c'est-à-dire comme ayant une courbure *négative* [Israelachvili, 1992]. D'après ce que nous avons vu, son inclusion devrait conduire à une augmentation de la tension de ligne quand on augmente sa concentration.

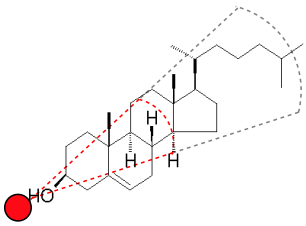

FIG. 7.14 – Cholestérol. Sa tête hydrophile est signalée par un cercle. On perçoit aisément sa géométrie conique inversée et donc le fait que sa courbure spontanée soit négative.

Le cholestérol, de par la très faible taille de sa tête polaire est essentiellement hydrophobe : on ne peut l'ajouter simplement à une suspension de vésicules géantes, sous peine de n'obtenir que des agrégats de cholestérol, et peu d'incorporation dans les membranes. Il faut l'inclure au moment de l'électroformation. Sa grande hydrophobicité nous assure que, au moins pour les faibles concentrations, le % mol/mol de cholestérol du dépôt de lipides sera reconstitué dans les vésicules géantes.

Ainsi, en mélangeant le cholestérol en solution organique avec du DOPC jusqu'à 30%, et obtenant des vésicules géantes dans un mélange sucre/glycérol iden-

tique à ce que l'on a déjà vu, O. Sandre a pu observer des pores transitoires plus courts (c'est-à-dire se fermant plus vite, ce qui est une signature d'une tension de ligne plus élevée) que dans le cas DOPC seul. La dynamique de fermeture de ces pores suit bien la loi $R^2 \ln(r)$ linéaire établie. La mesure de la tension de ligne en fonction de la quantité de cholestérol inclue à l'électroformation est présentée Fig. 7.15

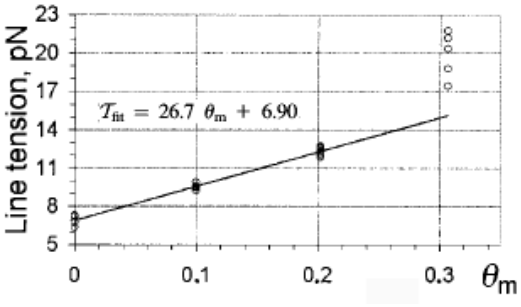

FIG. 7.15 – Variation de la tension de ligne mesurée grâce aux pores transitoires en fonction de la quantité de cholestérol ajoutée au DOPC lors de l'électroformation. Les lipides sont des lipides Sigma. On note une nette augmentation de la tension de ligne avec l'augmentation de la quantité de cholestérol, signature d'une déplétion en cholestérol au bord du trou (excès de ligne < 0). (adapté de [Karatekin et al., 2003b]

τ augmente avec θ, et l'on peut même, pour les concentrations les plus faibles, obtenir une loi linéaire. Ceci montre une déplétion en cholestérol au voisinage de la ligne (excès de ligne négatif). Ces résultats sont analysés plus en détails dans [Karatekin et al., 2003b]. Le cholestérol étant aussi connu pour modifier le module de courbure $\kappa(\theta)$, cette influence y est aussi analysée. Les résultats obtenus confirment bien que le cholestérol diminue la perméabilité des membranes, et augmente leur résistance [Chen and Rand., 1997].

7.3.2 Courbure positive : les Tween

Les détergents sont des molécules amphiphiles, capables de s'organiser en micelles directes quand elles sont dissoutes dans de l'eau, au dessus de leur CMC (en dessous de cette concentration, les molécules sont essentiellement non aggrégées). Ils peuvent ainsi créer un environnement hydrophobe, permettant de solubiliser des molécules insolubles dans l'eau, comme les corps gras lorsque l'on fait sa vaisselle, en formant des micelles mixtes. En biologie, Ils sont souvent utilisés pour détruire des membranes cellulaire afin d'en extraire des protéines, d'en séparer des structures lipidiques particulières (les rafts ou *Detergent Resistant Membrane*)... Ils sont aussi utilisés pour reconstituer des protéines transmembranaires dans des vésicules [Rigaud and Levy, 2003]. On pourra, comme revue sur les interactions entre membranes et détergents, se reporter à [Inoué, 1996, Heerklotz and Seelig, 2000].

Leur forme est modélisable par un cône (Fig. 7.13) et ils ont donc une courbure *p*ositive. D'après cette géométrie, ils ont tendance à préférer la bordure du pore, car c'est la région la plus courbée. La Fig. 7.13 montre un tel arrangement. L'équation dérivée de [Chernomordik et al., 1985] nous dit que la tension de ligne de la membrane devrait alors diminuer d'autant plus que les détergents sont présents en grande quantité dans cette région. On a donc affaire à des molécules qui sont, des agents de ligne (ou "edge-actants", par analogie avec les "surfactants", qui sont des agents de surface) [Saitoh et al., 1998, Puech et al., 2003], car elles vont se situer essentiellement au niveau du bord du pore. Celui-ci peut être considéré comme une ligne.

Nous avons réalisé une étude quantitative de l'influence d'un détergent, le Tween 20 (sa structure est présentée sur la Fig. 7.16 et ses caractéristiques sont données dans la légende). La principale différence de cette étude par rapport à celle effectuée avec le cholestérol est que l'on peut ajouter directement dans le milieu d'observation le détergent à une concentration connue. Une étude quali-

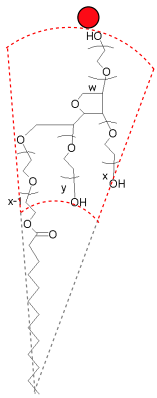

FIG. 7.16 – Tween 20 ($x + y + z = 20$). Ce tensioactif neutre à la forme d'un cône, sa courbure est positive. La tête polaire, de grande taille comparée à celle de la partie hydrophobe, est signalée par un cercle coloré. Sa CMC dans l'eau est 60 μM et sa HLB de 16,7 en fait un bon émulsifiant de l'huile dans l'eau. Il est très utilisé en membranologie pour "récupérer" des protéines membranaires. A cause de sa structure, il existe une distribution de taille de chaînes donc de géométrie qui nous est inconnue (Sigma) : nous verrons un effet moyen.

tative préliminaire, utilisant un gradient de concentration entre 0 et 10×CMC, a montré que l'on peut observer des pores transitoires, mais beaucoup plus longs à se refermer (jusqu'à plusieurs minutes), permettant de mesurer une chute importante de la tension de ligne, par un facteur 100. D'autres tensioactifs, comme le cholate de sodium, dont la structure est l'exacte inverse de celle du cholestérol, ont permis de constater le même type d'effet [Karatekin et al., 2003b].

Afin de visualiser l'effet de la concentration en Tween 20 (acheté chez Sigma, de polydispersité inconnue) sur la tension de ligne, nous avons introduit des vésicules géantes, préparées dans un mélange sucrose/glycérol avec des lipides DOPC Avanti Polar Lipids, dans des cellules contenant un mélange iso-osmolaire glucose/glycérol/Tween 20 préparé à partir d'une solution très concentrée en tensioactif [Borghi, 2002]. Le temps requis pour que les vésicules sédimentent et qu'elles se tendent sous illumination assure que la concentration est relativement homogène dans toute la cellule d'observation scellée. Le système peut être considéré à l'équilibre, car le temps nécessaire pour échanger une molécule de

Tween 20 entre la solution et la ligne est très court devant la durée de vie du pore [Puech et al., 2003]. Un paramètre important est la CMC de ce tensioactif dans les solutions visqueuses utilisées : elle ne peut être la même, car le glycérol est moins polaire que l'eau. On s'attend donc à ce qu'elle soit plus élevée (surtout qu'il y a 2/3 de glycérol en volume).

7.3.2.a Mesure de la CMC

Afin de la mesurer, et comme le Tween 20 est neutre, nous avons choisi une méthode de détermination par fluorescence du pyrène [Lantzsch et al., 1998][2]. Le spectre d'émission de celui-ci, présenté en encart sur la Fig. 7.17A, est sensible à la polarité de l'environnement. Le rapport d'intensité I_1/I_3 des pics à 372 et 380 nm varie : plus l'environnement devient apolaire, plus le pic à 380 nm est marqué, et ce rapport diminue. Il cesse d'évoluer dès lors que l'on a atteint la CMC.

La Fig. 7.17 présente les mesures par cette méthode de la CMC dans l'eau (A, qui est vérifiée être la même que la valeur donnée par la littérature et le fabriquant) et dans un mélange eau/glycérol 1 :2 (v/v) (B). Dans ce deuxième cas, la CMC mesurée est 20 fois supérieure à celle dans l'eau, soit aux environs de 1,2 mM.

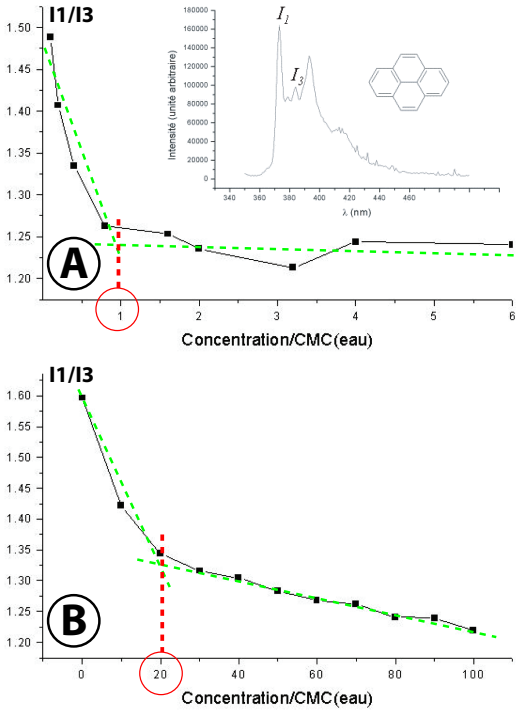

FIG. 7.17 – Mesure de la CMC de Tween 20 dans l'eau (A) et dans un mélange eau/glycérol 66% par la méthode de fluorescence du pyrène. En insert dans A, la molécule de pyrène et son spectre (excitation à 330 nm). Les intensités relevées sont I_1 à 372 nm et I_3 à 383 nm. Le rapport d'intensité I_1/I_3 varie en fonction de l'hydrophobicité du milieu, donc de la présence ou non de surfactants et de micelles. La CMC est mesurée à la rupture des pentes [Borghi, 2002].

[2]Des essais de mesure par fluorescence avec de l'ANS comme traceur ne se sont pas montré concluants

7.3.2.b Observations

En utilisant des solutions contenant des concentrations de Tween 20 jusqu'aux alentours de sa CMC, nous avons pu observer l'existence de pores transitoires dont la dynamique, au moins pour les concentrations très en dessous de la CMC mesurée, est semblable à celle des pores observés avec des vésicules de DOPC seul ou de DOPC/cholestérol. Pour ces concentrations là, les pores ont une durée de vie plus grande (ils se referment moins vite que dans le cas sans tensioactif, signe d'une diminution de la tension de ligne) et plusieurs pores peuvent se succéder pour la même vésicule. La détection par les macros est plus délicate, car le tensioactif fournit au colorant un milieu moins polaire et par conséquent le fond de fluorescence augmente avec la concentration de tensioactif.

Au voisinage de la CMC, le "premier" pore est quasiment le seul observé, car il dure une vingtaine de minutes et "dévore" la vésicule (Fig. 7.18). Nous reviendrons sur ceci plus loin.

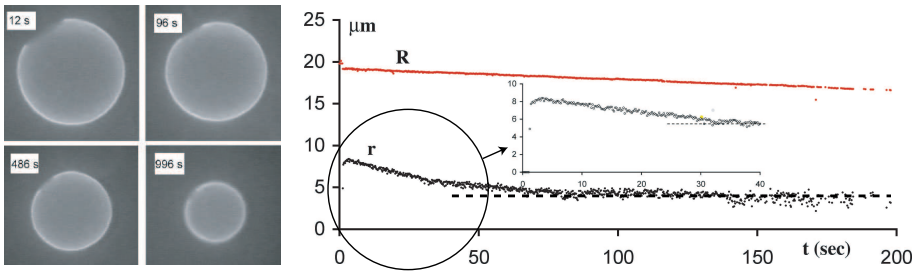

FIG. 7.18 – Pore "infini" au voisinage de la CMC. Le pore commence à se refermer, puis son rayon devient quasi-stationnaire alors que celui de la vésicule diminue beaucoup plus fortement (image empruntée à [Borghi, 2002]). A partir du premier régime (en encart), qui est semblable à celui observé pour des concentrations plus faibles en Tween 20, on peut extraire la tension de ligne associée à cette concentration.

La mesure de τ sur différentes vésicules, ou sur différents pores de la même vésicule (lorsque cela est possible), ne montre pas de variabilité nette (pas de tendance). Les écarts mesurés sont du même ordre de grandeur et permettent de construire des barres d'erreurs expérimentales raisonnables (ce qui peut être imputé à la polydispersité de Tween 20).

7.3.2.c Isotherme d'adsorption 1D

Ainsi, on peut construire une "isotherme unidimensionnelle" de Tween 20 sur le bord du pore, en traçant $\tau(c)$. La Fig. 7.19A présente la courbe obtenue et montre (i) que la tension de ligne diminue bien lorsque la concentration en

détergent en solution augmente et (ii) que cette diminution n'est pas monotone : quatre régimes différents apparaissent très clairement.

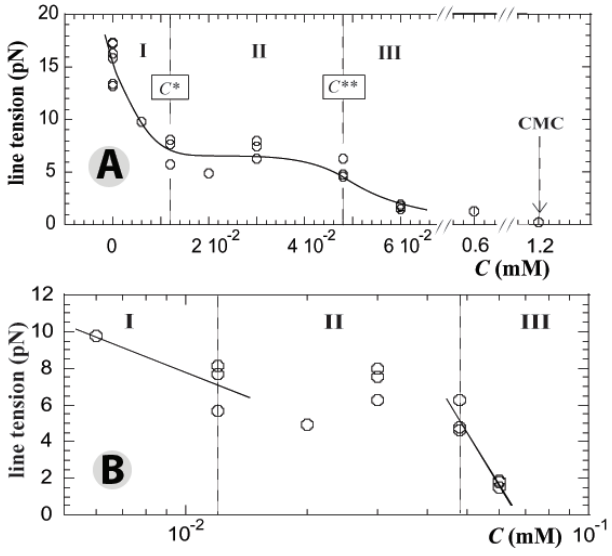

FIG. 7.19 – A : Isotherme unidimensionnel de l'adsorption de Tween 20 sur le bord de pores transitoires de vésicules géantes de DOPC. Trois régimes distincts sont visibles. B : Analyse de l'isotherme avec une équation de Gibbs à 1D : on en extrait les excès de ligne dans les deux régimes de variation, et l'on observe une compacification de l'arrangement des molécules de tensioactif au bord du pore (dans le premier régime, 2 molécules/nm ; dans le troisième, 9 molécules/nm – voir texte).

Loin en dessous de la CMC, où des pores multiples sont observés, trois régimes peuvent être décrits. Aux très faibles concentrations, la tension de ligne diminue d'un facteur 3 (régime I) avant d'atteindre un plateau (régime II). Ces deux premiers régimes ressemblent à une isotherme d'adsorption classique. Puis la tension de ligne diminue encore (régime III) jusqu'à atteindre une valeur 5 à 6 fois plus petite que sa valeur initiale. Enfin, au voisinage de la CMC, où l'on voit un premier pore quasi-unique, la tension de ligne continue à diminuer, jusqu'à atteindre une valeur presque deux ordres de grandeur plus petite que la valeur à concentration nulle, ce qui avait été observé lors des tests préliminaires. En fait, on peut réduire ces quatre régimes en trois : une décroissance rapide, un plateau et une deuxième décroissance, plus douce.

7.3.2.d Discussion

La Fig. 7.20 montre les différents scénarios proposés pour rendre compte des régimes observés, en se basant sur les équilibres possibles et probables entre le tensioactif et le bord du pore.

Pour les très faibles concentrations, le détergent s'inclut préférentiellement au niveau du bord du pore et le cicatrise,, diminuant ainsi fortement la tension de ligne. Dès que la concentration en bulk atteint $c^* = 0,01$ mM, qui peut être vue comme une "concentration (linéique) critique", le bord du pore est saturé, et les molécules excédentaires vont dans un réservoir, qui ne peut être ici que le reste de

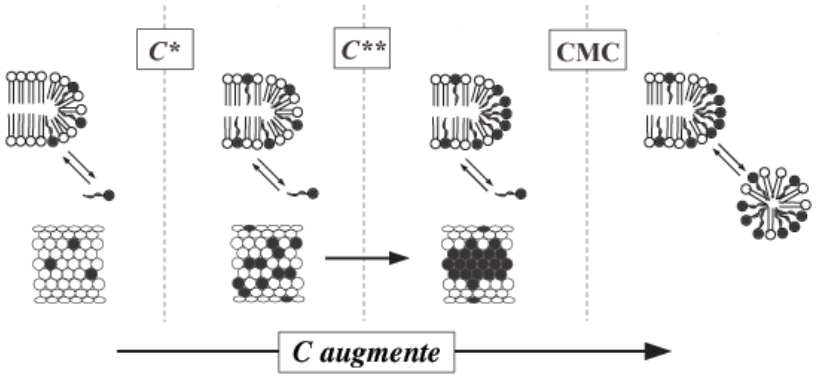

FIG. 7.20 – Interactions proposées entre le tensioactif et le bord du pore, pour les différents régimes observés dans l'isotherme de ligne de Tween 20 (d'après [Puech et al., 2003].

la membrane, étant donné que l'on est loin de la CMC. Ces molécules ne jouent alors pas de manière importante sur la tension de ligne (si ce n'est que l'on peut se poser la question de leur influence sur le module de courbure κ), et la tension de ligne ne varie plus, jusqu'à ce que l'on atteigne une autre "concentration (linéique) critique" $c^{**} = 0,05$ mM. A partir de là, la tension diminue de nouveau, et l'on peut avancer que cela est le signe d'un changement d'organisation du système (par analogie avec les isothermes de Langmuir), c'est-à-dire de la réorganisation de Tween 20 sur la ligne du pore. Pour cela, les molécules de tensioactif doivent être plus densément organisées, comme le montre la Fig. 7.20. Enfin, au voisinage de la CMC, l'intégrité de la membrane est perdue progressivement car des micelles peuvent exister et détruire la membrane en emportant, au sein de micelles mixtes, des lipides.

On peut analyser cet isotherme en utilisant un analogue 1D de l'équation de Gibbs, qui permet alors de tirer de l'isotherme l'excès de ligne des molécules de tensioactif [Puech et al., 2003]. Elle s'écrit [Chen., 2000], avec $\mu \simeq kT\ln(c)$ le potentiel chimique de ces molécules,

$$\Gamma_L = -\frac{d\tau}{d\mu} = -\frac{1}{kT}\frac{d\tau}{d\ln(c)}$$

Le tracé de $\tau(\ln(c))$ présenté sur la Fig. 7.19B permet alors, en effectuant des ajustements linéaires dans les régimes I et III de mesurer Γ_L : $\simeq 2$ molécules/nm (régime I) et $\simeq 9$ molécules/nm (régime III) . Cela étaye bien notre idée d'une condensation des molécules de Tween 20 au niveau du bord du pore lors de la deuxième phase de décroissance de la tension de ligne.

L'autre information que l'on peut déduire de l'isotherme est l'énergie d'adsorption d'une molécule de tensioactif au niveau de la ligne : un modèle simple,

basé sur l'énergie libre des molécules au niveau de la ligne, aboutit à une énergie de 12kT [Puech et al., 2003].

7.3.2.e Comparaison Tween 20/Tween 80

Afin d'étudier comment varie l'adsorption de molécules de tensioactif au niveau du bord du pore, nous avons effectué des expériences similaires de mesure de $\tau(c)$ en utilisant un autre Tween, le Tween 80. Il ne diffère en structure de Tween 20 que par une chaîne hydrophobe plus longue, la tête polaire restant la même ($x + y + z = 20$). Il est donc *a priori* moins conique que Tween 20, donc devrait moins aller se placer au niveau du bord du pore, mais s'incorporer plus dans la membrane (il a la même taille de chaîne que le DOPC).

La mesure de sa CMC dans l'eau avec la méthode du pyrène n'a pas posé de problème, alors que celle dans le mélange visqueux n'a pu être effectuée de manière convaincante.

Nous avons pu obtenir des pores transitoires et mesurer des tensions de ligne, mais cela a été (pour des raisons encore mal comprises) plus difficile qu'avec le Tween 20 et a conduit à des mesures plus dispersées. La comparaison entre les deux Tween, pour les faibles concentrations en tensioactif est présentée sur la Fig. 7.21. La seule conclusion que nous pouvons apporter à ce stade est qu'il semble bien que Tween 80 s'inclut moins au niveau du pore, car les diminutions de tension de ligne enregistrées semblent moins importantes que pour Tween 20.

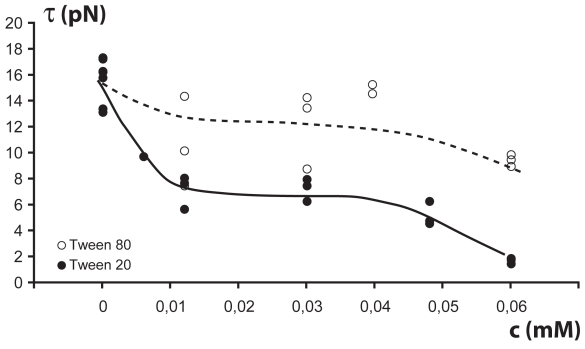

FIG. 7.21 – Comparaison des isothermes d'adsorption de deux Tween, 20 et 80. La dispersion des points obtenus est plus grande avec le Tween 80 qui est plus polydisperse en tailles de chaînes. Il abaisse moins la tension de ligne à concentration semblables que Tween 20, car il s'inclut moins bien au niveau du bord du pore, ayant une géométrie moins conique.

7.4 Conclusions et perspectives

Après avoir montré comment obtenir des pores transitoires dans des vésicules géantes en milieu visqueux et comment la dynamique de leur fermeture nous

donne accès à la tension de ligne de la membrane, nous avons étudié la modification de ce paramètre par ajout de molécules qui stabilisent ou déstabilisent le bord du pore, selon leur géométrie.

Une étude antérieure nous a permis de montrer que si la molécule ajoutée à la bicouche possède une courbure négative (forme de cône inversé), alors elle s'exclue du bord du pore et la tension de ligne augmente avec sa concentration (excès de ligne < 0). Le cas du cholestérol, composant très important de nos membranes cellulaires, a été exposé. Il permet de comprendre un autre rôle de cette molécule, en plus de sa capacité à augmenter la rigidité des membranes : en augmentant leur module de courbure, il diminue leur capacité à faire des pores.

Nous avons présenté le premier isotherme 1D d'adsorption de molécules sur une ligne. Les tensioactifs "hydrophiles", grâce à leur courbure positive (forme conique), se localisent aux endroits les plus courbés de la membrane, ici le bord du pore, et abaisse l'énergie de ligne. Nous avons mesuré la variation de la tension de ligne en fonction de la concentration en Tween 20 du milieu, et observé différents régimes, régis par l'équilibre entre le tensioactif en solution et dans la ligne, et sur des réorganisations des tensioactifs dans la ligne.

Nous pouvons mentionner un début d'étude (par N. Borghi) sur d'autres agents de ligne, les lysolipides, plus délicats à manier, que l'on peut soit introduire à l'électroformation, soit dans le milieu. Les pores infinis sont en train d'être modélisés, par F. Brochard et l'équipe de J. Prost [Girard, 2003].

Enfin, on peut signaler quelques observations extrêmement intéressantes décrites par [Karatekin et al., 2003a] montrant l'importance des agents de ligne dans la fusion membranaire : en présence d'une quantité suffisante de tensioactif, des phénomènes de fusion de vésicules géantes, de même signe, en milieu visqueux, sont observés (Fig. 7.22). Leur fréquence est bien plus importante qu'en l'absence de tensioactifs. La fusion se passe par ouverture simultanée de pores stabilisés par les molécules coniques, puis par réorganisation des bords des pores. Les processus de fusion biologique, dont on a parlé au début de ce chapitre, utilisent des molécules spécifiques capables de maintenir de telles structures (Fig. 7.2). Des études sont en train d'être menées par E. Karatekin (IBPC, Paris) et D. Tareste (Lab. de J. Rothman, New-York, USA) pour déterminer un système minimal permettant d'éclaircir ces phénomènes et comment nos résultats sur des pores géants peuvent être utilisés pour guider la recherche sur les pores nanoscopiques.

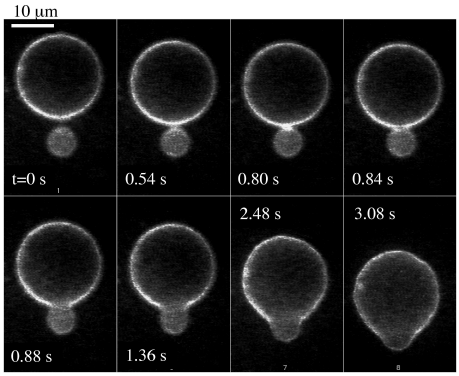

FIG. 7.22 – Séquence de fusion de deux vésicules en présence d'un tensio-actif, le Tween 20 – Il y a ouverture simultanée de deux pores au voisinage l'un de l'autre [Karatekin et al., 2003a].

Conclusions et perspectives

Ce travail de thèse a porté sur l'utilisation de vésicules géantes comme systèmes modèles simples des membranes biologiques. En particulier, l'adhésion spécifique de tels objets, décorés par des protéines, et les phénomènes de transport à travers la membrane, au travers de pores lipidiques géants, ont été étudiés.

Dans le Chapitre 4 est exposée l'utilisation d'une nouvelle technique, permettant d'accéder simplement à l'ordre de grandeur de la tension de vésicules lourdes, reposant au voisinage d'une surface, en combinant les microscopies de fluorescence et d'interférences par réflection. Elle est appliquée au suivi de la tension de vésicules subissant un dégonflement osmotique doux, ainsi qu'à leur mise sous tension photo-induite. Cette technique peut servir à déterminer la tension de vésicules avant adhésion sur un substrat modèle, paramètre qui a une forte influence sur la cinétique de l'adhésion.

Dans le Chapitre 5 est présentée la décoration de vésicules géantes par chélation de protéines portant une étiquette histidine sur des lipides porteurs d'ions métalliques. Ce type de fixation, qui permet d'orienter les protéines à la surface des vésicules, a été étudié en utilisant une protéine fluorescente, la GFP-6His. La fonctionalisation de surfaces de verre par formation, à partir de petites vésicules, d'une bicouche supportée pouvant être décorée avec des protéines par chélation est détaillée. De là, deux types d'expériences d'adhésion ont été menés, utilisant des fragments EC12-6His de E-cadhérine, une protéine calcium-dépendante essentielle à la cohésion des tissus et impliquée dans de nombreux phénomènes cancéreux : (i) entre vésicules libres, et (ii) entre des vésicules et une bicouche supportée. Dans les deux cas, une étude statistique des contacts, en présence ou en absence de calcium, a été effectuée. Dans les expériences de type (i), aucune différence notable avec et sans calcium n'a été observée. Dans les expériences de type (ii), un fragment muté, moins adhésif, a été utilisé comme contrôle, et la statistique d'adhésion, sur les surfaces décorées, est sensible à la présence de calcium et au remplacement de la protéine "efficace" par le mutant. Le système construit est un système d'adhésion spécifique mais dans des conditions délicates, car les énergies mises en jeu sont très faibles. Une suite possible de ce travail serait de faire varier la longueur de ces fragments, ce qui pourrait améliorer l'adhésion à la fois en fournissant une accessibilité et une mobilité des sites actifs plus grandes, ainsi

que, peut-être, des sites actifs supplémentaires (sur EC3, 4, 5).

Le Chapitre 6 expose l'utilisation de polyélectrolytes ou de la "super-glue" moléculaire (le couple streptavidine/biotine) conduisant à une adhésion forte, qui permet de suivre la cinétique de phénomènes d'adhésion non spécifique ou spécifique, entre une surface et une vésicule géante. En étudiant l'adhésion entre une bicouche supportée décorée avec de la streptavidine et des vésicules biotinylées, nous avons mis en évidence le rôle majeur de la tension de la membrane. Elle joue à la fois sur la morphologie de l'adhésion (présence d'un ou de plusieurs zones d'adhésion), et sur la cinétique de croissance de ces zones (pour une tension élevée, la cinétique est plus lente que pour une tension faible). Ce type de systèmes devrait nous permettre de valider de récentes prédictions théoriques sur les lois de cinétique de croissance de contacts. En travaillant à des concentrations en protéines extrêmement faibles – voisines des densités de surface des cellules –, on aimerait suivre la cinétique de recrutement des protéines qui diffusent vers le contact et qui régulent sa croissance. Par ailleurs, si ces protéines sont immergées dans une brosse de PEG, dont la fonction est d'éliminer l'adhésion non spécifique, l'adhésion clef/serrure distord la brosse et conduit à des interactions attractives entre les protéines liées. Cette séparation de phase où les protéines s'agglomèrent en de nombreux "patches" devrait modifier les lois de croissance du contact. Enfin, il serait aussi intéressant de défaire les contacts ainsi formés en détachant les vésicules par des écoulements, des pinces optiques ou magnétiques. L'énergie de détachement dépend de la vitesse de rupture du contact – et peut se relier à la force de rupture d'un lien unique mesurée par E. Evans *et al.*. On aurait ainsi une correspondance entre les travaux sur les molécules uniques et sur tapis moléculaire. Dans le cas de vésicules très peu tendues, afin de s'affranchir de la possibilité d'avoir plusieurs zones d'adhésion en même temps et du démarrage fréquent de l'adhésion au bord de la zone de contact, il faudra nucléer un contact unique en plaçant une bille au centre du méplat et suivre la croissance d'un patch unique de géométrie simple.

On peut aussi mentionner ici la possibilité d'utiliser la technique d'observation de l'interface entre une bicouche supportée et une vésicule géante afin de sonder des phénomènes d'hémifusion et de fusion de membranes, induits par des charges, de peptides de fusion ou de SNAREs. On peut espérer imager les étapes de ces processus.

Enfin, dans le Chapitre 7 sont présentés des résultats concernant la modification de la tension de ligne de membranes, par adjonction dans le système de molécules "agents de ligne". La cinétique de fermeture de pores transitoires, s'ouvrant dans des vésicules géantes en milieu visqueux sous l'effet de leur mise sous tension par la lumière, permet d'accéder facilement à la valeur de la tension de ligne. L'ajout de molécules tensioactives diminue la valeur de ce paramètre, sans modifier les traits essentiels de la cinétique de fermeture. La tension de ligne gou-

verne la capacité d'une membrane à résister à l'apparition de trous. Les molécules tensioactives choisies vont, grâce à leur géométrie, s'insérer préférentiellement au niveau du bord du pore afin de le "cicatriser" : les pores observés durent plus lontemps, jusqu'à plusieurs dizaines de minutes pour de fortes concentrations en tensioactif. En mesurant la tension de ligne, τ, en fonction de la concentration, c, on obtient une isotherme d'adsorption à une dimension du tensioactif sur la ligne formée par le bord du pore. Cela nous permet de mesurer l'énergie d'adsorption des molécules. La dépendance τ en fonction de $\log c$ donne l'excède ligne par une formule de Gibbs étendue à 1D. La capacité d'une famille de molécules à stabiliser le bord du pore en fonction de leur géométrie est aussi discutée : plus la forme conique de la molécule est prononcée, plus elle est à même de remplir cette fonction. La présence de telles molécules facilite les phénomènes de fusion entre vésicules parce qu'en diminuant τ, on diminue la barrière énergétique pour nucléer un trou dans la membrane, étape initiale de la fusion membranaire. L'application de ce type de mesures à des familles de tensioactifs plus monodisperses (copolymères, lysolipides) et/ou d'intérêt biologique (protéines, antibiotiques...) peut nous apporter une meilleure compréhension des phénomènes de fusion de membrane qui sont cruciaux pour les échanges entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule (exocytose).

Sous la forme d'un article est présentée ma contribution à la réalisation d'un système minimal permettant de tirer des tubes de membrane à l'aide de flux hydrodynamique et électro-osmotique, afin d'en étudier la dynamique d'extraction et de relaxation. Ceci fait actuellement l'objet d'un travail de thèse.

Les vésicules géantes, malgré leur fragilité qui demande à l'expérimentateur beaucoup d'expérience pour les manipuler, constituent un système modèle de premier choix pour isoler et visualiser certains phénomènes biologiques, en particulier les phénomènes d'adhésion. Mais il leur manque, outre l'*activité* des systèmes biologiques, encore un élément pour se rapprocher d'une membrane cellulaire : le *cytosquelette* qui sous-tend cette dernière et lui confère bon nombre de ses propriétés mécaniques. Le but actuellement est d'étendre ce travail à des "coques molles" décorées de molécules d'adhésion, et pouvant contenir un milieu interne gélatineux.

Bibliographie

[Abkarian, 2002] Abkarian, M. (2002). *Dynamique d'enveloppes déformables sous champs externes : vésicules et globules rouges.* Thèse de doctorat, Université Grenoble I (J. Fourier).

[Albersdörfer et al., 1997] Albersdörfer, A., Feder, T., and Sackmann, E. (1997). Adhesion-induced domain formation by interplay of long range repulsion and short range attraction force : a model membrane study. *Biophys. J.*, 73 :245.

[Albersdörfer et al., 1998] Albersdörfer, A., Feder, T., and Sackmann, E. (1998). Force spectroscopy on adhesive vesicles. *Europhys. Lett.*, 42 :227.

[Alberts et al., 2002] Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Ralf, M., Roberts, K., and Walter, P. (2002). *Molecular biology of the cell.* Garland Publishing.

[Angelova et al., 1992] Angelova, M. I., SolEau, S., MElEard, P., Faucon, J. F., and Bothorel, P. (1992). Preparation of giant vesicles by external ac electric fields. kinetics and applications. *Progr. Colloid Polym. Sci.*, 89 :127–131.

[Arnold, 1995] Arnold, K. (1995). *in Handbook of Biological Physics vol. 1.* Elsevier Science.

[Askovic, 2003] Askovic, V. (2003). *Adhésion de vésicules géantes sur substrat décoré – Contribution á l'étude de la cinétique.* Stage de maîtrise de chimie-physique, Université de Paris VI.

[Bagatolli et al., 2000] Bagatolli, L., Parasassi, T., and Gratton., E. (2000). Giant phospholipid vesicles : Comparison among the whole lipid sample characteristics using different preparation methods. a two photon fluorescence microscopy study. *Chem Phys Lipids*, 105 :135.

[Bar-ziv et al., 1995] Bar-ziv, R., Frisch, T., and Moses, E. (1995). Entropic expulsion in vesicles. *Phys. Rev. Lett.*, 75 :3481.

[Baumgart and Offenh, 2003] Baumgart, T. and Offenh, A. (2003). Polysaccharide-supported planar bilayer lipid model membranes. *Langmuir*, 19 :1730.

[Bernard et al., 2002] Bernard, A., Guedeau-Boudeville, M., Jullien, L., and di-Meglio, J. (2002). Raspberry vesicles. *Biochem. Biophys. Acta*, 1567 :1.

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

[Boggon et al., 2002] Boggon, T. J., Murray, J., Chappuis-Flament, S., Wong, E., Gumbiner, B. M., and Shapiro, L. (2002). C-cadherin ectodomain struture and implications for cell adhesion mechanisms. *Science*, 296 :1312.

[Borghi, 2002] Borghi, N. (2002). *Pores transitoires de vésicules géantes – Effets de l'ajout de tensioactifs sur la tension de ligne.* Dea de matière condensée, Université de Paris VI.

[Boulbitch et al., 2001] Boulbitch, A., Guttenberg, Z., and Sackmann, E. (2001). Kinetics of membrane adhesion mediated by ligand/receptor interaction studied with a biomimetic system. *Biophys. J.*, 81 :2743.

[Brochard and Lennon, 1975] Brochard, F. and Lennon, J. F. (1975). Frequency spectrum of the flicker phenomenon in erythrocytes. *J. Phys.*, 36 :1035–1047.

[Brochard-Wyart et al., 2000] Brochard-Wyart, F., Gennes, P.-G., and Sandre, O. (2000). Dynamics of transient pores in strectched vesicles : role of leak-out. *Physica A*, 278 :32–51.

[Bruinsma and Sackmann, 2001] Bruinsma, R. and Sackmann, E. (2001). Bioadhesion and the dewetting transition. *C.R. Acad. Sci. Paris*, 2 :803.

[Chappuis-Flament et al., 2001] Chappuis-Flament, S., Wong, E., Hicks, L. D., Kay, C. M., and Gumbiner, B. M. (2001). Multiple cadherin extracellular repeats mediate homophilic binding and adhesion. *J. Cell. Biol.*, 154 :231.

[Chen., 2000] Chen., P. (2000). The line adsorption equation : the one-dimensional counterpart of the gibbs adsorption equation. *Colloids Surf. A.*, 161 :23.

[Chen and Rand., 1997] Chen, Z. and Rand., R. P. (1997). The influence of cholesterol on phospholipid membrane curvature and bending elasticity. *Biophys. J.*, 73 :267.

[Chernomordik et al., 1985] Chernomordik, L., Kozlov, M., Melikyan, G., Abidor, I., Markin, V., and Chizmadzhev., Y. (1985). The shape of lipid molecules and monolayer membrane fusion. *Biochim. Biophys. Acta*, 812 :643.

[Chu et al., 2003] Chu, Y., Thomas, W., Eder, O., Pincet, F., Perez, E., Thiery, J., and Dufour, S. (2003). Quantitative measurements of separation forces in e-cadherin-mediated cell doublets reveal a rapid adhesive process strengthened by actin cytoskeleton remodeling through rho gtpases. *soumis.*

[Clain, 2003] Clain, J. (2003). *á venir "Démouillage intercalé : cisaillement du contact".* Thèse de doctorat, Université de Paris VI.

[Cremer and Boxer, 1999] Cremer, P. and Boxer, S. (1999). Formation and spreading of lipid bilayers on planar glass supports. *J. Phys. Chem. B*, 103 :2554.

[D.C.Chang et al., 1992] D.C.Chang, Chassy, B., Saunders, J., and Sauwers, A. (1992). *Guide to electroporation and electrofusion.* Academic Press, San Diego.

[de Gennes] de Gennes, P.-G. (1992). *Scaling concepts in polymer physics.* ***.

[de Gennes et al., 2003] de Gennes, P.-G., Puech, P.-H., and Brochard-Wyart., F. (2003). Adhesion induced by mobile stickers : A list of scenarios. *Langmuir*, 19 :7112.

[deGennes et al., 2001] deGennes, P.-G., Brochard-Wyart, F., and Quéré, D. (2001). *Gouttes, bulles et perles*. Belin, Paris.

[Dorn et al., 1998a] Dorn, I., Neumaier, K., and Tampé, R. (1998a). Molecular recognition of histidine-tagged molecules by metal-chelating lipids monitored by fluorescence energy transfert and correlation spectroscopy. *JACS*, 120 :2753.

[Dorn et al., 1998b] Dorn, I., Pawlitschko, K., Pettinger, S., and Tampé, R. (1998b). Orientation and two-dimension organization of proteins at chelator lipids interfaces. *Biol. Chem.*, 379 :1151.

[du Roure, 2003] du Roure, O. (2003). *Adhésion homophilique entre fragments de cadhérines : mesure de forces par microscopie à force atomique à l'échelle de la molécule unique*. Thèse de doctorat, Université Paris VI.

[EMAtlas, 2003] EMAtlas (2003). Elektronenmikroskopisher atlas im internet.

[Evans, 1991] Evans, E. (1991). Entropy-driven tension in vesicle membranes and unbinding of adherent vesicles. *Langmuir*, 7 :1900–1908.

[Evans and Needham, 1988] Evans, E. and Needham, D. (1988). Attraction between lipid bilayer membranes in concentrated solutions of nonadsorbing polymers : comparison of mean-field theory with measurements of adhesion energy. *Macromolecules*, 21 :1822.

[Feracci, 2003] Feracci, H. (2001-2003). communication(s) personnelle(s).

[Fery et al., 2003] Fery, A., Moya, S., Puech, P. H., Brochard-Wyart, F., and Mohwald, H. (2003). Interaction of vesicles with polyelectrolyte covered beads. *C. R. Acad. Sc. (Paris) 4*.

[Fournier et al., 2001] Fournier, J.-B., Ajdari, A., and Peliti., L. (2001). Effective area-elasticity and tension of micro-manipulated membranes. *Phys. Rev. Lett*, 86 :4970.

[Girard, 2003] Girard, P. (2003). *à venir "Fluctuations actives"*. Thèse de doctorat, Université Paris VII.

[Goldstein et al., 1990] Goldstein, B., Coombs, D., He, X., Pineda, A., and Wofsy, C. (1990). Purification of recombinant proteins with metal chelate adsorbent. *Genetic Engineering*, 12 :87.

[Groves et al., 2000] Groves, J., Boxer, S., and McConnell, H. (2000). Lateral reorganization of fluid lipid membranes in response to the electric field produced by a buried charge. *J. Phys. Chem. B*, 104 :11409.

[Gumbiner, 1996] Gumbiner, B. (1996). Cell adhesion : the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell*, 84 :345.

[Gumbiner, 2000] Gumbiner, B. (2000). Regulation of cadherin adhesive activity. *J. Cell. Biol.*, 148 :399.

[Heath et al., 2003] Heath, T., Fraley, R., and Papahadjopoulos, D. (2003). Antibody targeting of liposomes : vesicles conjugated to f(ab)2 bind specifically to cells. *Science*, 210 :539.

[Heerklotz and Seelig, 2000] Heerklotz, H. and Seelig, J. (2000). Titration calorimetry of surfactant/membrane partitioning and membrane solubilization. *Biochim. Biophys. Acta*, 69 :1508.

[Helfrich and Servuss, 1984] Helfrich, W. and Servuss, R. (1984). Undulations, steric interaction and cohesion of fluid membranes. *Nuevo Cimento*, 3D :137.

[Heuvingh, 2002] Heuvingh, J. (2002). *Hémifusion de vésicules géantes : caractérisation d'un état intermédiaire vers la fusion, en présence de forces spécifiques*. Thèse de doctorat, Université Paris VI.

[Hochuli, 1999] Hochuli, E. (1999). The influence of transport on the kinetics of binding to surface receptors : application to cells and biacore. *Journal of Molecular Recognition*, 12 :293.

[Hovis and Boxer, 2000] Hovis, J. and Boxer, S. (2000). Patterning barriers to lateral diffusion in supported lipid bilayer membranes by blotting and stamping. *Langmuir*, 16 :894.

[Hu, 2001] Hu, B. (2001). *Vesicle adhesion via interaction of integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ and cyclic-RGD-lipopeptide : a model of cell adhesion processes*. Thèse de doctorat, TU-Munich, Allemagne.

[Inoué, 1996] Inoué, T. (1996). *Interaction of surfactants with phospholipid vesicles, in Vesicles. Surfactant Science Series*, volume 62. M. Rosoff, editor. Marcel Dekker, New York.

[Israelachvili, 1992] Israelachvili, J. (1992). *Intermolecular and surface forces*. Academic Press (New York).

[Johnson et al., 2002] Johnson, J., Ha, T., Chu, S., and Boxer, S. (2002). Early steps of supported bilayer formation probed by single vesicle fluorescence assays. *Biophys. J.*, 83 :3371.

[Kam and Boxer, 2003] Kam, L. and Boxer, S. (2003). Spatially selective manipulation of supported lipid bilayers by laminar flow : Steps toward biomembrane microfluidics. *Langmuir*, 19 :1624.

[Karatekin et al., 2003a] Karatekin, E., Sandre, O., and Brochard-Wyart, F. (2003a). Pores in vesicles. *Polym. Int*, 52 :486.

[Karatekin et al., 2003b] Karatekin, E., Sandre, O., Guitouni, H., Borghi, N., Puech, P.-H., and Brochard-Wyart, F. (2003b). Cascade of transient pores in giant vesicles : Line tension and transport. *Biophys. J.*, 84 :1734–1749.

[Kenworthy et al., 1995] Kenworthy, A. K., Hristova, K., Needham, D., and McIntosh, T. (1995). Range and magnitude of the steric pressure between bilayers containing phospholipids with covalently attached poly(ethylene glycol). *Biophys. J.*, 68 :1921–1936.

[Kienberger et al., 2000] Kienberger, F., Kada, G., Gruber, H. J., Pastushenko, V. P., Riener, C., Trieb, M., Knaus, H.-G., Schindler, H., and Hinterdorfer, P. (2000). Recognition force spectroscopy studies of the nta-his6 bond. *Single Mol.*, 1 :59.

[Kloboucek et al., 1999] Kloboucek, A., Behrisch, A., Faix, J., and Sackmann, E. (1999). Adhesion-induced receptor segregation and adhesion plaque formation : A model membrane study. *Biophys. J.*, 77 :2311–2328.

[Kung et al., 2000] Kung, L., Kam, L., Hovis, J., and Boxer, S. (2000). Patterning hybrid surfaces of proteins and supported lipid bilayers. *Langmuir*, 16 :6773.

[Lantzsch et al., 1998] Lantzsch, G., Binder, H., Heerklotz, H., Welzel, P., and Klose, G. (1998). Aggregation behavior of the antibiotic moenomycin a in aqueous solution. *Langmuir*, 14 :4095.

[Lasic, 1993] Lasic, D. D. (1993). *Liposomes : from Physics to Applications.* Elsevier.

[Leckband, 2002] Leckband, D. (2002). The structure of *c*-cad ectodomain resolved. *Structure*, 10 :1.

[Lévy, 2002] Lévy, R. (2002). *Interactions intra et intermoléculaires, conformation des polymères adsorbés, transitions de phases sous étirement : que peut-on apprendre des mesures de force ?* Thèse de doctorat, Université Strasbourg I (L. Pasteur).

[Lipowski and Sackmann] Lipowski, R. and Sackmann, E., editors (1995). *Structure and dynamics of membranes*, volume 1A. North Holland/Elsevier.

[Luisi and Walde, 2000] Luisi, P. and Walde, P., editors (2000). *Giant vesicles.* Wiley.

[Mahadevan and Pomeau, 1999] Mahadevan, L. and Pomeau, Y. (1999). Rolling droplets. *Phys. Fluids*, 11 :2449.

[Manneville, 1999] Manneville, J.-B. (1999). *Fluctuations de membranes actives.* Thèse de doctorat, Université de Paris VI.

[Martel, 2002] Martel, L. (2002). *Méthodes d'analyse de surface appliquées à l'étude de protéines d'adhérence cellulaire.* Thèse de doctorat, Université J. Fourier (Grenoble I).

[Martin, 1997] Martin, P. (1997). *Démouillage d'un film de liquide intercalé entre un solide et un milieu déformable.* Thèse de doctorat, Université de Paris VI.

[Merkel et al., 1999] Merkel, R., Nassoy, P., Leung, A., Ritchie, K., and Evans, E. (1999). Energy landscapes of receptor-ligands bonds explored with dynamic force spectroscopy. *Nature*, 397 :51.

[Moreaux, 2002] Moreaux, L. (2002). *Microscopie optique non lineaire pour l'imagerie biologique*. Thèse de doctorat, Université Paris XI.

[Moreaux et al., 1982] Moreaux, L., Sandre, O., Charpak, S., Blanchard-Desce, M., and Mertz, J. (1982). Interactions between neutral phospholipid bilayer membranes. *Biophys. J.*, 37 :657.

[Moreaux et al., 2001] Moreaux, L., Sandre, O., Charpak, S., Blanchard-Desce, M., and Mertz, J. (2001). Coherent scattering in multi-harmonic generation microscopy. *Biophys. J.*, 80 :1568.

[Mui et al., 1995] Mui, B., Dobereiner, H., Madden, T., and Cullis, P. (1995). Influence of transbilayer area asymmetry on the morphology of large unilamellar vesicles. *Biophys. J.*, 69 :930.

[Nagar et al., 1996] Nagar, B., Overduin, M., Ikura, M., and Rini, J. M. (1996). Structural basis of calcium-induced rigidification and dimérization. *Nature*, 380 :360.

[Nardi et al., 1997] Nardi, J., Feder, T., Bruinsma, R., and Sackmann, E. (1997). Electrostatic adhesion between fluid membranes : phase separation and blistering. *Europhys. Lett.*, 37 :371.

[Noppl-Simson and Needham., 1996] Noppl-Simson, D. and Needham., D. (1996). Avidin-biotin interactions at vesicle surfaces : adsorption and binding, cross-bridge formation, and lateral interactions. *Biophys. J.*, 70 :1391.

[Olson et al., 2001] Olson, D., Johnson, J., Patel, P., Shaqfeh, E. G., Boxer, S., and Fuller, G. (2001). Electrophoresis of dna adsorbed to a cationic supported bilayer. *Langmuir*, 17 :7396.

[Pécréaux, 2003] Pécréaux, J. (2003). *à venir "Fluctuations actives"*. Thèse de doctorat, Université Paris VI.

[Perret et al., 2002a] Perret, E., Benoliel, A.-M., Nassoy, P., Pierres, A., Delmas, V., Thiery, J.-P., Bongrand, P., and Feracci, H. (2002a). Fast dissociation kinetics between individual e-cadherin fragments revealed by flow chamber analysis. *EMBO Journal*, 21 :2537.

[Perret et al., 2002b] Perret, E., Leung, A., Morel, A., Feracci, H., and Nassoy, P. (2002b). Versatile decoration of glass surfaces to probe individual protein-protein interactions and cellular adhesion. *Langmuir*, 18 :846.

[Pierrat, 2003] Pierrat, S. (2003). *à venir "BFP/cadhérines"*. Thèse de doctorat, Université Paris VI.

[Pierres et al., 2003] Pierres, A., Eymeric, P., Baloche, E., D. Touchard, A.-M. B., and Bongrand, P. (2003). Cell membrane alignment along adhesive surfaces : Contribution of active and passive cell processes. *Biophys. J.*, 84 :2058.

[Pincet, 2003] Pincet, F. (2001-2003). communication(s) personnelle(s).

[Pincet et al., 2001a] Pincet, F., Bouar, T. L., Zhang, Y., Esnault, J., Mallet, J.-M., Perez, E., and Sinay, P. (2001a). Ultraweak sugar-sugar interactions for transient cell adhesion. *Biophys. J.*, 80 :13541358.

[Pincet et al., 1999] Pincet, F., Cribier, S., and Perez, E. (1999). Bilayer of neutral lipids bear a small but significant charge. *Eur. Phys. J. B*, 11 :127–130.

[Pincet et al., 2001b] Pincet, F., Perez, E., Loudet, J.-C., and Lebeau., L. (2001b). From macroscopic adhesion energy to molecular bonds : A test of the theory. *Phys. Rev. Lett.*, 87 :178101.

[Pons et al., 2002] Pons, T., Moreaux, L., and Mertz, J. (2002). Photo-induced flip-flop of amphiphilic molecules in lipid bilayer membranes. *Phys. Rev. Lett.*, 89 :288104.

[Puech et al., 2003] Puech, P.-H., Borghi, N., Karatekin, E., and Brochard-Wyart, F. (2003). Line thermodynamics : Adsorption at a membrane edge. *Phys. Rev. Lett.*, 90 :128304.

[Puech and Brochard-Wyart, 2003] Puech, P.-H. and Brochard-Wyart, F. (2003). Membrane tensiometer for heavy giant vesicles. *soumis á Physica A*.

[Radler and Sackmann, 1993] Radler, J. and Sackmann, E. (1993). Imaging optical thicknesses and separation distances of phospholipidic vesicles at solid surfaces. *J. Phys. II France*, 3 :727–748.

[Rädler et al., 1995] Rädler, J., Strey, H., and Sackmann, E. (1995). Phenomenology and kinetics of lipid bilayer spreading on hydrophilic surfaces. *Langmuir*, 11 :4539–4548.

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

[Reimhult et al., 2003] Reimhult, E., Hook, F., and Kasemo, B. (2003). Intact vesicle adsorption and supported biomembrane formation from vesicles in solution : influence of surface chemistry, vesicle size, temperature, and osmotic pressure. *Langmuir*, 19 :1681.

[Rigaud and Levy, 2003] Rigaud, J. and Levy, D. (2003). Reconstitution of membrane proteins into proteoliposomes. *to appear in Methods in Enzymology, Liposomes part A*.

[Rigaud et al., 1995] Rigaud, J., Pitard, B., and Levy, D. (1995). Reconstitution of membrane proteins into liposomes : application to energy-transducing membrane proteins. *Biochim. Biophys. Acta*, 1231 :223.

[Rinia, 2001] Rinia, H. (2001). *Atomic Force Microscopy on domains in biological model membranes*. Thèse de doctorat, Utrecht University, Hollande.

[Rosoff, 1996] Rosoff, M., editor (1996). *Vesicles*, volume 62 of *Surfactant Science Series*. Decker.

[Rossier, 2003] Rossier, O. (2003). *Confinement : de la goutte à la cellule vivante.* Thèse de doctorat, Université de Paris VI.

[Rossier et al., 2003] Rossier, O., Cuvelier, D., Borghi, N., Puech, P. H., Derényi, I., Buguin, A., Nassoy, P., and Brochard-Wyart, F. (2003). Giant vesicles under flows : Extrusion and retraction of tubes. *Langmuir*, 19 :575–584.

[Rothen-Rutishauser et al., 2002] Rothen-Rutishauser, B., Riesen, F., Braun, A., Gunthert, M., and Wunderli-Allenspach, H. (2002). Dynamics of tight and adherens junctions under egta treatment. *J. Membr. Biol.*, 188 :151.

[Roux et al., 2002] Roux, A., Cappello, G., Cartaud, J., Prost, J., Goud, B., and Bassereau, P. (2002). A minimal system allowing tubulation with molecular motors pulling on giant liposomes. *Proc. Natl. Am. Soc.*, 99 :53945399.

[Sackmann, 1996] Sackmann, E. (1996). Supported membranes : Scientific and practical applications. *Science*, 271 :43–48.

[Saitoh et al., 1998] Saitoh, A., Takiguchi, K., Tanaka, Y., and Hotani, H. (1998). Opening up of liposomal membranes by talin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 95 :1026.

[Sandre, 2000] Sandre, O. (2000). *Pores transitoires, adhésion et fusion des vésicules géantes.* Thèse de doctorat, Université Paris VI.

[Sandre et al., 1999a] Sandre, O., Moreaux, L., and Brochard-Wyart, F. (1999a). Dynamics of transient pores in strectched vesicles. *Proc. Natl. Acad. Sc. USA*, 96 :10591.

[Sandre et al., 1999b] Sandre, O., Moreaux, L., and Brochard-Wyart, F. (1999b). Dynamics of transient pores in strectched vesicles. *Proc. Natl. Acad. Sc. USA*, 96 :10591.

[Sapuri et al., 2003] Sapuri, A., Baksh, M., and Groves, J. (2003). Electrostatically targeted intermembrane lipid exchange with micropatterned supported membranes. *Langmuir*, 19 :1606.

[Scheuring, 2000] Scheuring, S. (2000). *Atomic force and electron microscopic analysis of membrane channels and transporters.* Thèse de doctorat, Université de Bâle (Suisse).

[Schmitt et al., 2001] Schmitt, J., Danner, B., and Bayerl, T. M. (2001). Polymer cushions in supported phospholipid bilayers reduce significantly the frictional drag between bilayer and solid surface. *Langmuir*, 17 :244.

[Schmitt et al., 1994] Schmitt, L., Dietrich, C., and Tampé, R. (1994). Synthesis and characterization of chelator-lipids for reversible immobilization of engineered proteins at self-assembled lipid interfaces. *JACS*, 116 :8485.

[Schmitt et al., 2000] Schmitt, L., Ludwig, M., Gaub, H., and Tampé, R. (2000). A metal-chelating microscopy tip as a new toolbox for single-molecule experiments by atomic force microscopy. *Biophys. J.*, 78 :3275.

[Seifert et al., 1991] Seifert, U., Berndl, K., and Lipowsky, R. (1991). Shape transformations of vesicles : Phase diagram for spontaneous- curvature and bilayer-coupling models. *Phys. Rev. A*, 44 :1182–1202.

[Shapiro et al., 1995] Shapiro, L., Fannon, A., Kwong, P., Thompson, A., Lehmann, M., Grube, l. G., Legrand, J., Als-Nielsen, J., Colman, D., and Hendrickson, W. (1995). Structural basis of cell-cell adhesion by cadherins. *Nature*, 374 :327.

[Silberzan, 2003] Silberzan, P. (2001-2003). communication(s) personnelle(s).

[Sivasankar et al., 1999] Sivasankar, S., Brieher, W., Lavrik, N., Gumbiner, B., and Leckband, D. (1999). Direct force measurements of multiple adhesive interactions between cadherin ectodomains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 96 :11820.

[Sivasankar et al., 2001] Sivasankar, S., Gumbiner, B., and Leckband, D. (2001). Direct measurements of multiple adhesive alignments and unbinding trajectories between cadherin extracellular domains. *Biophys. J.*, 80 :1758.

[Solon, 2003] Solon, J. (2003). *à venir "Modèles pour la fusion"*. Thèse de doctorat, Université Paris VI.

[Takeichi, 1991] Takeichi, M. (1991). Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. *Science*, 251 :1451.

[Takeichi, 1995] Takeichi, M. (1995). Morphogenetic roles of classic cadherins. *Curr. Op. Cell. Bio.*, 7 :619.

[Tareste, 2003a] Tareste, D. (2001-2003a). communication(s) personnelle(s).

[Tareste, 2003b] Tareste, D. (2003b). *Liaisons par Chélation et Liaisons Hydrogène : une Mesure Directe*. Thèse de doctorat, Université Paris VI.

[Thiery, 2003] Thiery, J. (2003). Cell adhesion in cancer. *C. R. Acad Sci.*, 4.

[Wagner and Tamm, 2000] Wagner, M. L. and Tamm, L. K. (2000). Tethered polymer-supported planar lipid bilayers for reconstitution of integral membrane proteins : Silane-polyethyleneglycol-lipid as a cushion and covalent linker. *Biophys. J.*, 79 :1400.

[Winterhalter, 1999a] Winterhalter, M. (1999a). On the defect growth after short electric field pulses in planar lipid bilayers. *Colloids and Surfaces A*, 149 :161.

[Winterhalter, 1999b] Winterhalter, M. (1999b). Sugar transport through channels reconstituted in planar lipid membranes. *Colloids and Surfaces A*, 149 :547.

[Wintz et al., 1996] Wintz, W., Döbereiner, H., and Seifert, U. (1996). Starfish vesicles. *Europhys. Lett*, 33 :403–408.

[Yang et al., 2001] Yang, T., Jung, S.-Y., Mao, H., and Cremer, P. (2001). Fabrication of phospholipid bilayer-coated microchannels for on-chip immunoassays. *Anal. Chem.*, 73 :165.

[Zhelev, 1995] Zhelev, D. (1995). Exchange of monooleoylphosphatidylcholine with egg phosphatidylcholine vesicle membranes. *Biophys. J.*, 71 :257.

[Zhelev, 1998] Zhelev, D. (1998). Material propert y characteristics for lipid bilayers containing lysolipid. *Biophys. J.*, 75 :321.

[Zhelev and Needham, 1993] Zhelev, D. and Needham, D. (1993). Tension-stabilized pores in giant vesicles : determination of pore size and pore line tension. *Biochem. Biophys. Acta*, 1147 :89.

[Zhu et al., 2003] Zhu, B., Chappuis-Flament, S., Wong, E., Jensen, I., Gumbiner, B., and Leckband, D. (2003). Functional analysis of the structural basis of homophilic cadherin adhesion. *Biophys. J.*, 84 :4033.