



HAL
open science

Utilisation de tensioactifs photosensibles pour le photocontrôle de systèmes biomimétiques, macro- et microfluidiques

Antoine Diguet

► **To cite this version:**

Antoine Diguet. Utilisation de tensioactifs photosensibles pour le photocontrôle de systèmes biomimétiques, macro- et microfluidiques. Autre. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2011. Français. NNT: . tel-00610380

HAL Id: tel-00610380

<https://theses.hal.science/tel-00610380>

Submitted on 21 Jul 2011

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

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



THÈSE DE DOCTORAT DE
L'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE

Spécialité :
Chimie physique et chimie analytique

Présentée par :
ANTOINE DIGUET

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE

**Utilisation de tensioactifs photosensibles
pour le photocontrôle de systèmes
biomimétiques, macro- et microfluidiques**

Soutenue le 8 Juillet 2011 devant le jury composé de :

Loïc AUVRAY	Rapporteur
Damien BAIGL	Directeur de thèse
Dario BASSANI	Examinateur
Françoise BROCHARD-WYART	Présidente
Valérie MARCHI-ARTZNER	Rapporteuse
Howard STONE	Examinateur

Université Pierre et Marie Curie - Paris 6

Tél. Secrétariat : 01 42 34 68 35

Bureau d'accueil, inscription des doctorants et base de données

Fax : 01 42 34 68 40

Esc G, 2ème étage

Tél. pour les étudiants de A à EL : 01 42 34 69 54

15 rue de l'école de médecine

Tél. pour les étudiants de EM à MON : 01 42 34 68 41

75270-PARIS CEDEX 06

Tél. pour les étudiants de MOO à Z : 01 42 34 68 51

E-mail : scolarite.doctorat@upmc.fr

Remerciements

Je tiens tout d'abord à sincèrement remercier mon directeur de thèse, Damien Baigl. Damien m'a laissé une liberté dans la gestion de mon travail tout en étant très proche dès l'instant où une difficulté était rencontrée, une question était posée. Grâce à ses nombreuses idées, son dynamisme et sa générosité, ces trois ans et demi passés sous sa direction m'auront particulièrement enrichi, du point de vue scientifique bien sûr, mais aussi sur un grand nombre d'autres sujets.

J'aimerais également remercier les membres du jury qui m'ont fait l'honneur de juger ce travail : Françoise Brochard-Wyart pour l'avoir présidé, Loïc Auvray et Valérie Marchi-Artzner pour avoir accepté d'en être les rapporteurs, Dario Bassani et Howard Stone pour avoir apporté leur expertise respectivement en photochimie et en microfluidique.

Cette thèse m'a permis de collaborer de manière fructueuse avec de nombreuses personnes, contribuant chacune à son caractère interdisciplinaire. Je suis particulièrement reconnaissant envers Maël Le Berre, qui, par son approche fine de l'expérimentation, m'a rendu plus familier avec les phospholipides, les GUV et la photolithographie. Merci à Yong Chen pour son accueil au sein de son équipe et la mise à disposition de nombreux appareils de microfabrication. Merci à Li Hao pour son savoir-faire et ses nombreuses idées en microfluidique. Du point de vue de la synthèse organique, je remercie Ludovic Jullien pour m'avoir permis d'utiliser son laboratoire et les membres de son équipe que j'ai pu rencontrer (Isabelle Aujard, Ludovic Fournier, Matthieu Emond, Sylvie Maurin) pour leurs nombreux conseils qui m'ont facilité la mise en oeuvre de la synthèse des analogues de l'AzoTAB. De même, je tiens à remercier Matthieu Sollogoub et Samuel Guieu de l'UPMC pour leur apport sur ce domaine. Merci à Thomas Le Saux et Christophe Tribet pour leur savoir faire en électrophorèse capillaire. Merci à Arnaud Gautier et Zoher Gueroui pour leurs conseils en biochimie.

Le séjour enrichissant de deux mois que j'ai eu la chance de réaliser à l'université de Kyoto a été possible grâce à Kenichi Yoshikawa. En plus de son accueil chaleureux, il m'a permis d'interagir avec plusieurs physiciens de son équipe, dont Nobuyuki Magome avec qui nous avons débuté le travail sur l'effet chromocapillaire. Je lui en suis particulièrement reconnaissant. Merci aussi à Miho Yanagisawa, Hirohide Saito, pour leur apport respectivement sur les GUV à multidomains et l'expression de protéines. Un grand merci à Cécile Crozatier pour m'avoir rapidement familiarisé avec les manipulations liées à l'expression génétique *in vitro* et pour m'avoir mis rapidement à l'aise avec la culture et les sorties japonaises. De même, merci à Marcel Hörning et Shio Inagaki pour leur gentillesse et leur spontanéité. Ce sont aussi Arnaud Saint-Jalmes et Reine-Marie Guillermic que je tiens à remercier, pour leur sympathique accueil dans leur laboratoire à Rennes, mais aussi pour leur expertise en physique des tensioactifs, qui nous aura fait progresser dans la compréhension de plusieurs faits expérimentaux intrigants. Enfin, merci à Michel Volovitch et Eliane Ipendey du Collège de France pour leur apprentissage méticuleux de la préparation de plasmides.

Au Département de Chimie de l'ENS, j'ai eu la chance de partager mon quotidien avec des personnes de divers horizons que je remercie pour leur gentillesse et ce qu'ils m'auront apporté. En particulier merci à Anna Venancio, Ayako Yamada, Naresh Kumar Mani, Yanjun Liu, Lucia Cinque, Marie Geoffroy, Lei Lei, Ludivine Garcia, Thomas Di Maio, Fredrik Thege. J'ai aussi eu un grand plaisir à encadrer des stagiaires dynamiques et intéressés à qui j'espère avoir fait découvrir une physico-chimie variée et parfois surprenante : merci à Sacha Abadie, Elodie Brun et Nicolas Queyriaux. Ils m'auront en retour appris beaucoup de choses.

Table des matières

Avant-propos	9
I Les systèmes photochromes pour l'actuation par la lumière	13
1 Le photochromisme	15
1.1 Les fonctions photochromes	17
1.2 Applications du photochromisme	18
1.3 Conclusion	23
2 Les tensioactifs photosensibles : des outils à explorer	25
2.1 La tension interfaciale	27
2.2 Structures des tensioactifs photosensibles	30
2.3 Utilisations	31
2.4 Conclusion	35
II Photocontrôle moléculaire : conformation de l'ADN et expression gé-	37
nétique	
1 Compaction de l'ADN	39
1.1 Compaction de l'ADN dans la nature	41
1.2 Compaction <i>in vitro</i> de l'ADN : paramètres physico-chimiques	41
1.3 Modification de la compaction de l'ADN par une perturbation extérieure	49
1.4 Photocontrôle de la conformation de l'ADN	50
1.5 Conformation de l'ADN et activité transcriptionnelle	51
1.6 Conclusion	53
2 Ingénierie moléculaire de tensioactifs photosensibles	55
2.1 Synthèse d'analogues de l'AzoTAB	57
2.2 Photoisomérisation et autoassemblage	61
2.3 Photocontrôle de la compaction de l'ADN	64
2.4 Conclusion	69
3 Photocontrôle de l'expression génétique	73
3.1 Photocontrôle de l'activité transcriptionnelle	75

3.2	Photocontrôle de la synthèse de protéines modèles	80
3.3	Photocontrôle de la synthèse d'une enzyme	83
3.4	Conclusion	88
Conclusion de la deuxième partie		90
 III Photostimulation mésoscopique : préparation et perturbation de modèles membranaires		 91
1	Les vésicules unilamellaires géantes	93
1.1	Des phospholipides à la vésicule	95
1.2	Les méthodes de formation des GUV	97
1.3	Applications des vésicules	104
1.4	Conclusion	107
2	Un motif de phospholipides pour la formation de GUV monodisperses	109
2.1	Les méthodes d'obtention de motifs de phospholipides	111
2.2	Dépôt de phospholipides sur une surface microstructurée	113
2.3	Formation de GUV monodisperses	122
2.4	Conclusion	122
3	Interaction GUV–tensioactifs photosensibles	125
3.1	Lumière et vésicules	127
3.2	Photodestruction de GUV	130
3.3	Description du mécanisme	132
3.4	Contrôle spatial de la photodestruction	135
3.5	Tentative d'électrogonflement d'un film contenant de l'AzoTAB	135
3.6	Conclusion	138
Conclusion de la troisième partie		141
 IV Photoactuation de systèmes macro- et microfluidiques biphasiques		 143
1	Lumière et capillarité	145
1.1	Mouvement et tension de surface	147
1.2	Les interfaces microfluidiques	158
1.3	Conclusion	167
2	Photomanipulation par effet chromocapillaire	169
2.1	Choix du système biphasique	171
2.2	Variation de la tension interfaciale sous lumière UV	173
2.3	Illumination partielle de la goutte	175
2.4	Photomanipulation à façon	178
2.5	Conclusion	181
3	Photogénération réversible de gouttes en microfluidique	183

3.1	Introduction d'un tensioactif photosensible dans un dispositif microfluidique . . .	185
3.2	Description du mécanisme	187
3.3	Contrôle temporel et réversibilité	191
3.4	Contrôle spatial	192
3.5	Conclusion	198
	Conclusion de la quatrième partie	201
	Conclusion générale	203
	Annexes	205
A	Synthèse de l'AzoTAB et de ses dérivés	207
B	Expression génétique <i>in vitro</i>	213
C	Microfabrication	217
C.1	Microstructuration d'une surface de silicium	217
C.2	Fabrication d'un dispositif microfluidique	218
D	Mesures capillaires	221
D.1	Mesure de tension interfaciale	221
D.2	Mesure d'angle de contact	222
	Bibliographie	225
	Récapitulatif des articles issus de ce travail	249
	Abréviations	252
	Index	253

Avant-propos

La volonté de modifier l'état d'un système pour en obtenir une fonction est une question omniprésente dans tous les processus intervenant en chimie, physique et biologie. Parmi les moyens existants, c'est souvent la réaction chimique qui est utilisée, de manière à transformer la nature des composants pour donner au mélange les propriétés voulues. Cette façon d'agir reste limitée par deux aspects. D'une part, elle nécessite l'introduction de matière extérieure dont la résolution spatio-temporelle est en général faible. D'autre part, l'ajout de nouvelles espèces induit inévitablement un caractère irréversible à l'évolution.

Il existe d'autres stimuli pour pouvoir agir à la fois de manière plus sélective et sans apport de matière supplémentaire. Ils consistent en la transmission d'une énergie au système, qui peut être mécanique, électrique, thermique ou électro-magnétique. Parmi ces différentes formes, les deux dernières peuvent être générées par une excitation lumineuse. La lumière possède l'avantage de pouvoir transmettre de l'énergie sans contact mécanique avec le système, de manière non-invasive.

Pour que la lumière puisse interagir avec la matière de façon efficace en vue de provoquer des fonctions photoinduites, il est nécessaire de disposer de molécules adéquates. La chimie de synthèse offre des outils performants pour concevoir de nouvelles molécules photosensibles et aux caractéristiques bien définies. Il existe en particulier des groupements capables d'interagir avec la lumière de façon réversible : ce sont les fonctions photochromes, dont le développement a véritablement lieu depuis le milieu du XXème siècle. Grâce à elles, le système peut être basculé entre deux états sous illumination, à la manière d'un interrupteur moléculaire. Lorsque les propriétés des deux configurations sont bien distinctes (comme leur géométrie, leur polarité, leur spectre d'absorption, leur capacité à réagir), les changements photoinduits au niveau moléculaire peuvent se traduire de façon macroscopique, à travers la concentration des molécules, leur autoorganisation ou leurs interactions coopératives avec d'autres objets. L'intégration d'éléments photochromes dans de nouvelles structures est un sujet interdisciplinaire en développement continu, en vue de créer des fonctions photoinduites inédites.

L'objet de cette thèse est de montrer de nouvelles possibilités de photocontrôle, à travers l'utilisation de molécules qui sont à la fois tensioactives et photochromes. Malgré la structure relativement simple de ces molécules, nous allons voir que leur introduction dans des systèmes variés nous permet de créer de nouvelles fonctions de photoactuation, ceci à plusieurs échelles et niveaux d'organisation et le plus souvent de manière réversible.

Dans une première partie essentiellement bibliographique, nous nous intéresserons de façon large aux molécules photochromes et à leurs applications. Le cas particulier des tensioactifs photosensibles sera ensuite détaillé pour bien comprendre ce qui a été réalisé avec ces molécules et leur potentiel d'exploitation.

À l'échelle moléculaire tout d'abord, c'est la mise en contact de tensioactifs photosensibles avec de l'ADN qui sera détaillée dans une seconde partie. Grâce à eux, il est possible de contrôler par la lumière l'état de compaction de molécules individuelles d'ADN. Nous décrirons la synthèse et la mise en oeuvre de nouveaux tensioactifs photosensibles permettant de réaliser cette transition de manière plus efficace. L'application de ce phénomène au photocontrôle de l'expression de différentes protéines sera enfin démontrée.

Dans une troisième partie, nous nous intéresserons aux vésicules géantes, des édifices mimant les membranes cellulaires et possédant une taille allant de 1 à 100 μm . En vue de contrôler la taille

des vésicules produites par la méthode d'électroformation, une technique de dépôt de motifs de multicouches de phospholipides sur une surface microstructurée de silicium sera proposée. Nous décrirons ensuite l'interaction entre nos tensioactifs photosensibles et des vésicules unilamellaires géantes. Nous montrerons la possibilité d'induire la rupture des membranes par illumination et comment le tensioactif joue le rôle de nanosenseur de la mécanique des membranes.

Les modifications photoinduites de tension interfaciale offertes par les tensioactifs photochromes seront enfin exploitées dans une quatrième partie. Nous décrirons d'abord comment la tension de surface peut être utilisée pour provoquer des mouvements de fluide et comment elle intervient dans les phénomènes de mouillage. La photomanipulation d'une goutte d'huile millimétrique flottant sur un bain de tensioactif photosensible sera ensuite détaillée. Enfin, nous expliquerons comment un écoulement biphasique microfluidique peut être modifié réversiblement d'un régime continu à un régime de gouttes, à l'aide de la lumière.

Première partie

Les systèmes photochromes pour l'actuation par la lumière

Chapitre 1

Le photochromisme

Au-delà de l'esthétique des phénomènes lumineux qui fascinent les hommes, la lumière est avant tout nécessaire à la vie car elle transporte de l'énergie dont beaucoup de systèmes biologiques ont besoin, en particulier pour la photosynthèse. Aux yeux de l'expérimentateur qui sait la manipuler, elle représente un stimulus capable d'agir sur de nombreux systèmes, doté de plusieurs atouts. Du fait de sa nature électromagnétique, l'énergie lumineuse peut être transmise sans contact mécanique avec l'objet ciblé. Ceci est intéressant pour pouvoir agir sur un système à distance, de manière non invasive, en perturbant le moins possible son environnement. De plus, les progrès de l'optique permettent de disposer aujourd'hui de rayonnements dont les caractéristiques sont finement contrôlables :

- du point de vue spatial. La zone d'éclairement peut être précisément réglée, en taille ainsi qu'à travers son homogénéité ou la réalisation de motifs. Les dimensions des sections d'excitation sont très variables, aussi bien supérieures au mètre carré qu'inférieures au micromètre carré, en particulier dans les systèmes d'absorption biphotonique.

- du point de vue temporel. La variation de l'intensité du signal peut être modulée de façon très précise. Une lumière parfaitement stable peut être obtenue sur de longues durées, aussi bien qu'une lumière oscillante à très grande fréquence, au-delà du GHz.

- du point de vue de leur longueur d'onde. La fréquence lumineuse permet de sélectionner l'espèce avec laquelle interagir, suivant les propriétés d'absorption de celle-ci. Les sources lumineuses et les techniques de sélection de spectre permettent actuellement de disposer de signaux dont la monochromaticité (en particulier pour le laser) ou la largeur du spectre sont parfaitement contrôlées. Ce paramètre représente une autre dimension sur laquelle jouer pour rendre l'excitation lumineuse la plus sélective possible.

Pour profiter de la sélectivité offerte par les stimuli lumineux, il est aussi nécessaire que le système ciblé soit aussi suffisamment réactif et puisse provoquer des changements sensibles après irradiation. Parmi les espèces visées, les groupements photochromes permettent d'exploiter la lumière aussi bien à l'échelle moléculaire que macroscopique. Ces unités sont caractérisées par deux états dont le passage de l'un à l'autre est réalisable, sous une illumination précise et ceci de manière réversible.

Après avoir décrit le principe du photochromisme, nous allons voir dans ce chapitre que les systèmes photochromes sont aujourd'hui de nature variée et qu'ils représentent des outils de création de fonctions photoinduites.

1. Le photochromisme

1.1	Les fonctions photochromes	17
1.1.1	Définition	17
1.1.2	Exemples	17
1.2	Applications du photochromisme	18
1.2.1	Applications liées aux modifications spectrales	18
1.2.2	Applications liées aux modifications d'autres propriétés physico-chimiques	20
	Changements photoinduits macroscopiques	20
	Modifications photoinduites aux conséquences uniquement moléculaires	21
1.3	Conclusion	23

1.1 Les fonctions photochromes

1.1.1 Définition

Le photochromisme est la transformation réversible induite par une onde électromagnétique d'une espèce chimique entre deux isomères ayant des spectres d'absorption différents (FIGURE 1.1). La réversibilité de la réaction peut être thermique (photochromisme de type T) et/ou photochimique (photochromisme de type P).

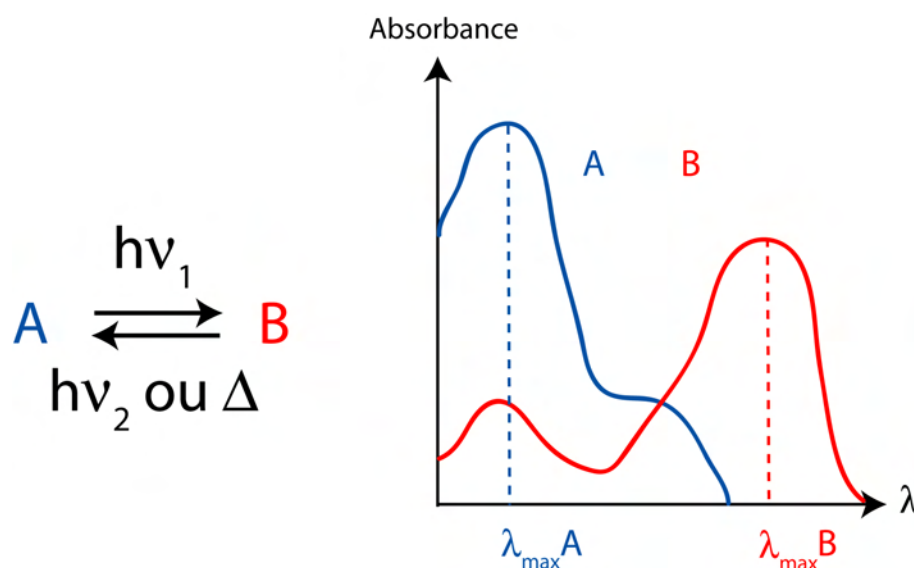


FIGURE 1.1 – Principe du photochromisme. A et B ont deux spectres d'absorption distincts.

Ce phénomène est décrit pour la première fois en 1867 par Fritsche qui observa la décoloration d'une solution de tétracène sous la lumière du soleil et sa régénération par chauffage [1]. Le terme "photochromisme" n'est finalement introduit qu'à partir de 1950 par Hirshberg [2], à un moment où les travaux de recherche, en particulier en synthèse et en spectroscopie (Infra-rouge, UV/visible, spectroscopie résolue en temps), ont permis de mieux comprendre la nature de cette transformation. Le terme est aujourd'hui associé non seulement aux molécules colorées dans la gamme du spectre visible mais aussi aux composés absorbant dans le proche UV ou l'infra-rouge.

1.1.2 Exemples

Les molécules caractérisées par un photochromisme contiennent des groupements de nature diverse, dont les principaux sont décrits FIGURE 1.2. Les mécanismes associés sont variés et majoritairement monomoléculaires. La photoisomérisation peut avoir lieu :

- à travers une isomérisation de configuration *cis-trans* autour d'une double liaison, comme dans le cas des stilbènes, des diazobenzènes (FIGURE 1.2 a et b) et des thioindigos. Ce type de réaction existe en particulier dans la rhodopsine, le récepteur biologique à l'origine de la vision. Dans ce système, l'isomérisation du rétinol provoque une déformation de la protéine à laquelle il est lié, qui représente le point de départ d'un signal nerveux.
- par une ouverture de cycle, comme pour les spiropyranes et les spirooxazines (FIGURE 1.2 c).

- par réactions péricycliques. Elles permettent de former réversiblement une liaison au sein d'une même molécule, comme pour les naphthopyranes (FIGURE 1.2 d), les diaryléthènes (FIGURE 1.2 e), les méta-cyclophanediènes ou les fulgides. Ce type de réaction peut aussi avoir lieu de façon bimoléculaire entre deux homologues comme dans le cas de l'antracène (FIGURE 1.2 f).

- à travers le transfert intramoléculaire d'hydrogène (par exemple à travers une tautomérie céto-énolique chez les anils) ou d'un autre groupement, comme pour les quinones polycycliques (FIGURE 1.2 g).

- par rupture d'une liaison sans reformation immédiate ; c'est ce qui a lieu de manière hétérolytique dans les triarylméthanés (FIGURE 1.2 h).

Il est à noter que ce type de réaction peut aussi être induite par une absorption biphotonique ou peut provoquer une inversion de chiralité dans certains systèmes particuliers (ce phénomène est appelé chirochromisme).

1.2 Applications du photochromisme

Plusieurs critères sont nécessaires pour qu'une réaction photochromique soit véritablement exploitable :

- la conversion d'un isomère à un autre ne doit pas avoir lieu de manière spontanée
- à l'inverse, une bonne réversibilité doit caractériser la réaction
- le rendement quantique ne doit pas être trop faible, pour éviter d'employer des sources lumineuses trop intenses
- la réaction doit rester non destructive : la photodégradation du système doit être la plus faible possible

Vis-à-vis de ces conditions, les groupements diazobenzènes apparaissent comme de bons candidats. Pour réaliser les deux photoconversions, il n'est pas nécessaire d'employer un rayonnement laser, des lampes classiques d'une puissance de quelques watts suffisent pour atteindre l'état photostationnaire en quelques secondes. L'énergie correspondant à la forme *cis* est supérieure d'environ 50 kJ.mol⁻¹ par rapport à la forme *trans*. Ceci garantit dans le noir ou sous illumination visible, à température ambiante, une proportion supérieure à 99% de l'isomère *trans*, le plus stable thermodynamiquement. De plus, la barrière énergétique associée au passage d'un isomère à l'autre est d'environ 200 kJ.mol⁻¹, ce qui limite considérablement le retour spontané à la forme *trans* plus stable. Dans le noir à température ambiante, le temps caractéristique de conversion thermique dans ce sens est en général de plusieurs heures. Pour ce type de fonction dans un environnement aqueux, la photoisomérisation peut être réalisée plusieurs dizaines de fois sans dommage important. Ces mêmes conditions sont aussi généralement respectées pour les groupements naphthopyranes et spirooxazines. Ces fonctions ont été intégrées depuis plusieurs décennies dans différents systèmes pour leur conférer des propriétés photodépendantes [3].

1.2.1 Applications liées aux modifications spectrales

L'application des molécules photochromes qui a été développée en premier à l'échelle industrielle est celle exploitant directement le changement de coloration des molécules. Ceci a donné lieu à l'apparition de matériaux à transmission optique variable comme des filtres pour caméra, des protecteurs optiques des flashes intenses, des lentilles ophtalmiques [4] et en particulier des verres de lunettes dont l'opacité est fonction de l'éclairage extérieur. Ils reposent sur l'incorporation de naphthopyranes dans un film polymérique. Dans ce type d'application, la principale

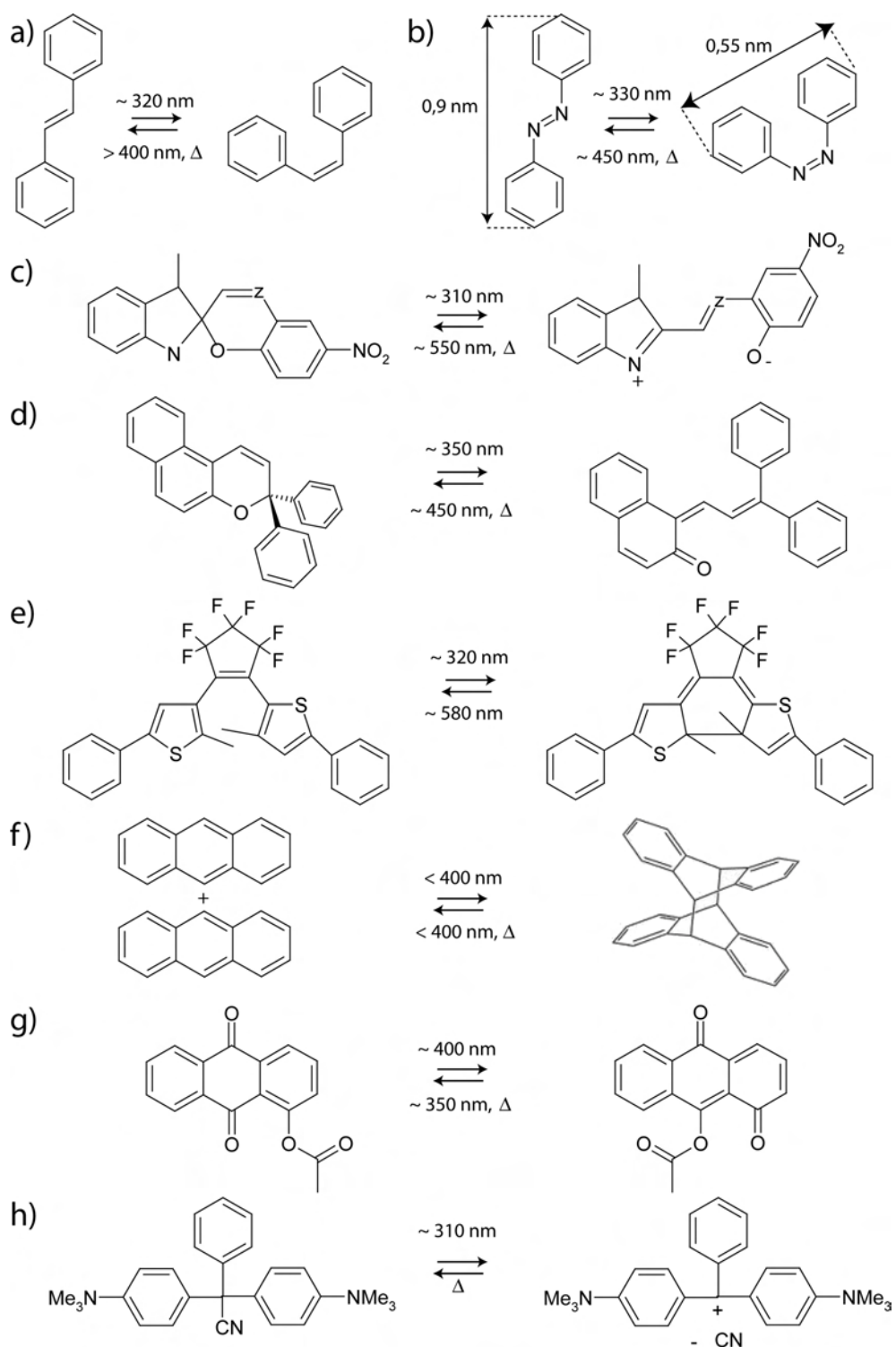


FIGURE 1.2 – Exemples de groupements photochromes et des longueurs d'onde approximatives de la lumière associée aux photoisomérisations. a) Stilbène. b) Diazobenzène. c) Spiropyrane (Z = CH) et spirooxazine (Z = N). d) Naphtopyrane. e) Diaryléthène. f) Anthracène. g) Quinone polycyclique. h) Triarylméthane.

contrainte est la limitation de la photodégradation pour permettre une longévité significative au matériau, même après des milliers de cycles de photoisomérisation. De ce fait, en plus de la couleur des isomères et de leur temps de photoconversion, leur résistance à la photooxydation est un des paramètres clefs.

Les possibilités de chirochromisme à l'échelle moléculaire ont été exploitées pour créer une matrice dont l'activité optique est modifiable par la lumière [5]. Cet effet, qui provoque un changement de spectre d'absorbance du matériau (ou de la solution) sous lumière polarisée, est obtenu généralement en amplifiant la photoisomérisation moléculaire à travers des macromolécules de conformation hélicoïdale [6, 7].

C'est aussi en optoélectronique où les matériaux photochromes offrent des perspectives intéressantes, même si les technologies associées sont encore en phase de développement [8]. Les molécules photochromes peuvent être vues comme des interrupteurs moléculaires bistables, ce qui permet d'espérer réduire la taille de la zone d'encodage d'un bit sur environ 1 nm^2 . La demande toujours croissante dans l'augmentation de la densité des supports de stockage, ainsi que la part toujours plus importante du "tout-optique" dans les télécommunications, permettent à la chimie organique d'apporter des réponses inédites avec ces objets. Le caractère réversible de la transformation laisse espérer pouvoir à la fois écrire et effacer à volonté. L'information pourrait être encodée en trois dimensions et avec plusieurs longueurs d'onde lorsque des groupements à spectres d'absorption distincts sont utilisés simultanément. Enfin du fait de leur coût raisonnable, ces molécules photocomutables peuvent aider dans le développement d'une électronique périssable, ne reposant pas sur l'utilisation de silicium ou de métaux.

1.2.2 Applications liées aux modifications d'autres propriétés physico-chimiques

En plus du spectre d'absorption, qui est souvent l'observable la plus accessible pour caractériser la transformation, ce sont d'autres propriétés physico-chimiques qui changent au cours du passage d'un isomère à un autre. Elles sont distinguées ici suivant l'échelle où la perturbation est visible.

Changements photoinduits macroscopiques

La conversion photoinduite peut être visible au niveau macroscopique, autrement que par un changement de couleur.

C'est le cas de l'effet photomécanique réversible observé lorsque la déformation structurale de chacun des groupements photochromes peut s'additionner pour induire la déformation du matériau hôte [9, 10]. Un exemple spectaculaire est celui du film polymérique préparé par Yu *et al.* dans lequel les monomères contiennent tous un groupement diazobenzène [11] (FIGURE 1.3 a). Ces unités s'organisent en parallèle dans des microdomaines. Leur longueur diminue lors de leur isomérisation : l'unité azobenzène passe de 0,9 nm en configuration *trans* à 0,55 nm en configuration *cis* (FIGURE 1.2 b). Ce changement de taille moléculaire provoque de façon synergique une réduction de la taille des domaines. Cet effet produit le repliement du film sur lui-même (FIGURE 1.3 b). La déformation est réversible (sous illumination visible, le film redevient plat) et la direction de la courbure peut même être contrôlée avec de la lumière polarisée. La mise en forme de ce genre de matériau peut être modifiée pour construire d'autres objets flexibles photodéformables, comme des particules colloïdales [12]. Ces effets photomécaniques montrent en quoi les groupements photochromes peuvent être utilisés pour convertir l'énergie lumineuse en mouvement.

Les déformations moléculaires précédentes peuvent modifier la nature chimique des atomes présents en surface ainsi que la rugosité du substrat. Ceci est par exemple visible avec un cristal de composé à motif diaryléthène qui montre réversiblement, une surface plane sous illumination visible ($\lambda > 500$ nm) et des microfibrilles sous illumination UV ($\lambda = 250$ nm) [13] (FIGURE 1.3 c). Dans ces situations, l'affinité d'un liquide déposé dessus pourra être différente, ce qui de façon macroscopique se traduit par un mouillage différent. Le cas de ces surfaces à la mouillabilité photodépendante sera plus précisément détaillé en Partie IV.

C'est aussi la viscosité d'un mélange qui peut être modifiée de façon réversible par illumination [14] (FIGURE 1.3 b). En introduisant dans une solution de tensioactifs une molécule photochrome capable de s'autoassembler de manière coopérative, la lumière permet de changer l'affinité des molécules entre elles (en particulier l'existence de liaisons hydrogène) et donc de changer la taille et l'enchevêtrement des agrégats. Ceci se traduit de façon macroscopique par une modification de la rhéologie de l'ensemble. Un gonflement photodépendant important (plus d'un rapport 3 en volume) d'un gel formé du mélange d'un copolymère et d'un leucocyanide (un dérivé du triarylméthane précédent) a aussi été démontré en présence de variations de température [15].

Modifications photoinduites aux conséquences uniquement moléculaires

L'introduction et l'exploitation de motifs photochromes n'est pas uniquement guidée par des conséquences visibles à l'échelle micro ou macroscopique. C'est en particulier en biologie que grâce à eux, la lumière devient un nouvel outil d'actuation [16].

L'intégration d'unités photochromes dans des systèmes toujours plus complexes a été rendue possible par les progrès constants de la chimie organique. C'est initialement à travers la chimie supramoléculaire que le contrôle lumineux des propriétés d'association de macromolécules sont apparues. Dès 1981, Shinkai *et al.* ont synthétisé un éther couronne photosensible (deux cycles séparés par un diazobenzène) pour lequel la complexation avec des cations métalliques peut être modifiée réversiblement après illumination [17]. L'intégration de groupements photochromes dans des blocs de construction d'édifices toujours plus évolués a été réalisée pour de nombreux systèmes, de manière à modifier leur autoassemblage de façon dynamique [18]. Ceci a par exemple été effectué avec un couple d'octapeptides cycliques séparés par un groupement diazobenzène [19] (FIGURE 1.4 a). Suivant sa configuration, le réseau de liaisons hydrogène est modifié. En configuration *trans*, l'association est intermoléculaire, tandis qu'en configuration *cis*, le réseau se forme majoritairement au sein de la même molécule.

Ce type de fonctionnalisation a été rapidement appliquée aux molécules biologiques. D'une part pour modifier l'organisation de petites molécules comme les phospholipides [20, 21]. Ces espèces amphiphiles sont capables de s'assembler par interactions non covalentes pour former des bicouches et des vésicules. L'intégration d'un groupement stilbène ou diazobenzène dans leur partie hydrophobe permet de changer la manière dont ils s'agrègent par la lumière. Nous reviendrons plus précisément sur ce type de molécule dans la Partie III.

Ce sont d'autre part des macromolécules biologiques qui ont été visées. La fonction de ces objets est fortement liée à leur structure, ce qui permet, par une légère modification de la longueur ou de la polarité d'une unité photochrome, de changer brutalement l'activité de la biomolécule. Cette stratégie est en particulier appliquée aux protéines en greffant un pont diazobenzène entre deux acides aminés précis [22]. Ceci est typiquement réalisé en exprimant une protéine à partir d'un gène mutant de manière à avoir des résidus cystéines à des positions prédéterminées qui soient facilement reliables dans l'espace. Ces groupes comportent une extrémité thiol qu'il est

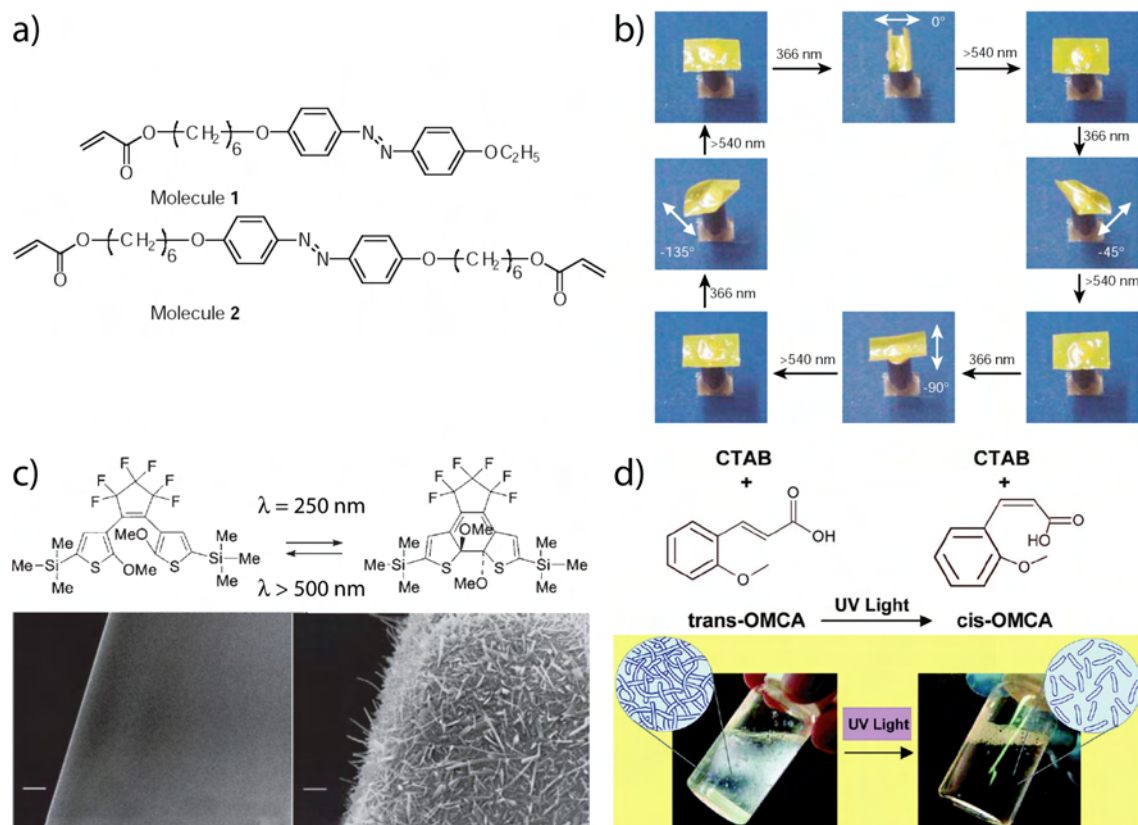


FIGURE 1.3 – Exemple d'applications des groupements photochromes aux conséquences macroscopiques. a) Préparation d'un polymère photochrome par mélange d'un monomère (molécule 1) et d'un agent réticulant (molécule 2) contenant tous les deux un groupement diazobenzène. Extrait de [11]. b) Courbure photoinduite réversible du film composé du polymère précédent. La direction du repliement peut être contrôlée suivant la direction de polarisation de la lumière. Les transitions ont lieu après environ 10 s d'éclairement. Extrait de [11]. c) Modification photoréversible de la morphologie de surface d'un cristal d'un composé à motif diaryléthène. Les barres d'échelle représentent 10 μm . Extrait de [13]. d) Fluide photorhéologique composé d'un mélange de bromure de cetyltriméthylammonium (CTAB) et de l'acide *trans-ortho*-méthoxycinnamique. Extrait de [14].

possible de fonctionnaliser avec la molécule jouant le rôle de pont. Ce type de couplage a d'abord concerné les systèmes peptidiques de petite taille [23]. La création de peptides cyclisés par un pont diazobenzène a permis de disposer d'objets modèles pour mieux comprendre les mécanismes de repliement des protéines et de les confronter aux prédictions théoriques. Les progrès dans le repérage et la sélection des zones à relier a récemment permis de développer cette méthode à l'échelle de la protéine [24]. Ainsi, en fonctionnalisant une zone à proximité de leur site actif, l'activité catalytique de certaines enzymes (ATPase, peroxidase et enzymes de restriction [25] (FIGURE 1.4 b)) a pu être rendue photodépendante. Ce type de fonctionnalisation a aussi été appliqué aux fibres de collagène [26]. Leur repliement habituellement sous forme de triple hélice a ainsi pu être perturbé par illumination apportant de nouvelles informations sur la stabilité de ces édifices. Enfin, ce sont les protéines membranaires qui ont été le sujet de ce photocontrôle [27]. En particulier, sans forcément créer de liaison covalente, l'utilisation de ligands photochromes permet de photocontrôler le passage d'ions au travers de pores membranaires [28]. Cette capacité à bloquer le canal membranaire est fonction de l'illumination et leur confère un caractère de neuromodulateur (FIGURE 1.4 c). Ces systèmes qui s'inscrivent dans le thème émergent de l'optogénétique [29], représentent des nouveaux outils pour contrôler un certain type de signal cellulaire de manière non invasive.

1.3 Conclusion

Nous avons décrit brièvement dans ce chapitre les principaux groupements photochromes et leurs utilisations pour que grâce à eux, la lumière puisse être utilisée pour induire à distance des modifications de différentes natures (géométrie, polarité, réactivité, autoassemblage,...) dans des systèmes variés (matériaux, solutions, protéines, membranes,...). Dans le domaine des matériaux ou de la matière molle, leurs applications sont nombreuses, même si du point de vue commercial, elle restent uniquement cantonnées à leurs modifications optiques. Les changements provoqués par le basculement de ces unités bistables sont d'une certaine manière moins efficaces que chez les molécules photo-cagées, l'autre grand type de molécules photoactivables. Par définition, la structure des deux états des fonctions photochromes sont isomériques, ce qui limite intrinsèquement les variations associées. Mais contrairement aux groupements photolabiles, elles permettent de conserver un système réversible, ce qui est nécessaire pour prolonger la durée de vie du système et réitérer les événements de stimulation.

Les possibilités de design d'autres systèmes restent ouvertes, en particulier de molécules comportant plusieurs fonctions photochromes. Ceci permettrait d'amplifier de façon synergique les changements photoinduits de leurs propriétés ou de créer des systèmes commutables sur plus de deux états, avec des longueurs d'onde d'excitation distinctes.

A l'inverse, nous allons voir dans le chapitre suivant qu'il n'est pas forcément nécessaire de complexifier d'avantage les unités photosensibles pour créer de nouvelles fonctionnalités. L'intégration d'un groupement photochrome dans de petites molécules amphiphiles permet de développer des systèmes simples et robustes dont les modifications photoinduites se manifestent à plusieurs niveaux d'échelles.

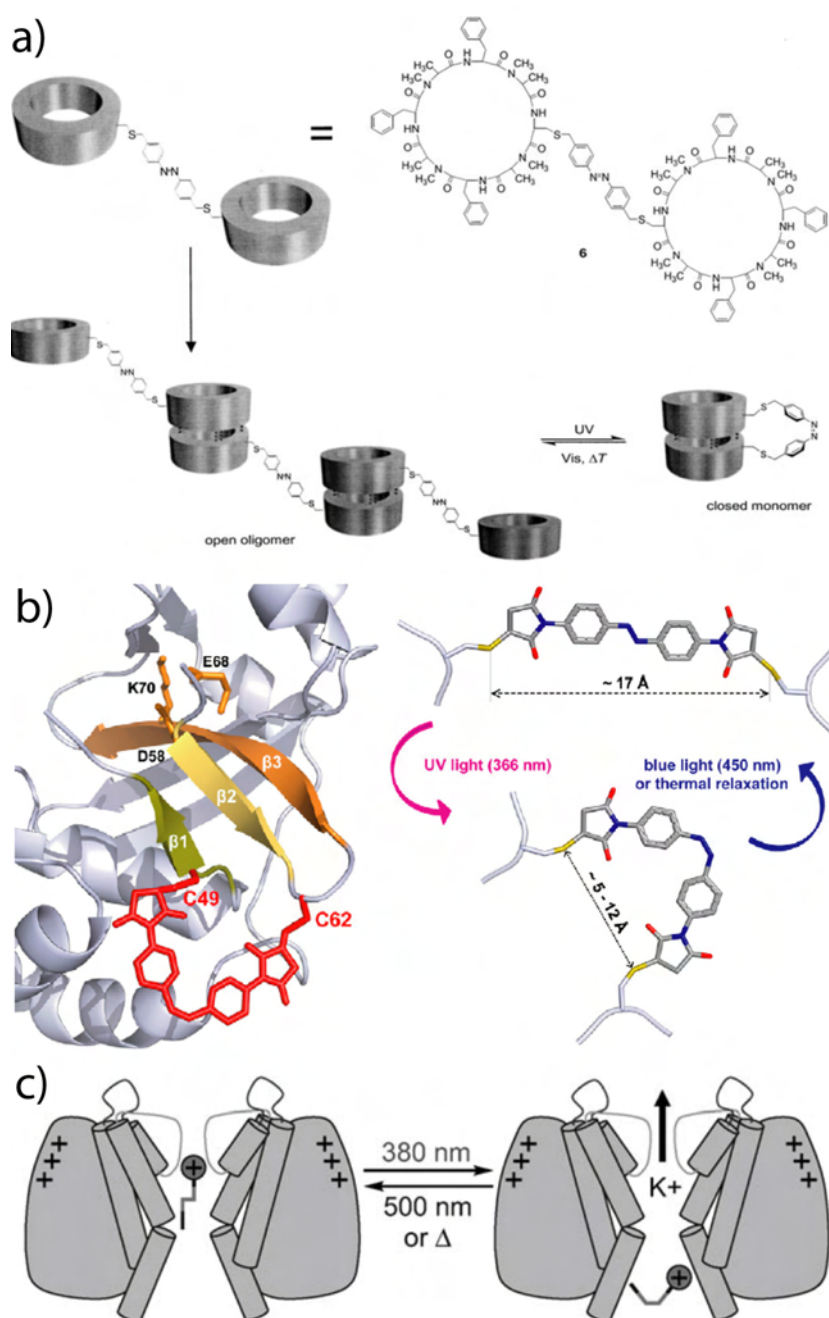


FIGURE 1.4 – Exemples d’application des groupements photochromes pour la modification d’édifices supramoléculaires et de protéines fonctionnelles par la lumière. a) Photocontrôle de l’autoassemblage d’octapeptides cycliques, à travers la modification du réseau de liaisons hydrogènes. Extrait de [18]. b) Photocontrôle de l’activité d’une enzyme de restriction PvuII. Un pont diazobenzène est greffé sur deux résidus cystéines (C49 et C62) à proximité du site actif de l’enzyme (D58, E68 et K70). La différence d’écartement entre les états *trans* et *cis* provoque une modification structurale de la protéine qui change son activité. Extrait de [25]. c) Photocontrôle du passage d’ions potassium à travers un canal membranaire. Le ligand introduit dans le voisinage de la protéine membranaire peut entrer dedans et le bloquer en configuration *trans*. En configuration *cis*, sa géométrie ne lui permet pas de s’insérer, il reste à l’extérieur, ce qui laisse les ions potassium traverser le pore. Extrait de [28].

Chapitre 2

Les tensioactifs photosensibles : des outils à explorer

Notre attention se focalise désormais sur des molécules qui sont à la fois tensioactives et qui contiennent un groupement photochrome. En comparaison avec les objets décrits dans le chapitre précédent, ce sont de petites molécules relativement simples qui laissent supposer des propriétés photodépendantes limitées. Elles nous intéressent malgré tout pour deux raisons.

D'une part, à cette simplicité structurale correspond souvent une facilité de préparation, de manipulation et de conservation. Ces objets seront en général robustes vis-à-vis de leur environnement et solubilisables en grande quantité. Tout ceci constitue un attrait pour introduire ces molécules dans de nouveaux milieux et les faire interagir avec des objets variés.

D'autre part, c'est leur nature tensioactive qui nous a conduit à nous en servir. L'amphiphilie de ce type de molécules leur confère plusieurs caractéristiques : elles auront tendance à se localiser aux interfaces, à modifier les énergies de surface et à s'autoassembler. De ces propriétés découlent de nombreuses situations où les tensioactifs remplissent une fonction. En imaginant substituer les tensioactifs par leurs homologues photochromes dans les différentes configurations où ils apparaissent, ce sont de nouvelles possibilités de photoactuation qui s'ouvrent.

Nous allons d'abord expliquer dans ce chapitre de manière générale ce qu'est la tension de surface, comment cette grandeur intervient dans la description des phénomènes de mouillage, ainsi que la façon dont elle est modifiée par des molécules amphiphiles. Après avoir décrit la structure des principaux tensioactifs photosensibles existants, ce sont les applications pour lesquelles ils ont déjà été utilisés qui seront détaillées.

2. Les tensioactifs photosensibles : des outils à explorer

2.1	La tension interfaciale	27
2.1.1	Définition	27
2.1.2	Le mouillage	28
2.1.3	Influence des tensioactifs	29
2.2	Structures des tensioactifs photosensibles	30
2.3	Utilisations	31
2.3.1	Photocontrôle de l'autoassemblage	31
2.3.2	Modification de tension de surface	33
2.3.3	Interaction avec d'autres objets	33
2.4	Conclusion	35

2.1 La tension interfaciale

2.1.1 Définition

Toute surface liquide "libre" (c'est-à-dire en contact avec un gaz et libre de se déformer) est caractérisée par une tension superficielle qui s'oppose à ses déformations et tend à minimiser la surface en contact avec son environnement.

Du point de vue microscopique, les molécules au sein d'un même liquide bénéficient d'interactions attractives avec toutes leurs voisines. En revanche, à la surface du fluide, elles perdent en moyenne la moitié de ces interactions de cohésion et sont destabilisées (FIGURE 2.1). A l'échelle des constituants du liquide, si U est l'énergie de cohésion par molécule, les molécules de la surface perdent environ $U/2$. La tension de surface γ , qui est une grandeur macroscopique, mesure directement ce défaut d'énergie par unité de surface. Avec a^2 la surface exposée par molécule, on a approximativement $\gamma \sim U/2a^2$ (qui s'exprime en J.m^{-2} , mais plus communément en N.m^{-1}).

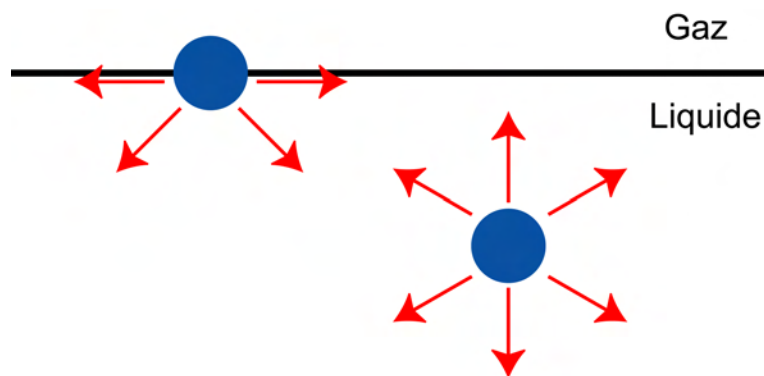


FIGURE 2.1 – Molécules de liquide au voisinage d'une interface liquide-gaz. Les flèches rouges représentent les interactions stabilisantes entre molécules voisines.

γ est d'autant plus importante que les interactions au sein du liquide sont stabilisatrices. Quelques ordres de grandeur sont donnés dans le TABLEAU 2.1. A température ambiante, les huiles où les interactions sont principalement de type Van der Waals, ont une tension d'environ 20 mN.m^{-1} . Pour l'eau, du fait des liaisons hydrogènes supplémentaires, γ est plus grande (72 mN.m^{-1}). Les liaisons métalliques présentes au sein du mercure lui font correspondre une tension de 480 mN.m^{-1} , qui est une des plus élevée de tous les liquides. Les sels fondus, caractérisés par des liaisons ioniques, peuvent avoir une tension supérieure.

Les conséquences de cette discontinuité énergétique à l'échelle moléculaire, sont visibles au niveau macroscopique. Les liquides ajustent leur forme pour exposer le minimum de leur surface. Inversement, augmenter la surface du liquide nécessite un apport extérieur d'énergie. C'est ce qui explique pourquoi une goutte de liquide a tendance à être sphérique ou que les cheveux se regroupent après avoir été mouillés. L'étude au sens large de ces interfaces liquides mobiles s'appelle la capillarité et trouve ses fondements dans les travaux de Laplace et Young à la fin du XVIIIème siècle [31].

Cette notion d'énergie de surface est généralisable à tous les types d'interfaces où deux phases distinctes sont en contact. Il est ainsi possible d'associer une tension de surface à l'interface formée par deux liquides non miscibles, qui sera plus précisément appelée tension interfaciale. Par exemple, la tension interfaciale entre l'eau et l'huile est d'environ 20 mN.m^{-1} .

Type de liquide	Tension superficielle γ (N.m ⁻¹)
Hélium (4 K)	10 ⁻⁴
Huiles siliconées (20°C)	20.10 ⁻³
Liquides organiques (20°C)	50.10 ⁻³
Eau (20°C)	72.10 ⁻³
Verre fondu	10 ⁻¹
Métaux liquides	10 ⁻² à 1,5
Sels fondus	10 ⁻¹

TABLE 2.1 – Ordre de grandeur de la tension de surface de quelques liquides usuels. Extrait de [30].

De même, une tension superficielle est associable à tous les solides, aussi bien quand ceux-ci sont en contact avec un gaz qu'un liquide. Comme pour les liquides, celle-ci dépend fortement de la nature des interactions chimiques au sein du solide. Lorsque les liaisons sont de type ionique, covalente ou métallique, la γ correspondante est de l'ordre de 1000 mN.m⁻¹. Lorsqu'elles sont plus faibles, comme dans les cristaux moléculaires ou les plastiques, γ est de l'ordre de 10 mN.m⁻¹.

2.1.2 Le mouillage

Lorsqu'une goutte de liquide repose sur une surface, trois phases (solide, liquide et gaz ou un autre liquide non miscible) sont alors en contact. La façon dont le liquide va s'étaler est directement liée aux énergies surfaciques associées aux 3 interfaces ($\gamma_{solide-gaz}$, $\gamma_{solide-liquide}$ et $\gamma_{liquide-gaz}$) et aux surfaces d'interaction correspondantes. Il est possible de décrire ce comportement par le calcul du paramètre d'étalement S défini par

$$S = \gamma_{solide-gaz} - (\gamma_{solide-liquide} + \gamma_{liquide-gaz}) \quad (2.1)$$

qui détermine la différence d'énergie surfacique entre la situation où le substrat est sec et celle où il est totalement mouillé. Deux situations existent suivant la valeur de S :

- Si $S > 0$, il est énergétiquement favorable pour le système que le liquide s'étale entièrement sur la surface. Le mouillage est qualifié de total.

- Si $S < 0$, le mouillage est dit partiel, c'est à dire que le liquide ne s'étale pas complètement. Il reste sous forme de calotte sphérique, dont la frontière est caractérisée par un angle de contact θ (FIGURE 2.2 a). A l'équilibre, c'est en projetant sur le plan du substrat les forces capillaires à l'interface en contact avec les trois phases (la ligne triple) que θ peut être déterminé ; il s'agit de la loi de Young-Dupré :

$$\cos \theta = \frac{\gamma_{solide-gaz} - \gamma_{solide-liquide}}{\gamma_{liquide-gaz}} \quad (2.2)$$

Les valeurs de θ sont très variables, suivant l'affinité du liquide pour le solide. A substrat donné, l'angle est d'autant plus grand que $\gamma_{solide-liquide}$ est grand. A liquide donné dans l'air, θ est dépendant du "besoin" du substrat de diminuer son énergie de surface ou non. Ceci est principalement lié à sa nature chimique. Par exemple vis-à-vis de l'eau, une surface dite hydrophile induira une valeur de θ inférieure à 60° environ. C'est le cas d'une lame de verre propre, dont la $\gamma_{solide-gaz}$ est d'environ 150 mN.m⁻¹. A l'opposé, une surface de polymère fluoré de type téflon

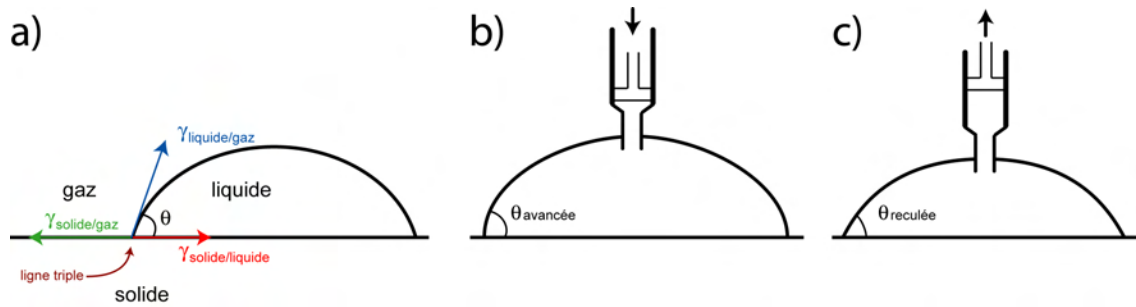


FIGURE 2.2 – Dépôt d’une goutte sur un substrat en situation de mouillage partiel. a) Détermination de l’angle de contact d’une goutte sur un substrat plan, par projection des tensions interfaciales sur la ligne triple. b) Angle d’avancée quand le volume de la goutte est augmenté. c) Angle de reculée quand son volume est diminué.

dont la tension de surface est d’environ $15 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ empêche l’étalement du liquide et augmente θ jusqu’à 120° .

En réalité, l’angle de contact issu de la formule 2.2 correspond au cas idéal d’une surface parfaitement plane et propre. Les surfaces réelles présentent souvent des irrégularités chimiques (tâches, saletés) et physiques (rugosité). L’angle de contact statique n’est alors pas unique. Lorsque le volume d’une goutte posée sur un substrat (initialement caractérisée par un angle de contact θ_{stat}) est augmenté, la ligne de contact peut rester ancrée ; l’angle de contact visible θ devient alors supérieur à θ_{stat} , sans que la ligne de contact n’ait bougé (FIGURE 2.2 b). Ce n’est qu’au-delà d’un angle θ_{avance} que la ligne triple se déplace. De même dans l’autre sens, en dégonflant la goutte, θ peut être diminué sans que la ligne ne bouge, jusqu’à un angle θ_{recule} inférieur à θ_{stat} , pour lequel la ligne se décroche (FIGURE 2.2 c). La différence entre les deux angles limites d’avancée et de reculée est appelée hystérésis de l’angle et est une donnée supplémentaire qui caractérise le mouillage sur une surface.

Connaissant donc les différentes énergies surfaciques, la façon dont s’étale le liquide et son angle de contact peuvent être déduits. Inversement, et c’est surtout de cette manière que l’équation de Young-Dupré est exploitée, θ (et l’hystérésis associé) est une observable macroscopique qui renvoie aux tensions interfaciales, qui sont des grandeurs dont la mesure est toujours indirecte (Annexe D).

Les travaux de recherche dans le contrôle de la mouillabilité des matériaux sont nombreux, aussi bien dans le domaine académique qu’à travers leur développement industriel. L’optimisation de l’étalement d’un fluide sur une surface concerne en effet de nombreux sujets, comme celui des peintures, des insecticides, du bâtiment, de la cosmétique, etc... ceci est particulièrement vrai dans le domaine des substrats super-hydrophobes, pour la mise au point de surfaces auto-nettoyantes [32].

2.1.3 Influence des tensioactifs

Une fois introduits en solution, les tensioactifs sont capables de modifier la tension de surface du liquide. Leur nature amphiphile leur permet en effet de se positionner de façon énergétiquement favorable à l’interface entre deux phases de polarités différentes. Typiquement à une interface eau-air, la tête s’orientera du côté de l’eau et la queue du côté de l’air. Cet agencement précis conduit à la formation d’une monocouche de tensioactifs (FIGURE 2.3). L’interposition des

tensioactifs à l'interface modifie la tension de surface associée : elle diminue car les tensioactifs ont plus d'affinité pour chacun des deux milieux. La destabilisation énergétique des molécules superficielles est réduite. En terme de valeur, cette diminution peut s'avérer importante, par exemple pour l'eau pure dont la γ à l'origine de $72 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ descend en dessous de $30 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ lorsque sa surface libre est saturée de molécules de bromure d'hexadécyltriméthylammonium (CTAB). Il suffit pour cela de dissoudre quelques $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$. Cet effet est similaire dans le cas d'une interface eau-huile.

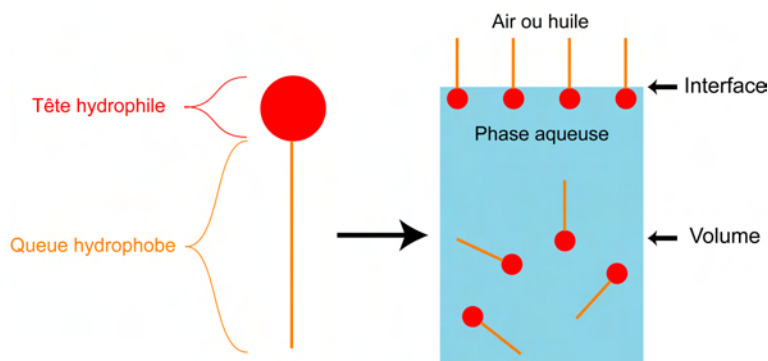


FIGURE 2.3 – Positionnement énergétiquement favorable de tensioactifs à une interface eau-air ou eau-huile.

Cette capacité de stabilisation d'une interface conduit les tensioactifs à être exploités pour différentes applications. Dans les systèmes dispersés (mousses et émulsions agroalimentaires, cosmétiques ou pharmaceutiques), ils permettent d'augmenter leur durée de vie et d'offrir un contrôle sur la taille des bulles et des gouttes. Ils sont introduits dans les liquides destinés à être projetés sur des surfaces solides (insecticides, nettoyant de vitres, colorant sur fibres textiles), car ils permettent de diminuer $\gamma_{\text{liquide-gaz}}$ et donc de diminuer l'angle de contact correspondant pour favoriser leur étalement. Ils entrent aussi dans la composition des détergents, où ils sont à l'origine du détachement des matières grasses, en s'intercalant entre les saletés et les fibres textiles pour réduire leur adhésion. Enfin leur caractère amphiphile leur fait jouer aussi un rôle dans la mise en contact des réactifs dans les procédés de catalyse aux interfaces liquide-liquide et de catalyse micellaire.

2.2 Structures des tensioactifs photosensibles

La synthèse des premiers tensioactifs contenant un groupement photochrome eu lieu par Shinkai *et al.* dès 1982 [33]. Ces molécules souffraient néanmoins d'une faible solubilité en milieu aqueux et n'ont servi qu'à une démonstration de principe de l'effet de la lumière sur leur agrégation. Ce n'est véritablement qu'à partir du milieu des années 1990 qu'un design précis et comparé de ces molécules est apparu [34].

Les principaux tensioactifs photosensibles existants jusqu'à présent sont représentés FIGURE 2.4 [35, 36]. Ils contiennent majoritairement un groupement diazobenzène, car c'est une fonction qui est à la fois facilement préparée (grâce au couplage diazoïque) et dont la photoisomérisation provoque des changements importants de structure. De part et d'autre de ce motif, plusieurs variantes dans les substituants ont été réalisées. Du côté de l'extrémité hydrophobe, les molécules comportent un groupement généralement court avec une chaîne aliphatique de deux [34, 37] ou

quatre carbones [38, 39, 40] ou un groupement éthoxy [34, 41] (FIGURE 2.4 a, b, c, d, e). En direction de la tête hydrophile, le nombre de carbones varie de deux à huit. La tête est souvent cationique, composée d'un groupement triméthylammonium ; mais elle a aussi été déclinée pour être anionique (avec un groupe sulfonate [40], FIGURE 2.4 d) ou neutre (avec un motif polyéthylèneglycol [42, 43], FIGURE 2.4 e). Le seul tensioactif linéaire de ce type contenant une autre fonction photoisomérisable est une molécule dont la tête est constituée d'un groupement spiropyrane [44] (FIGURE 2.4 f). Dans son cas ce n'est pas un changement de géométrie qui sera induit par la lumière, mais une modification directe de polarité. Enfin, d'autres molécules avec des structures moins linéaires ont été synthétisées. Des espèces bolaphiles (c'est à dire possédant deux extrémités de polarité différente de celle de leur partie centrale) ont été reportées [45, 46] (FIGURE 2.4 g). Elles peuvent contenir un groupement stilbène [47, 48]. Ces molécules ne sont pas strictement amphiphiles en configuration *trans*, mais le deviennent nettement après passage en *cis*, ce qui leur confère un caractère tensioactif. Le couplage d'homologues linéaires a aussi eu lieu, pour former des tensioactifs de type gémaux ("gemini"). Le groupement photochrome peut être contenu dans chacune des deux parties amphiphiles [49] (FIGURE 2.4 h) ou être la partie servant de jonction [20] (FIGURE 2.4 i).

2.3 Utilisations

2.3.1 Photocontrôle de l'autoassemblage

Les premières caractérisations de tensioactifs photochromes ont consisté à décrire les modifications photoinduites de la façon dont ils s'autoassemblent dans le volume de la solution.

C'est en particulier la modification de leur concentration micellaire critique (CMC) qui est déterminée [34, 38, 49]. Pour les tensioactifs classiques à motif diazobenzène, la CMC en configuration *trans* est de l'ordre de quelques mmol.L^{-1} . Après photoisomérisation (typiquement sous une lumière UV à 365 nm), elle devient plus grande. Ceci est lié à la diminution de l'hydrophobicité de la queue des molécules. Elles ont tendance à être plus solubles en milieu aqueux en configuration coudée *cis* (FIGURE 2.5 a). L'augmentation de la CMC peut être plus de deux fois supérieure. Pour la molécule Azo-4-TAB (FIGURE 2.4 b), la structure précise des micelles formées (leurs taille, sphéricité, nombre de molécules constitutives) a été comparée suivant l'éclairage, par diffusion de neutrons aux petits angles (SANS) [52]. Au lieu de former des micelles au-delà d'une certaine concentration, d'autres tensioactifs s'autoassemblent sous forme de vésicules, avec leurs homologues ou d'autres tensioactifs de charge opposée. Les édifices formés sont généralement de taille de l'ordre de la centaine de nanomètres (SUV) mais peuvent aussi avoir un diamètre micrométrique après sonication [55, 56]. Les morphologies de ces structures peuvent être caractérisées par SANS [46, 57, 47], par microscopie électronique à transmission après cryogénie (Cryo-TEM) [46] ou pour les plus grosses, par microscopie à contraste de phase [55, 56]. Les vésicules formées sont en général converties en micelles ou agrégats amorphes après illumination UV, car la structure coudée des molécules leur permet moins facilement de s'autoorganiser sous forme de bicouche. Tout ces phénomènes sont relativement réversibles après isomérisation inverse sous lumière visible.

Le photocontrôle de l'autoassemblage des tensioactifs photosensibles a permis de développer des systèmes dont la conséquence de l'organisation moléculaire est visible à l'échelle macroscopique, à travers un changement réversible de viscosité. Pour cela, il est en général nécessaire de réaliser un mélange avec d'autres tensioactifs [39] ou un polymère chargée hydrosoluble [50].

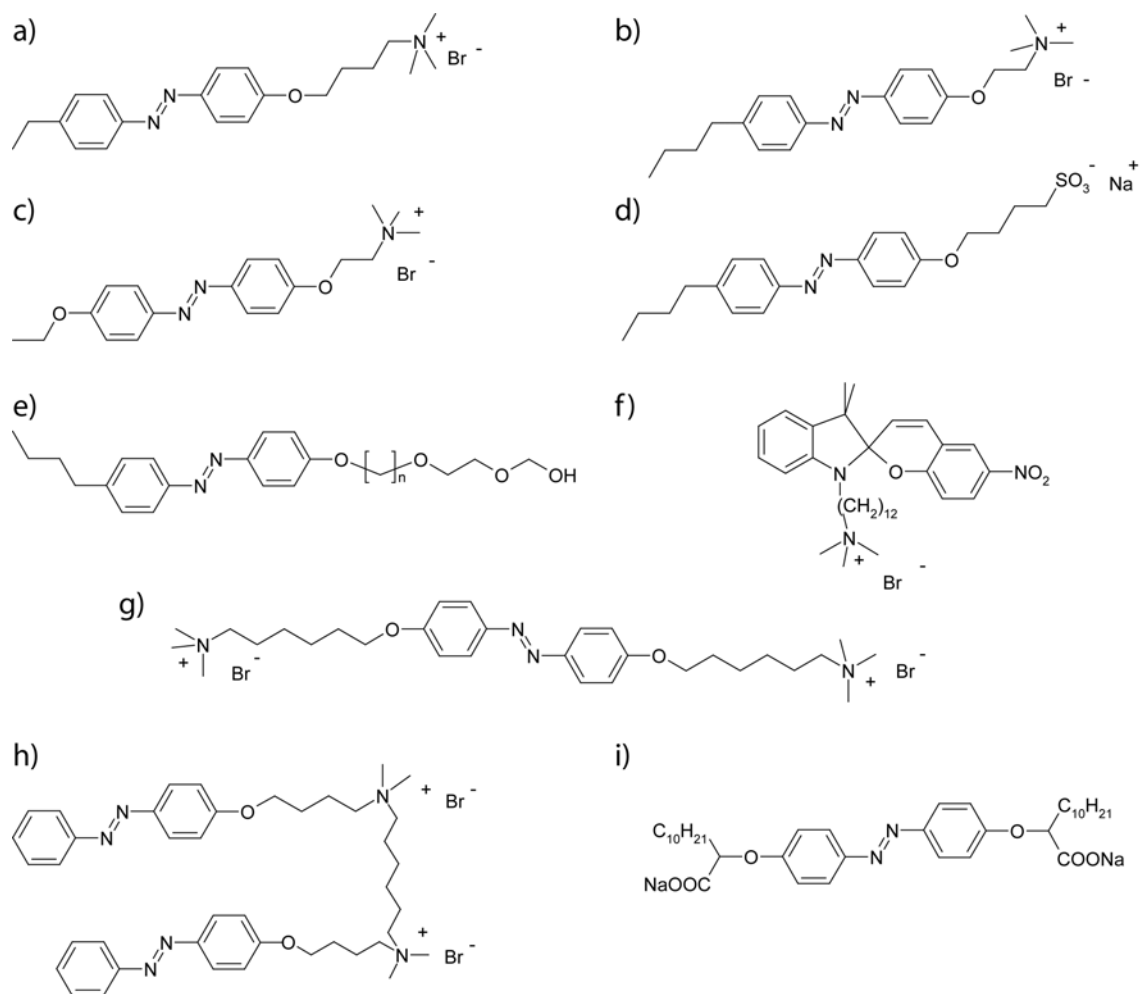


FIGURE 2.4 – Les principaux tensioactifs photosensibles. a) Azo-4-TAB [50, 51, 52, 53, 54]. b) AZTMA [39, 38]. c) AzoTAB [41]. d) AzoT-S4 [40]. e) C4azoOCnE2 [42, 43]. f) Sp-Me-12 [44]. g) BTHA [45, 46]. h) a4-6-4a [49]. i) C12-azo-C12 [20].

Mais ce type de fluide photorhéologique a aussi été obtenu sans autre composant [20]. Dans tous les cas la viscosité de la solution diminue après exposition sous lumière UV, d'un facteur pouvant aller jusqu'à 10^5 . Ce changement est du à la réduction de l'enchevêtrement des édifices micellaires. Lorsque le tensioactif est plus hydrophobe (configuration *trans*), il a plus tendance à former de longues micelles tubulaires avec les autres composants. Après isomérisation, ce réseau est nettement moins complexe et les agrégats sont plus petits et indépendants.

2.3.2 Modification de tension de surface

L'influence de la lumière a aussi été caractérisée à l'interface de la solution contenant les tensioactifs photosensibles, à travers la mesure des tensions de surface des solutions (interface eau-air) [42, 43, 44, 45, 47]. Suivant leur concentration, les variations les plus importantes sont observées un peu avant la CMC et peuvent atteindre 10 mN.m^{-1} . Pour les molécules linéaires à motif diazobenzène ainsi que pour la molécule à tête spiropyrane, la tension de surface est toujours supérieure après isomérisation en configuration *cis* (FIGURE 2.5 b). Ceci est du, comme pour l'augmentation de la CMC, à la diminution de l'hydrophobicité de la queue du tensioactif. La molécule est donc moins amphiphile et stabilise moins efficacement l'interface eau-air.

C'est aussi avec une interface solide que la différence de mouillage induite par la lumière a été observée [42]. Une différence d'angle de contact d'environ 15° a été observée. Cette observation ne concerne que le photocontrôle d'un comportement statique, sans chercher à induire le mouvement global d'un fluide grâce à la lumière. La seule application où la dynamique d'un liquide a été induite sélectivement par la lumière est celle de la chute de gouttes pendues à un capillaire [45]. En illuminant avec de la lumière UV une goutte d'un mélange de tensioactifs et de molécules bolaphiles photochromes suspendue à l'extrémité d'un tube en verre, l'augmentation progressive de sa tension de surface provoque son détachement (FIGURE 2.5 c).

2.3.3 Interaction avec d'autres objets

La mise en présence de tensioactifs photosensibles avec d'autres objets, autre que des tensioactifs ou des polyélectrolytes, a permis d'utiliser la lumière pour induire certains changements réversibles.

En introduisant une faible concentration de AzoT-S4 (FIGURE 2.4 d) dans une microémulsion faite d'eau et de décane, une séparation de phase photoinduite a été réalisée [40]. Ce phénomène a été démontré comme réversible.

La mise en présence d'Azo-4-TAB et d'une protéine, la BSA (Bovine Serum Albumine) a permis de modifier réversiblement sa structure tertiaire [51] et secondaire [53]. Ces changements sont caractérisés respectivement par SANS et par spectroscopie Infra-Rouge. La plus grande hydrophobicité du tensioactif en configuration *trans* l'entraîne à plus interagir avec la protéine, à s'insérer dans son volume et à provoquer son dépliement. Après illumination UV, le tensioactif est moins hydrophobe et se dissocie de la protéine, lui permettant de ré-adopter sa conformation initiale. Appliquée à une enzyme, le lysozyme, cette stratégie a permis de modifier son activité catalytique après quelques minutes d'éclairement, aussi bien pour la diminuer (après illumination UV, FIGURE 2.5 d) que pour l'augmenter (après illumination visible sur le tensioactif en configuration *cis*).

Enfin, et c'est un sujet que nous décrirons plus en détails en Partie II, le tensioactif AzoTAB (FIGURE 2.4 c) permet de modifier réversiblement la conformation de l'ADN par la lumière [41].

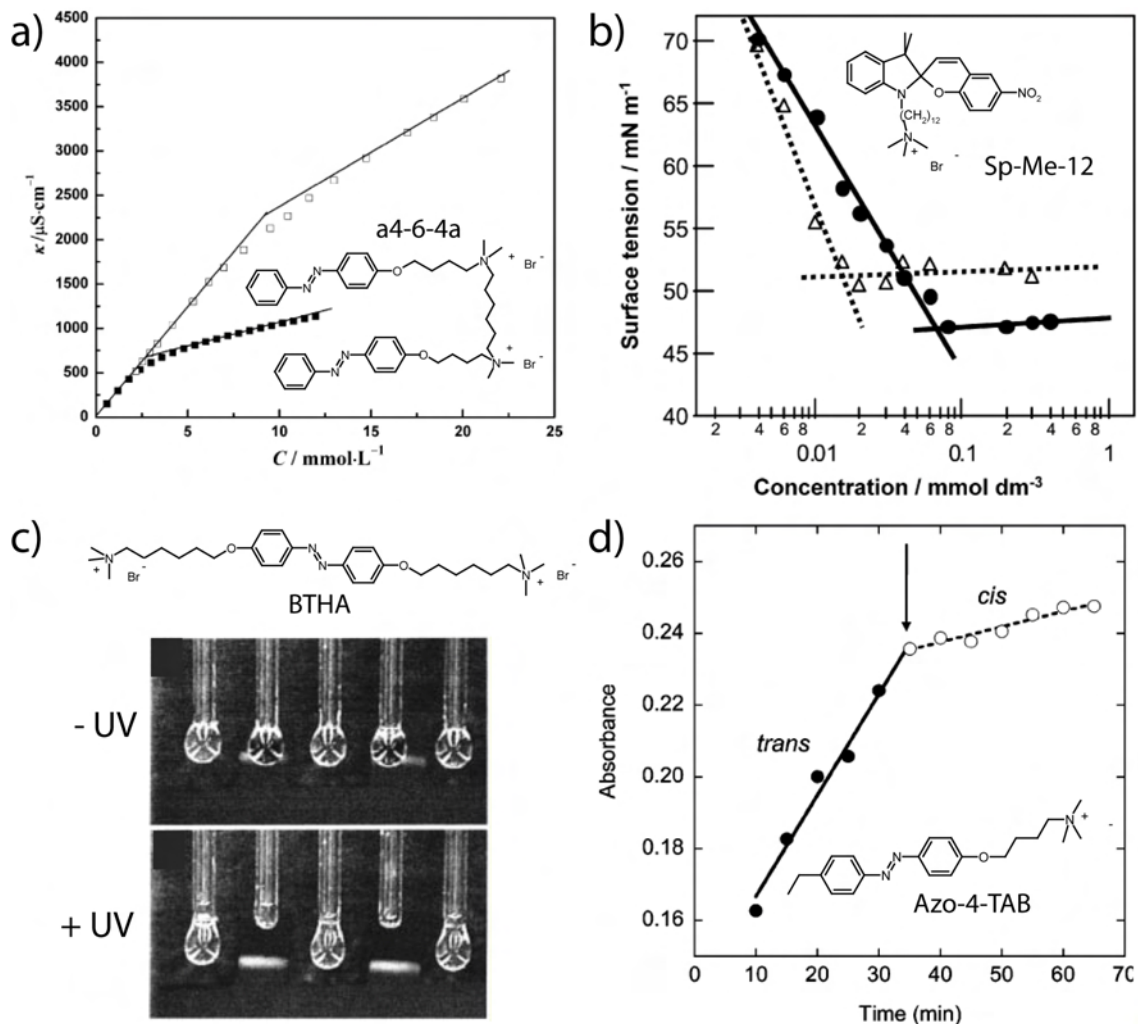


FIGURE 2.5 – Exemples de caractérisation et d'applications des tensioactifs photosensibles. a) Modification phot induite de la CMC de la molécule a4-6-4a dans l'eau. La mesure de la conductivité de solutions de différentes concentrations en a4-6-4a fait apparaître un point de rupture de pente dont la concentration correspond à la CMC. Les carrés pleins sont relatifs à la solution sous lumière visible. Les carrés vides correspondent à la solution ayant subi une illumination UV. Extrait de [49]. b) Tension de surface de solutions de Sp-Me-12 en fonction de la concentration en tensioactifs et de la présence (ronds pleins) ou non (triangles vides) d'une illumination UV avant mesure. Extrait de [44]. c) Chute photoinduite et sélective de gouttes d'une solution de BTBA et de dodécylsulfate de sodium (SDS). En haut : cinq gouttes sont suspendues au bout d'un capillaire de 1 mm de diamètre. En bas : image obtenue après illumination précise de deux gouttes avec de la lumière UV. Extrait de [45]. d) Phtorégulation de l'activité du lysozyme sur le substrat chromogénique glycolchitine-RBB. La réaction à 37°C est suivie par mesure de l'absorbance d'une solution composée de $[\text{lysozyme}] = 0,002 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, $[\text{glycolchitine-RBB}] = 1,5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, $[\text{Azo-4-TAB}] = 0,2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$. La flèche représente le moment de l'illumination UV. Extrait de [54].

2.4 Conclusion

Après avoir décrit de façon générale ce que sont la tension de surface et les tensioactifs, nous avons détaillé dans ce chapitre le cas particulier des tensioactifs contenant un groupement photochrome. La lumière permet de provoquer chez ces espèces, soit un changement direct de polarité (avec les spiropyranes), soit un changement géométrique qui peut aboutir à une modification de polarité (avec les diazobenzènes). Dans tous les cas, c'est la façon dont la molécule s'autoassemble en solution qui est affectée. Depuis le début des années 2000, de nouvelles molécules de ce type sont régulièrement synthétisées et leur organisation photodépendante est de mieux en mieux décrite, aussi bien du point de vue structural que dynamique. Elles sont néanmoins caractérisées par des structures similaires, reposant la plupart du temps sur le groupement diazobenzène.

Ce sont surtout les applications des tensioactifs photosensibles démontrées jusqu'à présent qui restent limitées. Dans le volume de la solution, outre le développement de fluides photo-rhéologiques, il n'y a qu'à travers leur mise en contact avec des protéines ou de l'ADN que ces molécules sont véritablement exploitées. Au niveau d'une interface, seules des modifications globales de tension de surface ont été réalisées, aussi bien dans le cas d'une interface liquide-air que liquide-liquide ou encore solide-liquide. Ces changements ont rarement été observés de manière dynamique. En particulier, la possibilité de contrôler spatialement cette grandeur pour induire un gradient de tension macroscopique, n'a jamais été démontrée. Les tensioactifs photosensibles sont d'une certaine manière sous-exploités et ne concernent pour l'instant la biochimie que d'un point de vue *in vitro*.

Nous allons voir que l'introduction de ces outils dans d'autres environnements offre de nouvelles possibilités de photoactuation. Il ne s'agit pas de développer des molécules plus complexes, mais de les implémenter judicieusement dans différents systèmes physico-chimiques. Le travail décrit dans les trois prochaines parties repose sur l'utilisation principale de l'AzoTAB. Même si c'est une petite molécule, en plus de son caractère photosensible, elle présente deux caractéristiques : elle est cationique et tensioactive. Ces propriétés vont être exploitées dans de nouveaux systèmes, pour créer de nouvelles fonctions photoinduites. Tout d'abord en faisant interagir l'AzoTAB avec des polymères négativement chargés (ADN). Ensuite en utilisant sa partie hydrophobe photodéformable pour stimuler des membranes biologiques. Enfin en exploitant sa capacité à se positionner aux interfaces biphasiques pour induire des changements de tension interfaciale et des mouvements de liquides.

Deuxième partie

Photocontrôle moléculaire : conformation de l'ADN et expression génétique

Chapitre 1

Compaction de l'ADN

Nous nous intéressons dans ce chapitre bibliographique à la façon dont se replie l'ADN dans l'espace. Au sein d'une cellule, cette molécule est en contact avec des milliers d'espèces différentes et est engagée dans des processus complexes dont la connaissance précise fait toujours l'objet de travaux. Nous adoptons ici une approche *in vitro*, à travers laquelle l'ADN est mis en présence d'un faible nombre d'espèces. Ceci permet de mieux identifier les mécanismes qui modifient sa conformation. Cette compréhension est nécessaire car le repliement spatial de l'ADN est lié à sa capacité à donner lieu à la réaction de transcription, le point de départ de la synthèse des protéines.

Après avoir présenté brièvement les propriétés générales de l'ADN, c'est la description physico-chimique de la compaction de l'ADN en présence de différents agents qui sera détaillée. Nous allons voir en particulier que les tensioactifs cationiques peuvent provoquer son repliement. Les rares possibilités de modifier son état conformationnel par un stimulus extérieur sans changer la composition du milieu, seront ensuite examinées, en particulier les travaux pionniers de Le Ny et Lee sur son photocontrôle à l'aide d'un tensioactif photochrome. Enfin nous nous intéresserons au lien entre la conformation de l'ADN et son activité transcriptionnelle en environnement *in vitro*, pour comprendre que la lumière peut être utilisée pour agir sur les réactions d'expression génétique.

1. Compaction de l'ADN

1.1	Compaction de l'ADN dans la nature	41
1.2	Compaction <i>in vitro</i> de l'ADN : paramètres physico-chimiques	41
1.2.1	Grandeurs caractéristiques	41
1.2.2	Le phénomène de compaction de l'ADN	43
	Transition de conformation	43
	Nature de l'état compact	43
1.2.3	Techniques d'observations	44
1.2.4	Les différents agents de compaction	45
	Les contre-ions multivalents	45
	Les polycations	46
	Les nanoobjets	46
	Cas des tensioactifs	48
	Autres possibilités	48
1.3	Modification de la compaction de l'ADN par une perturbation ex-	49
	térieure	
1.3.1	Effet de la température	49
1.3.2	Autres stimuli	49
1.4	Photocontrôle de la conformation de l'ADN	50
1.4.1	Principe	50
1.4.2	Développements	50
1.5	Conformation de l'ADN et activité transcriptionnelle	51
1.5.1	La régulation génétique	51
1.5.2	Approche <i>in vitro</i>	53
1.6	Conclusion	53

1.1 Compaction de l'ADN dans la nature

L'ADN, est la molécule support de l'information génétique. Elle résulte de l'assemblage non covalent de deux chaînes polymériques. Chaque brin est constitué d'une séquence de monomères différents, les nucléotides. Chaque nucléotide est formé de trois éléments : un groupement phosphate lié à un sucre désoxyribose, lui-même lié à une base azotée. Les nucléotides différents sont au nombre de quatre dans l'ADN, composés chacun d'une des quatre bases azotées qui sont l'adénine, la cytosine, la guanine et la thymine. La cohésion des deux brins est assurée par la possibilité d'établir des interactions stabilisatrices suffisamment fortes entre les nucléotides (FIGURE 1.1 a). Des liaisons hydrogènes peuvent en effet être établies entre les bases azotées qui sont complémentaires deux à deux (l'adénine avec la thymine ; la guanine avec la cytosine). La création de ces liaisons conduit les deux brins à s'enrouler de manière à former une double hélice dont le diamètre est d'environ 2 nm.

Le nombre de paires de bases contenues dans une molécule d'ADN génomique est de l'ordre du milliard. A ceci correspond une longueur totale tout à fait macroscopique, qui est par exemple de 1,8 m pour le génome humain. La présence d'une molécule aussi longue dans le noyau de chacune de nos cellules, d'une taille de 6 μm environ, suppose l'existence d'un repliement très performant de l'ADN sur lui-même. Dans les cellules eucaryotes, la compaction de l'ADN est particulièrement hiérarchisée. Les étapes successives sont décrites FIGURE 1.1 b. Ce repliement efficace est surtout possible parce que mis en solution, l'ADN peut être vu comme un polymère chargé. Ce sont les groupements phosphates de chaque nucléotide qui donnent à l'ADN un caractère anionique. Il comporte potentiellement deux charges (pour chaque paire de bases) pour 0,34 nm de tour d'hélice, ce qui fait de lui un polyélectrolyte fortement chargé. Cela lui permet de se lier avec les histones, des protéines positivement chargées, pour former un complexe ADN-histones appelé chromatine. Les enroulements successifs que subit la chromatine pour former le chromosome permettent de réduire la taille de la molécule initiale déroulée d'un rapport 50 000 et donc de pouvoir être effectivement insérable dans le noyau d'une cellule.

Ces différentes étapes de compaction n'existent pas chez les cellules procaryotes, où l'ADN est circulaire et n'est pas au contact d'histones. Néanmoins certaines protéines comme les DNA topoisomérases sont capables de modifier la façon dont l'ADN remplit l'espace, en augmentant ou diminuant le nombre de super-hélices, des structures dans lesquelles l'ADN est localement replié. Enfin c'est aussi l'ADN transporté dans les virus qui est particulièrement compacté : leur capsid d'une taille d'environ 100 nm μm renferme un fragment d'ADN d'une longueur de l'ordre de 10 μm .

1.2 Compaction *in vitro* de l'ADN : paramètres physico-chimiques

1.2.1 Grandeurs caractéristiques

Du fait de ses monomères chargés qui se repoussent, l'ADN est un polymère qui possède une certaine rigidité. Il est qualifié de semi-flexible. Sa longueur de persistance l_p (la longueur au-delà de laquelle la corrélation dans la direction de la tangente est perdue) est de l'ordre de 50 nm [58], ce qui correspond à 150 paires de bases. Ceci indique qu'il est à la fois non déformé à l'échelle des nucléotides et entièrement flexible sur de plus grandes dimensions.

Nous nous plaçons dans la suite ce travail avec le point de vue du physico-chimiste, qui étudie l'ADN dans un milieu *in vitro*, en le solubilisant pour le mettre en contact avec un faible nombre

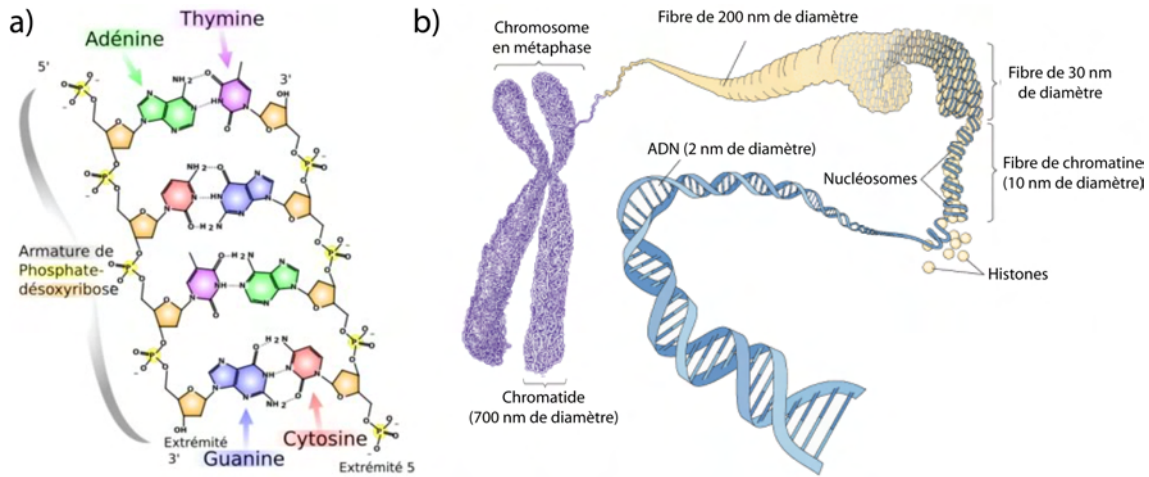


FIGURE 1.1 – Structure de l'ADN. a) Complémentarité des bases azotées et formation d'un double brin d'oligonucléotides. b) Les différents niveaux de compaction de l'ADN dans un chromosome en métaphase. La première étape de compaction est la formation de nucléosomes par l'enroulement de l'ADN autour des protéines histones. La fibre de chromatine formée est enroulée sur elle-même à plusieurs niveaux d'échelle pour former le chromosome.

d'espèces différentes, la plupart du temps uniquement des ions. Nous nous intéressons à de longues molécules d'ADN (bien plus grandes que l_p) en régime dilué, c'est à dire à des concentrations faibles, où les molécules sont suffisamment espacées pour n'avoir que peu d'interactions entre elles.

En l'absence d'histone ou d'autres protéines, l'ADN introduit en solution aqueuse modifie la répartition des ions présents dans son environnement. Une description simple mais suffisante dans notre cas est issue de la théorie de la condensation de Manning-Oosawa développée à la fin des années 60 [59, 60]. Ce modèle s'intéresse entre autres à la façon dont les contre-ions s'organisent autour des polyélectrolytes dans le solvant. Il conclut que lorsqu'un polyélectrolyte fortement chargé comme l'ADN est introduit en solution, une partie de ses contre-ions se localise au contact de la chaîne pour diminuer le potentiel électrostatique entre ses groupes chargés.

Avant la prise en compte de ce phénomène, tous les groupements phosphate de l'ADN sont considérés comme chargés. Son taux de charge chimique f , indiquant la fraction de monomères chargés est alors égal à un. f est aussi défini de façon générale comme le rapport a/d avec a la longueur d'un monomère et d la distance séparant deux charges consécutives. Le modèle de Manning-Oosawa prédit que le taux de charge effectif f_{eff} de l'ADN est abaissé à une valeur inférieure à un. En effet, la densité de charge sur l'ADN est telle que l'attraction électrostatique à laquelle sont soumis les contre-ions est initialement supérieure à leur agitation thermique. Ceux-ci s'accumulent donc sur la chaîne jusqu'à un état d'équilibre où l'énergie d'interaction électrostatique entre deux charges consécutives sur la chaîne est égale à l'énergie thermique. La distance séparant deux charges dans le cas de cette égalité est appelée longueur de Bjerrum, l_B , et vaut :

$$l_B = \frac{e^2}{4\pi\epsilon k_B T} \quad (1.1)$$

avec e la charge élémentaire, ϵ la constante diélectrique du solvant, k_B la constante de Boltzmann et T la température. Du fait de cette condensation, il y aura donc le long de l'ADN un groupement

Z	1	2	3	4
$f_{eff} = a/Zl_B$	0,24	0,12	0,08	0,06
$\theta = 1 - f_{eff}$	0,76	0,88	0,92	0,94

TABLE 1.1 – Valeurs du taux de charge effectif f_{eff} et du taux de neutralisation θ de l'ADN suivant la valence Z des contre-ions présents en solution.

chargé toutes les l_B . L'ADN est vu comme un polyélectrolyte avec un $f_{eff} = a/l_B$. a vaut 0,34 nm, il y a deux groupes phosphate par monomère et dans l'eau pure à 25°C, l_B vaut 0,71 nm, ce qui donne $f_{eff} = 0,24$. Lorsque des contre-ions de valence Z sont présents, pour un même coût entropique, la neutralisation est Z fois plus efficace. La distance séparant les unités chargées devient Zl_B . La fraction de monomères effectivement chargés sur l'ADN est alors $f_{eff} = a/(Zl_B)$, et le taux de neutralisation correspondant est $\theta = 1 - f_{eff} = 1 - a/(Zl_B)$. Les valeurs de θ correspondantes à plusieurs valeurs de Z sont reportées dans le TABLEAU 1.1. Il ressort que plus de 75% des groupements phosphate de l'ADN sont neutralisés en solution par ses contre-ions monovalents et que cette neutralisation augmente significativement quand Z augmente.

Cette approche nous permet de mieux comprendre l'effet de l'environnement ionique de l'ADN sur sa charge effective. Malgré la neutralisation de trois monomères sur quatre, la présence régulière de charges sur l'ADN lui confert dans l'eau pure une conformation en pelote étirée ou "coil", dans laquelle la chaîne est à la fois largement déployée dans l'espace et soumise à des fluctuations qui la déforment.

1.2.2 Le phénomène de compaction de l'ADN

Transition de conformation

L'ajout d'agents compactants au contact de l'ADN peut produire une transition de conformation vers une phase très compacte. Ceci a principalement lieu de deux manières. D'une part en augmentant son taux de neutralisation au-delà d'une certaine valeur, le polyélectrolyte n'est finalement plus soluble et il devient énergétiquement plus favorable pour la chaîne de se replier de façon à minimiser le contact avec la solution. C'est ce que nous allons décrire lors de l'ajout d'espèces cationiques. D'autre part, sans modifier son taux de neutralisation, il est aussi possible de modifier l'interaction entre les monomères de l'ADN et le solvant en jouant sur ϵ .

Nature de l'état compact

Dans les situations de contact défavorable avec son environnement, le repliement de l'ADN sur lui-même résulte d'un compromis entre l'énergie de surface qui stabilise un état compact et sa rigidité qui s'oppose aux fortes déformations. La forme la plus couramment adoptée est celle d'un toroïde dont la taille est d'environ le double de la longueur de persistance, c'est à dire d'une centaine de nanomètres [61] (FIGURE 1.2 a). Il est aussi possible d'observer la formation de globules [62], de batonnêt [63] ou de raquette [64], suivant la longueur de la molécule, la quantité et la nature de l'agent compactant. La première observation d'un condensat en forme de toroïde a été réalisée en 1976 par Gosule et Schellman [65]. Sa structure interne a été plus précisément décrite par la suite, en particulier l'enroulement périodique de l'ADN suivant un réseau hexagonal [66]. Cette organisation s'est avérée être très similaire à celle adoptée par l'ADN contenu dans

les capsides de virus [67] (FIGURE 1.2 b).

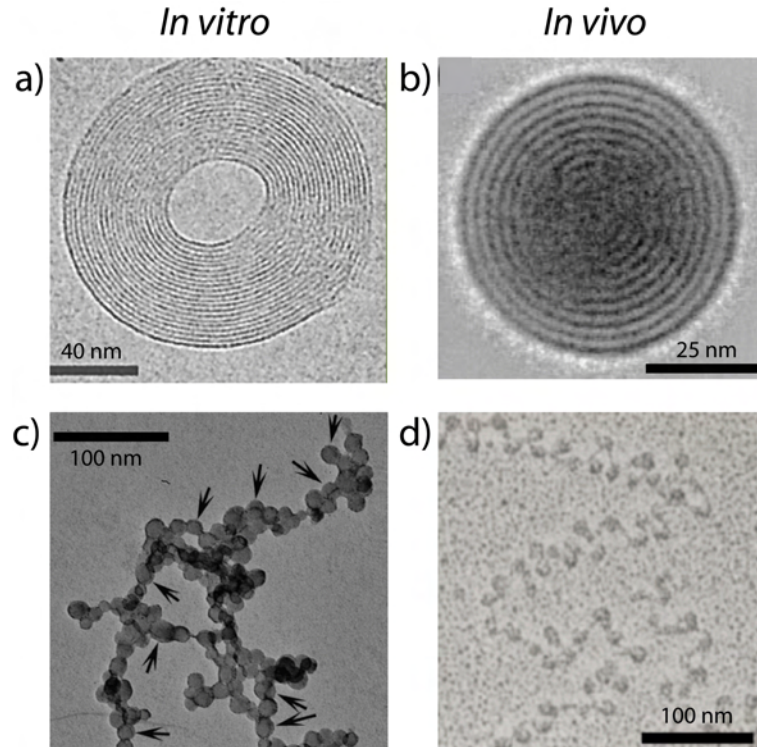


FIGURE 1.2 – Comparaison des structures compactes d'ADN *in vivo* et *in vitro* observées par microscopie électronique à transmission. a) ADN λ compacté sous forme de toroïde en présence de $\text{Co}(\text{NH}_3)_6^{3+}$. Extrait de [66]. b) ADN compacté dans la capsid d'un virus bactériophage T7. Extrait de [67]. c) ADN T4 complexé avec des nanoparticules de 15 ± 4 nm de diamètre recouvertes de poly(L-lysine) (qui les rend négativement chargées). Les flèches indiquent les particules autour desquelles l'ADN enroulé est bien visible. Extrait de [68]. d) Fibre de chromatine extraite d'un foie de rat. Extrait de [69].

1.2.3 Techniques d'observations

Avant de poursuivre sur la description de l'effet des agents compactants, il est nécessaire d'avoir un aperçu expérimental de la façon dont l'ADN est traditionnellement observé en milieu *in vitro*. Ceci permet de mieux comprendre quels sont les éléments qui permettent de caractériser son état conformationnel. Suivant sa longueur, plusieurs méthodes existent.

Pour de longues molécules d'ADN génomiques, c'est à dire de l'ordre de 100 kbp, l'ADN peut être observé directement en solution par microscopie de fluorescence. En ajoutant des marqueurs fluorescents (par exemple le DAPI, le YOYO-1,...) à l'échantillon, il suffit de déposer une goutte de liquide sur une lamelle de microscope pour pouvoir observer individuellement les molécules (FIGURE 1.3 a). Une caméra ultra-sensible est néanmoins nécessaire. Les molécules n'étant pas repliées apparaissent comme des objets fluctuants d'une dimension de quelques μm , dont le déplacement sous les fluctuations browniennes est relativement lent. L'aspect des molécules fortement compactes est bien distinct : elles apparaissent comme des points lumineux de plus faible taille apparente (inférieure au μm) qui diffusent plus rapidement par agitation brownienne dans la solution. Cette technique est la plus simple à mettre en oeuvre, mais nécessite un échantillon

dans lequel les états conformationnels sont bien distincts.

Pour les molécules de taille inférieures, la différentiation ne peut plus être faite par microscopie optique. Les méthodes de diffusion de la lumière (statique (SLS) ou dynamique (DLS)) peuvent être utilisées car la façon dont est diffusé un rayonnement par l'ADN en solution est très variable suivant sa taille et donc sa conformation. C'est la technique de choix pour les petites molécules (< 10 kbp), mais elle renvoie uniquement au comportement moyen des molécules présentes.

Enfin c'est la microscopie électronique à transmission (TEM) qui permet aussi d'observer en détails l'ADN, de façon individuel. Celui-ci doit être déposé sur une surface et ne peut donc pas être caractérisé directement dans le volume d'une solution. Elle est particulièrement adaptée à l'observation des structures formées lorsque l'ADN est mis en présence de nanoobjets (FIGURE 1.3 b). De même, la microscopie à force atomique (AFM) est applicable à l'observation de l'ADN déposé sur un substrat plan, qui est donc aussi dans un état figé (FIGURE 1.3 c).

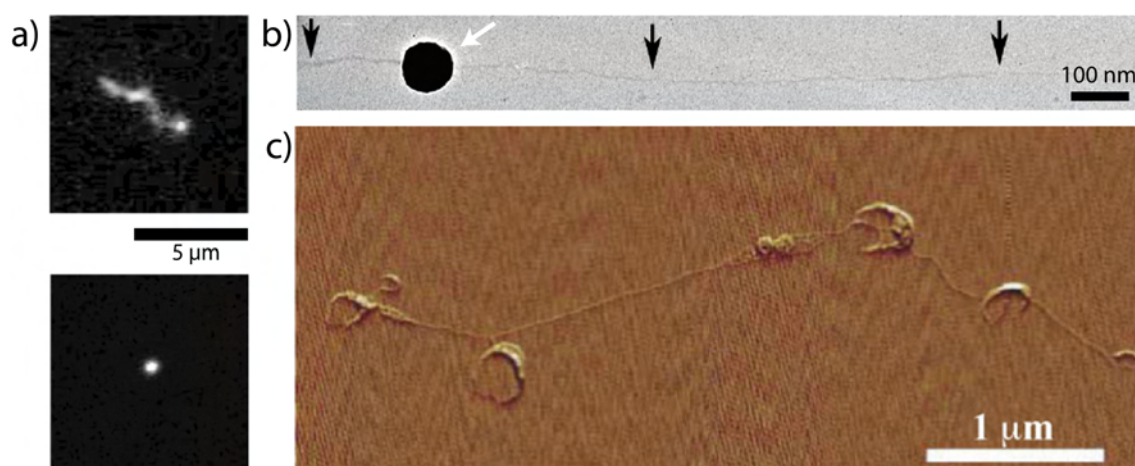


FIGURE 1.3 – Techniques d'observation *in vitro* de l'état conformationnel de l'ADN. a) Observation par microscopie de fluorescence (marquage au YOYO-1) d'une molécule d'ADN T4 en solution (166 kbp) décompacte (en haut) et repliée totalement par un tensioactif cationique (en bas). Extrait de [70]. b) Image par microscopie électronique à transmission d'une molécule d'ADN T4 (flèches noires) partiellement enroulée autour d'une nanoparticule de silice (flèche blanche). Adapté de [71]. c) Image par microscopie à force atomique d'un ADN T4 dont certaines régions sont partiellement repliées. Extrait de [72].

1.2.4 Les différents agents de compaction

La compaction de l'ADN en solution est possible en ajoutant différents agents. Suivant la nature de l'espèce, trois types de processus peuvent avoir lieu [73].

Les contre-ions multivalents

Le premier type de compaction est un phénomène où la transition a lieu entre deux états distincts, l'état décompact précédent et un état compact. A l'échelle d'une molécule, il n'y a pas d'état intermédiaire. La progression de la compaction est en revanche visible lorsque c'est une population de plusieurs molécules qui est observée. Ceci a habituellement lieu en ajoutant des contre-ions multivalents pour accroître l'attraction entre les monomères de la chaîne. Ce

changement est analogue à une transition de phase du premier ordre entre une phase gazeuse désordonnée et une phase compacte très dense ordonnée [74].

L'introduction de cations multivalents au voisinage de l'ADN provoque leur échange avec les contre-ions monovalents de l'ADN initialement présents (FIGURE 1.4 a). Ce remplacement est favorisé par le gain d'entropie provoqué par le relargage d'un plus grand nombre d'ions monovalents dans le volume de la solution. Comme nous l'avons vu, le taux de neutralisation de la chaîne θ est modifié. Ce n'est pas cette observable qui est directement responsable de la compaction de l'ADN, mais elle est un bon indicateur phénoménologique pour estimer la progression de la compaction. Pour différents types de sels ajoutés ainsi que pour différentes modifications de la constante diélectrique du solvant, il a été observé la plupart du temps que la transition vers la compaction a lieu pour $\theta \approx 0,89$. Suivant le modèle de Manning-Oosawa, cela nous indique que les contre-ions mono- et divalents ne peuvent pas induire la compaction de l'ADN. Par contre ceux pour qui $Z \geq 3$ peuvent provoquer une neutralisation suffisante pour compacter la molécule. De plus, la concentration du cations multivalents nécessaire pour observer la transition sera d'autant plus faible que sa valence sera grande.

Les contre-ions multivalents les plus utilisés ayant $Z \geq 3$ sont les polyamines telles que la spermidine ($Z = 3$ à pH = 7) [65, 74] et la spermine ($Z = 4$ à pH = 7) [75, 76, 77], qui sont des molécules connues pour être naturellement présentes dans le noyau des cellules. Des cations métalliques ($\text{Co}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ [78], Al^{3+} [79], Ga^{3+} [79], Cr^{3+} [80], Cu^{2+} [81], Pb^{2+} [81], Fe^{3+} [82]) et des ions lanthanides (La^{3+} , Eu^{3+} , Tb^{3+} [83]) ont aussi été utilisés. C'est en excès que ces ions doivent être introduits par rapport au nombre de charges de l'ADN car ils entrent en compétition avec les ions monovalents initialement présents dans le milieu. Nous appelons ρ^* le rapport entre la quantité d'agent compactant et la quantité de charges de l'ADN pour lequel la transition de compaction a lieu. ρ^* augmente lorsque la présence d'autres sels de faible valence augmente. ρ^* diminue fortement lorsque Z augmente et atteint approximativement 1 pour $Z \approx 10$ (FIGURE 1.4 b).

Les polycations

La seconde possibilité de compaction est plus progressive et a lieu lorsqu'une forte attraction entre plusieurs monomères consécutifs de l'ADN peut être produite localement. Ceci est réalisé traditionnellement en la complexant avec des polycations d'une longueur supérieure à 10 monomères [85]. Les agents typiques utilisés dans ce cas sont les polyéthylèneimines et les polypeptides cationiques tels que la poly-L-lysine [86]. Leur mise en présence avec l'ADN conduit à l'apparition de complexes interpolyélectrolytes très stables, dont la formation est aussi favorisée d'un point de vue entropique par le fait que les contre-ions de l'ADN ainsi que ceux du polycation sont dispersés dans le solvant (FIGURE 1.4 c). Au niveau de chaque polycations en contact avec l'ADN, c'est un repliement local qui apparaît [87]. Le brin peut alors former des boucles stables dans lesquelles une même molécule de polycation est en contact avec deux régions distinctes de l'ADN. La chaîne se replie progressivement sur elle-même au fur et à mesure que l'agent compactant est ajouté. L'état de plus forte compacité est atteint en général pour $\rho^* \approx 1$. Ceci se fait, contrairement au cas des ions de faible valence, de façon indépendante de Z (FIGURE 1.4 b).

Les nanoobjets

La troisième voie de compaction est assistée et plus hiérarchique. Contrairement aux deux précédentes, elle ne concerne pas directement l'interaction entre les monomères de l'ADN. Elle

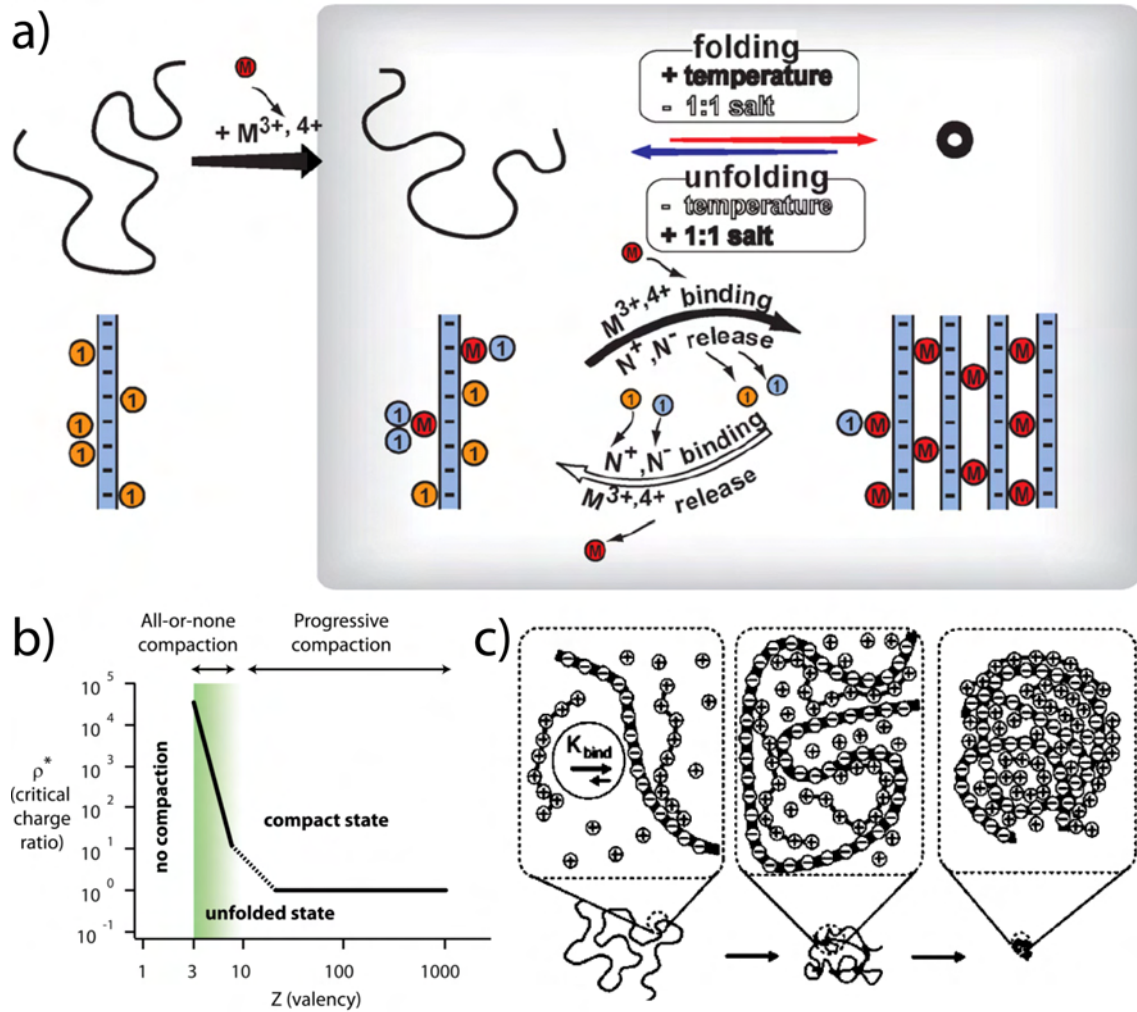


FIGURE 1.4 – Interactions des contre-ions avec l'ADN conduisant à sa compaction. a) Schéma du contact entre les contre-ions et l'ADN suivant son état conformationnel. La compaction est réalisée ici en introduisant des cations multivalents. Les sphères rouges, oranges et bleues représentent respectivement les cations multivalents, les cations monovalents et les anions monovalents. Extrait de [84]. b) Représentation schématique de l'évolution de ρ^* , le rapport critique d'agent compactant sur le nombre de charges de l'ADN, qui induit la transition de compaction en fonction de la valence Z de l'agent de compaction, dans le cas d'une interaction purement électrostatique. Extrait de [73]. c) Représentation schématique du repliement progressif de l'ADN lors de l'addition de longues molécules de poly-L-lysine (environ 92 monomères). Extrait de [85].

a lieu lorsque la molécule est mise en présence d'objets nanométriques autour desquels elle peut s'enrouler. Tout à fait analogue à ce qui existe dans la chromatine (l'ADN s'embobine autour des histones), elle peut être réalisée avec des objets imitant les histones tels que des nanoparticules chargées [88, 71] (FIGURE 1.2 c et d) ou des dendrimères cationiques [89]. L'ensemble final est à distinguer des condensats obtenus par les deux voies précédentes, d'une part par la présence des objets qui provoquent l'apparition d'une structure en collier de perles, d'autre part par sa densité qui est environ cent fois inférieure à celle d'un toroïde compact. Plutôt que de parler ici de compaction, ce phénomène est qualifié de complexation.

L'ADN étant localement rigide, ce mode de compaction dépend fortement de l'arrangement spatial des charges et de la flexibilité de l'agent compactant. Dans le cas de nanoparticules cationiques, l'enroulement de l'ADN peut être décrit de trois façons différentes : il s'adsorbe sur les nanoparticules de grandes dimensions (> 40 nm), il s'enroule autour de celles de taille intermédiaire (~ 15 nm) et ce sont les nanoparticules de petite taille (< 10 nm) qui s'adsorbent sur lui [88]. Ces phénomènes principalement dus aux interactions électrostatiques sont particulièrement dépendants de la teneur en sel du milieu et marchent d'autant mieux que sa composition est proche de la composition physiologique. Il faut en effet trouver un compromis pour qu'à la fois, l'ADN soit suffisamment flexible (ce qui n'est plus le cas à faible concentration saline, car les répulsions électrostatiques au sein du polyélectrolyte sont fortes) et que les interactions attractives avec les nanoobjets ne soient pas écrantées. C'est ce procédé qui est habituellement mis en oeuvre pour la reconstitution *in vitro* de la chromatine.

Cas des tensioactifs

Nous avons considéré jusqu'alors que les espèces cationiques interagissent avec l'ADN à travers des forces purement électrostatiques. D'autres aspects doivent être pris en compte lorsque l'agent compactant comporte des parties hydrophobes et/ou qu'il est capable de s'autoassembler avec ses homologues. Les plus étudiées de ces molécules sont les tensioactifs cationiques, dont la mise en présence avec l'ADN a fait l'objet de travaux dès le milieu des années 80 [90]. Il a été rapidement mis en évidence que l'interaction entre l'ADN et les tensioactifs est fortement coopérative [91]. En effet, la présence d'un tensioactif au contact de l'ADN facilite la venue d'une molécule identique sur un site voisin, car en plus d'une affinité électrostatique entre une charge de l'ADN et la tête du tensioactif, les interactions hydrophobes entre les queues des molécules favorisent leur approche. Ce mécanisme peut être vu de façon analogue à celui de la formation des micelles [90]. Plus la partie hydrophobe des tensioactifs est grande, plus leurs interactions sont importantes et leur autoassemblage est favorisé. De ce fait, il a été observé que la capacité du tensioactif à induire la compaction est d'autant plus efficace que sa queue est hydrophobe [92].

Autres possibilités

Autrement que par l'interaction des groupements phosphate de l'ADN avec une espèce cationique, il est possible de réduire l'affinité de l'ADN pour le solvant. Ceci a été fait en diminuant sa constante diélectrique [93], par exemple en y ajoutant de l'éthanol [94]. La modification de ce paramètre se traduit directement par un changement de la longueur de Bjerrum et donc de la charge effective de l'ADN. La transition se fait de manière discrète dans ce cas.

Une autre possibilité consiste à introduire un polymère hydrosoluble. Ce peut être une espèce neutre comme le polyéthylène glycol (PEG) [95] ou anionique comme des polypeptides [96]. La

compaction induite par ces agents est décrite en terme de volume exclu : le nombre de molécules de solvants effectivement disponibles pour assurer la solubilisation de l'ADN diminue et provoque sa compaction (suivant la première voie) au-delà d'un certain seuil.

1.3 Modification de la compaction de l'ADN par une perturbation extérieure

1.3.1 Effet de la température

La température est un paramètre d'importance dans la description des interactions électrostatiques entre l'ADN et son environnement. Il a été montré qu'à composition chimique fixée, sa modification peut provoquer un changement de l'état conformationnel de l'ADN dans un sens ou dans l'autre. La compaction de l'ADN est favorisée par la température lorsque l'agent compactant est un cation multivalent comme la spermidine [97] ou la spermine [98]. Cette tendance est expliquée par la différence d'entropie entre les deux configurations. Lors de la compaction, les contre-ions monovalents sont remplacés par un nombre inférieur de cations de plus grande valence. Leur dispersion dans le volume de la solution est accompagnée d'une augmentation de l'entropie de translation de l'ensemble des ions. Cette augmentation est supérieure à la diminution de l'entropie conformationnelle de l'ADN lors de son repliement. Cet accroissement de l'entropie globale du système favorise la compaction à plus haute température. La tendance inverse est observée lorsque l'agent compactant est un polymère neutre comme du PEG [99]. Le phénomène est aussi décrit en terme d'entropie de translation des contre-ions. Dans cette situation la compaction n'induit pas d'échange d'ions de valence différente, mais les contre-ions au voisinage de l'ADN ont une liberté de mouvement bien supérieure dans le cas où la molécule est dépliée.

1.3.2 Autres stimuli

La modification *in situ* d'une caractéristique de l'agent compactant par un stimulus externe pour changer l'état conformationnel de l'ADN a été réalisée de différentes manières. D'un côté, c'est la valence d'un contre-ion multivalent qui a été changée. Ceci a été fait par réaction rédox sur le couple $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ [82]. L'ion Fe^{3+} induisant la compaction de l'ADN sur une large gamme de concentrations où Fe^{2+} ne le fait pas, sa réduction par introduction d'acide ascorbique dans le milieu a permis d'observer le dépliement de l'ADN. Ce phénomène a été réalisé de manière analogue en augmentant le pH d'une solution où l'ADN est initialement compacté par de la spermine, de façon à diminuer sa charge de 4+ à 3+ [100]. De même, l'hydrolyse progressive de l'ATP en ADP permet de modifier sa charge négative, pour moduler sa compétition avec de la spermidine chargée positivement ayant d'abord induit la compaction [101].

D'autre côté, sans modifier la charge globale des espèces, c'est la structure d'assemblages de surfactants qui peut être changée. Ceci a constitué une partie mon projet de stage de Master 2 [102]. Il est possible de compacter l'ADN avec des vésicules unilamellaires de petite taille (SUV) d'environ 100 nm de diamètre, composées de phospholipides dont une partie est positivement chargée. Ces édifices compactent l'ADN de façon plus efficace que si les tensioactifs étaient répartis de manière homogène dans la solution, car ils présentent localement une forte densité de charges positives. En ajoutant un tensioactif neutre (du Triton X-100) qui s'intercale dans les vésicules, ces agrégats sont progressivement détruits et les molécules chargées sont dispersées

dans tout le volume de l'échantillon. L'ADN repasse ainsi progressivement sous conformation décompacte.

1.4 Photocontrôle de la conformation de l'ADN

1.4.1 Principe

Nous venons de voir que l'état conformationnel de l'ADN est modifiable *in vitro* par sa mise en contact avec des espèces de nature très différente. Des modifications dynamiques ont aussi été démontrées, de manière chimique (par ajout d'une molécule qui change une caractéristique de l'agent compactant) ou de manière physique (par changement thermique). Pour provoquer le passage d'un état compact à un état décompact (ou l'inverse), il n'y a finalement dans ces approches que la modification de température qui puisse être réalisée sans changer la composition chimique du système. Comme nous allons le voir, l'autre stimulus qui existe pour agir à la fois à composition fixée, de manière dynamique et réversible, est la lumière.

Cette possibilité a été montrée pour la première fois en 2006 par Le Ny et Lee [41]. L'agent compactant utilisé est l'AzoTAB, un tensioactif cationique à tête triméthylammonium, contenant un groupement diazobenzène dans sa queue (FIGURE 1.5 a). La configuration de cette fonction peut être changée sous illumination, de *trans* à *cis* sous lumière UV et de *cis* à *trans* sous lumière bleue. L'effet de la photoisomérisation se traduit par un changement de polarité de la queue : relativement linéaire en configuration *trans*, elle est plus hydrophobe que lorsqu'elle est en configuration *cis*, car la structure coudée ne permet plus aux moments dipolaires associés aux oxygènes de s'annuler. La lumière permet donc de changer à distance et sans modification de composition, l'hydrophobicité du tensioactif et donc son affinité pour l'ADN. La compaction de l'ADN se produit donc pour des concentrations différentes suivant la configuration de la molécule. La quantité de *cis*-AzoTAB nécessaire pour provoquer la compaction est plus grande que pour le *trans*-AzoTAB car son affinité est moindre ; il est un moins bon tensioactif qu'en configuration *trans*. Ainsi, il existe une gamme de concentration en AzoTAB pour laquelle l'ADN est compacté sous lumière visible et déplié sous illumination UV. La mise sous lumière UV d'un échantillon compacté peut donc aboutir au changement de son état conformationnel, de manière réversible (FIGURE 1.5 b).

1.4.2 Développements

En collaboration avec l'équipe du Prof. Matthieu Sollogoub, notre équipe a synthétisé l'AzoTAB il y a quelques années. Nous avons décidé de donner le nom général pNAB (pour photo-sensitive Nucleic Acid Binder) à ce type de molécule, qui est à la fois photosensible et capable de se fixer sur l'ADN. En étudiant pour la première fois la transition à l'échelle de la molécule unique (FIGURE 1.6 a), l'équipe a pu tracer la courbe de compaction de l'ADN par l'AzoTAB avec et sans UV (FIGURE 1.6 c), et montré que la transition observée est bien du premier ordre [103] (de façon analogue à ce qui est connu pour des contre-ions multivalents de petite taille). De plus, elle a montré que cette stratégie est utilisable pour photocontrôler la conformation de l'ADN à l'échelle de la molécule unique dans un microenvironnement biomimétique telle qu'une microgoutte dont l'interface est recouverte de phospholipides [70] (FIGURE 1.6 c). En parallèle, c'est l'étude de la dynamique de la transition de conformation qui a été étudiée par Le Ny et Lee [104]. Ils ont aussi montré que la préparation de SUV catanioniques de charge positive à base

d'AzoTAB et de tensioactif négatif (dodécyl sulfate de sodium, SDS) est effective pour réaliser un photocontrôle réversible similaire [105]. Ces deux derniers travaux ont été en fait réalisés avec une molécule similaire, ayant un groupe para-éthyl au lieu du groupe para-éthoxy, mais les auteurs ont conservé le nom AzoTAB dans chacun de leur article.

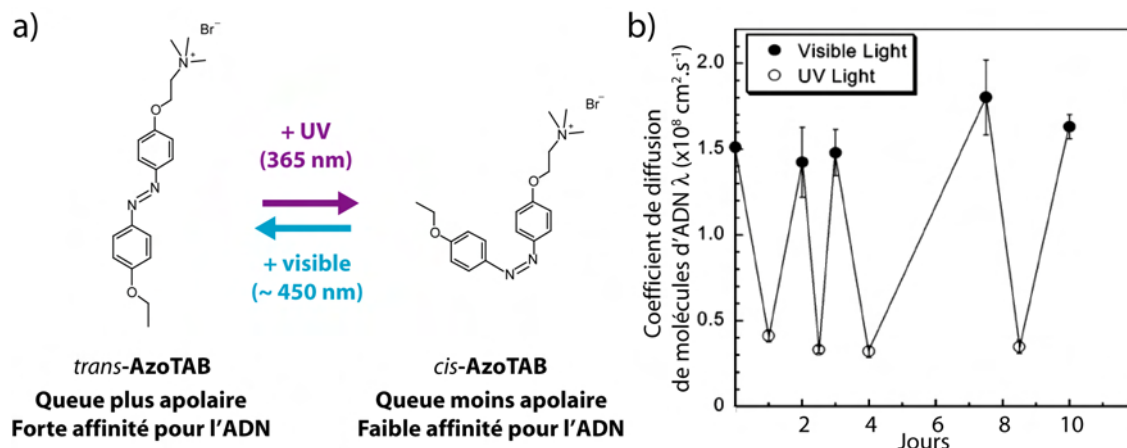


FIGURE 1.5 – Photocontrôle de la compaction de molécules d'ADN à l'aide d'un tensioactif photosensible. a) Photoisomérisation de l'AzoTAB. La polarité de sa queue est augmentée sous illumination UV, ce qui diminue son affinité pour l'ADN. Ce phénomène est réversible sous illumination visible. b) Coefficients de diffusion translationnelle de molécules d'ADN λ en fonction de cycles d'illuminations UV et visible. Les mesures sont réalisées par DLS. Aux plus grands coefficients correspondent des molécules compactes ; aux plus petits correspondent des molécules dépliées. Extrait de [41].

1.5 Conformation de l'ADN et activité transcriptionnelle

1.5.1 La régulation génétique

Même si les éléments permettant le fonctionnement d'une cellule sont de mieux en mieux identifiés, leur interaction conduit à des propriétés émergentes et non pas à leur simple superposition. C'est en particulier le cas des mécanismes de régulation génétique dans un organisme qui forment un processus complexe, à travers lesquels différents gènes sont exprimés à la fois à un moment précis et pendant une durée limitée.

L'un des mécanismes importants de la régulation génétique a lieu au niveau de l'étape de transcription. Sa compréhension est un des enjeux majeurs de la biologie cellulaire et moléculaire et s'inscrit dans l'épigénétique, le domaine qui s'intéresse de façon globale aux facteurs héréditaires, autres que la séquence, qui influencent le phénotype [106]. Deux stratégies principales sont distinguables [107]. D'une part, il existe une classe de protéines spécifiques (appelées facteurs *trans*-régulateurs) capables de se lier à une séquence d'ADN (l'élément *cis*) au niveau des régions promotrices des gènes. Cette liaison sera à l'origine d'un contrôle sur la vitesse de transcription de manière à activer ou inhiber la séquence suivant certaines circonstances physiologiques, comme par exemple un message hormonal. D'autre part, c'est l'accès physique des facteurs *trans* et des RNA polymérase à la séquence d'ADN qui peut être modifié suivant la structure locale adoptée au niveau du gène. L'ADN est le support de l'information génétique, mais est donc aussi l'un des acteurs de la façon dont elle s'exprime. Cette influence dynamique de la conformation de l'ADN

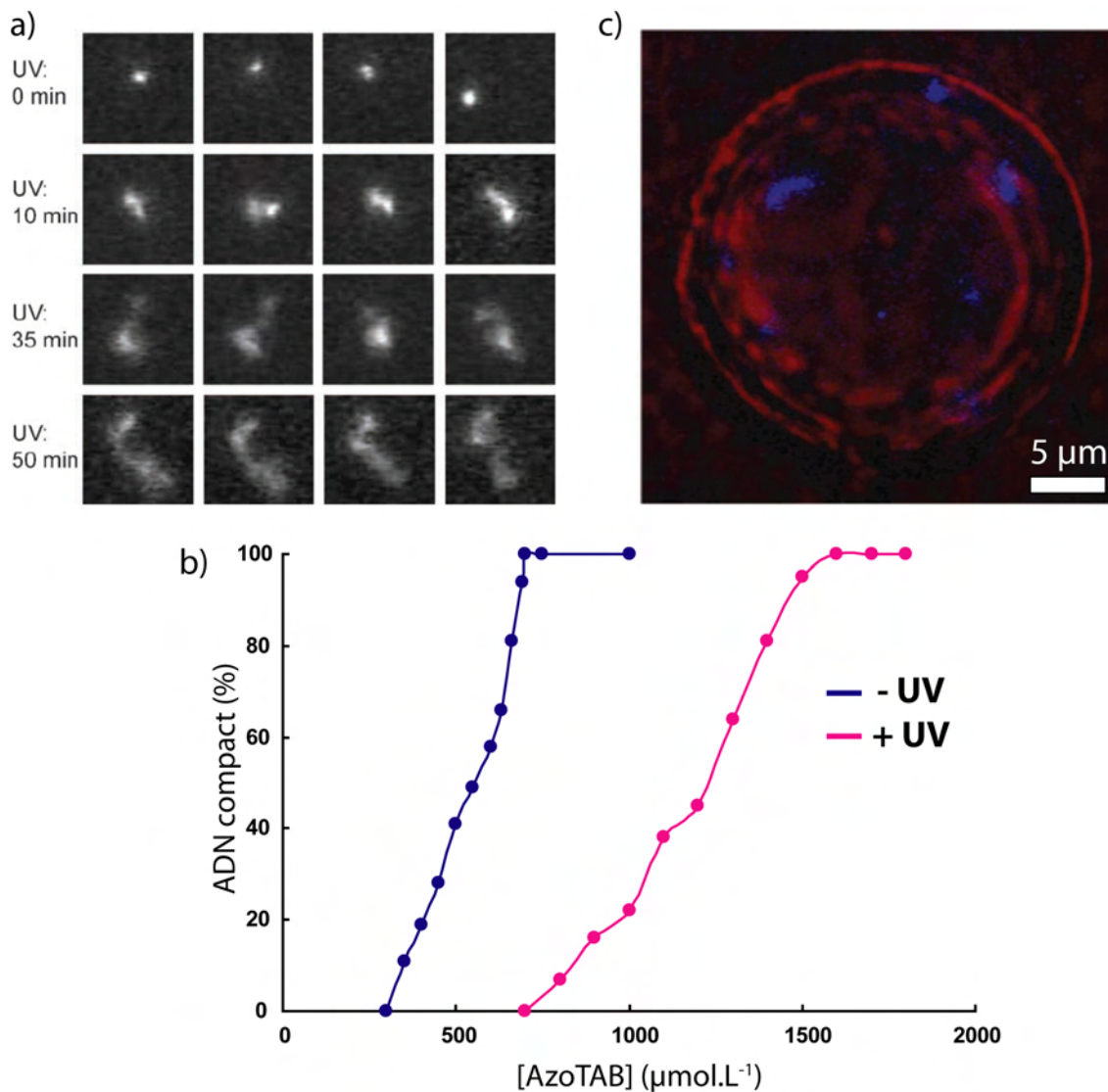


FIGURE 1.6 – Photocontrôle de la conformation de molécules individuelles d'ADN à l'aide de l'AzoTAB. a) Séquence d'images par microscopie de fluorescence de la décompaction d'une molécule d'ADN T4 sous une concentration d'AzoTAB de $600 \mu\text{mol.L}^{-1}$ après différents temps d'illumination UV. En horizontale, les images sont séparées d'un temps de 100 ms. Chaque image a une taille de $5 \mu\text{m}$ de côté. Extrait de [103]. b) Courbe de compaction de molécules d'ADN T4 en fonction de la concentration en AzoTAB et de l'application ou non d'une illumination UV sur la solution avant l'ajout d'ADN. La concentration en ADN est de $0,1 \mu\text{mol.L}^{-1}$ en nucléotides, dans un tampon Tris-HCl 10mmol.L^{-1} . Le décompte est réalisé sur 200 molécules par microscopie de fluorescence. c) Décompaction après illumination UV de molécules d'ADN T4 dans une microgoutte recouverte de phospholipides. La concentration initiale en AzoTAB est de $700 \mu\text{mol.L}^{-1}$. Sur cette image en fausses couleurs ont été superposées l'image en transmission de la goutte (rouge) et l'image en fluorescence de l'ADN (bleu). Extrait de [103].

sur la régulation génétique a été identifiée il y a plusieurs décennies chez les eucaryotes [108]. Mais ses conséquences précises n'ont été détaillées qu'au début des années 2000 chez les bactéries [109, 110], dans lesquelles la compaction de l'ADN et les régions super-enroulées s'avèrent jouer un rôle primordial dans la régulation génétique.

1.5.2 Approche *in vitro*

La démonstration et l'étude de ce phénomène a été abordée progressivement par une approche "bottom-up", en mettant au point un système de composants minimaux pour identifier chacun de leurs rôles de manière *in vitro*. La première fois que de l'ADN volontairement compacté fut mélangé avec les éléments nécessaires à la transcription (sels, ATP, RNA polymérase, acides aminés, etc...), était par Baeza *et al.* en 1987 [111]. Ils ont montré que de l'ADN mis en présence de spermidine a une activité transcriptionnelle supérieure qu'en son absence. Malgré les observations des condensats par microscopie électronique, il semble que l'interprétation de leur conclusion ne soit pas juste, en particulier du fait des faibles quantités de spermidine utilisées. L'interaction entre la spermidine et les différentes protéines est sans doute à l'origine de cette augmentation d'activité. Ce n'est que bien plus tard que ce type de manipulation a été reproduit. Tsumoto *et al.* ont préparé un ADN long de 40 kbp contenant un promoteur T7 à mi-longueur. En le compactant aussi bien avec de la spermine qu'avec du PEG, son activité transcriptionnelle a été significativement inhibée [112]. Des résultats similaires ont été obtenus en complexifiant le système. La variation dans la quantité d'ARN transcrite induite par un changement d'état conformationnel a été observée dans les microgouttes d'une émulsion d'eau dans l'huile [113]. Leur interface constituée d'une monocouche de phospholipides permet à l'ADN de pouvoir être dans un état décompact malgré la présence d'une quantité importante de spermine, par adsorption sur la paroi. La complexation d'ADN T4 avec des nanoparticules cationiques, de façon analogue à la chromatine, a montré une réduction de son activité transcriptionnelle, mais de façon plus graduelle que lorsque la compaction est induite par des ions [68].

Enfin comme pour la transcription, il est possible de raisonner de façon similaire pour l'étape de translation qui permet la synthèse de protéines à partir d'ARN. L'ARN qui est aussi un polymère de nucléotides, peut subir, comme nous allons le voir, l'effet d'agents compactants pour modifier sa conformation et donc modifier la vitesse du processus de synthèse de la protéine pour laquelle il code.

1.6 Conclusion

L'ADN a été considéré dans ce chapitre avec le point de vue du physico-chimiste, c'est à dire en portant attention non pas à l'information qu'elle contient, mais à sa nature semi-flexible, fortement chargée et à son environnement chimique qui influent sur sa conformation.

Nous avons vu que la compaction de l'ADN en milieu *in vitro* est réalisable par des agents compactants de composition variée, en particulier par des tensioactifs cationiques. Malgré ces nombreuses possibilités, il se trouve qu'un contrôle dynamique de l'état conformationnel par un stimulus extérieur n'est pour l'instant possible que par deux moyens : de façon thermique ou de façon lumineuse à travers l'introduction de pNAB cationiques capables de se lier à l'ADN de manière photodépendante. Enfin, le lien entre l'état de compaction de l'ADN et son activité transcriptionnelle en milieu *in vitro* a été décrit. Il apparaît clairement qu'aucune réaction d'expression génétique ne peut avoir lieu significativement si la molécule codante est complètement

compactée.

Ces descriptions permettent de mieux comprendre le repliement compact et hiérarchisé de l'ADN dans les virus et le noyau des cellules eucaryotes. Néanmoins dans ces dernières, même en raisonnant sur la chromatine, la reproduction du repliement de l'ADN reste encore trop simpliste dans le nombre d'espèces mises en présence. Parallèlement, comprendre l'influence de la conformation de l'ADN sur sa capacité à donner lieu à la transcription, permet d'apporter des éléments supplémentaires pour la constitution d'édifices biomimétiques reconstitués qui joueraient le rôle de cellule artificielle.

Nous nous sommes intéressés de notre côté par poursuivre les premiers travaux sur le contrôle de la conformation de l'ADN par la lumière. Ceci a d'une part eu lieu dans une direction visant à rendre le photocontrôle plus efficace. L'effet de nouveaux tensioactifs photochromes a ainsi été évalué dans le chapitre suivant. D'autre part, c'est l'application de cette stratégie au photocontrôle de la synthèse d'ARN et de protéines qui sera démontrée dans le chapitre 3.

Chapitre 2

Ingénierie moléculaire de tensioactifs photosensibles

Nous avons vu à travers les travaux pionniers de Le Ny et Lee à l'USC, et de notre équipe à l'ENS, que le photocontrôle *in vitro* de la conformation de l'ADN est possible grâce à un tensioactif photosensible, l'AzoTAB. La démonstration du principe étant établie, des voies de complexification ou d'amélioration du système sont désormais ouvertes.

C'est l'optimisation du phénomène qui a attiré notre attention. En particulier le fait que la concentration d'AzoTAB nécessaire pour réaliser la transition de conformation photoinduite est environ 5000 fois plus grande que la concentration en nucléotides. Même sans parler d'intégration de ce système en milieu *in vivo*, la perspective de réaliser le photocontrôle dans un milieu proche des conditions physiologiques, nécessite une amélioration de l'efficacité de la compaction provoquée par le pNAB, tout en gardant une réversibilité vis-à-vis d'un stimulus lumineux.

C'est dans cet objectif que nous avons travaillé sur le développement de dérivés de l'AzoTAB. La synthèse d'un analogue polychargé a tout d'abord échoué. Ensuite, deux autres molécules ont été préparées, formant avec l'AzoTAB une série appelée AzoCx. Tout en conservant une tête cationique analogue, la longueur de leur queue hydrophobe est accrue. Après avoir décrit l'influence de ce paramètre sur des systèmes comparables, nous caractériserons le comportement sous illumination et l'autoassemblage des tensioactifs synthétisés. Leur mise en présence avec de l'ADN et les possibilités de photocontrôle de sa conformation seront enfin étudiées. Les résultats de ce chapitre ont été publiés dans [114].

2. Ingénierie moléculaire de tensioactifs photosensibles

2.1 Synthèse d'analogues de l'AzoTAB	57
2.1.1 Deux manières d'augmenter l'affinité	57
2.1.2 Stratégie de synthèse	58
2.1.3 Tentative d'augmentation de la valence	58
Substitution par la triméthylamine	58
Substitution par un nucléophile moins encombré	59
2.1.4 Augmentation de l'hydrophobicité	59
2.2 Photoisomérisation et autoassemblage	61
2.2.1 Photoisomérisation	61
2.2.2 Concentration micellaire critique	63
2.3 Photocontrôle de la compaction de l'ADN	64
2.3.1 Compaction de l'ADN	64
2.3.2 Réversibilité	67
2.4 Conclusion	69

2.1 Synthèse d'analogues de l'AzoTAB

2.1.1 Deux manières d'augmenter l'affinité

Les tensioactifs cationiques sont caractérisés par deux principaux paramètres : leur valence Z et la longueur de leur queue hydrophobe (FIGURE 2.1 a). L'AzoTAB est monovalent et sa queue a une longueur comparable à une chaîne aliphatique linéaire de 12 carbones. L'augmentation de la capacité de l'AzoTAB à compacter l'ADN peut se faire en jouant sur ces deux grandeurs (FIGURE 2.1 b).

D'une part la charge de sa tête cationique peut être augmentée. Comme nous l'avons vu lorsque l'agent compactant est un cation multivalent (Section 1.2.4), plus il est chargé, plus la transition de compaction a lieu à des concentrations inférieures en cation. Puisque le taux de neutralisation θ est proportionnel à l'inverse de Z , la concentration critique d'agent de compaction n'évolue pas du tout de façon linéaire avec Z mais diminue de manière bien plus importante. Ainsi, utiliser de la spermine ($Z = 4$) à la place de la spermidine ($Z = 3$) permet de réduire la concentration nécessaire en cation d'un facteur d'environ 50 [100]. Multiplier la valence de l'AzoTAB par deux permet d'espérer une réduction du même ordre de grandeur.

D'autre part sa queue peut être rendue plus hydrophobe. Les études sur la mise en présence d'ADN avec des tensioactifs cationiques classiques démontrent que plus leur partie hydrophobe est grande, plus l'effet coopératif qui provoque leur fixation sur l'ADN sera important et donc plus la compaction de l'ADN sera réalisée de manière efficace [92]. Par exemple augmenter la queue linéaire d'un tensioactif de 14 à 16 carbones permet de réduire la concentration d'agent compactant nécessaire d'un rapport d'environ 4.

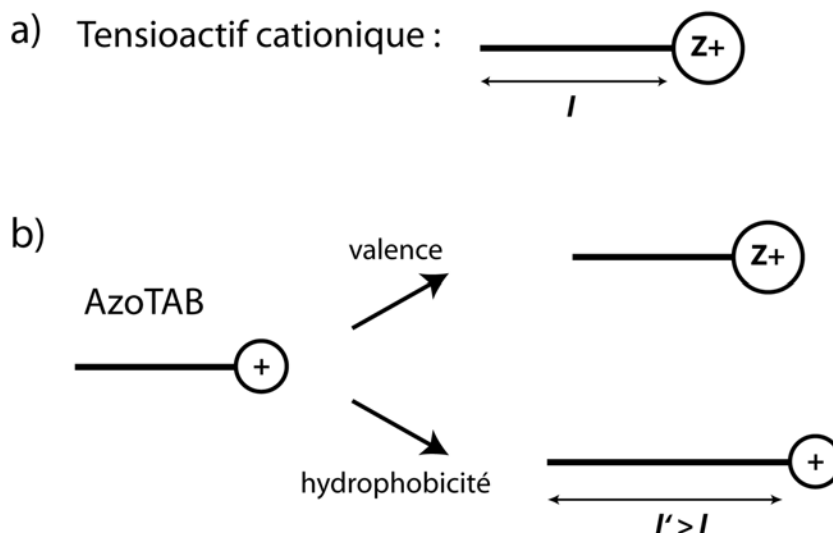


FIGURE 2.1 – Les deux stratégies pour augmenter l'affinité d'un tensioactif cationique pour l'ADN. a) Représentation schématique d'un tensioactif cationique faisant apparaître ses deux principales caractéristiques : la taille de sa chaîne carbonée l et sa valence Z . b) Les deux voies de modification des caractéristiques de l'AzoTAB.

2.1.2 Stratégie de synthèse

Le protocole de synthèse de l'AzoTAB est relativement simple à modifier pour jouer sur ces deux paramètres. Tout comme l'avaient fait Hayashita *et al.* en 1994 [34] pour préparer des tensioactifs photosensibles similaires à l'AzoTAB, nos pNAB analogues ont été synthétisés à partir d'un protocole en trois étapes. Elles sont représentées dans le cas de l'AzoTAB sur la FIGURE 2.2 et consistent en :

- 1) un couplage diazoïque de type Sandmeyer, pour former le motif diazobenzène
- 2) une déprotonation du phénol, suivie d'une unique substitution nucléophile sur un dérivé bromé symétrique
- 3) une substitution nucléophile sur l'extrémité bromée restante par de la triméthylamine, pour former un ammonium quaternaire, de façon à créer une tête chargée à la molécule

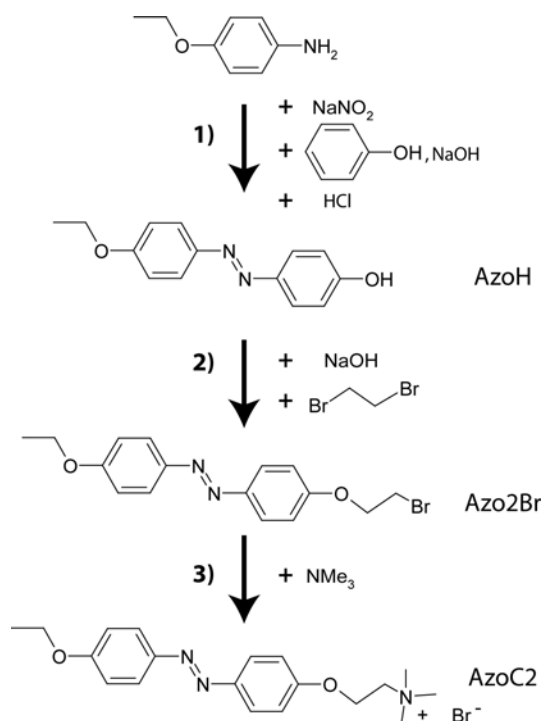


FIGURE 2.2 – Principe de la synthèse en trois étapes de l'AzoC2.

L'étape 2 offre un moyen simple de modification, aussi bien pour multiplier le nombre de charges dans la tête que pour augmenter la longueur finale de la queue.

2.1.3 Tentative d'augmentation de la valence

Substitution par la triméthylamine

Pour la deuxième étape, en utilisant un dérivé dont le nombre d'extrémités bromées est supérieur à deux, il est théoriquement possible de pouvoir réaliser plus d'une amination à la troisième étape. C'est ce que nous avons tenté en réalisant la substitution nucléophile de AzoH sur le 1,3-dibromo-2,2-bis(bromométhyl)propane en espérant obtenir une molécule finale avec trois groupements bromure de triméthylammonium (FIGURE 2.3). Pour réaliser la monosubsti-

tution sur le tétrabromure, AzoH est dissous dans du DMF, déprotoné par NaH puis ajouté très lentement à une solution de dérivé bromé en excès d'un rapport six. Le composé intermédiaire AzoTriBr a été obtenu. Les détails de sa synthèse et de ses caractérisations sont rassemblés en Annexe A. La substitution avec la triméthylamine gazeuse, par bullage dans de l'éthanol, n'a par contre pas véritablement fonctionné. Un précipité a été obtenu, mais en faible quantité par rapport à ce qui est d'habitude obtenu pour l'AzoTAB. Une chromatographie sur colonne de silice a montré que AzoTriTAB n'était pas seul et qu'il s'agissait plutôt d'un mélange d'espèces. Ces molécules sont sans doute les dérivés à tête mono, bi et triaminée. Le résultat n'est pas plus satisfaisant quand le bullage est réalisé dans du THF. Malgré la nature primaire des halogénures, il semble que la ramification induise une proximité qui limite les substitutions par la triméthylamine.

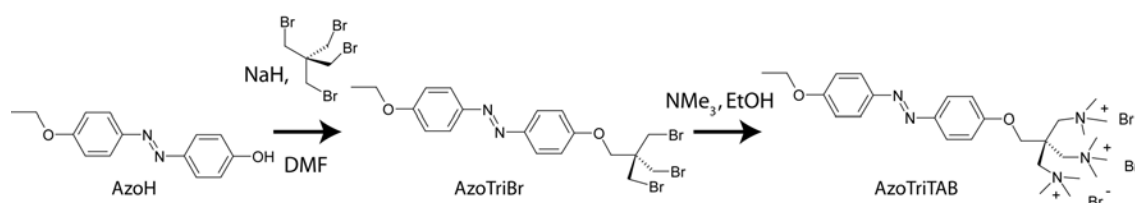


FIGURE 2.3 – Principe de la synthèse d'un dérivé de l'AzoTAB comportant trois têtes aminées.

Substitution par un nucléophile moins encombré

Pour essayer de limiter cet encombrement stérique, nous avons utilisé deux nucléophiles plus petits (FIGURE 2.4).

D'abord l'ammoniac. AzoTriBr est introduit dans une solution d'ammoniaque à 20%, l'ensemble a été chauffé à 60°C sous forte agitation pendant une nuit. Aucune augmentation de la solubilité du solide initial n'a été constatée. Après évaporation, la RMN n'a pas non plus montré l'apparition d'une nouvelle espèce, même lorsque 30 vol% de THF est ajouté au mélange réactionnel.

D'autre part, l'ajout d'ions azidures N_3^- a été essayé. Un excès de NaN_3 (20 équivalents) a été ajouté à de l'AzoTriBr dans du DMF au reflux. La molécule AzoTriN₃ a été obtenue. Le protocole et la caractérisation du produit sont rassemblés en Annexe A. En vue d'obtenir le composé triaminé correspondant, la réduction de AzoTriN₃ a été entreprise avec de la triphénylphosphine dans du THF anhydre. Après purification, la molécule AzoTriNH₂ est obtenue. Le protocole et la caractérisation du produit sont rassemblés en Annexe A. Malgré la purification sur gel de silice, AzoTriNH₂ est faiblement soluble en milieu Tris-HCl (moins de 2 mmol.L⁻¹), même en diminuant le pH du tampon avec de l'acide chlorhydrique jusqu'à pH = 5. Les spectres RMN du proton et du carbone ont montré des signaux parasites ne permettant pas d'affirmer que seule la molécule triaminée a été synthétisée. De plus, la quantité obtenue fut trop faible (10 mg) pour constituer un réel stock durable dans le temps. Nous avons donc abandonné cette voie.

2.1.4 Augmentation de l'hydrophobicité

La mise en contact de l'ADN avec un pNAB plus hydrophobe que l'AzoTAB a déjà été réalisée auparavant dans notre équipe [70]. C'est un tensioactif cationique de type gémaux ("gemini") qui a été étudié (FIGURE 2.5 a), synthétisé par l'équipe du Prof. Dario Bassani à L'institut des

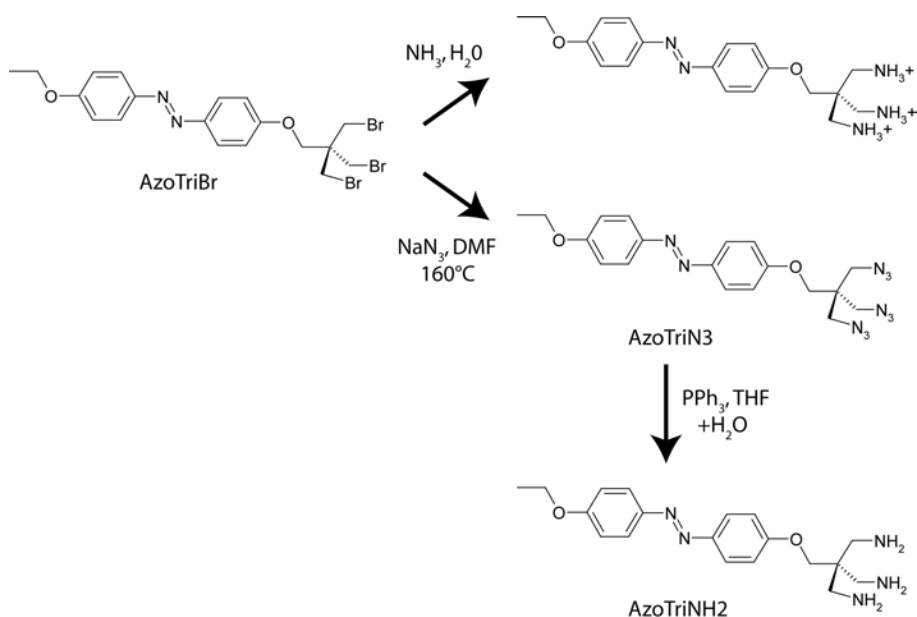


FIGURE 2.4 – Utilisation de deux nucléophiles plus petits que NMe₃ pour réaliser une tri-amination sur le dérivé bromé AzoTriBr. La voie de synthèse du haut n'a pas abouti. Le produit issue de celle du bas n'a pas été mis en contact de l'ADN.

Sciences Moléculaires de Talence. Il contient à la fois deux charges, un groupement diazobenzène et deux longues chaînes aliphatiques de 16 carbones. En présence d'ADN, cette molécule montre une très forte capacité de compaction. Le ratio molaire d'AzoGEM sur le nombre de nucléotides est de 1,5 au moment de la compaction (il est d'au moins 5000 pour l'AzoTAB). Ceci s'explique à la fois par la présence de deux charges positives (contre une pour l'AzoTAB) et de deux queues particulièrement hydrophobes. L'efficacité de compaction est donc clairement meilleure, mais pour que le photocontrôle soit effectif, il est nécessaire qu'une décompaction sous stimulus lumineux existe. Cette réversibilité n'a pas été observée avec l'AzoGEM, même si un changement de polarité, ainsi que d'écartement entre ses charges, est bien constaté après irradiation. Cette limite provient sans doute de sa trop grande affinité pour l'ADN, qui ne lui permet pas de provoquer une réorganisation brutale après illumination.

C'est donc un compromis qui doit être trouvé, entre une affinité forte pour induire la compaction et un maintien de la réversibilité après le processus de photoisomérisation. Pour cela, nous avons synthétisé deux molécules analogues à l'AzoTAB contenant un nombre supérieure de carbones entre sa tête triméthylammonium et l'oxygène lié au groupement diazobenzène. Ceci est réalisé en modifiant le nombre de carbones du dérivé bromé symétrique qui est introduit à la deuxième étape (FIGURE 2.6). De cette manière, la nouvelle molécule qui est obtenue en réalisant la même amination est plus hydrophobe, mais conserve la même tête ammonium quaternaire que l'AzoTAB. Les détails de la synthèse et des caractérisations sont décrits en Annexe A. Nous avons baptisé cette série d'analogues AzoC x , x étant le nombre de ces carbones (FIGURE 2.5 b). Ce nombre est de deux pour l'AzoTAB, nous l'appellerons ainsi dans ce chapitre AzoC2. Les autres molécules inédites préparées, l'AzoC5 et l'AzoC8, en contiennent respectivement 5 et 8.

Il est à noter que la quantité de base ajoutée à la seconde étape ne doit pas être trop importante (pas plus de deux équivalents) car il existe un risque d'élimination. En effet, après

la monosubstitution sur le dérivé dibromé, une déprotonation de l'avant dernier carbone peut conduire à la formation d'un alcène terminal.

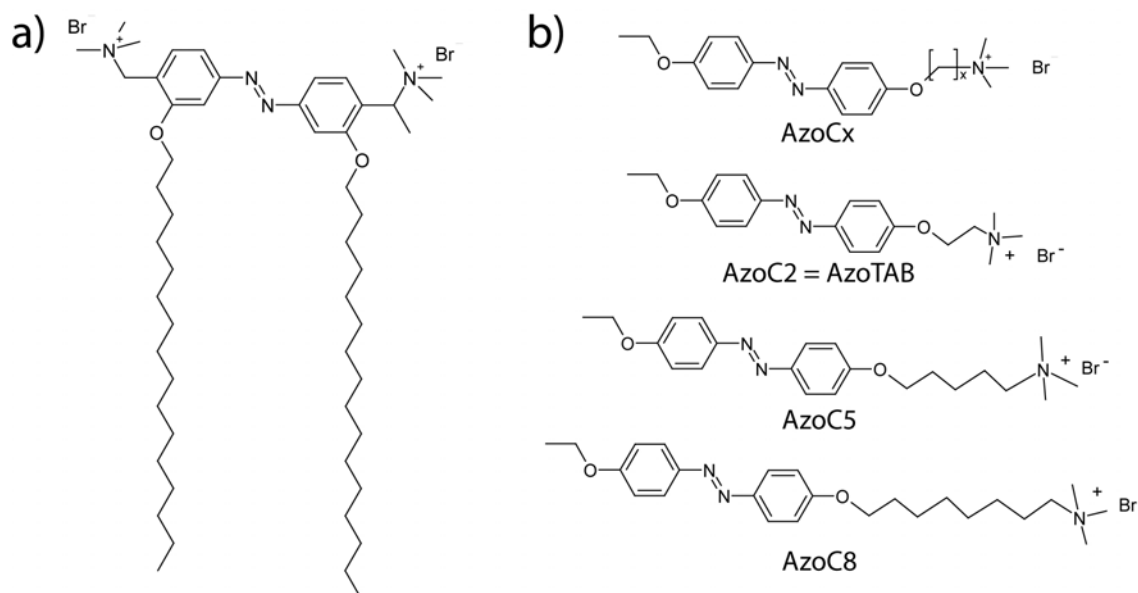


FIGURE 2.5 – Formule d'autres tensioactifs photosensibles à groupement diazobenzène ayant servi d'agent compactant de l'ADN. a) Formule de l'AzoGEM. b) Formules des dérivés AzoCx, avec $x = 2$, $x = 5$, $x = 8$.

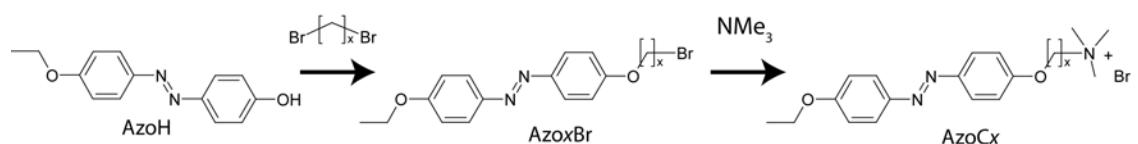


FIGURE 2.6 – Principe de la synthèse en trois étapes des dérivés AzoCx.

2.2 Photoisomérisation et autoassemblage

2.2.1 Photoisomérisation

C'est d'abord la capacité des molécules AzoCx à photoisomériser qui a été vérifiée. Pour cela, leur spectre UV-visible a été réalisé avec un lecteur de microplaque (Synergy HT, Biotek Instruments). Les solutions ont été préparées en dissolvant les AzoCx à une concentration de $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$ dans un tampon Tris-HCl à 10 mmol.L^{-1} (pH = 7,5), qui est le tampon dans lequel seront réalisées les expériences de compaction (FIGURE 2.7). Leurs spectres ont été comparés après différentes périodes d'illumination UV à 365 nm en plaçant chaque solution dans un tube de 1,5 mL (Eppendorf) à une distance d'environ 7 cm d'une lampe UV (Vilbert Lourmat, 6 W).

Les AzoC5 et AzoC8 montrent des spectres très similaires à ceux de l'AzoC2. En l'absence d'illumination UV, elles présentent toutes un maximum d'absorption vers 360 nm, qui est caractéristique de leur configuration principalement en *trans*. Les absorbances associées à ces maxima

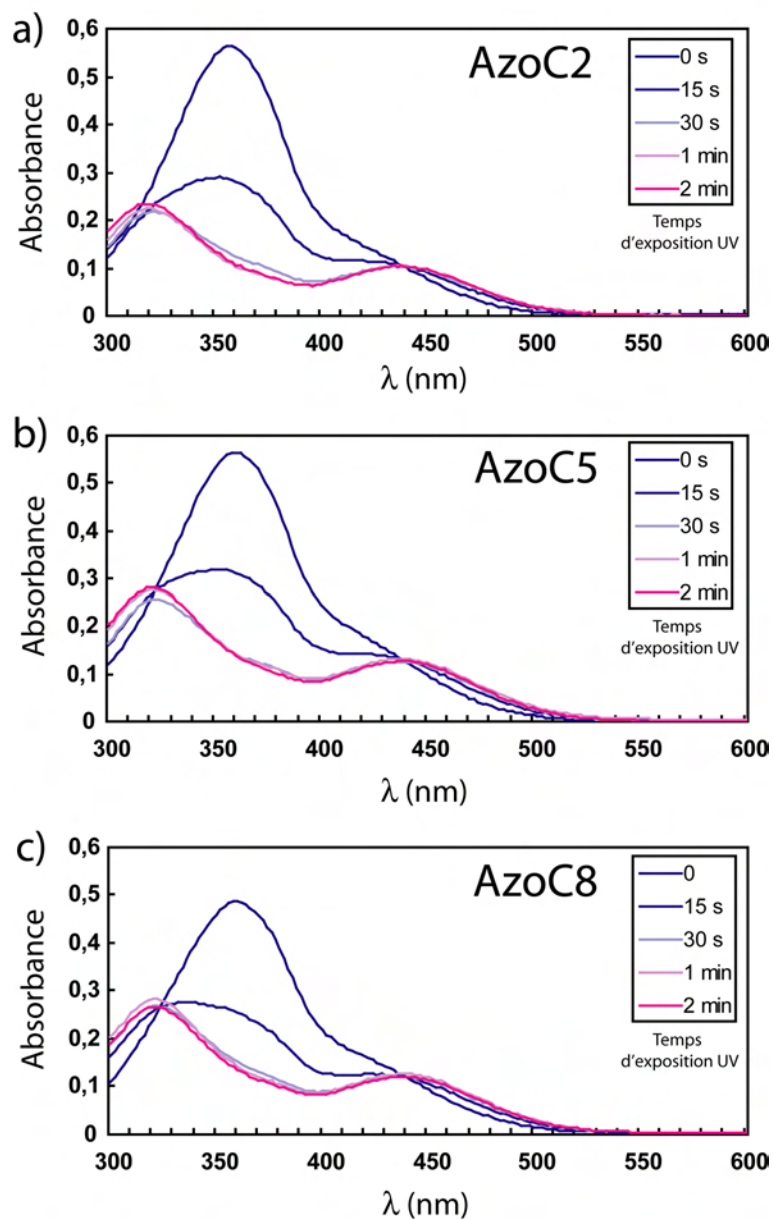


FIGURE 2.7 – Spectres UV-visible des molécules AzoC x après illuminations UV (365 nm) de différentes durées. a) $x = 2$. b) $x = 5$. c) $x = 8$. Chaque solution a une concentration de $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$ en tensioactif et est tamponnée par 10 mmol.L^{-1} de Tris-HCl à $\text{pH} = 7,5$.

sont comparables. En présence de lumière UV, les bosses précédentes disparaissent au profit d'un état photostationnaire à deux maxima (322 et 442 nm), typique de la présence majoritaire d'isomères en configuration *cis*. Avec la faible résolution temporelle utilisée, les vitesses de photoconversion apparaissent proches, l'état photostationnaire contenant une majorité de *cis* étant atteint en moins d'une minute.

2.2.2 Concentration micellaire critique

Pour caractériser l'effet de la taille de la queue des pNAB sur leurs propriétés d'autoassemblage, ainsi que l'effet de la lumière UV, nous avons déterminé la concentration micellaire critique (CMC) des trois molécules AzoCx. Nous avons procédé par mesure de la conductimétrie de solutions d'AzoCx à différentes concentrations. La conductivité molaire des tensioactifs est dépendante entre autres de leur taille. En dessous de la CMC, toutes les molécules sont libres et migrent rapidement sous un champ électrique. La conductivité de la solution est alors proportionnelle à la concentration en tensioactifs. Lorsque la concentration est supérieure à la CMC, des micelles apparaissent. Ces objets composés de quelques dizaines de molécules sont plus chargés mais migrent beaucoup moins vite en solution. Pour $[AzoCx] > CMC$, la concentration en monomère est fixe et la concentration en micelle croît de manière linéaire avec la concentration. Par conséquent, la conductivité augmente de manière linéaire mais avec une pente plus faible que dans le cas des monomères seuls ($[AzoCx] < CMC$). La CMC peut se déterminer comme la concentration à laquelle s'effectue la transition entre ces deux régimes.

Les expériences ont été réalisées avec un conductimètre à électrodes de platine (C860, Consort) en diluant progressivement une solution concentrée de chaque AzoCx dans un tube en plastique de 50 mL. Chaque mesure a été effectuée dans le noir à une température de $22 \pm 1^\circ\text{C}$, après avoir bien homogénéisé l'échantillon. Les illuminations UV avant la série de mesure dans le noir ont été faites en plaçant la solution à 7 cm environ d'une lampe UV de 45 W pendant 30 minutes. Ce temps est grand pour s'assurer que la conversion *trans-cis* a bien eu lieu, même pour les échantillons les plus concentrés. Les résultats sont rassemblés sur la FIGURE 2.8. Les valeurs de CMC obtenues sont rassemblées dans le TABLEAU 2.1.

Sans prendre en compte l'illumination UV, ces mesures montrent d'abord que plus x est grand, plus la CMC est petite. Cette capacité à s'autoassembler plus facilement traduit bien l'existence d'une moins bonne affinité pour l'eau et donc une plus grande hydrophobicité quand la queue contient plus de groupes méthylène. L'évolution des valeurs de CMC sont comparables à celle de la série des tensioactifs DTAB, TTAB et CTAB (TABLEAU 2.1). Ces molécules ont la même tête triméthylammonium (suffixe TAB) et contiennent au total respectivement 12 (dodécyl-), 14 (tétradécyl) et 16 (hexadécyl-) atomes de carbone dans leur queue aliphatique. De façon similaire entre les deux groupes de molécules, le fait d'allonger la chaîne carbonée de 3 carbones (entre AzoC2 et AzoC5) et 4 carbones (entre DTAB et CTAB) réduit la CMC d'une quinzaine de mmol.L^{-1} à moins d'une mmol.L^{-1} . D'autre part après illumination UV, un même comportement est observé pour chaque molécule : la CMC sans UV (molécules majoritairement en configuration *trans*) est plus petite que la CMC après illumination (isomère *cis* majoritaire). Ceci indique que les molécules sont moins apolaires après photoisomérisation et donc moins aptes à s'autoassembler sous forme de micelles. Ce résultat est conforme à ce que leurs structures *trans* et *cis* laissent supposer. Enfin, il apparaît que plus x est grand, plus l'écart absolu entre les CMC avec et sans UV est petit. Même si l'écart relatif ne varie pas de manière sensible entre AzoC5 et AzoC8, cette tendance indique qualitativement que la variation de polarité des molécules après illumination

Tensioactif	AzoC2	AzoC5	AzoC8	DTAB	TTAB	CTAB
CMC (mmol.L ⁻¹) - UV	12.6 ± 0.2	0.83 ± 0.02	0.57 ± 0.02	16.3	3.75	0.96
CMC (mmol.L ⁻¹) + UV	14.6 ± 0.3	0.90 ± 0.02	0.62 ± 0.02	idem	idem	idem

TABLE 2.1 – Valeurs des CMC des dérivés AzoCx déterminées par conductimétrie, avec ou sans illumination UV avant les mesures et des CMC des homologues DTAB, TTAB et CTAB ne contenant pas de motif diazobenzène dans leur queue (valeurs obtenues par conductimétrie issues de [115]).

est plus faible quand la queue est plus grande.

Ces résultats sont en accord qualitatifs avec la série proche de Hayashita *et al.* [34], même si nous trouvons des grandeurs de CMC bien inférieures (jusqu'à plus de dix fois par rapport à une de leurs molécules qui serait équivalente ici à l'AzoC6). Par contre nos valeurs sont tout à fait comparables à celles obtenues récemment par Fan *et al.* [37] avec une série d'analogues, différant au niveau du substituant du phényl terminal (groupement éthyle au lieu d'éthoxy). La modification de CMC de ces derniers agents sous UV n'est malheureusement pas décrite dans cet article.

2.3 Photocontrôle de la compaction de l'ADN

2.3.1 Compaction de l'ADN

La mise en présence d'ADN avec les dérivés AzoCx a été effectuée. C'est l'état conformationnel de l'ADN T4 (166 kbp) qui a été caractérisé par microscopie de fluorescence. Pour cela, l'échantillon est préparé par le mélange, dans cet ordre, d'eau, du tampon Tris-HCl (10 mmol.L⁻¹, pH = 7,4), de l'intercalant fluorescent YOYO-1 (0,01 μmol.L⁻¹), du tensioactif photosensible. L'ADN est enfin introduit délicatement (mélange non pas par vortex, mais par quelques retournements du tube) pour éviter sa coupure. La concentration finale en nucléotides est de 0,1 μmol.L⁻¹, ce qui correspond à une forte dilution où les molécules d'ADN pourront être examinées individuellement. Avant l'ajout d'ADN, l'échantillon peut être illuminé sous une lampe UV (Vilbert Lourmat, 6 W) à 365 nm pendant 10 minutes. Les observations sont réalisées à l'aide d'un microscope inversé (AxioObserver D1, Zeiss), muni d'un objectif 100x à immersion d'huile. 20 μL de la solution d'ADN sont déposés sur une lamelle de verre propre. Une caméra ultra-sensible avec gain électromagnétique (Photonmax 512B, Princeton Scientific) et son logiciel d'acquisition (Metavue, Molecular Devices) sont utilisés pour déterminer l'état de compaction des molécules individuelles pour chaque concentration en AzoCx. Des images représentatives des molécules suivant différentes concentrations en AzoCx et la présence d'une illumination UV avant l'ajout d'ADN ou non, sont visibles FIGURE 2.9 a. Pour chaque échantillon, c'est la conformation d'au moins 200 molécules qui est caractérisée. Ce comptage permet de déterminer la fraction de molécules dans l'état compact et de tracer les courbes de compaction de la FIGURE 2.9 b.

Les résultats montrent deux choses. La première est que, qu'il y ait eu illumination UV ou non, plus x est grand, plus la concentration critique $[AzoCx]^*$ pour compacter totalement l'ADN est petite ($[AzoCx]^* = 700, 100$ et $27,5 \mu\text{mol.L}^{-1}$ pour $x = 2, 5$ et 8 , respectivement). La seconde est que, après illumination UV pour chaque AzoCx, cette concentration est supérieure à celle où l'AzoCx n'a pas subi d'UV ($[AzoCx]_{UV}^* = 1500, 300$ et $45 \mu\text{mol.L}^{-1}$ pour $x = 2, 5$ et 8 , respectivement). Les deux isomères *trans* et *cis* des AzoCx ont donc une plus grande capacité de

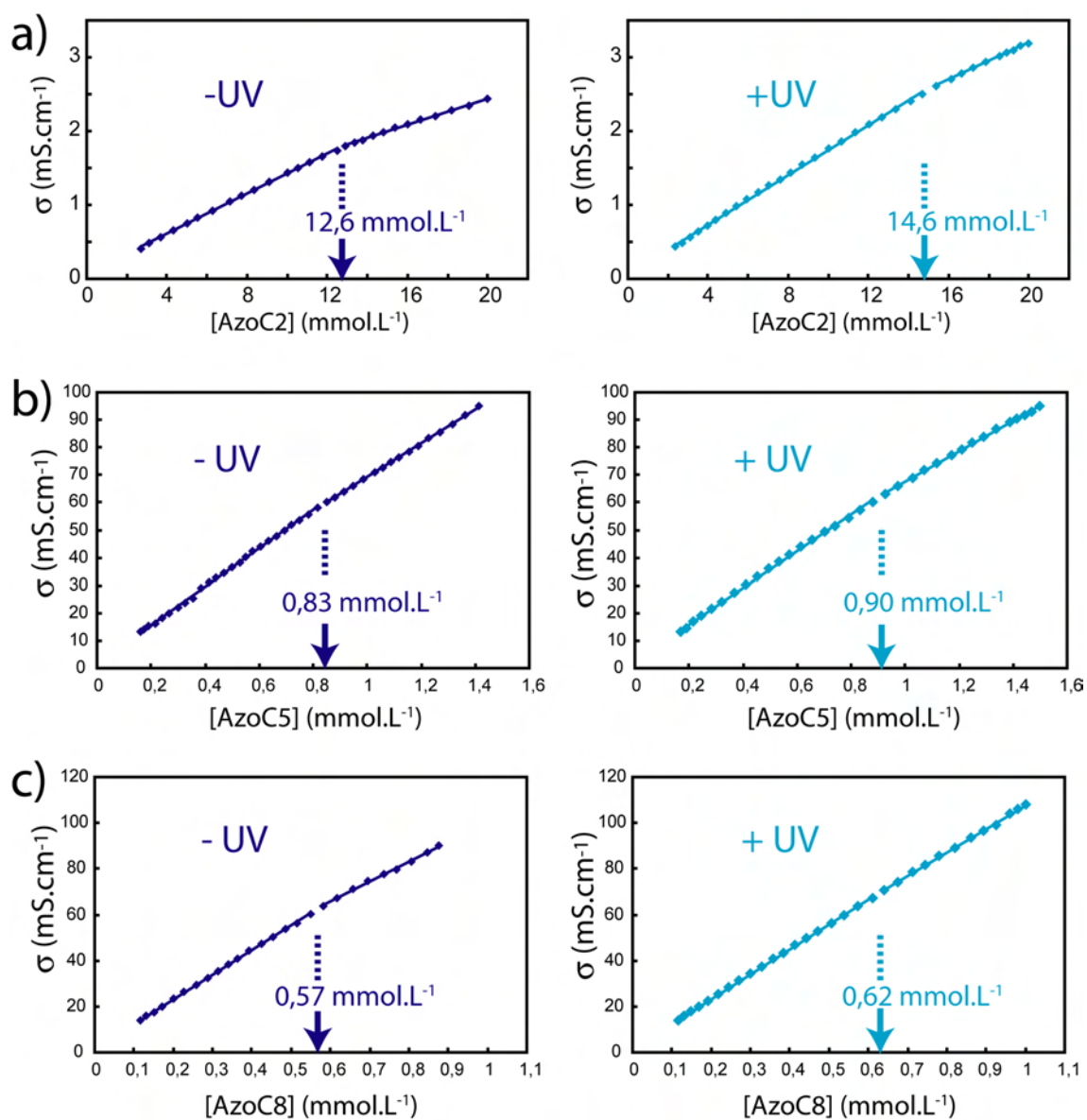


FIGURE 2.8 – Détermination de la CMC des AzoCx dans l'eau par mesure de la conductivité σ de la solution en fonction de la concentration en AzoCx, sans (à gauche) et après illumination de la solution à 365 nm (à droite). a) $x = 2$. b) $x = 5$. c) $x = 8$.

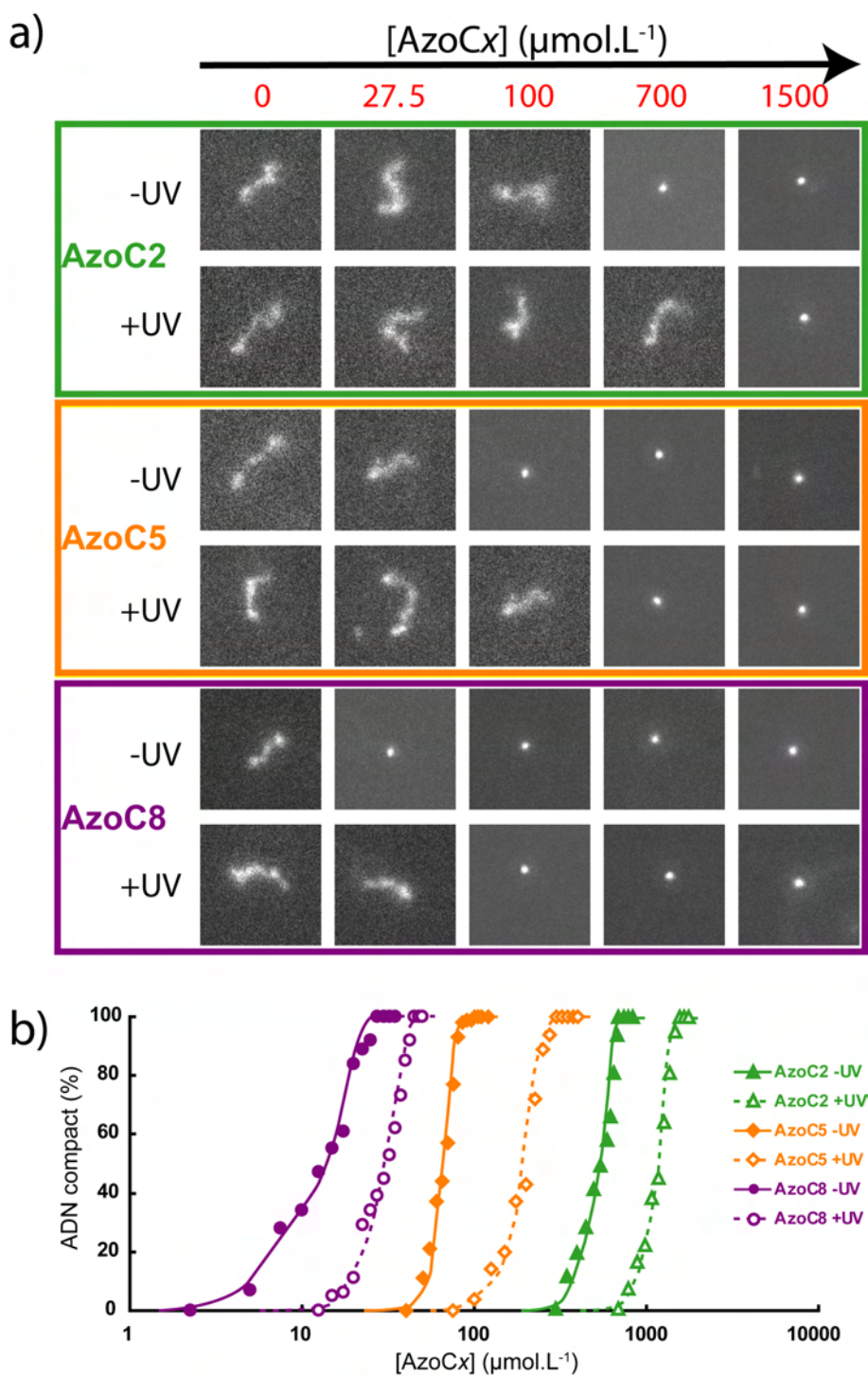


FIGURE 2.9 – Compaction de l'ADN par les AzoCx. a) Molécules individuelles d'ADN T4 observées par microscopie de fluorescence (concentration de $0,1 \mu\text{mol.L}^{-1}$ en nucléotides, dans un tampon Tris-HCl 10 mmol.L^{-1}) en présence de différentes concentrations d'AzoCx, avec et sans illumination UV (10 min) avant ajout de l'ADN à la solution. La température est de 25°C . Chaque image a une taille de $8 \times 8 \mu\text{m}^2$. b) Courbes de compaction correspondantes après décompte de l'état de compaction de 200 molécules par échantillon.

compaction de l'ADN quand leur queue hydrophobe est plus grande et l'isomère *cis* reste moins efficace que le *trans*.

Il a été mis en évidence que le contact entre les tensioactifs cationiques et l'ADN menant à sa compaction, est un phénomène fortement coopératif [90]. Les interactions hydrophobes entre leurs queues en sont à l'origine : la présence d'un tensioactif sur un site de fixation de l'ADN favorise l'arrivée d'une autre molécule sur un site voisin. Nous nous reposons sur cette hypothèse pour expliquer la compaction plus efficace visible avec une plus grande longueur de queue. Les expériences de conductimétrie ont montré que la capacité des tensioactifs à former des micelles est d'autant meilleure que x est grand. Cette capacité est en lien avec l'existence d'interactions hydrophobes plus fortes avec x qui augmente leur tendance à se fixer sur l'ADN. C'est aussi ce qu'ont constaté Dias *et al.* lors de la comparaison du pouvoir compactant de tensioactifs cationiques non photosensibles ayant différentes longueurs de queue [92]. Le raisonnement est similaire pour expliquer la moins bonne compaction obtenue avec les molécules en configuration *cis*. Etant moins aptes à s'autoassembler qu'en configuration *trans*, les tensioactifs *cis* interagissent de façon moins coopérative et donc moins forte au voisinage de l'ADN et produisent alors sa compaction à plus haute concentration.

2.3.2 Réversibilité

Les courbes de compaction précédentes montrent donc qu'il existe une certaine gamme de concentration en AzoCx pour laquelle l'ADN est majoritairement compact sans illumination UV préalable (*trans*-AzoCx) et majoritairement décompacte après photoisomérisation des pNAB. Cette gamme ne montre pas de superposition pour l'AzoC2 (pour [AzoC2] = 700 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, 100% de molécules sont compactées sans UV, 0% avec UV), ainsi que pour l'AzoC5 (pour [AzoC2] = 100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, 100% de molécules sont compactées sans UV, 4% avec UV). La tendance est moins prononcée pour l'AzoC8 mais reste satisfaisante (pour [AzoC8] = 27,5 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, 100% de molécules sont compactées sans UV, 39% avec UV). Cette différence photoinduite est nécessaire pour que le caractère photosensible des AzoCx puisse être exploité dans le photocontrôle de la conformation de l'ADN. Mais pour réaliser un photocontrôle réversible, comme ce qui a été obtenu jusqu'alors avec l'AzoC2, l'effet de la lumière sur la compaction de l'ADN doit aussi être évalué *in situ*, c'est à dire sur l'ADN après ajout d'AzoCx.

Pour cela, des échantillons d'ADN en présence d'une [AzoCx] telle que 95% de l'ADN soit compacté ont été illuminés sous lampe UV pendant différents temps et l'état conformationnel des molécules a été ensuite caractérisé (FIGURE 2.10). Les concentrations initiales des tensioactifs sont [AzoCx] = 690, 80 et 18,5 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ pour $x = 2, 5$ et 8 respectivement.

Pour l'AzoC2 et l'AzoC5, la décompaction a lieu : après 20 minutes d'illumination, seulement 20% et 35% des molécules d'ADN restent sous forme compactée, respectivement. La réversibilité qui a été observée auparavant pour l'AzoC2 est donc également effective pour l'AzoC5. Par contre avec l'AzoC8, même après 30 minutes de lumière UV, au moins 85% des molécules sont encore compactées. Un photocontrôle réversible n'est donc pas possible avec ce dérivé. Il semble que sa queue soit trop longue pour que l'isomérisation du groupement diazobenzène produise un changement de polarité suffisant.

Pour caractériser de façon plus précise l'interaction entre les pNAB et l'ADN ainsi que les possibilités de décompaction, nous avons mesuré la taille d'un grand nombre de molécules d'ADN avant et après illumination UV. Les concentrations utilisées sont les mêmes que pour la décompaction, c'est à dire celles permettant d'avoir environ 95% de molécules compactes, à savoir

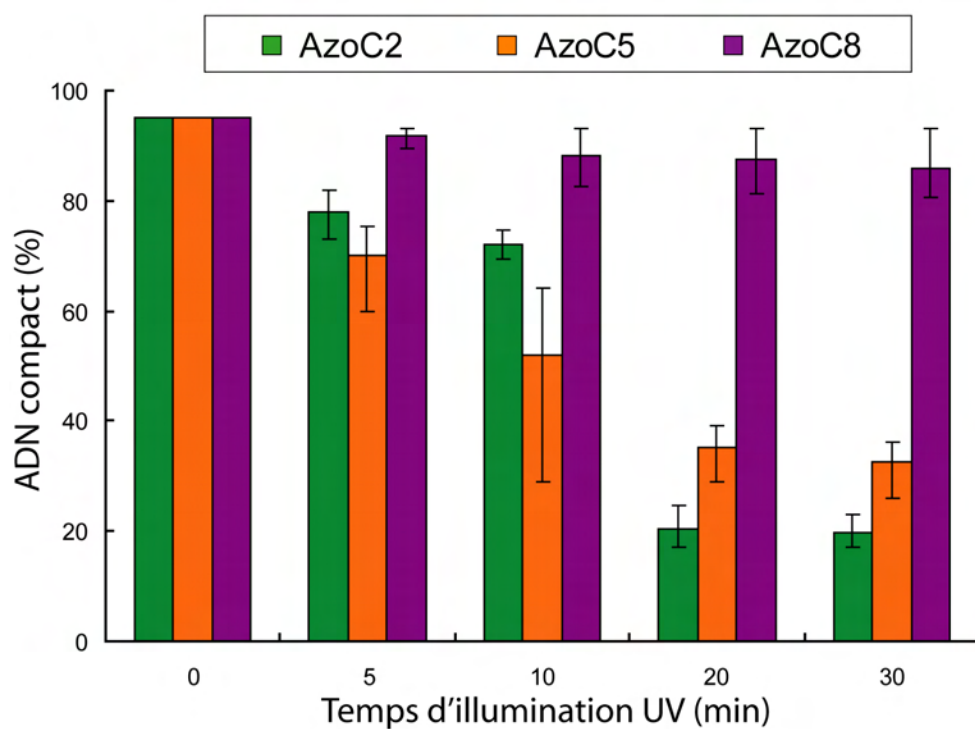


FIGURE 2.10 – Pourcentage de molécules d'ADN en état compact après différents temps d'illumination UV. Les concentrations en AzoCx ont été choisies de manière à avoir une solution initiale contenant 95% de molécules en état compact, ce qui signifie $[AzoCx] = 690, 80$ et $18,5 \mu\text{mol.L}^{-1}$ pour $x = 2, 5$ et 8 , respectivement. La concentration en nucléotides est $0,1 \mu\text{mol.L}^{-1}$, le tampon est composé de 10mmol.L^{-1} de Tris-HCl et la température est de 25°C .

$[AzoCx] = 690, 80 \text{ et } 18,5 \mu\text{mol.L}^{-1}$ pour $x = 2, 5 \text{ et } 8$ respectivement. La taille des molécules a été déterminée selon leur grand axe L_{DNA} (FIGURE 2.10 a). Les mesures ont été réalisées sur 150 molécules. Les résultats sont rassemblés sous la forme des distributions de la FIGURE 2.10, en comparaison avec la distribution de l'ADN T4 en solution sans tensioactif.

Sans AzoCx (FIGURE 2.11 a), la distribution est, avant ou après illumination UV, assez large et centrée autour d'une valeur de $3,5 \mu\text{m}$. L'effet des UV est donc très faible sur l'intégrité des molécules d'ADN, dans nos conditions. En présence des concentrations d'AzoCx décrites, les distributions sont toutes similaires (FIGURE 2.11 b, c, d). Elles sont très piquées autour d'une valeur de $0,75 \mu\text{m}$, qui correspond approximativement à la taille des condensats observés de la même manière lorsque l'ADN est compacté avec un agent classique comme la spermine. Comme nous l'avons vu, les structures toroïdes formées par l'ADN T4 ont une taille d'environ 100 nm . En microscopie de fluorescence, elles apparaissent comme des points lumineux de diamètre $0,8 \mu\text{m}$. Après 20 minutes d'illumination, la distribution est décalée vers les plus grandes tailles (entre $1 \text{ et } 4 \mu\text{m}$), pour chaque tensioactif. L'ADN a tendance à se déplier, mais ne le fait pas dans les mêmes proportions suivant x . Tout d'abord, le nombre de molécules restant en état compact (pour lesquelles $L_{DNA} \leq 1,25 \mu\text{m}$) augmente avec x , ce qui est cohérent avec les résultats de la FIGURE 2.10. Ensuite, la longueur des molécules décompactes (pour lesquelles $L_{DNA} < 1,25 \mu\text{m}$) est différente suivant la molécule : le maximum de la distribution diminue avec x (il est situé à $2,75 ; 1,75 \text{ et } 0,75 \mu\text{m}$ pour $x = 2, 5 \text{ et } 8$ respectivement). Il apparaît que les molécules décompactes après illumination en présence d'AzoC2 et d'AzoC5 sont clairement dans un état de "pelote", très proche de celui de l'ADN seul, mais il a tendance à être moins déployé dans l'espace. Les interactions hydrophobes supplémentaires qui caractérisent le système ADN/AzoC5, sont sans doute à l'origine de cette conformation plus compacte. Dans le cas de l'AzoC8, seules quelques molécules montrent une conformation complètement décompacte de ce type ($\sim 5\%$). D'autres molécules sont visibles ($\sim 10\%$), qui ne sont pas aussi compactes que les condensats, mais pas non plus déployées. Il s'agit sans doute d'ADN replié sous forme de globule gonflé ("swollen globule") qui est une structure qui a déjà été observée dans d'autres travaux, en particulier ceux concernant la compaction progressive avec des polycations de grande taille [85].

2.4 Conclusion

La synthèse de deux nouveaux pNAB, l'AzoC5 et l'AzoC8 a été réalisée. Ces tensioactifs photosensibles sont dérivés de l'AzoTAB (AzoC2) et constituent avec lui une série d'analogues (les AzoCx) dont la queue hydrophobe est progressivement allongée, de trois et cinq carbones supplémentaires. Une caractérisation relativement complète de ces trois molécules a été réalisée. D'une part de manière isolée, c'est leur capacité à photoisomériser et à s'autoassembler différemment après illumination UV qui a été étudiée. Les tensioactifs ont montré une capacité à former des micelles d'autant plus forte que leur queue est longue, ce qui traduit bien un caractère plus hydrophobe. Leur isomérisation conduit à une diminution de cette hydrophobicité, qui est moins prononcée lorsque leur queue est grande.

D'autre part, les trois pNAB ont été mis en contact d'ADN génomique pour observer leur capacité à induire sa compaction. L'un des objectifs de leur synthèse est atteint : les AzoC5 et AzoC8 compactent l'ADN de façon plus efficace que l'AzoC2. Un facteur 37 est gagné sur la concentration critique de compaction lorsque l'AzoC8 est utilisé. Mais dans le but d'utiliser ces molécules pour photocontrôler de manière réversible l'ADN, l'effet des UV après compaction a

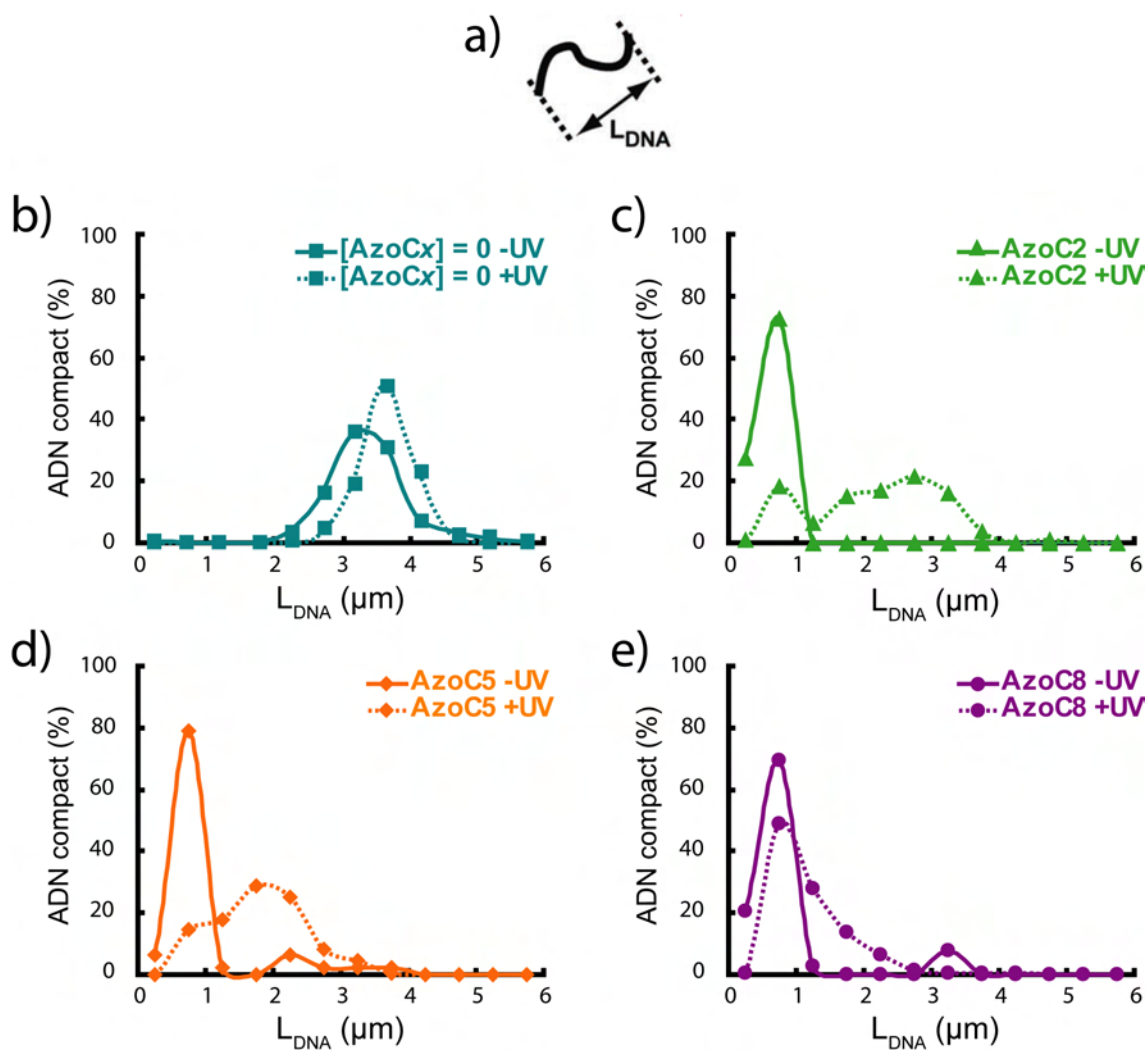


FIGURE 2.11 – Distribution de la taille selon leur grand axe des molécules d'ADN avant et après illumination de la solution (20 min). a) Schéma de définition de (L_{DNA}), le grand axe d'une molécule d'ADN. b) En absence d'AzoCx. c) Avec $[AzoC2] = 690 \mu\text{mol.L}^{-1}$. d) Avec $[AzoC5] = 80 \mu\text{mol.L}^{-1}$. e) Avec $[AzoC8] = 18,5 \mu\text{mol.L}^{-1}$. A chaque point correspond un pourcentage de molécules dont la taille est comprise entre $(L_{DNA}) - 0,25 \mu\text{m}$ et $(L_{DNA}) + 0,25 \mu\text{m}$. La concentration en nucléotides est $0,1 \mu\text{mol.L}^{-1}$, le tampon est composé de 10mmol.L^{-1} de Tris-HCl et la température est de 25°C .

été étudié. Finalement le changement de polarité photoinduit de l'AzoC8 est insuffisant pour permettre un dépliement de l'ADN. Ce caractère réversible existe néanmoins avec l'AzoC5. Au final avec cette molécule, c'est un compromis satisfaisant qui est obtenu : l'efficacité de compaction est améliorée par rapport à l'AzoC2 (d'un facteur 8 environ), tout en conservant la réversibilité photoinduite.

D'autres pistes existent pour développer des pNAB encore plus efficaces. Comme nous l'avons tenté, le design d'un tensioactif photochrome à tête cationique multivalente pourrait fortement augmenter son affinité pour l'ADN, tout en évitant les problèmes liés à une augmentation du caractère hydrophobe de la molécule. D'autre part, comme l'a démontré Haberfield en 1987, il existe des molécules à motif diazobenzène dont l'illumination UV produit, non pas un changement de polarité de sa queue, mais une variation de sa charge globale [116] (FIGURE 2.12 a). Lorsque l'un des cycles phényle du diazobenzène est fonctionnalisé par un groupement hydroxyle en position ortho, il y a formation d'une liaison hydrogène entre un des azotes et le proton, lorsque la double liaison est en configuration *trans*. Cette liaison n'existe pas en configuration *cis*. Entre les deux formes, le proton subit une différence de labilité : la molécule le perd plus facilement en *cis* qu'en *trans*, une différence de pKa d'environ trois est observée. Ce type de plate-forme n'a été que très rarement utilisée. Elle a été récemment appliquée pour engendrer des variations contrôlées de pH suivant l'éclairement [117, 118]. Il serait possible de la mettre en présence d'ADN, à condition de la rendre hydrosoluble. Ceci est imaginable en la fonctionnalisant de manière à obtenir la molécule de la FIGURE 2.12 b. Dans notre cas en fixant le pH avec un tampon approprié, sa charge serait modifiée sous lumière UV : en configuration *trans*, le phénol est protoné, la charge globale serait de 3+, tandis qu'en *cis* la molécule possède un phénolate et donc une charge 2+. A la manière d'une diminution de la valence de contre-ions multivalents, une transition de conformation pourrait être provoquée réversiblement : la lumière UV favoriserait la décompaction tandis que la lumière visible favoriserait la compaction.

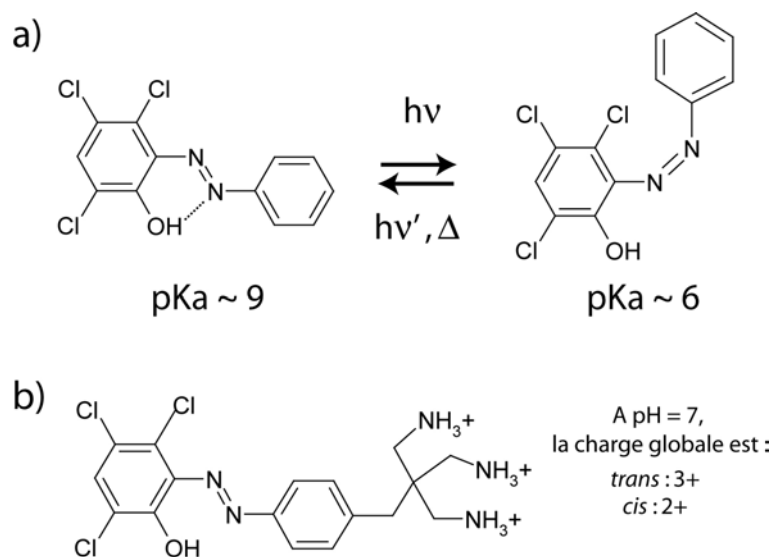


FIGURE 2.12 – Une autre stratégie pour le développement d’agents compactants de l’ADN photosensibles : l’introduction de molécules à plate-forme 2-hydroxyazobenzène dont la charge change suivant l’illumination. a) Principe de la modification de pKa photoinduite, suivant l’existence d’une liaison hydrogène intramoléculaire. b) Exemple d’une molécule dont la charge globale pourrait être modifiée sous éclairage pour être utilisée dans le photocontrôle de la compaction de l’ADN.

Chapitre 3

Photocontrôle de l'expression génétique

D'un côté grâce à l'AzoTAB et ses dérivés, le photocontrôle *in vitro* de la conformation de l'ADN est effectif. D'un autre, il est clairement démontré que dans un système reconstitué, la transcription a lieu principalement lorsque l'ADN est dans un état déplié. D'un certain point de vue, ce chapitre porte sur la combinaison de ces deux approches pour montrer qu'un changement de conformation photoinduit à l'aide de l'AzoTAB modifie directement la possibilité de transcription et de synthèse de protéines. Mais au-delà de la simple démonstration de principe, ces travaux sont aussi l'occasion de mieux décrire sa cinétique et de mieux comprendre certains aspects du phénomène de photocontrôle comme l'influence de la taille de l'ADN.

L'idée d'utiliser le photocontrôle de la compaction de l'ADN pour réguler l'expression génétique a été proposée pour la première fois par Prof. Damien Baigl. Elle a été étudiée par Dr. André Estevez Torres, alors post-doctorant, dans le cadre d'une collaboration entre l'équipe de D. Baigl et le laboratoire du Prof. Kenichi Yoshikawa au département de physique de l'université de Kyoto. Ce travail a été poursuivi par Dr. Cécile Crozatier. C'est au cours d'un séjour de deux mois dans le même laboratoire que j'ai contribué à ces travaux. Pour une meilleure compréhension, l'ensemble des résultats sont décrits, même si ma contribution reste relativement modeste, et centrée sur le processus global d'expression.

Ce chapitre détaille d'abord la possibilité d'utiliser la lumière pour modifier l'activité transcriptionnelle de l'ADN à l'aide de l'AzoTAB. C'est ensuite le photocontrôle réalisé sur la synthèse de la protéine qui est expliqué. Ces résultats ont été publiés dans [119]. Enfin, nous décrivons nos travaux les plus récents où cette stratégie est appliquée au photocontrôle de la synthèse et de l'activité d'une enzyme.

3. Photocontrôle de l'expression génétique de l'ADN

3.1	Photocontrôle de l'activité transcriptionnelle	75
3.1.1	A partir d'un ADN génomique T4	75
3.1.2	Avec d'autres types d'ADN	75
3.1.3	Aspects cinétiques	77
	Activation photoinduite de l'expression	77
	Contrôle dynamique	79
3.2	Photocontrôle de la synthèse de protéines modèles	80
3.2.1	A partir d'ARN	80
3.2.2	A partir d'ADN	81
3.3	Photocontrôle de la synthèse d'une enzyme	83
3.3.1	Système et méthode de quantification de l'expression	83
	Choix de l'enzyme	83
	Système d'expression	84
	Quantification de l'enzyme	85
3.3.2	Expression photodépendante	85
	Cinétique d'expression	85
	Influence de la concentration en AzoTAB	86
	Réversibilité	86
3.4	Conclusion	88

3.1 Photocontrôle de l'activité transcriptionnelle

3.1.1 A partir d'un ADN génomique T4

Comme nous l'avons vu dans les Chapitres 1 et 2, l'ADN du bactériophage T4 est traditionnellement utilisé pour étudier sa conformation car sa longueur de 166 kbp lui permet d'être facilement observé par fluorescence. Il est aussi utilisable dans des expériences de transcription ; il porte en effet environ 40 promoteurs de l'enzyme RNA polymérase de *E. coli*.

Nous avons donc quantifié son activité transcriptionnelle en fonction de la concentration en AzoTAB et de la présence ou non d'une illumination UV (FIGURE 3.1). Les autres détails expérimentaux de cette section sont décrits en Annexe B. Le milieu de transcription consiste en un mélange de sels (similaire à la composition physiologique), de nucléotides (NTP), d'agent réducteur (le DTT) et de l'enzyme RNA polymérase de *E. coli*. L'activité transcriptionnelle est définie par la quantité d'ARN produit divisée par la quantité d'ARN produit sans UV (365 nm) lorsque $[AzoTAB] = 0 \text{ mmol.L}^{-1}$. La mesure de la quantité d'ARN produite est réalisée en y ajoutant du Ribogreen (Invitrogen), qui est une molécule qui fluoresce en présence d'acides nucléiques.

En parallèle, la microscopie de fluorescence permet de caractériser l'état conformationnel de molécules individuelles dans le milieu de transcription (par marquage au YOYO-1, à un ratio 1:10 par rapport à la concentration en paires de bases). Des mesures par diffusion statique de la lumière (SLS) ont aussi été réalisées pour confirmer ces observations.

La FIGURE 3.1 montre que l'activité transcriptionnelle mesurée est en phase avec l'évolution de la conformation de l'ADN. Pour $[AzoTAB] \leq 1,3 \text{ mmol.L}^{-1}$ l'ADN est sous forme dépliée. L'activité diminue légèrement mais reste significative ($\geq 50 \%$) qu'il y ait illumination UV (10 minutes après mélange) ou non. Sans UV, c'est pour $[AzoTAB] > 1,3 \text{ mmol.L}^{-1}$ que la diminution est importante. L'inhibition de l'activité est totale pour $[AzoTAB] \geq 2 \text{ mmol.L}^{-1}$. Ceci est en lien avec la conformation des molécules : à cette concentration dans cette solution, la compaction de l'ADN est totale. Dans cette gamme de concentration, l'effet des UV est clairement visible. D'une part l'ADN reste majoritairement en conformation dépliée et d'autre part, l'activité transcriptionnelle est maintenue à un taux d'environ 80% du niveau de référence. Il est nécessaire que la concentration en AzoTAB soit supérieure ($[AzoTAB] \geq 2,6 \text{ mmol.L}^{-1}$) pour que l'activité diminue jusqu'à rejoindre les valeurs où il n'y a pas eu d'illumination. Pour cette gamme de concentration, malgré la photoisomérisation de l'AzoTAB, l'ADN apparaît en effet sous une conformation compacte.

Ces observations de l'état conformationnel de l'ADN sont une preuve pour affirmer que les changements d'activité transcriptionnelle sont bien dus à la modification de son repliement et non pas à une interaction photodépendante entre l'AzoTAB et l'enzyme. D'autre part, pour confirmer que l'effet des UV est négligeable sur l'activité de la polymérase, cette expérience a été réalisée en illuminant avant ou après l'introduction de la polymérase dans le mélange. Le maintien de l'activité transcriptionnelle est similaire dans les deux cas.

3.1.2 Avec d'autres types d'ADN

La transition de conformation de l'ADN induite par des tensioactifs cationiques est *a priori* valable, indépendamment de leur séquence, pour des ADN de tailles très différentes, aussi bien très longs comme l'ADN T4, que pour des plus petits fragments comme de l'ADN de sperme de saumon ($\sim 1000 \text{ bp}$) [90, 91]. Il est donc nécessaire d'évaluer le caractère universel du photocon-

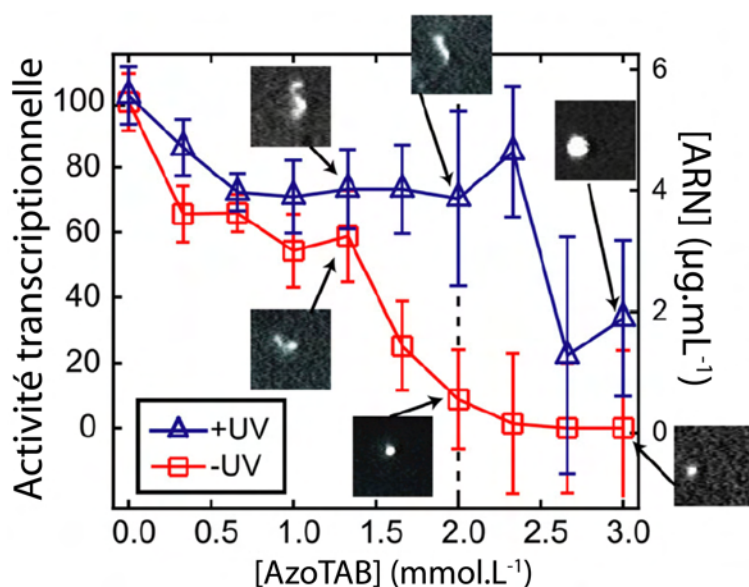


FIGURE 3.1 – Activité transcriptionnelle de l'ADN T4 en fonction de la concentration en AzoTAB, dans le noir et après 10 minutes d'illumination UV. Les images montrent une observation représentative par microscopie de fluorescence d'une molécule individuelle pour plusieurs concentrations en AzoTAB. Chaque image a une taille de côté de $6 \mu\text{m}$. Toutes les expériences sont réalisées dans les mêmes conditions : $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ d'ADN T4, $0.02 \text{ U.}\mu\text{L}^{-1}$ de RNA polymérase de *E. coli*, 40 mmol.L^{-1} de Tris-HCl, $\text{pH} = 7.5$, 150 mmol.L^{-1} de KCl, 10 mmol.L^{-1} de MgCl_2 , 0.5 mmol.L^{-1} de NTP et 10 mmol.L^{-1} DTT, $T = 37^\circ\text{C}$.

trôle de l'activité transcriptionnelle observé précédemment. Pour cela, des expériences similaires ont été menées avec des ADN différents contenant tous un promoteur T7, en présence de T7 RNA polymérase (FIGURE 3.2).

La transcription a tout d'abord été réalisée avec un ADN d'environ 5 kbp. Appelé pQBi-T7-GFP, c'est un plasmide commercial (Quantum Biotechnologies), qui permet la synthèse de GFP sous le contrôle d'un promoteur T7. Il a été dans un premier temps linéarisé à l'aide d'une enzyme de restriction (BglII). L'effet des UV avec le plasmide linéarisé est particulièrement efficace. Son activité transcriptionnelle est maintenue autour de 100% avec et sans illumination, pour $[\text{AzoTAB}] \leq 1 \text{ mmol.L}^{-1}$. Tandis que sans UV, elle diminue rapidement à 0% pour $[\text{AzoTAB}] \geq 2 \text{ mmol.L}^{-1}$. La production d'ARN est maintenue au niveau initial et même au-delà lorsqu'une illumination préalable a eu lieu. Ce contrôle net de la transcription a été confirmé par électrophorèse sur gel des fragments d'ARN transcrits (FIGURE 3.2 b). Pour $[\text{AzoTAB}] \leq 1,3 \text{ mmol.L}^{-1}$ l'effet de l'AzoTAB et de l'illumination UV sont négligeables. En revanche pour $[\text{AzoTAB}] \geq 1,7 \text{ mmol.L}^{-1}$, l'inhibition en l'absence d'UV est visible ainsi que le maintien de la production d'ARN sous UV, de même que l'augmentation de son intensité par rapport au niveau initial. Il y a deux bandes pour chaque expérience correspondant à une molécule de 900 monomères codant pour la GFP et à une molécule de 5000 monomères environ. Cette dernière est une molécule d'ARN produite par la transcription de toute la molécule d'ADN. Le promoteur est localisé à une extrémité du plasmide linéarisé, mais le terminateur ne semble pas complètement efficace pour stopper la synthèse de l'ARN par la T7 RNA polymérase. Ceci explique la présence du transcrit long. Quelles que soient les conditions d'illumination et la concentration en AzoTAB, les deux ARN transcrits sont identiques en longueur et en concentrations relatives. Ceci montre

que le photocontrôle modifie leur quantité produite et non pas leur nature. Du point de vue du mécanisme, nous pouvons en conclure que c'est l'accessibilité du promoteur lors du repliement de l'ADN qui est déterminante. Une fois fixée, la processivité de l'enzyme le long de l'ADN ne semble que peu affectée.

L'effet de deux autres ADN contenant un promoteur T7 a ensuite été comparé : à partir de petits fragments de 140 bp (FIGURE 3.2 c) et à partir du même plasmide de 5 kbp dans un état circulaire et super-enroulé (FIGURE 3.2 d). L'ADN de 140 bp est commercial (λ ZAP II, Stratagene). L'activité transcriptionnelle des fragments courts est très similaire à celle du plasmide linéarisé. Néanmoins, la différence est importante avec le plasmide circulaire. Sans UV, l'activité transcriptionnelle diminue progressivement jusqu'à être totalement inhibée pour $[\text{AzoTAB}] = 2 \text{ mmol.L}^{-1}$. Avec illumination UV, le niveau initial est conservé jusqu'à $[\text{AzoTAB}] \leq 1,3 \text{ mmol.L}^{-1}$ mais diminue plus rapidement ensuite et ne peut être maintenu au dessus de 50%. Ceci montre que notre méthode de photocontrôle est relativement indépendante de la longueur de l'ADN linéaire, mais qu'en même temps, elle dépend de sa structure.

La comparaison des comportements pour les trois morceaux d'ADN peut être interprétée à partir de ce qui est connu au sujet de la nature de leur transition de conformation. En présence d'agent compactant, le plasmide linéarisé est compacté suivant une transition du premier ordre à deux états (courbe de compaction en forme de sigmoïde), les fragments courts s'autoassemblent en condensats multimoléculaires [120] et le plasmide circulaire se replie de façon nettement plus continue [121]. Le maintien de l'activité transcriptionnelle entre le plasmide linéaire et le circulaire suggère que la transition de conformation est réversible dans le premier cas (de manière analogue à ce qui est visible pour l'ADN T4) mais qu'elle ne l'est pas pour le linéarisé. L'état compacté du plasmide super-enroulé en sans doute piégé d'un point de vue cinétique et ne peut se déplier aussi facilement. Ce blocage explique l'activité transcriptionnelle moindre sous UV. Cette différence entre les deux types de plasmide de même longueur est aussi une nouvelle preuve pour affirmer que c'est l'état conformationnel de l'ADN codant qui gouverne principalement la possibilité de transcription et non pas une éventuelle interaction enzyme-AzoTAB.

Enfin, un phénomène étonnant apparaît : l'activité dépasse 100% de l'activité de référence pour le plasmide linéarisé et les fragments courts à concentration importante en AzoTAB. Ceci est observé de façon reproductible, aussi bien pour la quantification avec le Ribogreen qu'avec l'électrophorèse sur gel. Ce phénomène est probablement lié à la conformation que prend l'ADN après illumination UV. Comme on l'a vu en Section 3 du Chapitre 2 à travers la mesure du grand axe de l'ADN, l'illumination UV d'un ADN compact se traduit par un dépliement vers la conformation en pelote. Cependant cette pelote est moins étirée que l'ADN natif, c'est à dire avant compaction. Cette configuration "compacte mais pas trop" permet sans doute une répétition plus rapide des étapes de fixation et de libération de l'enzyme polymérase. Un effet comparable a été reporté avec une T7 RNA polymérase sur des ADN en présence de polycations et de PEG [112] : la transcription augmente avant que la compaction ne provoque l'inhibition totale.

3.1.3 Aspects cinétiques

Activation photoinduite de l'expression

La caractérisation cinétique du photocontrôle a ensuite été réalisée, avec les fragments de 140 bp dans un milieu contenant 2 mmol.L^{-1} d'AzoTAB (FIGURE 3.3). Sous l'illumination UV utilisée, la photoisomérisation de l'AzoTAB de *trans* à *cis* a lieu complètement après environ

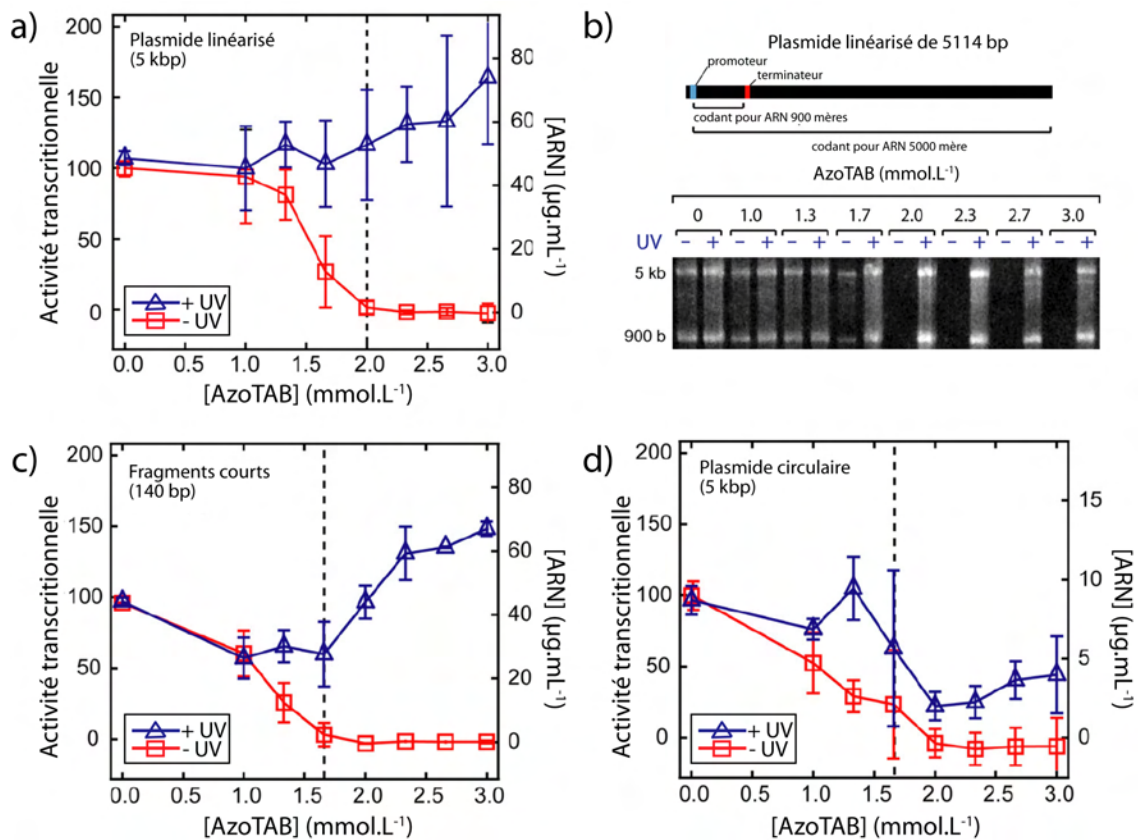


FIGURE 3.2 – Réponse de différents systèmes de production d'ARN contenant un promoteur T7, avec ou sans illumination UV. Activité transcriptionnelle en fonction de la concentration en AzoTAB en l'absence et en présence de 10 minutes d'illumination UV pour différentes molécules d'ADN : a) plasmide linéarisé de 5 kb, c) plasmide circulaire superenroulé de 5 kb, d) fragment linéaire de 140 bp. b) Schéma de la séquence (en haut) et du gel d'agarose non dénaturant des produits transcrits par le plasmide linéarisé (en bas). Toutes les expériences sont réalisées dans les mêmes conditions : $2 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ADN, $5 \text{ U.}\mu\text{L}^{-1}$ T7 RNA polymérase, 40 mmol.L^{-1} Tris-HCl, pH = 7.5, 25 mmol.L^{-1} NaCl, 8 mmol.L^{-1} MgCl₂, 0.5 mmol.L^{-1} NTP et 5 mmol.L^{-1} DTT, T = 37°C.

3 minutes (FIGURE 3.3 a, haut). Ceci est quantifié par spectrophotométrie. Le changement de conformation des fragments, d'un état compact sous forme d'agrégats multimoléculaires à un état décompact libre, qui est observé par diffusion statique de lumière, montre une cinétique similaire (FIGURE 3.3 a, milieu). Enfin, la quantité d'ARN produite après 20 minutes de réaction de transcription, atteint un plateau lorsque l'échantillon est illuminé préalablement pendant 3 minutes sous UV (FIGURE 3.3 a, bas). Ces trois phénomènes se déroulent à des vitesses similaires, ce qui indique que l'étape cinétiquement déterminante lors du retour de la transcription sous lumière UV, est la photoisomérisation de l'AzoTAB. Dans les conditions d'illumination utilisées, elle a lieu en environ 3 minutes, ce qui est un temps de réponse satisfaisant.

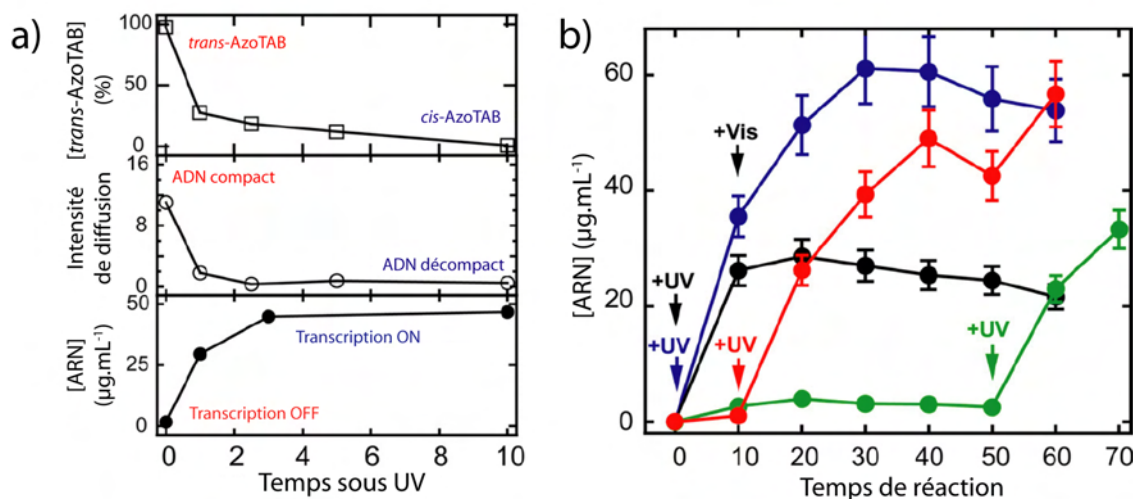


FIGURE 3.3 – Temps de réponse du changement de conformation de l'ADN et de son activité transcriptionnelle après illumination UV. a) Concentration en *trans*-AzoTAB (déterminée par spectrophotométrie UV/visible), intensité de diffusion de lumière statique et quantité d'ARN produit pour le fragment de 140 bp portant un promoteur T7 après 20 minutes de transcription en fonction du temps d'illumination d'UV (appliqué au début de la réaction de transcription). b) Cinétique de production d'ARN suivant différentes conditions d'illumination. $t = 0$ correspond à l'addition de la T7 RNA polymérase. Les flèches indiquent l'instant d'application de l'UV (10 minutes) ou de la lumière visible (3 minutes).

Contrôle dynamique

Pour montrer que ce changement est assez rapide pour pouvoir contrôler de manière dynamique la transcription, c'est un suivi de la cinétique de la production d'ARN qui a été réalisé suivant différentes illuminations UV (365 nm, pendant 10 minutes) et visible (400 nm, 3 minutes) (FIGURE 3.3 b). En partant de solutions identiques, il apparaît que la transcription n'a pas lieu si aucune illumination UV n'est réalisée. Après chaque illumination UV, la synthèse d'ARN a lieu de manière similaire, quel que soit le moment après le mélange où les 10 minutes d'UV sont appliquées. Enfin, nous avons jusqu'ici observé l'activation de la transcription par illumination UV. Mais c'est aussi un arrêt de cette réaction qui peut être effectué, grâce à de la lumière visible, de manière à ce que la quantité d'ARN présente dans le milieu n'augmente plus.

Ce caractère réversible à l'aide de deux illuminations de longueurs d'onde différentes, représente une première pour un système dans lequel ni l'ADN, ni les protéines ne sont modifiés pour être rendues photosensibles.

L'effet de la lumière visible est quelque chose que nous avons déjà étudié sur la conformation des longues molécules d'ADN en présence d'AzoTAB. En revanche nous ne l'avons jamais observé par microscopie de fluorescence sur des fragments courts. Ceci a été réalisé en effectuant une séquence de compaction par 2 mmol.L^{-1} d'AzoTAB, suivie d'une illumination UV puis d'une illumination visible (FIGURE 3.4). Il apparaît que l'ajout d'agent compactant provoque l'agrégation des fragments, qui sont visibles comme des tâches intenses. La présence de ces agrégats multimoléculaires n'existe plus après illumination UV : seul un background fluorescent relativement homogène est observé. Ceci est analogue à ce qui est visible en l'absence d'AzoTAB, signe que les fragments sont libres en solution. Cette séquence de compaction-dispersion-recompaction est à notre connaissance la première observée par microscopie de fluorescence. Elle correspond tout à fait à la séquence d'inhibition-activation-inhibition de la synthèse d'ARN lors de l'expérience de cinétique.

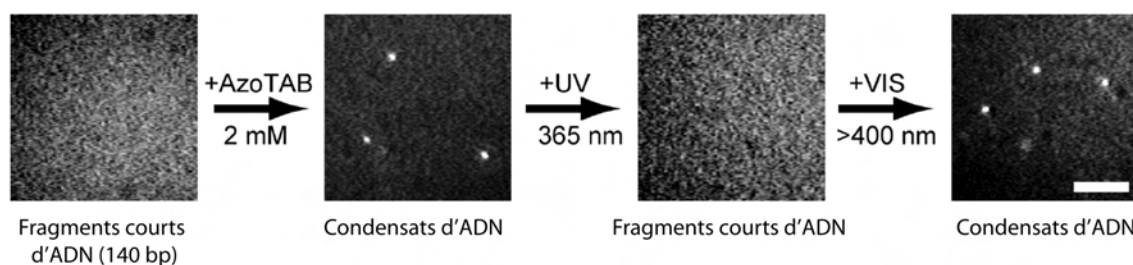


FIGURE 3.4 – Images par microscopie de fluorescence de fragments d'ADN de 140 bp dans le volume d'une solution de transcription, suivant la séquence suivante : addition d'AzoTAB (2 mmol.L^{-1}), exposition 10 minutes sous UV et application de 3 minutes de lumière visible. La composition du milieu est : $2 \mu\text{g.mL}^{-1}$ d'ADN, 2 mmol.L^{-1} d'AzoTAB, $5 \text{ U.}\mu\text{L}^{-1}$ de T7 RNA polymérase, 40 mmol.L^{-1} de Tris-HCl, $\text{pH} = 7.5$, 25 mmol.L^{-1} de NaCl, 8 mmol.L^{-1} de MgCl_2 , 0.5 mmol.L^{-1} de NTP et 5 mmol.L^{-1} DTT, $T = 37^\circ\text{C}$.

3.2 Photocontrôle de la synthèse de protéines modèles

L'effet de l'AzoTAB a été étudié jusqu'à présent sur la seule réaction de transcription. Pour pouvoir appliquer cette stratégie de photocontrôle à des systèmes plus complexes que l'unique synthèse d'ARN, il est nécessaire d'évaluer cette possibilité sur la réaction de translation ainsi que sur le phénomène d'expression génétique global qui permet l'obtention de protéine à partir d'ADN.

3.2.1 A partir d'ARN

Pour quantifier de façon aisée la protéine finale, nous avons travaillé avec des protéines fluorescentes. Un ARN messager (mARN) codant pour de la EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein) a tout d'abord été utilisé. La préparation du mARN est décrite en Annexe B. Toutes les expériences suivantes ont été réalisées dans un système de translation-expression, reconstitué des composants purifiés nécessaires à la mise en place de ces réactions (facteur de translation,

enzymes, autres protéines, acides aminés, ARN de transfert). Ce système appelé ici PURESystem est à l'origine développé par Ueda *et al.* [122] ; désormais commercial (à l'époque produit par Post Genome Institute), il permet l'expression de protéines par le simple mélange de l'ADN codant aux deux solutions du PURESystem, et un temps d'incubation à 37°C de l'ordre d'une heure.

L'activité de translation d'un mARN codant pour l'EGFP (759 b) en fonction de la concentration en AzoTAB et avec ou sans illumination UV, est représentée FIGURE 3.5 a. Il a été observé sans AzoTAB, qu'une exposition aux UV de 10 minutes diminue de manière importante (~ 60%) le rendement de production de protéine. Pour éviter cette photodestruction, le temps d'illumination UV a été réduit à 1,5 minute. Ce temps permet de ne pas endommager le système d'expression tout en maintenant une photoisomérisation importante de l'AzoTAB.

Sans illumination, la production d'EGFP diminue progressivement avec la concentration en AzoTAB jusqu'à une inhibition complète pour $[AzoTAB] = 3 \text{ mmol.L}^{-1}$. En présence de 1,5 minute d'UV, l'activité est maintenue à 90% jusqu'à $[AzoTAB] = 1 \text{ mmol.L}^{-1}$, puis diminue tout en restant bien supérieure au niveau de translation sans lumière UV. Pour $[AzoTAB] = 3 \text{ mmol.L}^{-1}$, l'illumination UV permet une synthèse de protéine 5,5 fois plus grande que sans.

Nous démontrons ici la possibilité de contrôler la réaction de translation par la lumière.

3.2.2 A partir d'ADN

Le photocontrôle a été ensuite évalué sur le processus complet d'expression génétique, à partir du plasmide de 5 kbp codant pour la GFP. Lorsque le plasmide est circulaire (FIGURE 3.5 b), une diminution progressive de l'activité d'expression est observée, pour laquelle l'inhibition totale apparaît pour $[AzoTAB] = 2,5 \text{ mmol.L}^{-1}$. L'illumination UV de 1,5 minutes permet une diminution plus lente de cette activité. En particulier, pour $[AzoTAB] = 2 \text{ mmol.L}^{-1}$, le niveau avec UV est 4,8 fois plus important que sans et pour $[AzoTAB] = 2,5 \text{ mmol.L}^{-1}$, alors qu'aucune protéine n'est détectée sans UV, leur quantité après illumination est maintenue à 26% de l'activité initiale.

Ces résultats ont été comparés avec ceux obtenus dans les mêmes conditions avec le plasmide linéarisé (FIGURE 3.5 c). Dans ce cas les diminutions d'activité avec et sans UV en fonction de la concentration en AzoTAB, sont plus progressives, de façon quasi linéaire. D'autre part, le maintien de la production de GFP après UV est moins efficace, les valeurs sont toujours inférieures à celles du plasmide circulaire.

Pour savoir si ces observations peuvent être dues à l'état conformationnel de l'ARN dans le milieu d'expression, des images par microscopie de fluorescence ont été réalisées. Des molécules d'ARN messager de 759 b (50 nmol.L^{-1}) ont été mises en présence de Ribogreen (en rapport 1x, comme pour les quantifications précédentes), pour différentes concentrations d'AzoTAB et conditions d'illumination, dans le milieu du PURESystem sans ARN de transfert (tARN) ni facteurs de protéines (FIGURE 3.6). Etant un polyélectrolyte négativement chargé, l'ARN peut en effet subir aussi des changements de conformation suivant son environnement. Ici du fait de leur taille, les fragment d'ARN apparaissent avec ce type de microscopie comme un background fluorescent lorsqu'ils sont libres et comme des tâches fortement fluorescentes lorsqu'ils forment des agrégats multimoléculaires. Pour mieux comparer la présence de ces deux types d'états, les images ont été réalisées à la surface de la lamelle de verre sur laquelle est déposée la goutte de solution. Le gain de la caméra et l'excitation lumineuse ont été maintenues constantes entre chaque image. Il apparaît que les agrégats ne sont pas visibles à $[AzoTAB] = 0 \text{ mmol.L}^{-1}$, quelle

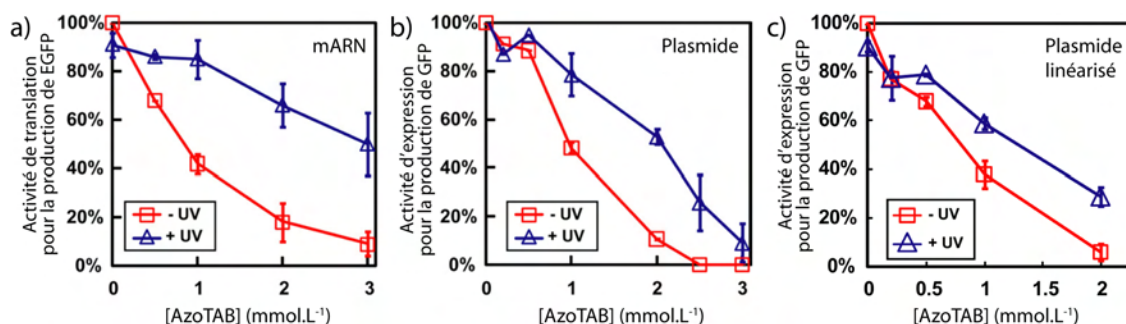


FIGURE 3.5 – Photocontrôle de la translation et de la transcription de protéines fluorescentes dans le PURESystem, en présence de différentes quantités d'AzoTAB. a) Activité translationnelle d'un mRNA codant pour de l'EGFP. b) Activité d'expression d'un plasmide codant pour la GFP. c) Activité d'expression d'un plasmide linéarisé codant pour la GFP. Pour toutes les expériences, la concentration finale en mRNA et ADN est de $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$. L'illumination UV est appliquée pendant 1,5 min au début de l'incubation.

que soit l'illumination. Sans UV, ils apparaissent pour $[\text{AzoTAB}] = 1 \text{ mmol.L}^{-1}$, ce qui est en lien avec le début de diminution de l'activité de translation (FIGURE 3.5 a). A partir de cette concentration, plus il y a d'AzoTAB, plus les agrégats sont nombreux et gros. Après illumination UV, le nombre et la taille moyenne des agrégats sont plus faibles.

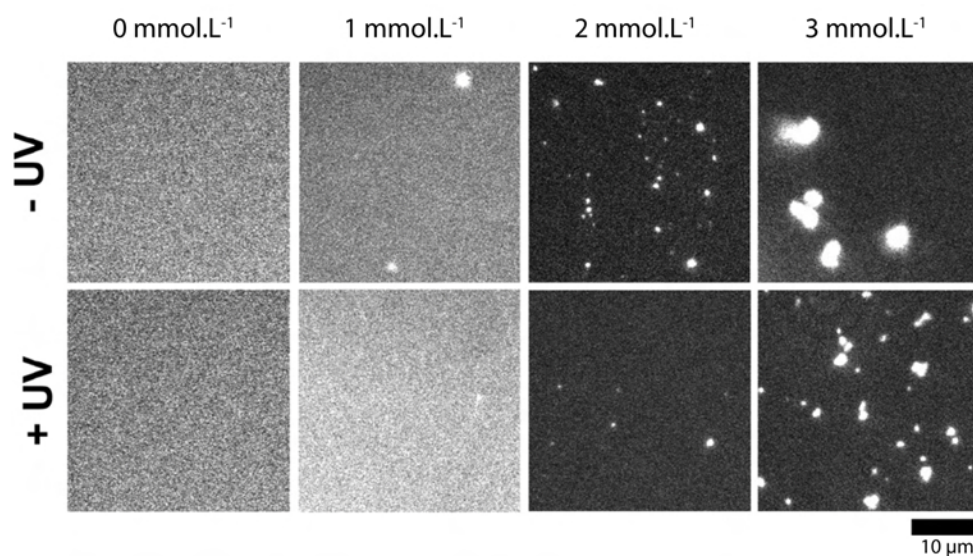


FIGURE 3.6 – Image par microscopie de fluorescence de mRNA (50 nmol.L^{-1}) adsorbés sur une lamelle de verre, marqués par du Ribogreen dans la solution de PURESystem, sans tARN ni facteur de protéine, en fonction de la concentration en AzoTAB et de la présence d'UV ou non.

C'est la première fois que la condensation d'ARN codants est observée. Ces résultats montrent qu'en plus du phénomène de compaction de l'ADN, il est aussi nécessaire de prendre en compte celui de l'agrégation des molécules d'ARN messenger qui contrôle l'étape de transcription. Cette agrégation a de plus lieu à des concentrations inférieures en pNAB : les condensats sont visibles à partir de $[\text{AzoTAB}] = 1 \text{ mmol.L}^{-1}$, tandis que la courbe de compaction de l'ADN T4 dans

le PURESystem (FIGURE 3.7) montre l'apparition de molécules compactes pour $[AzoTAB] \sim 2 \text{ mmol.L}^{-1}$. L'AzoTAB a donc une affinité différente pour les deux acides nucléiques, plus grande pour l'ARN que pour l'ADN.

Nous en concluons donc que nous pouvons effectuer le photocontrôle de l'expression génétique au niveau de la transcription seule, de la traduction seule ou des deux processus simultanément. Dans le cas de la transcription, le contrôle est basé sur la compaction de l'ADN, tandis que dans le cas de la traduction, le contrôle est basé sur celle de l'ARN.

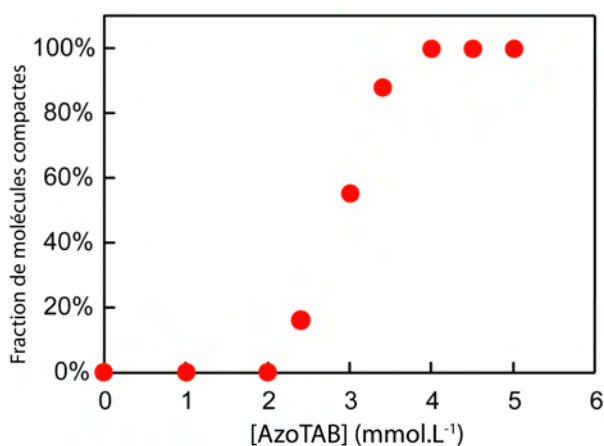


FIGURE 3.7 – Fraction de molécules compactes d'ADN T4 en fonction de la concentration en AzoTAB dans le PURESystem sans tARN ni facteur de protéine, à 37°C. La concentration en ADN est $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

3.3 Photocontrôle de la synthèse d'une enzyme

Le photocontrôle de l'expression de GFP étant démontré, il convient de l'appliquer à la synthèse d'une protéine véritablement fonctionnelle. Le fait que le phénomène soit relativement indépendant de la séquence de l'ADN de départ, permet un choix sans réelle contrainte sur la protéine. La sélectivité et la rapidité avec lesquelles les enzymes peuvent catalyser les réactions biochimiques, nous ont poussé dans un premier temps à choisir ces objets. Ainsi, même avec une faible variation d'expression photoinduite, les différences sur la conversion ultérieure d'un substrat peuvent être nettement plus grandes.

Ce travail a été débuté à l'occasion du stage de Master 2 d'Anna Venancio Marques Serra et devrait constituer le point de départ de son projet de thèse.

3.3.1 Système et méthode de quantification de l'expression

Choix de l'enzyme

Parmi les nombreuses enzymes existantes, notre attention a été retenue par la famille des β -lactamases, qui sont des enzymes capables d'hydrolyser les groupements céphalosporines. Elles sont en particulier connues car ce sont elles qui permettent d'inactiver l'ampicilline et de conférer une résistance à cet antibiotique aux cellules la sécrétant. En plus d'être des enzymes courantes, elles sont aussi intéressantes du point de vue des nombreux substrats qu'elles peuvent convertir.

En vue d'applications ultérieures, il est nécessaire de pouvoir disposer de substrats dont la fonction biochimique est modifiée après conversion. La connaissance des substrats des β -lactamases est aujourd'hui très complète, en particulier par l'attention portée depuis la moitié du XXème siècle à la chimie de la pénicilline et des motifs céphalosporines. De façon générale, tout en conservant une grande efficacité catalytique, la spécificité des β -lactamases est très large vis-à-vis des groupements supplémentaires porté par la céphalosporine [123]. Cette tolérance a permis la construction de nombreuses pro-drogues activables pouvant libérer diverses molécules comme du gaz moutarde ou des agents thérapeutiques comme des antimétabolites ou des immunorépresseurs. Un exemple particulièrement intéressant est celui du substrat pouvant acquérir une fonction anticancéreuse, comme la pro-drogue ProTax développée en 1995 par Rodrigues *et al.* [124]. Cette molécule est un précurseur non actif de l'anticancéreux Taxol, qui est dégradé par une β -lactamase en trois molécules, dont l'une d'entre elle est le taxol. Même si ce précurseur n'est pas commercial, ce substrat est une illustration supplémentaire des nombreuses possibilités de création de pro-drogues activables à grande vitesse lors du contact avec une β -lactamase. Ce type de molécule a aussi été développée pour la libération des anticancéreux doxorubicine, paclitaxel et mitomycine C [123].

Du point de vue de la quantification de l'expression, la production d'une enzyme de ce type ne permet pas d'utiliser directement la mesure de fluorescence, contrairement à la GFP. Du fait du caractère courant des β -lactamases, il a été développé des substrats spécifiques chromo- et fluorogéniques qui sont aujourd'hui commerciaux. Ils permettent ainsi de caractériser indirectement la présence d'enzyme. C'est en particulier le cas de la nitrocéfine (Calbiochem), que nous avons utilisé [125] (FIGURE 3.8). Cette molécule qui contient un groupement céphalosporine est initialement jaune (maximum d'absorption à 390 nm). Lors de son hydrolyse, sa conjugaison est modifiée et la fait changer de couleur : elle devient rouge (maximum d'absorption à 486 nm). Ce changement dans le spectre d'absorption permet donc de suivre sa conversion par spectrophotométrie UV/visible et de disposer d'une observable pour quantifier le niveau de synthèse de l'enzyme.

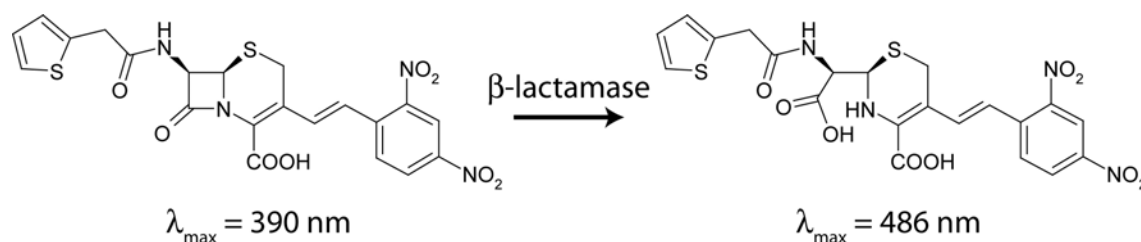


FIGURE 3.8 – Nitrocéfine avant et après hydrolyse par une β -lactamase.

Système d'expression

Le système d'expression *in vitro* est analogue au PURESystem utilisé pour l'expression de GFP. Obtenu chez un autre fournisseur (New England Biolabs), il s'appelle désormais PURExpress *In Vitro* Protein Synthesis Kit. Il provient de la reconstitution des composants nécessaires pour réaliser la translation chez *E. coli*.

Le plasmide utilisé est appelé T7lac. Sa préparation est décrite en détail en Annexe B et a été réalisée par mes soins au Collège de France dans l'équipe du Prof. Prochiantz, avec l'aide du Prof.

Michel Volovitch. D'une longueur d'environ 2,5 kbp, il contient un gène codant (1,2 kb) pour la β -lactamase venant du transposon Tn3 [126], précédé d'un promoteur T7 et se poursuivant par un terminateur T7. Ce gène synthétique a été produit par Eurofins.

L'expression de l'enzyme est réalisée en mélangeant, dans cet ordre, de l'eau "DNAse-free", la solution A du PURExpress, le plasmide T7lac, l'AzoTAB et la solution B du PURExpress. La concentration finale en ADN est de $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$. La solution est illuminée, ou non, à 365 nm (UV) ou 420 nm (bleu) pendant 4 minutes. L'ensemble est ensuite incubé à 37°C pendant un certain temps, dont le minimum sera déterminé par la suite.

Quantification de l'enzyme

La mise en contact de l'enzyme et de la nitrocéfine se fait après incubation à 37°C . La réaction est stoppée en plongeant le tube où a eu lieu l'expression dans de la glace. L'échantillon est dilué jusqu'à un volume de $200 \mu\text{L}$ avec de la nitrocéfine (concentration finale de $36,3 \mu\text{g.mL}^{-1}$) dans un tampon phosphate $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, $\text{pH} = 7$. Le mélange est rapidement déposé dans le puit d'une microplaque. Le suivi temporelle de l'évolution de la couleur est réalisé en mesurant l'absorbance de la solution à 490 nm avec un lecteur (Synergy HT, Biotek). Il est préférable de suivre l'augmentation à cette longueur d'onde plutôt que la diminution à 405 nm car même si les coefficients d'extinction molaire sont similaires ($\sim 20 \text{ } 500 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$), la différence d'absorbance d'une forme à l'autre est plus grande. Pour que les cinétiques puissent être comparées, la décomposition de la nitrocéfine a lieu à température fixée (37°C).

Pour obtenir la quantité d'enzyme synthétisée à partir du suivi de conversion de la nitrocéfine, nous utilisons la relation suivante, qui est issue de la théorie de Michaelis-Menten :

$$v = \frac{v_{max}[S]}{K_m + [S]} \quad (3.1)$$

avec v la vitesse de la réaction enzymatique à un instant donné pour une concentration en substrat $[S]$, v_{max} la vitesse maximale (pour une concentration saturante en substrat), et K_m la constante de Michaelis spécifique de l'enzyme. v_{max} est aussi égale dans ce modèle à $k_2[E]_0$, k_2 étant la constante de dissociation du complexe enzyme-substrat et $[E]_0$ la concentration initiale en enzyme. La mesure de ces vitesses aura lieu au temps initial où v_0 est donnée par la pente de la tangente à l'origine de la courbe de cinétique d'apparition du produit. Au temps initial, $[S]$ étant fixée et égale entre chaque expérience, v_0 est donc proportionnelle à v_{max} qui est elle-même proportionnelle à $[E]_0$. Les vitesses mesurées pourront donc être considérées comme proportionnelles à la quantité d'enzyme présente.

3.3.2 Expression photodépendante

Cinétique d'expression

Pour connaître le temps de réaction à 37°C nécessaire à la synthèse du maximum d'enzyme, c'est d'abord un suivi des cinétiques de décomposition à différents temps d'incubation qui a été effectué (FIGURE 3.9). Cette expérience est réalisée en prélevant régulièrement un même volume dans un mélange plasmide T7lac + PURExpress durant l'incubation à 37°C . Cet aliquot est dilué avec de la nitrocéfine et l'évolution de l'absorbance en fonction du temps est suivie. Pour chaque courbe les pentes des tangentes au temps initial sont déduites graphiquement comme sur les exemples de la FIGURE 3.9 a. Les valeurs de pentes sont ensuite rassemblées en fonction

du temps d'incubation (FIGURE 3.9 b). Même en l'absence de β -lactamase, la nitrocéfine subit une hydrolyse spontanée, ce qui fait que la valeur au temps $t = 0$ n'est pas strictement nulle. Ce phénomène n'a pas été soustrait des mesures. Toutes ces données montrent l'apparition d'un plateau après un peu plus d'une heure d'expression, pour lequel il n'est plus possible de synthétiser plus d'enzyme. Ceci est similaire avec ce que nous avons constaté pour l'expression de la GFP. Le temps d'incubation retenu pour la suite sera finalement le même, fixé à 75 min.

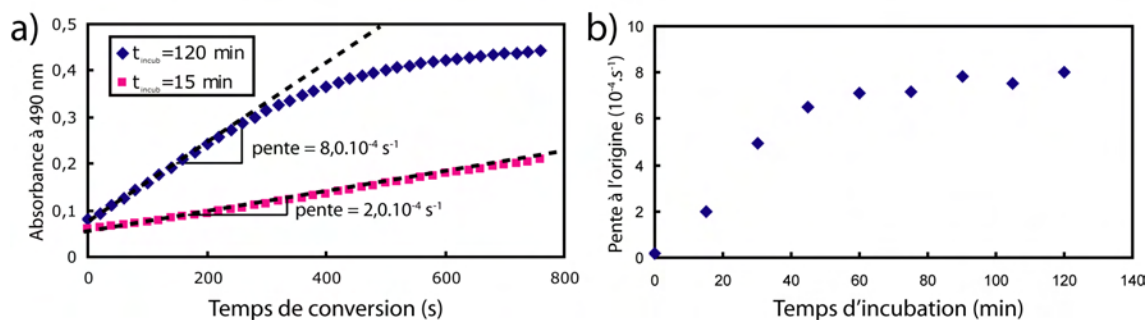


FIGURE 3.9 – Quantité relative de β -lactamase synthétisée en fonction du temps d'incubation à 37°C. a) Suivi de la cinétique de conversion de la nitrocéfine après dilution de mélanges d'expression ayant été incubés 15 et 120 minutes à 37°C. L'absorbance est mesurée à 490 nm, qui correspond au maximum d'absorption du produit de la conversion de la nitrocéfine. De ces courbes sont déduites les pentes de la tangente à l'origine qui est proportionnelle à la quantité d'enzyme présente. b) Pentes des tangentes à l'origine après suivi de la conversion de la nitrocéfine pour différents temps d'incubation du mélange à 37°C.

Influence de la concentration en AzoTAB

L'expression de β -lactamase a été ensuite réalisée avec différentes concentrations d'AzoTAB et avec ou sans illumination UV (FIGURE 3.10). L'éclairement est fait immédiatement après mélange des composants sous lampe UV durant 4 minutes à température ambiante, juste avant la période d'incubation. Cette durée a été choisie après comparaison de l'effet de plusieurs temps d'exposition. C'est elle qui permet d'avoir une bonne différence d'expression tout en gardant un bon niveau dans la quantité obtenue (photodégradation minimale du milieu). L'activité d'expression est définie comme la quantité d'enzyme divisée par la quantité d'enzyme obtenue pour $[\text{AzoTAB}] = 0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$.

Plusieurs commentaires caractérisent cet ensemble d'expériences. D'une part sans UV, le niveau d'expression diminue rapidement avec $[\text{AzoTAB}]$, de façon relativement linéaire, jusqu'à être pratiquement nul pour $[\text{AzoTAB}] = 2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$. Ceci est analogue à ce qui a été observé pour l'expression de GFP. D'autre part avec illumination UV, la quantité d'enzyme exprimée diminue aussi rapidement mais reste toujours supérieure à celle sans UV. Cet écart est maximal pour $[\text{AzoTAB}] = 2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ où la différence d'expression avec et sans UV est plus grande d'un facteur 4 environ.

Réversibilité

Pour mieux caractériser le photocontrôle et en particulier l'effet d'une illumination avec de la lumière bleue, une expérience supplémentaire a été mise en oeuvre. Il s'agit d'observer la quantité

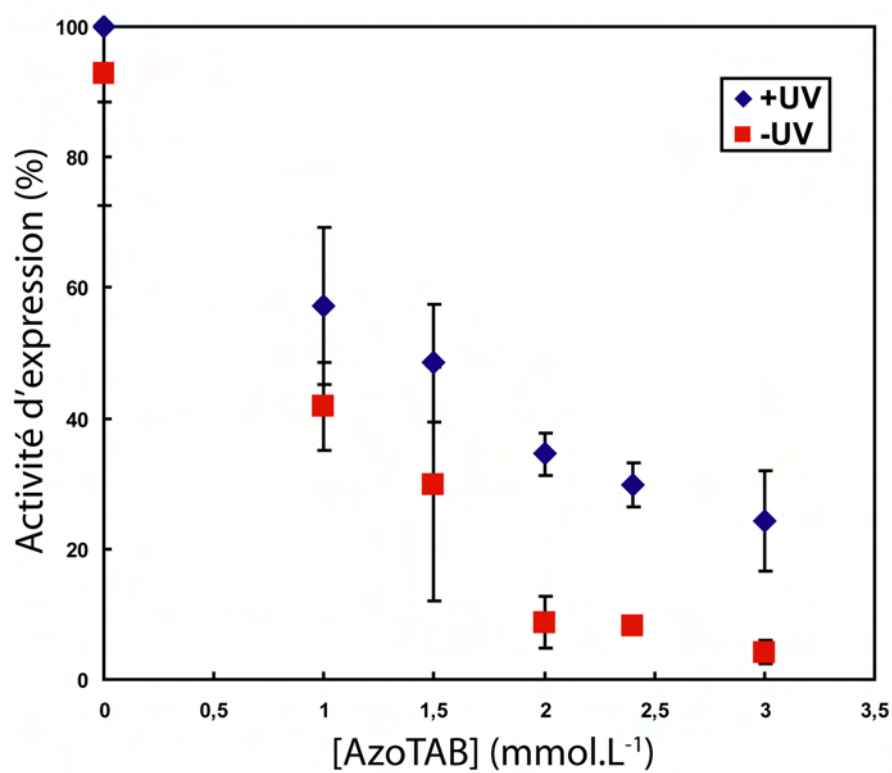


FIGURE 3.10 – Activité d'expression de β -lactamase synthétisée en fonction de la concentration en AzoTAB et de la présence ou non d'illumination UV (4 minutes) au début de la réaction d'expression. Pour chaque condition, le temps d'incubation à 37°C est de 75 minutes. Les valeurs et les barres d'erreur correspondent à la moyenne de trois expériences.

d'enzyme produite en présence d'AzoTAB après avoir soumis l'échantillon, avant incubation, à une alternance de lumière UV et visible. La lumière bleue a été sélectionnée grâce à une lumière blanche et un filtre passe bande à 480 ± 30 nm. La concentration en AzoTAB retenue est de $2,4 \text{ mmol.L}^{-1}$. Les résultats sont rassemblés FIGURE 3.11. Nous retrouvons bien la tendance précédente où l'expression est nettement augmentée après 4 minutes d'illumination UV, d'un facteur 4 environ. Une illumination bleue successive (4 minutes) avant l'incubation a pour effet de réduire la quantité d'enzyme exprimée, à un niveau similaire à celui de l'échantillon n'ayant pas subi d'éclairement. Enfin après un cycle UV/lumière bleue, une même illumination UV permet un retour de l'expression à un niveau analogue à celui atteint après la première illumination UV.

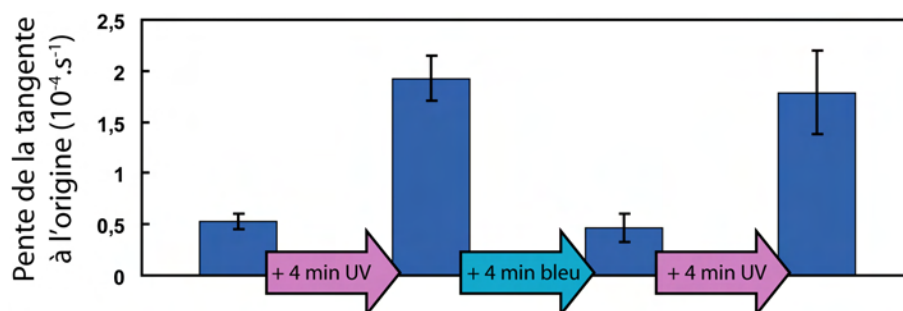


FIGURE 3.11 – Variation de la quantité relative d'enzyme produite (après 75 minutes d'incubation à 37°C) en fonction d'illuminations alternatives UV et bleue, après mélange et juste avant le lancement de la réaction d'expression.

Cette expérience nous montre la réversibilité du processus d'activation et d'inhibition de l'expression de l'enzyme par l'AzoTAB. Ce caractère est lié à la réversibilité de la photoisomérisation de l'AzoTAB, qui peut être alternée librement entre les configurations *cis* et *trans* du moment que les illuminations UV et visibles sont assez longues. Il semble donc que la conformation du plasmide T7lac suive aussi le changement de polarité photoinduit de l'AzoTAB, même lorsqu'une séquence UV-lumière bleue est appliquée. Comme pour l'expression de GFP, nous constatons ici que la lumière bleue peut aussi être utilisée pour stopper la réaction d'expression.

Des expériences supplémentaires sont en cours de réalisation pour démontrer au cours du temps que l'expression de l'enzyme peut être activée et inhibée de façon dynamique, de façon analogue à ce qui a été obtenu auparavant pour la GFP (FIGURE 3.3 b).

3.4 Conclusion

Malgré sa faible affinité pour les acides nucléiques, ces travaux montrent d'abord que les changements de conformation induits par l'AzoTAB restent efficaces même lorsque le milieu contient une teneur importante en différents sels ainsi que plusieurs protéines et d'autres molécules nécessaires aux réactions d'expression génétique. Les concentrations pour lesquelles les effets précédents sont observés (de l'ordre du mmol.L^{-1}) restent élevées par rapport à celle des molécules qui les réalisent *in vivo* (entre le nmol.L^{-1} et le mmol.L^{-1}). Mais notre stratégie reste indépendante de la séquence de l'ADN, ce qui ne permet pas non plus d'avoir de fortes constantes d'affinité liées à des spécificités locales. Du point de vue du mécanisme, il a été montré que chaque étape de l'expression est contrôlée par le repliement de l'acide nucléique situé en amont de la réaction : la conformation de l'ADN régule la transcription, tandis que l'agrégation des ARN

messagers contrôle la translation.

Il est intéressant de comparer notre approche avec l'autre principale stratégie existante de photocontrôle de l'expression génétique (qui a parfois été démontrée *in vivo*). Cette méthode repose sur des espèces cagées qui sont rendues actives après illumination [127, 128]. Ces molécules cagées peuvent être de l'ADN, des peptides, des protéines, des enzymes ou de petites molécules fonctionnelles nécessaires au processus d'expression (par exemple l'estradiol ou l'ecdysones). Malgré son efficacité, cette technique est la plupart du temps irréversible, la perturbation ne pouvant être stoppée par une reformation de la molécule cagée initiale sous illumination. D'autre part, cette stratégie est en général spécifique, ce qui est un atout pour sélectionner une cible précise, mais ce qui nécessite la synthèse systématique d'une molécule adéquate. A l'opposé, le photocontrôle de l'expression génétique basé sur l'interaction ADN-pNAB offre à la fois un caractère réversible et, pour un unique pNAB utilisé, une relative indépendance vis-à-vis de la séquence de l'ADN puisqu'il est lié à un changement conformationnel. Cette indépendance peut être considérée comme une limite, elle offre néanmoins des avantages, en particulier de pouvoir être applicable à tout gène codant pour une fonction d'intérêt.

Notre stratégie a été démontrée au départ avec une protéine fluorescente non fonctionnelle, pour disposer d'une observable simple. Nous l'avons ensuite transposée au photocontrôle de la synthèse d'une enzyme β -lactamase. Le contrôle lumineux s'est avéré être effectif de manière similaire au cas de la GFP. En introduisant un substrat dans le milieu d'expression, c'est finalement un photocontrôle de sa conversion dont nous disposons. Le choix d'un substrat pouvant acquérir une fonction (en particulier une activité thérapeutique), permet d'imaginer un système où la production d'une molécule d'intérêt est photoinduite, pour quelle puisse agir de façon sélective, au moment et à l'endroit où l'illumination est réalisée.

L'équipe travaille désormais sur l'application de notre stratégie à la synthèse d'une protéine membranaire de type connexine, qui joue le rôle de canal ionique. De cette manière, en imaginant pouvoir localiser le système d'expression au voisinage d'une membrane (bicouche ou liposome), il serait possible de fonctionnaliser la paroi par illumination.

Conclusion de la deuxième partie

La modification de la compaction que peut subir l'ADN est une question qui est à la fois complexe et omniprésente dans les mécanismes fondamentaux de l'expression génétique et qui peut être aisément étudiée dans des systèmes minimaux par le physico-chimiste.

Nous avons tout d'abord décrit dans cette partie le phénomène de compaction de l'ADN en milieu *in vitro* en s'intéressant aux différentes caractéristiques qui permettent de l'expliquer et qui représentent des paramètres sur lesquels jouer pour provoquer la transition. Parmi les différents agents de compaction qui ont été décrits, la récente possibilité de photocontrôler de manière réversible l'état de compaction de l'ADN grâce à un tensioactif photochrome, l'AzoTAB, a retenu notre attention.

Dans le but de diminuer la concentration nécessaire en AzoTAB pour provoquer la transition de compaction, la synthèse et la caractérisation de deux nouveaux tensioactifs photosensibles a été ensuite réalisée. L'augmentation de la valence de l'AzoTAB n'ayant pu aboutir, seules deux nouvelles molécules (l'AzoC5 et l'AzoC8) dont la partie apolaire est accrue ont été synthétisées. Par rapport à l'AzoTAB, ces deux espèces sont plus hydrophobes et permettent effectivement de compacter l'ADN à des concentrations inférieures. Néanmoins elles se distinguent par leur capacité à permettre une décompaction *in situ* induite par la lumière. L'AzoC8 est trop hydrophobe après photoisomérisation pour permettre un déplieement de l'ADN. Par contre, l'AzoC5 représente un compromis optimal entre une affinité importante pour l'ADN et un changement de polarité suffisant. Il permet un photocontrôle réversible de la compaction de l'ADN à faible concentration en tensioactifs.

C'est enfin l'application du photocontrôle de la compaction de l'ADN à la synthèse de protéines qui a été étudiée. Il a été auparavant démontré que la façon dont la molécule codante est compactée, autorise ou non la mise en place des réactions d'expression génétique. Nous avons montré avec l'AzoTAB, qu'à travers la transition de compaction de l'ADN, la lumière permet effectivement de modifier les niveaux de production d'ARN et de protéine. Il a été observé que l'AzoTAB intervient aussi dans l'étape de translation, en modifiant l'état de condensation de l'ARN. Cette stratégie a été démontrée comme faiblement dépendante de la séquence et de la longueur de l'ADN initial. Appliquée initialement à la GFP, notre méthode a été transposée à la synthèse d'une enzyme, la β -lactamase. Le fait de pouvoir exprimer cette enzyme de manière photodépendante, offre des perspectives de contrôle sur la façon dont des substrats pro-actifs (précurseurs de médicaments, par exemple) pourront être convertis. En choisissant une séquence codant pour une autre protéine fonctionnelle, en particulier des protéines membranaires, ce sont d'autres fonctions biomimétiques qui pourront être modulées par la lumière.

Aussi petite et simple que soit la molécule d'AzoTAB, cette partie montre en quoi son interaction avec un objet biologique dans un environnement approprié permet de réguler à l'échelle moléculaire un processus biologique complexe, la régulation génétique, à l'aide d'un stimulus lumineux.

Troisième partie

Photostimulation mésoscopique : préparation et perturbation de modèles membranaires

Chapitre 1

Les vésicules unilamellaires géantes

Dans ce chapitre bibliographique vont être décrites les vésicules unilamellaires géantes (GUV), qui résultent de l'autoassemblage de tensioactifs, de manière à former une membrane sphérique délimitant les milieux internes et externes. Les GUV représentent des édifices d'intérêt pour de nombreuses disciplines, aussi bien en biophysique qu'en biologie cellulaire ou de façon plus exploratoire, en médecine. Nous allons constater que leur utilisation croissante brouille la frontière entre le monde du vivant et celui des objets artificiels.

Après avoir précisément décrit leur structure, nous nous intéresserons aux différentes méthodes permettant de les préparer pour comprendre la façon dont leurs composants peuvent s'autoorganiser. Ce sont enfin leurs nombreuses utilisations qui seront détaillées.

1. Les vésicules unilamellaires géantes

1.1	Des phospholipides à la vésicule	95
1.1.1	Les phospholipides	95
1.1.2	Les vésicules	95
1.2	Les méthodes de formation des GUV	97
1.2.1	Par gonflement d'un film	97
	Le gonflement spontané	97
	L'électroformation	98
	Principe	98
	Optimisation	99
1.2.2	Par transfert d'émulsion	100
1.2.3	Par microfluidique	100
1.2.4	Comparaison	104
1.3	Applications des vésicules	104
1.3.1	Applications des SUV	104
1.3.2	Applications des GUV	104
	Microréacteurs	105
	Modèles de membrane cellulaire	105
	Cellules artificielles	106
1.4	Conclusion	107

1.1 Des phospholipides à la vésicule

1.1.1 Les phospholipides

Les phospholipides sont des tensioactifs dont la tête hydrophile contient un groupe phosphate. Pour les phospholipides naturels, leur queue hydrophobe est toujours composée d'une double chaîne aliphatique.

Ils se distinguent d'une part par la nature de leur tête, qui une fois en solution, est le plus souvent zwitterionique (tête phosphatidylcholine PC ou phosphoéthanolamine PE), mais pouvant être aussi chargée (par exemple avec une tête phosphatidylsérine PS) (FIGURE 1.1). Il n'existe pas de phospholipide naturel chargé positivement dans les conditions de pH physiologique, mais des molécules de synthèse sont couramment utilisées.

C'est d'autre part leurs chaînes carbonées qui permettent de les caractériser. Elles contiennent en général 12 à 24 carbones, avec différents degrés d'insaturations. La longueur de la chaîne a une incidence directe sur la stabilité de l'assemblage phospholipidique. Celle-ci est caractérisée par la température de transition T_m , qui sépare l'existence sous une phase gel ou sous une phase cristal liquide. Dans la phase gel, les molécules sont cristallisées et ont peu de degrés de liberté, alors que dans la phase cristal liquide, les chaînes sont désordonnées et les molécules peuvent se déplacer les unes par rapport aux autres comme dans un liquide. Plus le nombre de carbones est élevé, plus T_m est élevée. La présence d'insaturations introduit des coudes dans la chaîne, ce qui rend la cristallisation plus difficile, T_m diminue. La nature de cette queue est décrite dans la première partie du nom du phospholipide. Par exemple, lorsqu'elle est composée de deux chaînes de 18 carbones qui comprennent chacune une insaturation entre les carbones 9 et 10 (la plus courante dans les phospholipides composant les membranes cellulaires), le préfixe dioléoyl (DO) est associé à la molécule. A une queue composée de deux chaînes de 16 carbones saturées est associé le préfixe dipalmitoyl (DP).

1.1.2 Les vésicules

En tant que tensioactifs, les phospholipides sont capables de s'assembler en structures organisées, aussi bien sous phase solide que dissous dans l'eau. Comme le décrit Israelachvili [129], la nature de l'édifice est fortement liée à la géométrie de la molécule, en particulier du rapport de la taille de la tête sur celle de la queue. Suivant la nature du solvant et la température, l'autoorganisation peut conduire à la formation de micelles, de cylindres, de lamelles ou de micelles inverses. Les diagrammes de phase peuvent s'avérer variés. Dans le cas des phospholipides pouvant former des vésicules, leur géométrie est cylindrique. En l'absence de solvant, ils s'alignent queues contre queues formant alors une lamelle plane, dont l'épaisseur est d'environ 4 nm. Elle est recouverte d'autres lamelles de façon à ce que les têtes et les queues soient en contact avec des parties analogues. Cet empilement de bicouches constitue une phase lamellaire qui est suffisamment stable pour être conservée au-delà de sa température de fusion et montre en général une structure cristal liquide lyotropique.

En présence de solvant polaire, ces lamelles se séparent de manière à ce que les bicouches soient isolées, la tête des phospholipides orientée à l'extérieur (FIGURE 1.2). Le repliement tridimensionnel d'une bicouche sur elle-même permet la formation d'une vésicule encore appelée liposome. Ceci a été mis en évidence pour la première fois en 1964 par Bangham et Horne [130]. Différents types de vésicules ont été distingués depuis, en fonction de leur taille et de leur organisation. Elles peuvent être multilamellaires (MLV) lorsque leur membrane est composée de

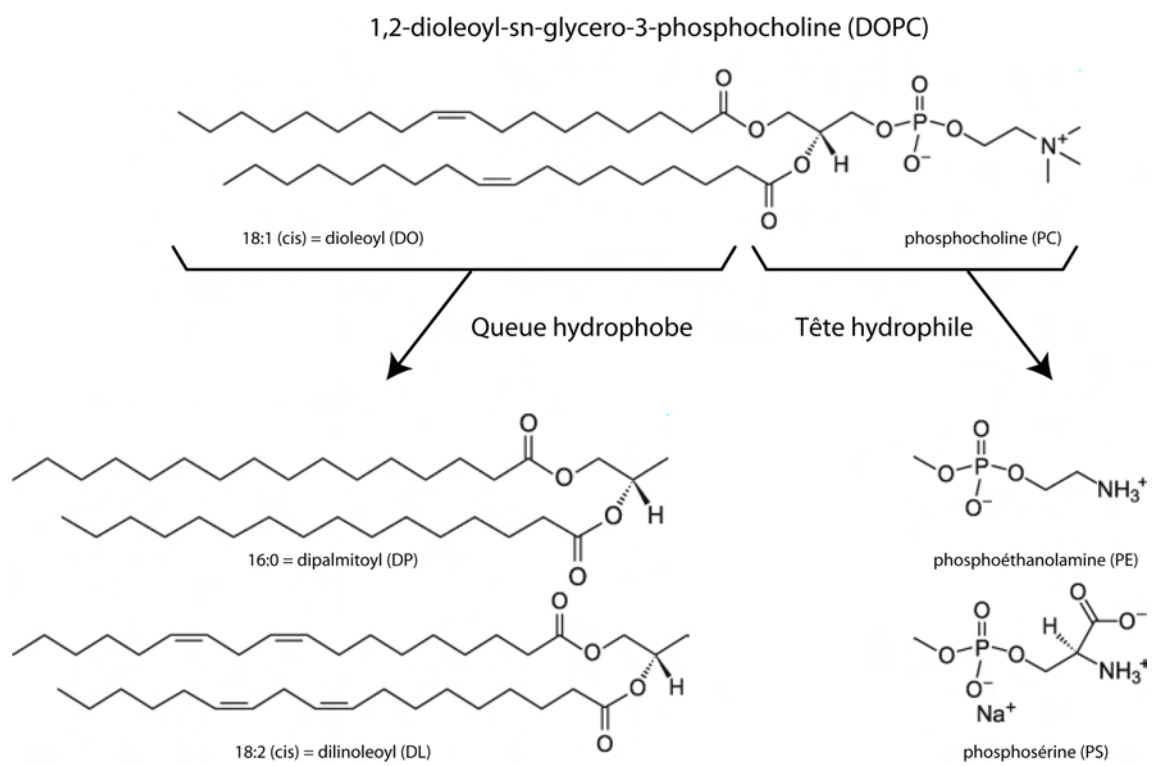


FIGURE 1.1 – Formules de différents phospholipides, suivant la nature de leur queue hydrophobe et de leur tête hydrophile.

plusieurs bicouches ou unilamellaires si une seule bicouche est présente. Dans ce dernier cas, trois types existent ; les petites vésicules unilamellaires (SUV) lorsque leur taille est inférieure à 100 nm ; les grandes vésicules unilamellaires (LUV) entre 100 nm et 1 μm ; et les vésicules unilamellaires géantes (GUV) au-delà. Cette séparation est liée aux conséquences que leur taille induit sur leurs propriétés mécaniques, leur méthode d'obtention et leur domaine d'utilisation. En particulier, la façon de les observer est différente : contrairement aux autres, les GUV pourront être étudiées par microscopie optique.

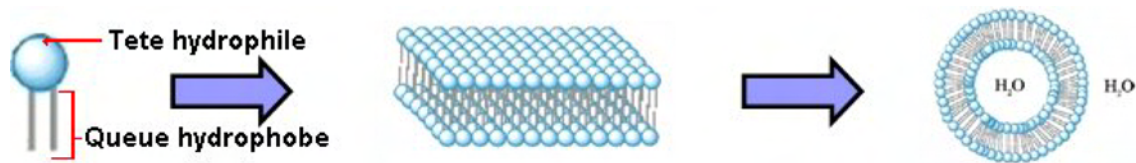


FIGURE 1.2 – Autoassemblage de phospholipides en solvant aqueux sous forme de bicouche puis de vésicule par repliement. Adapté de [131].

1.2 Les méthodes de formation des GUV

De nombreuses méthodes ont été développées pour fabriquer des vésicules, chacune répondant à un besoin spécifique. Du fait de leur robustesse, la formation efficace et contrôlée de SUV et de LUV a connu une mise au point plus rapide. Par simple introduction de la pointe d'un sonicateur dans une solution de vésicules multilamellaires, il est possible de les convertir en SUV et en LUV [132], dont la taille dépend de la puissance et du temps d'exposition aux ultrasons [133]. Mais cette technique simple fournit une grande polydispersité en taille et il est courant d'extruder ensuite le mélange pour en homogénéiser la taille des vésicules [134]. Ceci est réalisé en faisant traverser la solution à travers une membrane nanoporeuse, dont la taille des trous déterminera la taille des vésicules.

Contrairement aux SUV, les GUV sont mécaniquement plus fragiles. Des méthodes distinctes ont dû être développées. Même si un plus grand nombre de variantes existe [135], nous décrivons ici les trois grandes catégories. Chacune possède des avantages et des inconvénients au niveau du contrôle de la taille, de l'unilamellarité, des quantités formées de GUV, ainsi que dans l'encapsulation possible et leur facilité de mise en oeuvre.

1.2.1 Par gonflement d'un film

Le gonflement spontané

La première méthode qui a permis d'obtenir des vésicules géantes est celle du gonflement spontané, imaginée en 1969 par Reeves et Dowben, encore appelée technique de l'hydratation douce [136]. Pour la réaliser, un solvant volatil contenant des phospholipides (classiquement du chloroforme) est déposé sur un substrat lisse, par exemple le fond d'un tube en verre. Un film multilamellaire est formé après son évaporation (qui peut être forcée sous flux d'azote). Son épaisseur doit être de l'ordre de la centaine de nanomètres, ce qui correspond à quelques dizaines de bicouches. Une solution aqueuse est alors ajoutée et permet d'obtenir après quelques heures ou quelques jours d'incubation, des GUV à la surface du film. La composition de la solution

est importante : elle contient généralement des sucres et des sels en faible concentration, de manière à ce que l'hydratation des bicouches puisse se faire de façon régulière et individuelle, pour éviter le gonflement d'objet multilamellaires. L'agitation du milieu est proscrite, pour ne pas décoller les films de façon trop violente. Cette méthode marche particulièrement bien pour les films contenant un certain pourcentage de phospholipides chargés [137].

De façon générale, le gonflement spontané présente l'avantage d'être très simple à mettre en oeuvre et d'offrir des possibilités d'encapsulation faciles et variées. Malgré tout, la tendance à la multilamellarité est forte (la fraction de véritables GUV ne dépasse pas la moitié [138]), de même que pour le polymorphisme (obtention de tubes et d'autres objets non sphériques).

L'électroformation

Principe L'électroformation est d'une certaine manière une version améliorée du gonflement spontané. Son principe est décrit FIGURE 1.3 et a été présenté à l'origine par Angelova et Dimitrov en 1986 [139]. Ici en plus du gonflement naturel auquel est soumis le film de phospholipides, un champ électrique est appliqué perpendiculairement à l'électrode sur laquelle il a été déposé. La tension de quelques volts qui est appliquée favorise le décollement des bicouches les unes par rapport aux autres et permet la formation de vésicules unilamellaires en surface de la multicouche. Celles-ci sont retenues au film par un ou plusieurs tubules. L'extraction du liquide de la cellule d'électroformation suffit à récupérer les GUV. Initialement utilisée avec un champ électrique constant, l'application d'une tension alternative (environ 2 V, à 10 Hz) a montré plusieurs avantages [140], en particulier le fait d'obtenir une population de GUV plus homogène.

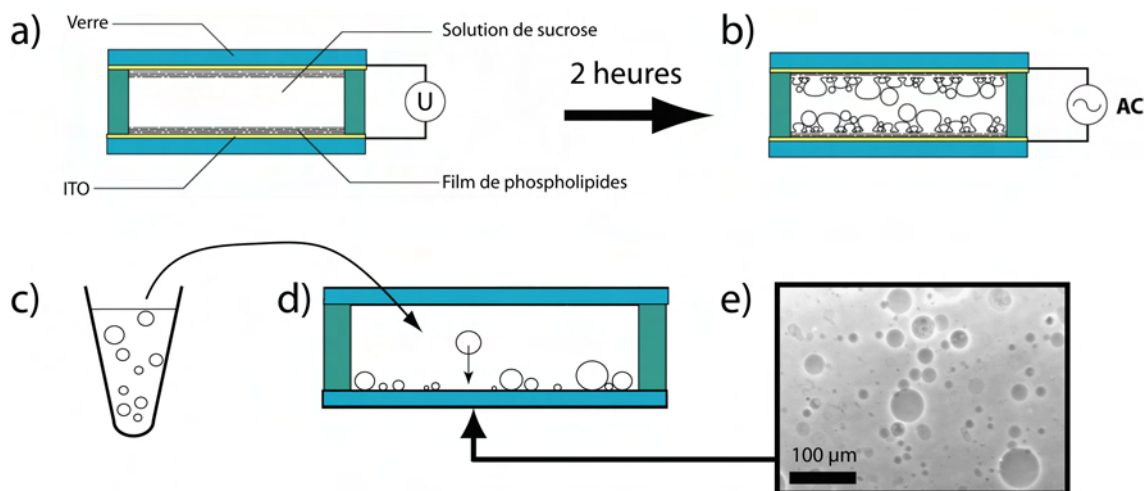


FIGURE 1.3 – Schéma de principe de l'électroformation et de l'observation des GUV obtenues. a) La cellule de gonflement est composée de deux électrodes en regard recouvertes d'ITO sur lesquelles a été déposé un film de phospholipides. Le tout est baigné dans une solution de sucrose. b) Après application d'un champ électrique pendant au moins 2 heures, des vésicules ont gonflé sur les électrodes. c) Le contenu de la cellule d'électroformation est extrait. d) Une partie de cette solution est déposée dans un puits d'observation, en présence d'une solution de glucose isotonique de plus faible densité. e) Après une heure de sédimentation, les GUV reposent au fond du puits. f) Par microscopie à contraste de phase, plusieurs vésicules peuvent être observées dans un même plan.

Cette méthode offre l'avantage de pouvoir être appliquée avec de nombreux phospholipides

(DOPC, DOPE, EPC [139], DOPS [141], DGDG [140], DMPC [139], DLPC [138], POPC [138]), avec des mélanges de ces molécules, ainsi qu'avec d'autres molécules amphiphiles comme des duplex de cyclodextrines [142]. Sa mise en oeuvre est relativement simple et a été réalisée avec différents types d'électrodes (au départ du platine, plus couramment de l'oxyde d'indium et d'étain (ITO), mais aussi du silicium [143] et des substrats non conducteurs [144]) et des solutions de composition variable (en particulier la possibilité de la faire dans des conditions physiologiques [145]).

Les autres avantages de la méthode sont de fournir des vésicules particulièrement sphériques et unilamellaires, dont la membrane est très régulière. Par rapport au gonflement spontané, le champ électrique améliore grandement leur unilamellarité [146, 138] : en moyenne plus de 95% des vésicules sont formées d'une unique bicouche et 80% sont absolument sans défaut (contre 40% pour le gonflement spontané).

Tous les paramètres de l'électroformation (nature de l'électrode, composition et structure du film de phospholipides, température, fréquence et intensité du champ électrique, composition de la solution de gonflement, temps de gonflement) ont une influence sur le nombre, la taille et la polydispersité finale des GUV. La distinction de leur rôle fait toujours l'objet de travaux, en particulier pour préciser le mécanisme précis du gonflement des vésicules, qui reste à l'heure actuelle uniquement qualitatif.

Cette méthode possède par contre deux principaux inconvénients : les possibilités d'encapsulation (par exemple de solutions salines, ou de grands objets comme les molécules d'ADN) sont très limitées et le contrôle de la taille des GUV est très faible (distribution en taille très large, allant de 1 à 200 μm de diamètre).

Optimisation La volonté d'améliorer la technique pour produire des GUV monodisperses par électroformation fait toujours l'objet de travaux, en particulier à travers le contrôle de l'organisation du film de phospholipides sur l'électrode. Au lieu d'un dépôt manuel (en translatant le cône d'une seringue contenant la solution de phospholipides sur le substrat) qui n'offre que peu de maîtrise sur son épaisseur et sa régularité, la technique de "spin-coating" a été évaluée [141]. En étalant une goutte de solvant volatil contenant les phospholipides par rotation paramétrée sur l'électrode, c'est l'épaisseur du film en résultant qui peut être contrôlée avec précision (entre 20 et 100 nm d'épaisseur, à ± 2 nm). Même si les GUV formées sont plus homogènes en taille que sans cette technique de dépôt, le contrôle est limité car plus que l'épaisseur moyenne du film, c'est la façon dont il est fracturé qui semble importer sur l'aspect final des GUV. L'importance de ce paramètre a aussi été montrée par notre équipe en utilisant des électrodes non plus planes, mais comportant des microstructures régulières [143, 147] (FIGURE 1.4 a). En créant des micropiliers d'une hauteur de 170 nm sur une électrode en silicium, il a été observé que le diamètre des piliers influence la taille des GUV électroformées. Ces microstructures modifient l'organisation du film qui est déposé dessus, en créant plus ou moins d'irrégularités suivant leur densité (FIGURE 1.4 b). De même, la chimie de surface de l'électrode a aussi été identifiée comme jouant sur la taille finale de GUV. Sur une surface plane, la nature de la couche superficielle du silicium joue en effet sur la façon dont le film va se structurer. Enfin, c'est la délimitation de l'aire du film qui permet de borner la taille maximale des GUV. Ceci a été montré en pratiquant le "micro-contact printing" sur un film de phospholipides [148] (FIGURE 1.4 c). Le motif qui est déposé sur l'électrode est constitué de carrés réguliers de multicouches de phospholipides d'une taille d'environ 10 μm de côté. En appliquant l'électroformation à ce film, des GUV de taille similaire sont visibles (FIGURE 1.4 d). Néanmoins, l'analyse complète des GUV récupérées n'a

pas été mentionnée par les auteurs. Le micro-contact printing offre un contrôle latéral précis du dépôt, mais ne permet pas un contrôle en épaisseur, pour modifier le nombre de bicouches superposées. Un autre moyen de générer un film de phospholipides avec une étendue spatiale désirée, sera décrit précisément dans le chapitre suivant. Il s'agit de faire migrer la frontière d'une goutte de liquide contenant des phospholipides sur une surface microstructurée (FIGURE 1.4 e). Cette méthode, avec laquelle il est possible de contrôler la quantité de molécules déposées, permet d'obtenir des GUV relativement monodisperses en taille après électroformation.

1.2.2 Par transfert d'émulsion

Une autre méthode permettant la formation de GUV est la technique du transfert de phase à partir d'une émulsion. Elle est apparue pour subvenir aux faibles possibilités d'encapsulation des méthodes précédentes [149, 150]. Elle consiste en deux étapes (FIGURE 1.5). Une émulsion est formée dans un premier temps par mélange à la pipette, pour obtenir des gouttes micrométriques de solution aqueuse dans une phase d'huile et stabilisée par des phospholipides. De cette manière, plusieurs bicouches de phospholipides se superposent aux interfaces eau-huile. L'émulsion est ensuite versée dans un puits où se trouve de l'huile contenant des phospholipides, superposée sur une solution aqueuse. Lors de leur décantation, les gouttes traversent l'interface eau-huile où est présente une monocouche ; ceci permet la formation d'une unique bicouche. Cette méthode a même permis de former des vésicules de taille millimétrique [151]. Elle offre plusieurs avantages : elle est simple à mettre en oeuvre, l'encapsulation est aisée [152] (tout simplement liée à ce qui est introduit au moment de la formation de l'émulsion initiale) et elle permet même de former des GUV à membrane asymétrique [153] (en utilisant deux types de phospholipides distincts pour l'émulsion et le transfert). Par contre, la membrane formée contient souvent des défauts : les cas de vésicules multilamellaires ou ayant piégé de l'huile sont fréquents. Enfin le contrôle de la taille est faible car dépendant directement de la taille de l'émulsion de départ et les GUV obtenues restent accrochées à l'interface. Ce dernier point peut être une bonne chose pour les observer simultanément, mais est une contrainte pour pouvoir les utiliser dans un autre environnement.

1.2.3 Par microfluidique

Les méthodes précédentes donnent en général une polydispersité importante. Obtenir un grand nombre de GUV de même taille est une nécessité pour pouvoir réaliser des expériences reproductibles et quantitatives, en particulier pour leur utilisation de cellule artificielle. L'échelle mise en jeu dans les interactions d'autoorganisation entre phospholipides (de l'ordre de la dizaine de nanomètres) est bien inférieure à la taille des GUV. Malgré tout, l'apparition de la microfluidique au début des années 2000 a mis à disposition plusieurs outils pour le contrôle précis de l'écoulement de fluides (taille, débit, localisation) à l'échelle de la dizaine du micromètre. Nous reviendrons de façon plus générale sur la microfluidique en Partie IV.

Les techniques microfluidiques ont d'abord été mises à profit en produisant une émulsion monodisperse (gouttes d'environ 50 μm de diamètre) de solution aqueuse dans une phase d'huile contenant des phospholipides [154] (technique décrite en Section 1.2.1 de la Partie IV du manuscrit). En ajoutant un faible volume de cette émulsion dans un bain aqueux (étape analogue à celle de la méthode de transfert), la paroi des gouttes est rapidement convertie en bicouche de phospholipides. En plus de la monodispersité des GUV, l'autre intérêt de cette méthode a rapidement été exploité : il s'agit de l'encapsulation parfaitement contrôlée au moment de la formation de l'émulsion (qui a été montrée dans ce cas avec des protéines, des cellules et des

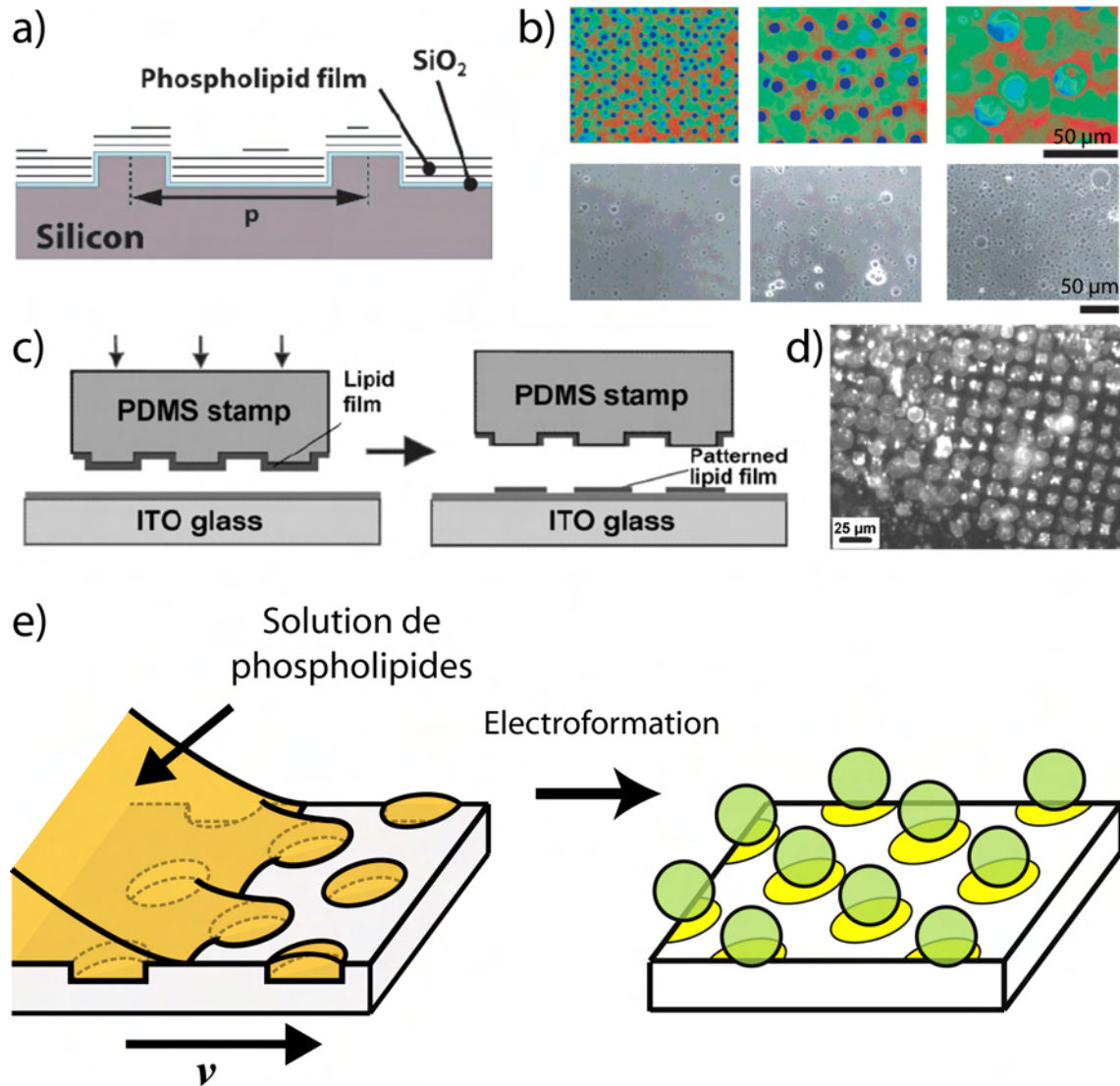


FIGURE 1.4 – Stratégies existantes pour contrôler la taille des GUV formées par électroformation. a) Schéma d'un film de phospholipides déposé sur un substrat de silicium microstructuré par des micropiliers. Extrait de [143]. b) En haut : microscopie par réflexion montrant en fausses couleurs l'organisation du film de phospholipides sur le silicium microstructuré, avec des micropiliers espacés de 7, 15 et 60 μm . En bas : observation par contraste de phase des GUV obtenues après électroformation des films précédents, après sédimentation dans une solution de glucose isotonique. Extrait de [143]. c) Schéma de principe du "micro-contact printing" appliqué à un film de phospholipides sur une surface d'ITO. Extrait de [148]. d) Observation par microscopie de fluorescence du gonflement de GUV à partir du motif de phospholipides obtenu par micro-contact printing. Extrait de [148]. e) Schéma de principe du dépôt de phospholipides sur une surface microstructurée et de son utilisation en électroformation. Après translation d'une goutte à vitesse v , le substrat recouvert de phospholipides sert d'électrode pour l'électroformation. Un contrôle sur la taille des GUV est obtenu.

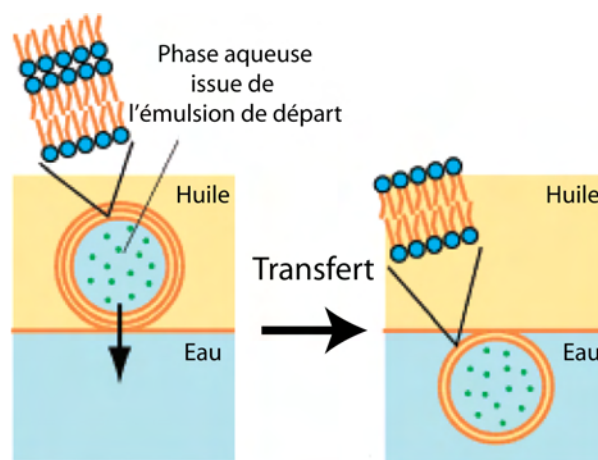


FIGURE 1.5 – Schéma de principe de la méthode de transfert de phase. Une émulsion d'eau dans de l'huile contenant des phospholipides est déposée au-dessus d'une interface huile-eau. La traversée de l'interface permet la formation d'une bicouche de phospholipides tout autour de la goutte et donc d'une GUV. Adapté de [149].

microbilles). Cette première méthode comporte quand même l'inconvénient de nécessiter deux étapes distinctes de production (émulsion puis transfert).

La formation directe de GUV au sein même du dispositif microfluidique a été réalisée à l'origine par jet pulsé, perpendiculairement à une bicouche de phospholipides [155] (FIGURE 1.6 b). En approchant l'extrémité d'une seringue au voisinage d'une bicouche suspendue dans un milieu aqueux, il est possible de la déformer puis de la rompre par injection ponctuelle de liquide. Malgré la monodispersité des vésicules obtenues ($300 \pm 20 \mu\text{m}$), les auteurs admettent néanmoins que leur membrane contient une teneur non négligeable d'huile. L'amélioration de cette technique a rapidement permis à Stachowiak *et al.* d'obtenir des vésicules géantes à la fois monodisperses (taille de $200 \pm 6 \mu\text{m}$) et unilamellaires [156, 157]. Une autre méthode microfluidique tout aussi performante a été récemment proposée [158] (FIGURE 1.6 c). Elle consiste à créer successivement au niveau d'une jonction en T modifiée, une première interface eau-huile, puis une seconde, et enfin d'étirer la bicouche sous forme d'une langue jusqu'à ce qu'elle rompe en vésicule. Enfin la possibilité de produire en microfluidique des émulsions doubles a été appliquée à la formation de GUV [159] (FIGURE 1.6 d). L'émulsion produite est composée de gouttes d'eau dans un solvant volatil contenant des phospholipides, lui-même dans de l'eau. Lorsque le solvant s'évapore à travers l'eau, les phospholipides forment petit à petit une bicouche sphérique. Sa taille est fixée par la dimension de l'émulsion interne, qui joue ici le rôle de patron. Cette technique permet une fabrication plus rapide de vésicules que celle de jet pulsé, mais l'unilamellarité des vésicules obtenues n'est pas démontrée.

L'utilisation de la microfluidique pour former des GUV monodisperses est désormais effective, mais possède des inconvénients : elle nécessite la préparation d'un dispositif particulier, le réglage de paramètres fins, et ne permet pas une production en grande quantité (à quelques centaines de Hz tout au plus).

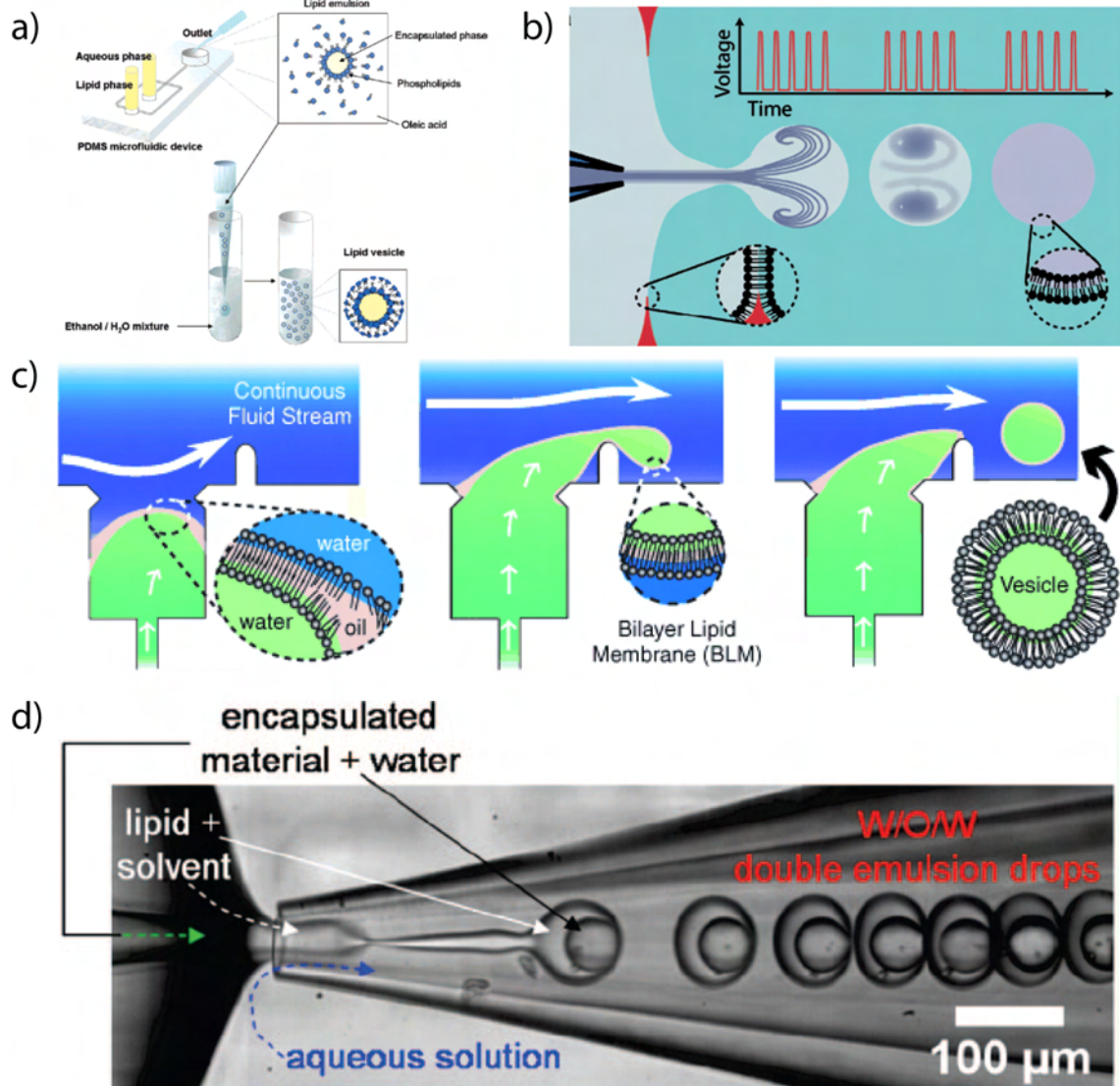


FIGURE 1.6 – Production de GUV par microfluidique. a) Principe de la production d’une émulsion monodisperse dans une phase huile contenant des phospholipides, suivie par un transfert en phase aqueuse. Extrait de [154]. b) Principe de la formation de vésicules par jet pulsé d’un fluide aqueux sur une bicouche de phospholipides. Extrait de [157]. c) Déformation d’une bicouche de phospholipides au niveau d’une jonction en T. Le flux de solution aqueuse l’étire jusqu’à ce qu’il rompe sous forme d’une vésicule. Extrait de [158]. d) Formation d’une émulsion double stabilisée par des phospholipides. L’évaporation du solvant contenu entre les deux phases aqueuses permet la formation d’une membrane. Extrait de [159].

Méthode	Sphéricité	Unilamellarité	Encapsulation	Rendement	Facilité
Gonflement spontané	–	+	++	++	+++
Electroformation	+++	+++	+	+++	++
Transfert	++	+	+++	+	++
Microfluidique	+++	+	+++	+	–

TABLE 1.1 – Comparaison des quatre principales méthodes de formation des GUV, suivant plusieurs paramètres liés à l'allure des GUV obtenues et leur facilité de mise en oeuvre.

1.2.4 Comparaison

Dans le TABLEAU 1.1 sont comparées de manière récapitulative les quatre principales méthodes suivant la qualité et le nombre des GUV formées et leur simplicité.

1.3 Applications des vésicules

1.3.1 Applications des SUV

De manière générale, les vésicules peuvent interagir avec la peau et les membranes cellulaires sans engendrer de destruction majeure. En plus de cette biocompatibilité, les SUV présentent une bonne stabilité et peuvent être produites en grande quantité.

Elles sont aujourd'hui couramment introduites dans des produits cosmétiques dans lesquels elles permettent de contrôler leur rhéologie. Leur diamètre leur permet en plus d'être confinées dans de faibles volumes, en particulier les vaisseaux sanguins de taille submicrométrique. Cette possibilité a poussé plusieurs équipes à utiliser les SUV comme vecteurs thérapeutiques pour que ces containers mésoscopiques puissent transporter un principe actif dans un organisme [160]. Ce principe actif peut être simplement un médicament ; dans ce cas la vésicule joue le rôle de barrière semi-perméable qui augmentera le temps de diffusion de la molécule. Les SUV peuvent aussi servir à cibler le lieu d'action du médicament. Les liposomes ont tendance à s'accumuler dans le foie et les organes hypervascularisés, ce qui permet de délivrer naturellement leur contenu pour traiter ces organes. De plus, en fonctionnalisant leur surface avec des anticorps, c'est un type cellulaire particulier qui peut être visé. Enfin la fusion possible entre les SUV et les membranes cellulaires permet de déverser leur contenu dans le cytoplasme ; cela en fait une possibilité pour construire des vecteurs non viraux de matériel génétique. Ces stratégies sont désormais mises en oeuvre dans quelques médicaments commerciaux, mais restent limitées à certaines pathologies précises.

1.3.2 Applications des GUV

Les GUV sont plus déformables et plus fragiles que les SUV. Même si le renforcement de leur bicouche est imaginable, elles n'ont pas encore trouvé d'application commerciale en thérapeutique. C'est leur taille proche de celle d'une cellule (20 μm) et la possibilité de les observer par microscopie optique qui en font des objets d'intérêt pour d'autres applications.

Microréacteurs

Le confinement permis par les GUV permet d'y enfermer des molécules en vue de les faire réagir, à la fois dans un volume petit (de l'ordre du femtolitre) et relativement transparent, ce qui permettra une observation plus aisée que dans des microcapsules inorganiques opaques. La possibilité d'y réaliser une réaction chimique relativement sensible aux conditions a été démontrée par exemple à travers la cristallisation de protéines [161]. Ceci a aussi été réalisé pour la formation d'hydrogels [162] ou de filaments [163, 164] et de cortex [152] d'actine. En connectant plusieurs GUV par des tubules de phospholipides, ce sont des réseaux de microréacteurs qui sont constructibles [165] (FIGURE 1.7 a). Le transport et l'interaction de leur contenu [166, 167] ou encore l'influence de la présence de bactéries [168] ont été étudiées dans ces structures. Enfin c'est la possibilité de les localiser précisément pour y observer la réaction se déroulant en leur sein, qui les présente comme de bons candidats pour réaliser du criblage à haut débit de réactions chimiques [169, 170] (FIGURE 1.7 b). Puisque leurs propriétés de surface sont contrôlables, un marquage peut permettre leur fixation à une cible précise sur une surface. Ce positionnement est applicable à un grand nombre de GUV et à différentes cibles, suivant la fonctionnalisation réalisée. De cette manière, c'est un arrangement planaire de microcompartiments qui est construit, chaque point correspondant à des conditions spécifiques. Les résultats des réactions sont lisibles sur la matrice, de façon analogue aux puces à ADN [171]. Il a été montré que la température pouvait être un stimulus externe efficace pour le lancement de ces réactions en parallèle [172].

Modèles de membrane cellulaire

Chronologiquement, ce sont d'abord les biophysiciens qui ont utilisé les GUV pour l'étude des propriétés physiques de leur membrane. Leur mécanique a été étudiée quantitativement à partir de 1987 grâce la technique de microaspiration par pipette développée par Evans *et al.* [173] (FIGURE 1.7 c). En mettant en contact une vésicule contre l'extrémité d'une micropipette, il est possible de la soumettre à une dépression tout en observant ses changements de forme. Ceci permet de mesurer plusieurs modules élastiques et de caractériser sa perméabilité [174]. Sur ces valeurs ont été étudiées l'influence de la composition de la membrane [175, 176] et de la température [177] (qui modifie les phases lipidiques). Des mesures similaires ont été effectuées par analyse des oscillations browniennes des contours [178] et par microrhéologie à bille magnétique [179]. C'est aussi par simple observation par microscopie en temps réel qu'ont été caractérisées l'influence d'actine sur la membrane [180], leur déformation sous champ électrique [181], sous environnement oxydant [182], sous une différence de pression osmotique [183] ou leur capacité à fusionner suivant la composition du milieu externe [184]. Ceci permet de mieux comprendre et de modéliser la mécanique des membranes de façon à préciser les mécanismes d'exocytose [185], le repliement des organelles [186] ou la forme qu'adopte une cellule lors de la construction de son proto-cytosquelette [180, 187]. L'étude de leur interaction avec des surfaces définies a permis aussi d'établir des modèles d'adhésion et désadhésion des cellules [188] et de mobilité par haptotaxie [189].

Lorsque la membrane est composée de deux phospholipides différents et que du cholestérol est ajouté, un phénomène de séparation de phase au sein d'une même membrane peut être observé. Les recherches sur les domaines distincts de phospholipides sont en lien avec l'hypothèse formulée par Simons et Ikonen en 1997 [190]. Ils postulent l'existence de clusters (ou "raft") de phospholipides capables de se déplacer latéralement dans une membrane fluide et qui joueraient un rôle de plate-forme fonctionnelle où auraient lieu de façon privilégiée différents mécanismes cellu-

lares fondamentaux tel que les invaginations de membrane, l'attachement et le passage sélectif de protéines. Même si ces clusters ont une taille caractéristique d'une centaine de nanomètres, les GUV servent de systèmes modèles dans ce sujet, pour aider à préciser la composition et les propriétés physico-chimiques des domaines apparaissant dans un mélange ternaire de ce type (lipides différents en présence de cholestérol). Les phospholipides typiques utilisés pour induire la ségrégation de phase sont la DOPC et la DPPC. La DPPC, dont les chaînes aliphatiques sont totalement saturées, interagit plus fortement avec ses homologues. En présence de cholestérol, elle forme une phase liquide avec un ordre à faible distance. La DOPC s'organise sous une forme liquide désorganisée, qui contient moins de cholestérol que la précédente. La distinction de ces deux types de domaines est facilement réalisée en choisissant deux fluorophores adéquats, dont l'affinité pour les deux phases est différente. Une petite molécule peu polaire comme le pérylène aura tendance à s'insérer de façon préférentielle dans la phase organisée. Un phospholipide dont la tête comporte un groupement fluorescent comme la rhodamine-DPPE, aura une affinité supérieure pour la phase désorganisée. Leur caractérisation sont de ce fait réalisées par microscopie de fluorescence classique, confocale ou biphotoniques. Ces domaines sont aussi visibles lorsque la DPPC est remplacée par de la sphingomyéline, qui possède aussi moins d'insaturation que la DOPC.

L'analyse géométrique des courbures des membranes correspondant à chaque domaine au sein d'une même GUV a ainsi permis d'en déduire plusieurs paramètres mécaniques [191, 192] (FIGURE 1.7 d). L'existence et la proportion relative des domaines suivant la teneur en cholestérol a été quantifiée pour réaliser des diagrammes ternaires [193, 194] et observer l'influence de la température sur leur ségrégation [195]. La spectroscopie de corrélation de fluorescence (FCS) permet aussi de comparer la mobilité de molécules dans chacune des phases [196]. D'autres études ont aussi permis d'observer différentes morphologies de domaines : habituellement de forme sphérique, des géométries en rayures ou en tâche ont aussi été obtenues [197]. Leur cinétique d'apparition dès l'instant ou leur existence thermodynamique est permise a fait l'objet de modélisation [198, 199]. Enfin la coexistence de phases lipidiques a pu être obtenue dans des membranes asymétriques, dont les deux parois de la bicouche sont de compositions différentes [200].

Cellules artificielles

La complexification de la membrane des GUV couplée à celle de leur milieu interne offre des possibilités encore plus larges. En particulier lorsque du matériel génétique y est introduit, ce sont des réacteurs biochimiques biomimétiques qui peuvent être construits. Développés au milieu des années 2000, ils ouvrent la voie à la mise en place de cellules artificielles, dont les composants minimaux sont illustrés FIGURE 1.7 e. Ces édifices représentent à la fois un but ultime du biomimétisme (en vue de thérapies ou du remplacement d'organe) et un outil expérimental pour mieux comprendre les mécanismes du vivant. En effet ceci est utile à la biologie cellulaire où l'on cherche à identifier les éléments nécessaires à une fonction donnée. Une approche "bottom-up" dans laquelle sont reproduits des systèmes minimaux toujours plus complexes représente une voie de progression pour trouver les unités suffisantes à une fonction biologique donnée [201].

L'encapsulation d'ADN dans un système d'expression génétique reconstitué artificiellement a été par exemple réalisée dans des GUV. La synthèse de protéine a pu être mise en évidence [202], de même que celle d'enzymes permettant l'ajout de phospholipides dans la membrane [203]. Une méthode de tri des vésicules selon leur teneur finale en protéine a même été mise au point

[204]. La réalisation simultanée d'une même réaction d'expression sur plusieurs dizaines de GUV permet d'en quantifier plus précisément les caractéristiques. L'effet de la taille des GUV sur la cinétique d'expression peut être dégagée ainsi que des variabilités dans la quantité de protéines produites [205] (FIGURE 1.7 f). Des paramètres plus fins ont aussi été étudiés, comme l'influence de la composition de la membrane [206], ou l'effet de l'approvisionnement externe en nutriments pour que la réaction puisse se poursuivre [207].

L'augmentation croissante de la complexité des GUV, aussi bien de leur membrane que de leur contenu, permet aujourd'hui de disposer des modèles solides et variés pour l'imitation et la compréhension des réactions de base de la biochimie. Néanmoins, un travail important reste à faire pour augmenter la robustesse de ces objets avant de pouvoir les introduire dans de réels systèmes vivants.

1.4 Conclusion

Dans ce chapitre, les GUV ont été présentées de manière générale. Leur structure a d'abord été détaillée. Les principales méthodes permettant de les former ont ensuite été exposées, chaque méthode ayant leurs avantages et leurs inconvénients. Enfin à travers la description de leurs applications variées, il apparaît que les GUV sont des objets d'intérêts pour la biologie ainsi que pour les différents domaines scientifiques qui touchent au biomimétisme.

Dans la suite de cette thèse, les GUV nous intéressent plus particulièrement pour deux points.

D'une part, parce que ce sont des modèles de membranes cellulaires. Dans la partie précédente liée à l'ADN, nous nous sommes inscrits dans une démarche "bottom-up" visant à rassembler les éléments minimaux nécessaires au fonctionnement d'une cellule. Les GUV représentent l'élément supplémentaire principal pour la construction d'une cellule artificielle car elles permettent d'encapsuler le matériel génétique et les composants permettant la synthèse des protéines. Pour réaliser cette compartimentalisation, il est nécessaire de connaître la structure de ces édifices et la manière de les produire. Parmi leurs méthodes de préparation, l'électroformation est celle qui représente le meilleur compromis entre facilité de mise en oeuvre, nombre, unilamellarité et monodispersité des GUV. Nous allons voir dans le chapitre suivant, qu'une modification préalable du dépôt de phospholipides sur le substrat qui sert d'électrode, permet d'augmenter considérablement la monodispersité des vésicules après électroformation.

D'autre part, de façon analogue aux micelles, les GUV résultent de l'autoassemblage non covalent de tensioactifs. Leur relative fragilité fait d'elles des édifices capables d'interagir avec d'autres tensioactifs, pour subir des changements de morphologie. Nous constaterons dans le Chapitre 3 de cette partie que la lumière peut jouer le rôle de stimulateur lorsque les GUV sont mises en présence de tensioactifs photosensibles.

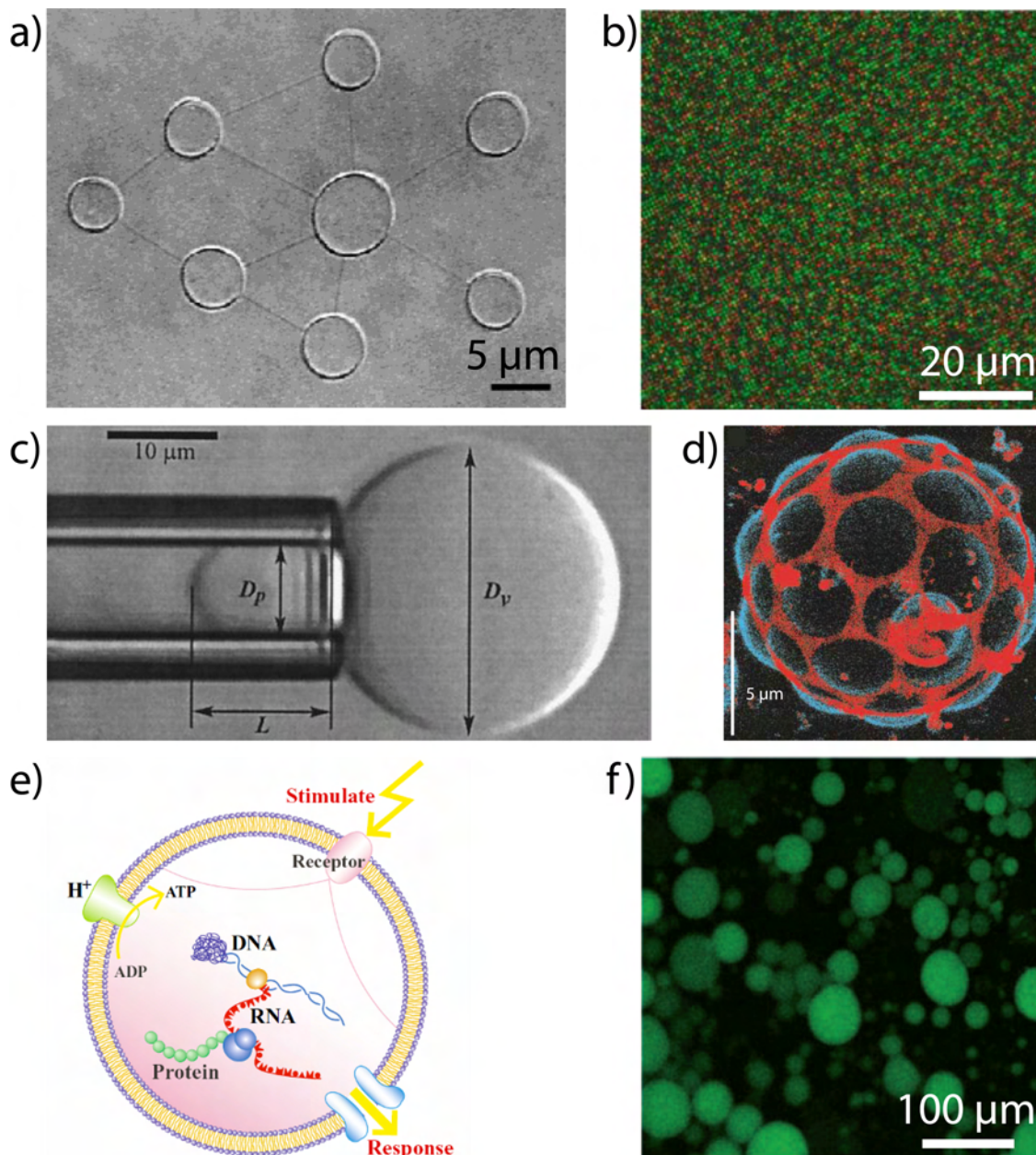


FIGURE 1.7 – Exemples d’applications des GUV. a) Formation d’un réseau de vésicules connectées par des nanotubes de phospholipides, pour étudier le transport et l’interaction de leur contenu. Extrait de [166]. b) Matrice de vésicules fixées sur une surface de manière spécifique et contenant différents contenus fluorescents. Adapté de [169]. c) Vésicule soumise à une aspiration par contact avec une micropipette. De l’observation de sa géométrie peuvent être déduites les caractéristiques élastiques de sa membrane. Extrait de [174]. d) Superposition d’images obtenues par microscopie biphotonique montrant la coexistence de domaines distincts de phospholipides dans une vésicule, contenant chacun un fluorophore différent. Le bleu correspond au pérylène (phase ordonnée), le rouge à la rhodamine-DPPE (phase désordonnée). La courbure des domaines peut être analysée pour en déduire des paramètres mécaniques. Adapté de [191]. e) Schéma de principe d’une cellule artificielle : le matériel nécessaire à l’expression de protéines est confiné dans une membrane qui contient des protéines transmembranaires capables de fournir de l’énergie et d’établir une communication avec le milieu externe. f) Expression de GFP dans des vésicules. Le suivi cinétique de l’expression et de sa variabilité suivant la taille des GUV peuvent être effectué de façon quantitative. Extrait de [205].

Chapitre 2

Un motif de phospholipides pour la formation de GUV monodisperses

Parmi les méthodes de formation des GUV décrites au chapitre précédent, l'électroformation est sans doute la plus utilisée. Tout en étant relativement facile à mettre en oeuvre, elle permet d'obtenir un grand nombre de vésicules, la plupart étant unilamellaires. Elle permet aussi d'éviter l'emploi de solvants organiques durant leur apparition. En plus de la difficulté de l'encapsulation, son principal inconvénient est lié à leur faible monodispersité, qui est problématique pour les applications à caractère quantitatif. La limite réside dans la préparation du film de phospholipides dont l'épaisseur et l'organisation ne sont pas contrôlées. En préparant un motif de phospholipides d'épaisseur et d'organisation latérale contrôlées, nous pouvons espérer augmenter la régularité des vésicules obtenues par électroformation.

Nous décrirons tout d'abord les méthodes existantes de formation d'un motif de phospholipides. Nous détaillerons ensuite la solution innovante que nous avons proposée. Elle consiste au déplacement de la frontière d'une goutte de solvant volatil contenant des phospholipides, sur une surface microstructurée de trous réguliers. Enfin nous verrons en quoi l'utilisation du substrat recouvert permet la production de GUV après électroformation avec une bonne monodispersité en taille. Les résultats de ce chapitre ont été publiés dans [208].

2. Un motif de phospholipides pour la formation de GUV monodisperses

2.1	Les méthodes d'obtention de motifs de phospholipides	111
2.1.1	Intérêt	111
2.1.2	Formation de multicouches homogènes : contrôle de l'épaisseur	111
2.1.3	Motif de monocouches : contrôle de l'organisation latérale	112
2.1.4	Motif de multicouches : contrôle à la fois de l'épaisseur et de l'organisation latérale	112
2.2	Dépôt de phospholipides sur une surface microstructurée	113
2.2.1	Montage de guidage capillaire	113
2.2.2	Dépôt sur une surface plane	114
	Régime d'évaporation	114
	Régime de Landau-Levich	115
2.2.3	Dépôt sélectif dans des microstructures	115
2.2.4	Effet de la vitesse de translation et de la taille des microstructures	116
	Allure du dépôt et quantité déposée	116
	Organisation au sein des trous	119
2.3	Formation de GUV monodisperses	122
2.4	Conclusion	122

2.1 Les méthodes d'obtention de motifs de phospholipides

2.1.1 Intérêt

Le contrôle de la formation de films de phospholipides sur une surface solide est nécessaire pour deux raisons principales. La première concerne l'étude des membranes supportées, c'est à dire des bicouches de lipides reposant sur une surface plane. La construction de membranes supportées de composition définie par une approche "bottom-up" permet de disposer d'édifices biomimétiques pour l'étude des mécanismes biologiques [209]. Il est en effet courant depuis leur apparition au milieu des années 80 [210] de les complexifier par différents types de biomolécules (par exemple des protéines transmembranaires, des filaments d'actine ou des anticorps) pour créer une interface modèle, de façon à décrire leurs propriétés structurales (organisation, rigidité, diffusion interne, mouillabilité) et fonctionnelles (adhésion, reconnaissance de molécules, transport). D'autre part, en maîtrisant l'assemblage et la fonctionnalisation de ces molécules, ce sont des objets bioinspirés inédits qui peuvent être élaborés [211] et qui offrent des perspectives en chimie analytique pour la séparation et la détection de molécules biologiques.

2.1.2 Formation de multicouches homogènes : contrôle de l'épaisseur

La création de membranes d'épaisseur contrôlée a d'abord été réalisée par dépôt de type Langmuir-Blodgett et Langmuir-Schaefer [212]. Ces techniques ont été initialement développées pour le dépôt de monocouches de tensioactifs, mais la répétition de l'opération d'introduction et de retrait du substrat dans la solution de molécules à déposer, permet d'augmenter l'épaisseur du film. A chaque cycle, une bicouche est ajoutée, ce qui fournit un empilement dont la hauteur est directement proportionnelle au nombre de passages dans la solution. Malgré tout pour les phospholipides, les films les plus épais pouvant être obtenus par cette méthode sont limités à deux ou trois bicouches. Même si l'affinité des phospholipides pour le substrat est contrôlable, les interactions entre deux monocouches de phospholipides sont beaucoup plus compliquées à maîtriser et empêchent leur superposition de manière régulière. Pour concevoir des multicouches d'épaisseur supérieure sur une aire importante ($> 1 \text{ mm}^2$), c'est d'une part la méthode du spin-coating qui a été exploitée [141]. Les épaisseurs moyennes pouvant être obtenues varient de façon large, entre 15 et 90 nm (autrement dit de 3 à 23 bicouches environ). Par contre, cette stratégie ne garantit pas une organisation homogène au film car même si l'étalement de la solution est bien contrôlé, l'évaporation qui précède la formation de la multicouche l'est moins. Le dépôt est caractérisé par de nombreuses hachures et défauts.

D'autre part, une technique de dépôt par translation contrôlée d'une goutte a été développée dans notre équipe par Dr. Maël Le Berre [213]. Le principe est décrit sur la (FIGURE 2.1 a). Une goutte de phospholipides dissous dans un solvant volatil est introduite entre un pinceau fixe et un support plan mobile où repose le substrat. Lors de la translation de la surface à vitesse contrôlée, la frontière de la goutte est entraînée. L'évaporation du solvant provoque le dépôt des phospholipides avec une bonne uniformité. L'épaisseur du film obtenu est directement liée à la vitesse de translation (FIGURE 2.1 a). Comme nous allons le décrire dans la prochaine section, deux régimes de vitesse existent et permettent la formation d'une multicouche variant de 25 à 100 nm (c'est à dire entre 6 et 25 bicouches environ). Nous nous inspirerons de cette méthode pour la suite de ce travail.

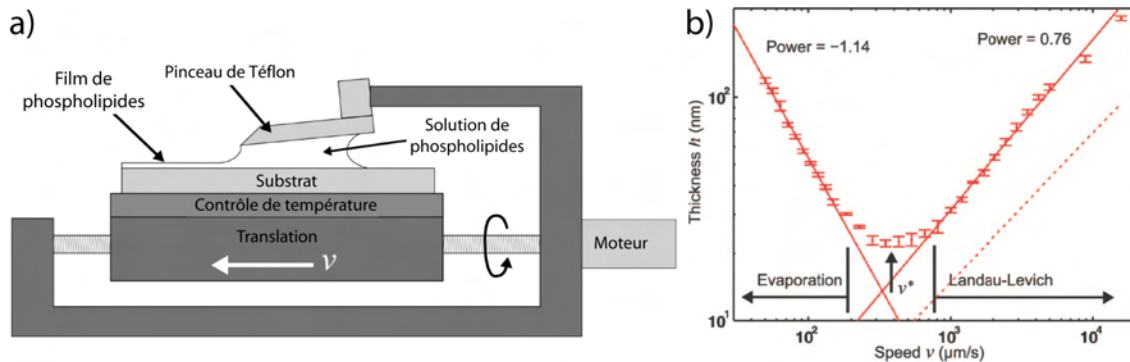


FIGURE 2.1 – Contrôle de l'épaisseur d'un film homogène de phospholipides par translation régulière du ménisque d'une goutte de phospholipides sur un substrat plan. a) Schéma du montage. b) Epaisseur h du film de phospholipides en fonction de la vitesse de translation v . Deux régimes sont identifiés : le régime d'évaporation (pour lequel, h évolue approximativement comme v^{-1}) et le régime de Landau-Levich (pour lequel h évolue approximativement comme $v^{-2/3}$). Extrait de [213].

2.1.3 Motif de monocouches : contrôle de l'organisation latérale

Ensuite, c'est la conception de membranes non homogènes selon un motif spatial bien défini, qui a été examinée. De nombreuses techniques efficaces ont été présentées sur des membranes supportées [214]. En utilisant les techniques de photolithographie, il a été possible de le faire avec une résolution inférieure au micromètre par fonctionnalisation chimique du substrat avant dépôt de phospholipides [215], dégradation photochimique directe à travers un masque [216], ou par "lift-off" final [217]. A l'aide d'une pointe de microscope à force atomique (AFM), c'est aussi par grattage sub-micrométrique ("nanoshaving lithography") que des phospholipides ont pu être retirés sur mesure de la membrane [218]. Enfin, le dépôt de type Langmuir-Blodgett rectiligne [219] ou tournant [220] a été utilisé pour créer des irrégularités micrométriques sous forme de rayures.

2.1.4 Motif de multicouches : contrôle à la fois de l'épaisseur et de l'organisation latérale

En dernier lieu, et c'est sur cet objectif que porte le travail suivant, il est possible de former un film de phospholipides, à la fois d'épaisseur contrôlée, et organisé suivant un motif latéral défini. Il n'existe à notre connaissance que deux techniques.

La première est celle du "micro-contact printing" [148] qui a ensuite été appliquée à la formation de GUV monodisperses en taille (FIGURE 1.4 c). Même si le choix du motif voulu est arbitraire et que la résolution est de l'ordre de la dizaine de micromètres, le contrôle de l'épaisseur de la multicouche déposée n'est pas possible. Il dépend d'une part de l'épaisseur du film plan de molécules sur lequel est accolé le timbre flexible (en général fait de polydiméthylsiloxane, ou PDMS). Nous avons vu qu'il n'existe pas de méthode idéale pour produire un film homogène d'épaisseur donnée. D'autre part c'est l'arrachement sélectif de la multicouche avec le PDMS qui ne permet pas son transfert fidèle sur le second substrat.

L'autre technique, la plus performante à l'heure actuelle, est celle de la "dip-pen" nanolithographie (ou littéralement, nanolithographie par porte-plume). Mise au point par Mirkin, elle consiste à introduire un petit volume de solution au niveau d'une pointe d'AFM située au voi-

sinage d'une surface plane [221] (FIGURE 2.2 a). Un ménisque se forme entre la pointe et la surface. L'évaporation du liquide provoque le dépôt des molécules qu'il contient sur le substrat. En tradant à vitesse régulière la pointe et en contrôlant l'humidité du milieu (qui joue sur la vitesse d'évaporation), l'épaisseur du dépôt peut ainsi être contrôlée. Appliquée à différents types de molécules (ADN, protéines, tensioactifs), elle fut utilisée en 2007 pour le dépôt de phospholipides par Lenhart *et al.* [222]. Elle a permis de former des lignes régulières de moins d'un micromètre de diamètre (FIGURE 2.2 b). Leur épaisseur, pouvant aller jusqu'à 100 nm, est contrôlée avec une précision satisfaisante ($\pm 10\%$) suivant la vitesse de translation et l'humidité de l'environnement (FIGURE 2.2 c). La mise en parallèle de plusieurs cantilevers alimentés en solution de phospholipides permet de répéter ces structures à vitesse rapide ($\sim 5 \text{ cm} \cdot \text{min}^{-1}$). Ceci a été appliqué à la construction de réseaux de diffraction composés uniquement de phospholipides pouvant servir de biosenseur [211]. Cette méthode comporte néanmoins les deux inconvénients suivants. Elle ne permet pas de former une multicouche homogène sur une aire importante ou une aire de n'importe quelle géométrie ; sa mise en oeuvre nécessite un appareillage extrêmement sophistiqué.

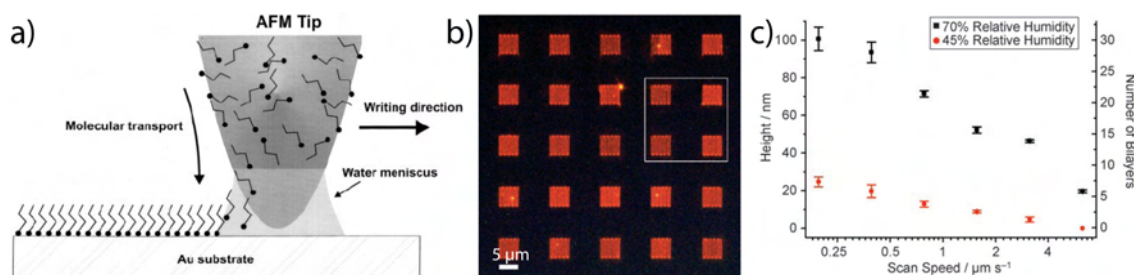


FIGURE 2.2 – Dépôt contrôlé de multicouches de phospholipides par "dip-pen" nanolithographie. a) Principe de la "dip-pen" nanolithographie. La solution s'écoulant le long d'une pointe d'AFM forme un ménisque entre la pointe et le substrat. L'évaporation du solvant est contrôlée par l'humidité du milieu et la vitesse de translation de la pointe. Les molécules solubilisées sont alors progressivement déposées sur la surface. Extrait de [221]. b) Dépôt de phospholipides (contenant une fraction de phospholipides fluorescents) répété sur une surface de polystyrène. Extrait de [222]. c) Contrôle de l'épaisseur de la multicouche de phospholipides déposée (mesurée par AFM) en fonction de la vitesse de translation de la pointe de l'AFM et de l'humidité ambiante. Extrait de [222].

2.2 Dépôt de phospholipides sur une surface microstructurée

2.2.1 Montage de guidage capillaire

Pour contrôler le dépôt de phospholipides sur un substrat, nous avons utilisé le montage à tiroir (M-403.6 PD, PI) visible FIGURE 2.3. Ce dispositif possède deux parties distinctes :

- une partie mobile jouant le rôle de thermostat, qui se déplace à vitesse v de façon horizontale le long d'une vis sans fin et dont la vitesse est contrôlée à l'aide d'un ordinateur
- une partie fixe à laquelle est accroché un pinceau de téflon, dont la position est réglable par une vis micrométrique

De cette manière, il est possible de maintenir une goutte de solvant volatil entre le pinceau et la surface en mouvement pour contrôler son évaporation à la frontière de la goutte et donc la manière dont vont se déposer les objets qu'il contient. Cette technique appelée guidage capillaire a été

utilisée à l'origine pour le dépôt de colloïdes [223, 224] et de nanoparticules [225, 226, 227, 228]. Elle a été introduite auparavant dans notre équipe par Dr. Maël Le Berre pour le dépôt de phospholipides sur une surface plane [213].

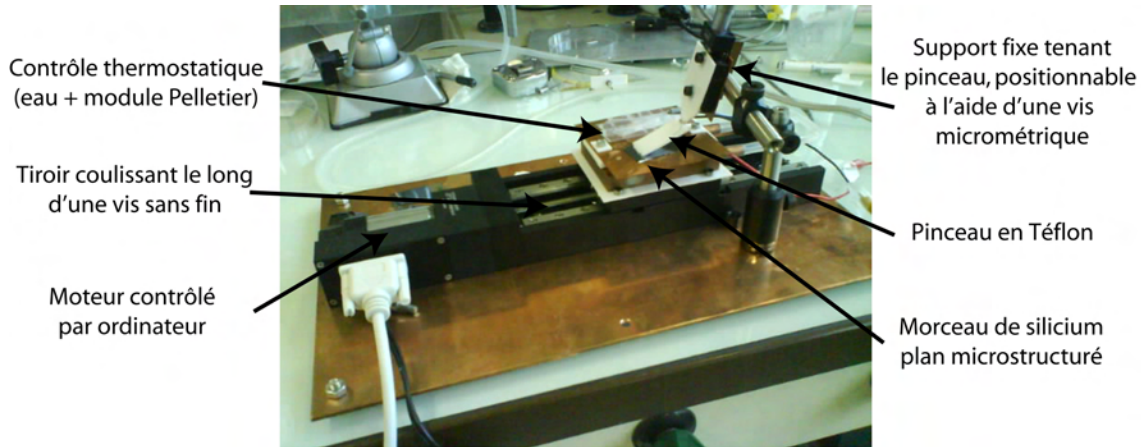


FIGURE 2.3 – Photographie du montage de dépôt de guidage capillaire par translation de goutte.

2.2.2 Dépôt sur une surface plane

De façon générale, lorsque le solvant a une bonne affinité pour le substrat (mouillage total), deux régimes distincts sont observés suivant la vitesse de translation (FIGURE 2.4). Ces deux comportements expliquent la forme en "V" du graphe de la FIGURE 2.1 b précédente.

Régime d'évaporation

A faible vitesse ($v < 100 \mu\text{m.s}^{-1}$), l'évaporation provoque l'accumulation du contenu du solvant en frontière de la goutte. Un film quasi-sec est déposé (FIGURE 2.4 a). Cette configuration où le dépôt de matière est directement réalisé au niveau de la ligne de contact est appelée régime d'évaporation. L'épaisseur du dépôt dépend de manière précise de v . Pour trouver cette relation, un bilan de matière est réalisé dans la boîte entourant le menisque, représentée FIGURE 2.4 a. Trois phénomènes sont responsables d'un échange de matière entre l'intérieur et l'extérieur de la boîte : l'évaporation du solvant (à laquelle correspond un flux volumique de solvant Q_{evap}), le dépôt de soluté sur le substrat (le flux sortant de molécules est appelé J_{film}) et un flux volumique de solvant $Q_{solvent}$ qui est accompagné d'un flux moléculaire de soluté J_{solute} . En régime de dépôt permanent, la conservation de la quantité de matière dans la boîte impose :

$$Q_{evap} = Q_{solvent} \quad (2.1)$$

$$J_{film} = J_{solute} \quad (2.2)$$

Si la concentration C de la solution est homogène aux frontières de la boîte et suffisamment faible pour négliger le volume de soluté par rapport au volume de solvant, J_{solute} peut être lié à $Q_{solvent}$ par :

$$J_{solute} = CQ_{solvent} \quad (2.3)$$

Connaissant les propriétés physiques de la molécule déposée, l'épaisseur e de film peut être liée à J_{film} par :

$$J_{film} = \frac{h\rho v}{M_w} \quad (2.4)$$

où ρ est la densité du film, v la vitesse du substrat et M_w la masse molaire de la molécule en solution. On en déduit, en insérant 2.1, 2.2, 2.3 dans 2.4 la relation suivante :

$$e = \frac{M_w C Q_{evap}}{\rho} v^{-1} \quad (2.5)$$

L'épaisseur du film est donc inversement proportionnelle à v .

Régime de Landau-Levich

À grande vitesse ($v > 1000 \mu\text{m.s}^{-1}$), les forces visqueuses sont prédominantes et entraînent le liquide sur la surface de manière à créer un film homogène (FIGURE 2.4 b). L'évaporation a ensuite lieu et conduit à la formation du dépôt de matière. Ce régime est dit de Landau-Levich. Il permet de former un film dont l'épaisseur est aussi directement liée à la vitesse d'étirement. Elle est d'autant plus grande que les forces visqueuses sont grandes et que donc v est grande. Il est possible de montrer qu'elle est proportionnelle à $v^{2/3}$ [213].

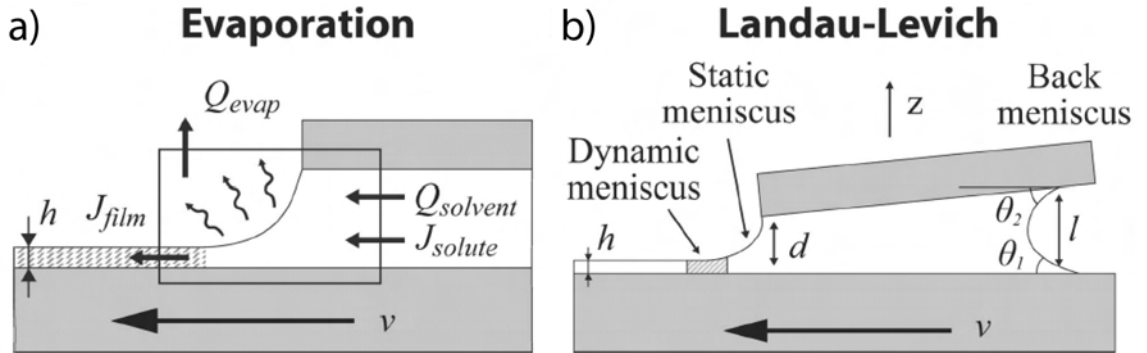


FIGURE 2.4 – Schéma des deux régimes limites de dépôt. a) Régime d'évaporation. b) Régime de Landau-Levich. Extrait ce [213].

Dans notre cas, nous choisissons une situation où la vitesse est faible pour ne pas entraîner le liquide par les forces de viscosité et où le solvant ne mouille pas la surface pour empêcher le dépôt sur les parties planes du substrat.

2.2.3 Dépôt sélectif dans des microstructures

Pour réaliser un dépôt sélectif à l'aide de la méthode de guidage capillaire, nous avons utilisé pour substrat une surface plane de silicium microstructurée par un réseau hexagonal de trous de différents diamètres (FIGURE 2.5 a). La réalisation de ces microstructures a été réalisée par photolithographie suivie de gravure sèche. Le protocole est décrit en Annexe C.1. La profondeur des trous a été mesurée par AFM et est d'environ 400 nm.

Contrairement à ce qui est classiquement utilisé pour l'assemblage convectif, nous cherchons ici à ce que le solvant mouille faiblement la surface utilisée, pour éviter tout dépôt sur les parties

planes [229]. Pour avoir à la fois un solvant volatil dans lequel se dissolvent les phospholipides et une faible affinité pour le substrat, nous avons choisi d'utiliser le trichloroéthylène. Il fournit clairement les meilleurs résultats par rapport aux autres solvants que nous avons testé (chloroforme et octane). La surface de silicium microstructurée a été rendue très hydrophile par passage dans un mélange de "piranha" (en volume, 1/3 d'eau oxygénée à 50% et 2/3 d'acide sulfurique concentré). Elle est utilisée immédiatement après ce traitement pour le dépôt. De cette manière, lorsque la goutte est déplacée sur le substrat, les phospholipides ne se déposent pas sur les parties planes de la surface (FIGURE 2.5 b. i). Le ménisque se déplace avec un angle de contact fixe égal à l'angle de reculée θ_r . Lorsque la ligne de contact atteint le bord d'un trou, l'angle apparent devient très grand et la ligne s'accroche (FIGURE 2.5 b. ii). Une partie du liquide reste alors piégée dans le trou (FIGURE 2.5 b. iii). La formation du film de phospholipides a ensuite lieu quelques secondes après, une fois que tout le solvant s'est évaporé (FIGURE 2.5 b. iv). Ce dépôt sélectif de liquide a pu être précisément observé à l'aide d'une caméra de faible focale (FIGURE 2.5 c).

Nous avons observé le motif final par microscopie de fluorescence, en utilisant un mélange de phospholipides de 98% de DOPC + 2% d'un phospholipide fluorescent, la 1-oléoyl-2-6-[(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino]hexanoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (NBD-PC). De cette manière, les quantités de molécules déposées dans les microstructures peuvent être quantifiées et comparées. Pour une meilleure uniformité, il est nécessaire de fixer la température, du fait de l'importance de l'évaporation. Ceci est réalisé avec le module Pelletier de l'appareil. Nous avons choisi 20°C pour toutes les expériences. Dans les conditions optimales (le solvant est le trichloroéthylène et la surface est traitée au piranha), le motif obtenu est particulièrement régulier. Les FIGURES 2.6 a et b montrent un exemple réalisé en traduisant une goutte de 80 μL de concentration 0,5 mg.mL^{-1} à $v = 25 \mu\text{m.s}^{-1}$ sur une surface à trous de $d = 12 \mu\text{m}$. Chaque trou montre une quantité similaire de molécules (variant au maximum de 20%), ceci sur une aire pouvant être de l'ordre du cm^2 . Ce type de motif peut être obtenu pour différentes v , comme nous allons le voir dans la section suivante. Par contre ce dépôt est nettement moins sélectif si un solvant plus mouillant est utilisé (par exemple avec de l'octane, FIGURE 2.6 c) ou si le silicium n'est pas assez hydrophile (sans passage dans le mélange piranha, FIGURE 2.6 d). Dans ces situations, l'ensemble est très irrégulier et un dépôt sur les zones planes est aussi observé.

2.2.4 Effet de la vitesse de translation et de la taille des microstructures

L'influence plus précise de la vitesse de dépôt ainsi que de la taille des microtrous a été étudiée. Trois surfaces ayant un réseau isomorphe de trous de diamètre $d = 6, 12$ et $24 \mu\text{m}$ ont été préparées. Le rapport entre la surface des trous et la surface totale sont égaux pour ces trois substrats. Les dépôts obtenus pour trois vitesses différentes ($v = 15, 25$ et $45 \mu\text{m.s}^{-1}$) sont représentés FIGURE 2.7.

Allure du dépôt et quantité déposée

Tout d'abord, indépendamment de d , le motif du dépôt reproduit de façon fidèle la microstructure du substrat. Les molécules se situent bien à l'intérieur des microstructures. Ensuite, v a un effet important sur la quantité de phospholipides déposés dans les trous. De façon globale, l'intensité de fluorescence augmente quand v diminue. Pour quantifier précisément la quantité de phospholipides déposée, le signal de fluorescence a été converti en épaisseur de film. Une courbe de calibration a en effet été réalisée dans une étude précédente [213]. Celle-ci a permis de

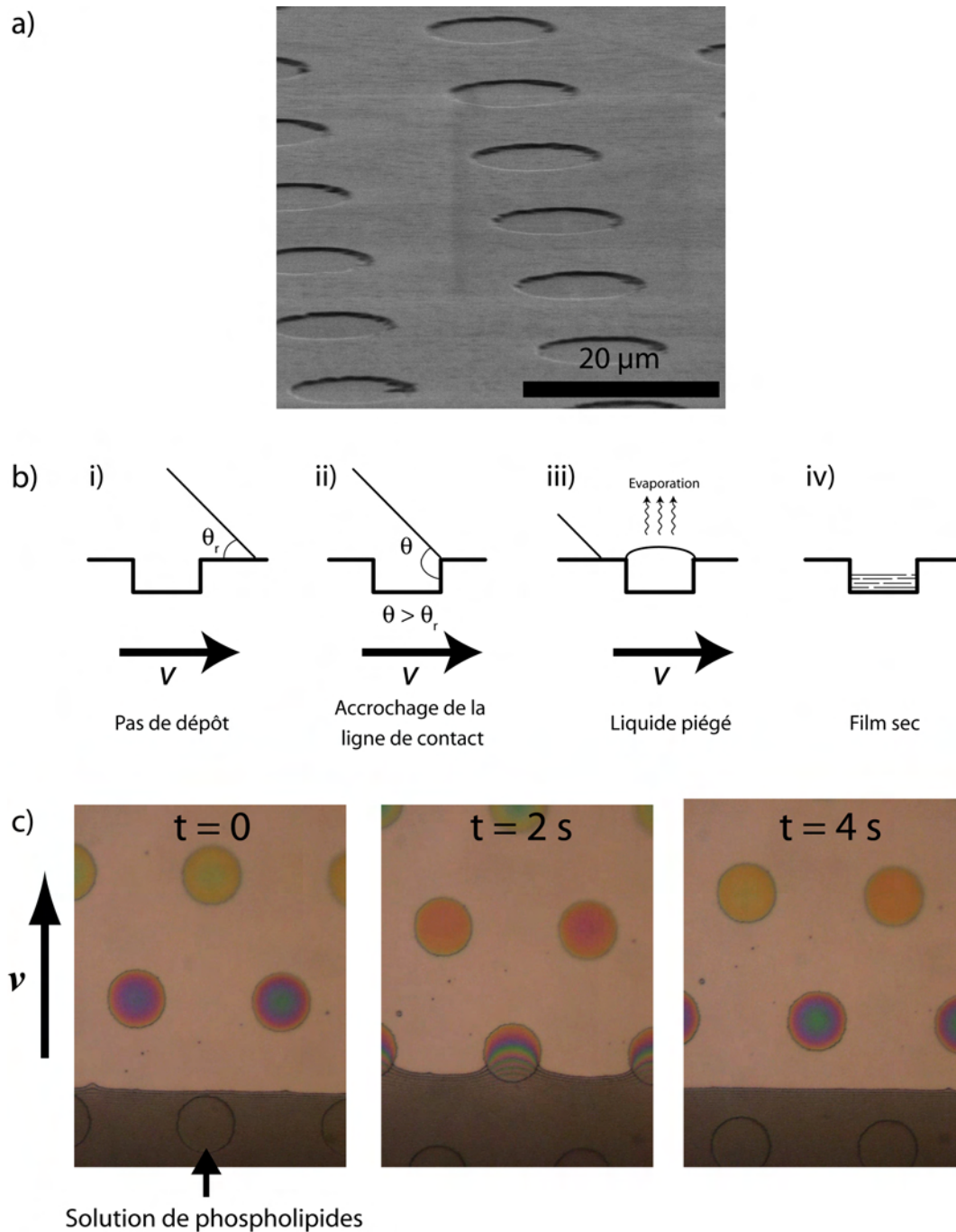


FIGURE 2.5 – Dépôt sélectif d’une solution de phospholipides dans les microstructures d’une surface de silicium. a) Image par microscopie électronique à balayage d’une surface de silicium microstructurée par des trous d’un diamètre de $12 \mu\text{m}$. b) Principe du dépôt sélectif lors de la translation à vitesse v de la surface microstructurée sous une goutte fixe : la solution de phospholipides est en situation de mouillage partiel sur la surface plane, elle n’est déposée que dans les trous. L’évaporation conduit ensuite à la formation du film de phospholipides. c) Images successives en couleurs réelles du dépôt sélectif ayant lieu au niveau de la ligne de contact d’une goutte de trichloroéthylène lors de la translation du substrat (vers le haut). Les couleurs correspondent aux irisations qui existent du fait de la faible épaisseur de liquide. Les trous ont un diamètre de $24 \mu\text{m}$.

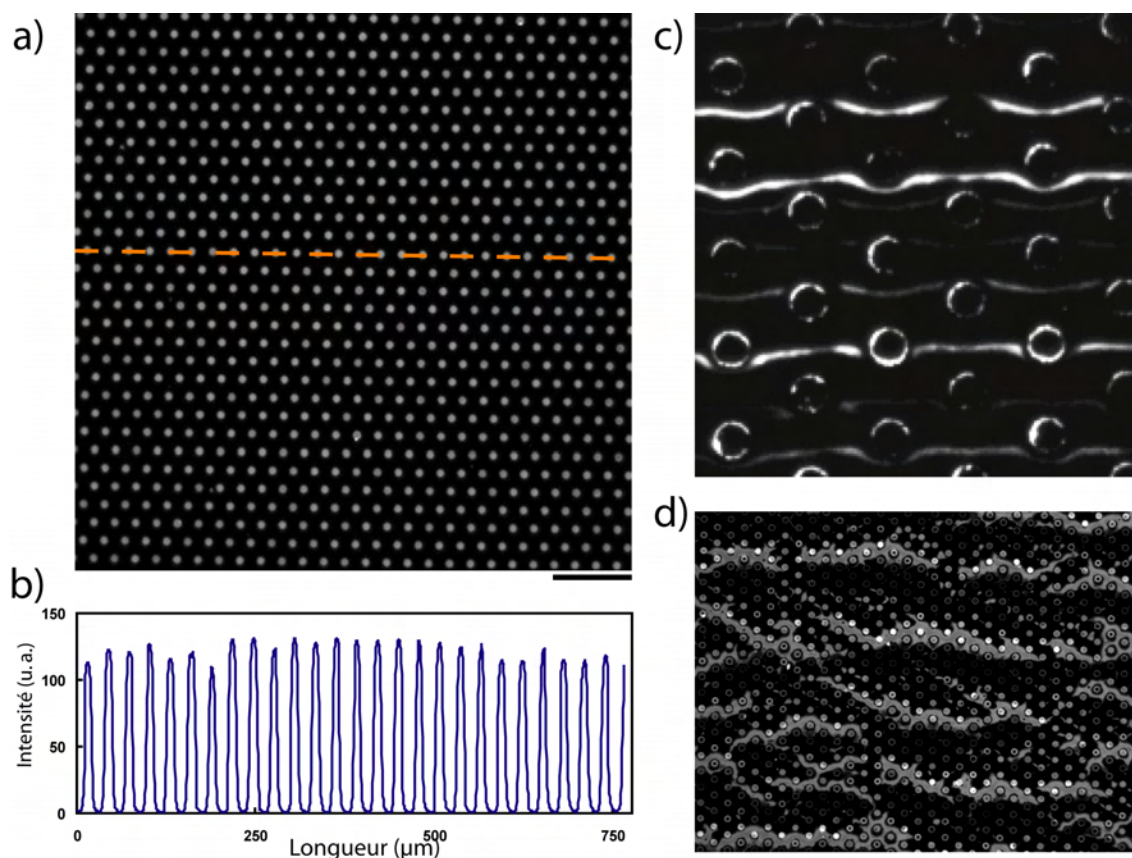


FIGURE 2.6 – Allure des motifs obtenus par translation à vitesse constante d’une solution de phospholipides (98% DOPC + 2% NBD-PC) sur un substrat microstructuré de silicium suivant son hydrophilicité et la nature du solvant. a) Image par microscopie de fluorescence obtenue sur un substrat très hydrophile après passage dans un mélange piranha ayant des trous de diamètre $d = 12 \mu\text{m}$ déplacé à une vitesse $v = 25 \mu\text{m.s}^{-1}$. Le solvant est le trichloroéthylène et la solution a une concentration totale de $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$. La barre d’échelle représente $100 \mu\text{m}$. b) Profil d’intensité de fluorescence selon la ligne en pointillés indiquée en a). c) Motif obtenu par translation d’une goutte d’une solution de phospholipides à $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ dans de l’octane sur une surface de silicium hydrophile. Le diamètre des trous est de $12 \mu\text{m}$. d) Motif obtenu par translation sur une surface pas assez hydrophile (n’ayant pas subi de passage dans le mélange piranha, mais simplement un passage de 3 minutes dans un plasma d’oxygène à 500 mTorr) à vitesse $v = 80 \mu\text{m.s}^{-1}$. Le solvant est le trichloroéthylène et la concentration de la solution est de 4 mg.mL^{-1} . Le diamètre des trous est de $12 \mu\text{m}$.

relier l'intensité de fluorescence dans les mêmes conditions d'acquisition, à l'épaisseur moyenne d'un film de phospholipides mesurée par ellipsométrie (FIGURE 2.8). De cette manière, le signal moyen de chaque trou a été converti en épaisseur moyenne de film (FIGURE 2.9). Pour $15 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1} < v < 75 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$, l'épaisseur moyenne des films varie de 28 à 100 nm, ce qui correspond à la superposition d'environ 7 à 25 bicouches.

Deux choses caractérisent l'évolution de la quantité de phospholipides déposée en fonction de d et v . Elle est d'une part relativement indépendante de d . Pour une même v , les microstructures étant isomorphes, c'est une même quantité de liquide qui est déposée dans les trous, donc une même densité de phospholipides qui se retrouve ensuite dans le film. D'autre part, la quantité totale par trou diminue en fonction de v . Cette tendance moyennée sur les trois tailles de trous montre un comportement linéaire. Ceci peut être expliqué de la façon suivante. L'évaporation du solvant provoque l'accumulation des phospholipides au niveau de la ligne de contact, d'autant plus fortement que v est basse. Le film qui en résultera dans les trous sera alors plus épais lorsque v est basse. Le côté linéaire de cette évolution reste à préciser, mais est sans doute une approximation sur cette gamme étroite de vitesse (moins d'une décade) de la proportionnalité entre l'épaisseur du film et v^{-1} , qui a été observée dans notre équipe sur silicium plan [213] (comme il a été vu lors du bilan de matière en régime d'évaporation, dans l'équation 2.5 précédente).

Il est à noter que nous n'avons pas travaillé avec d'autres concentrations en phospholipides. Il serait bien sûr nécessaire d'observer l'effet de C sur l'allure des motifs. Néanmoins comme l'indique l'équation 2.5, l'épaisseur du film est inversement proportionnelle à v , mais est aussi proportionnelle à C . Ces deux paramètres ont *a priori* un effet antagoniste : travailler avec une C deux fois plus grande reviendrait à travailler avec une v deux fois plus basse.

Organisation au sein des trous

L'organisation précise du film dans les trous est aussi dépendante de v et d . Pour $v \geq 40 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$, le dépôt de molécules consiste en un anneau, de la taille du trou, quelque soit d . Ceci s'explique par le fait que la goutte piégée dans la microstructure a une forme convexe, qui est due à sa faible affinité pour le substrat. De façon analogue aux anneaux qui sont visibles sur les tâches de café [230], l'évaporation du solvant provoque alors l'apparition d'un flux radial de matière et conduit à l'accumulation des phospholipides sur les bords de la goutte. Puisque la quantité totale de molécules par trou est plus faible qu'aux vitesses plus basses, cette accumulation est telle qu'il y a déplétion de phospholipides dans le centre de la goutte. Pour des vitesses inférieures, les trous sont remplis d'un disque homogène pour $d = 6$ et $12 \mu\text{m}$. Le phénomène de déplétion observé à plus haute vitesse n'a ici manifestement pas lieu. Par contre même pour de faibles vitesses, les trous de $d = 24 \mu\text{m}$ montrent des inhomogénéités dans chaque trou. Leur interprétation est moins claire. Les profils de fluorescence montrent que la quantité de phospholipides présents est moindre au centre des trous. Ceci indique que le flux radial de matière qui existe durant l'évaporation joue un rôle plus sensible lorsque la goutte est plus grande. Seule une déplétion partielle est visible, car la concentration des phospholipides est plus importante qu'à haute vitesse. A cela s'ajoute sans doute aussi des inhomogénéités de concentration en surface de la goutte, qui engendrent des flux Marangoni qui rendent les profils encore plus complexes.

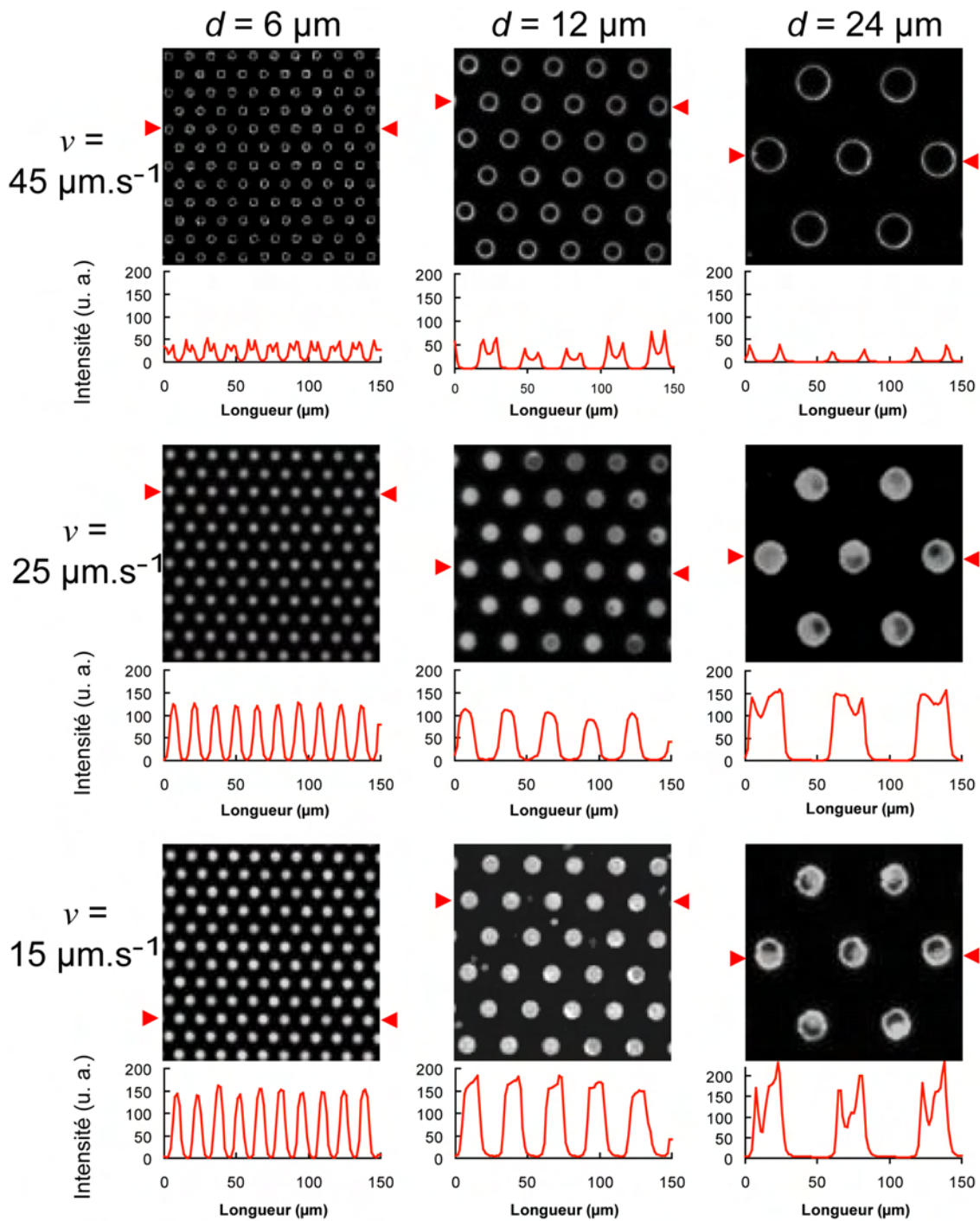


FIGURE 2.7 – Motifs obtenus après dépôt de phospholipides en fonction du diamètre d des trous de la microstructure et de la vitesse de translation v . Pour chaque image obtenue par microscopie de fluorescence (en haut) est tracé un profil d'intensité de fluorescence (en bas) entre chaque flèche rouge. Pour chaque expérience, la solution de phospholipides est composée de 98% DOPC + 2% NBD-PC à $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ dans du trichloroéthylène. La taille de chaque image est de $150 \times 150 \text{ } \mu\text{m}^2$.

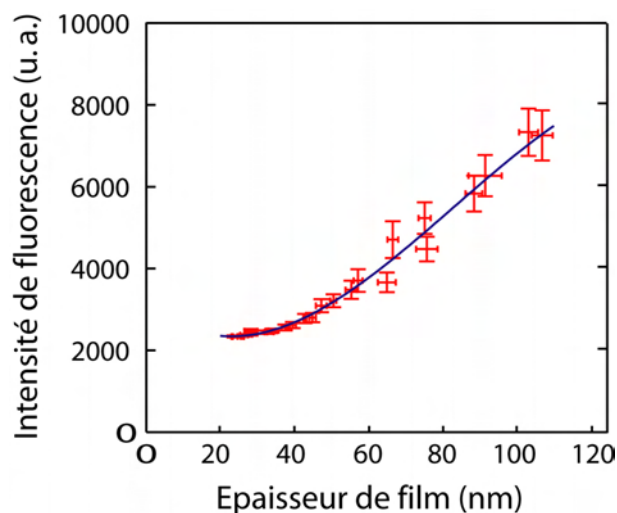


FIGURE 2.8 – Courbe de calibration de l'intensité de fluorescence moyenne d'un film homogène de phospholipides (donnée par l'observation au microscope) en fonction de son épaisseur (mesurée par ellipsométrie). La composition du film est, en poids, de 98% DOPC et 2% NBD-PC.

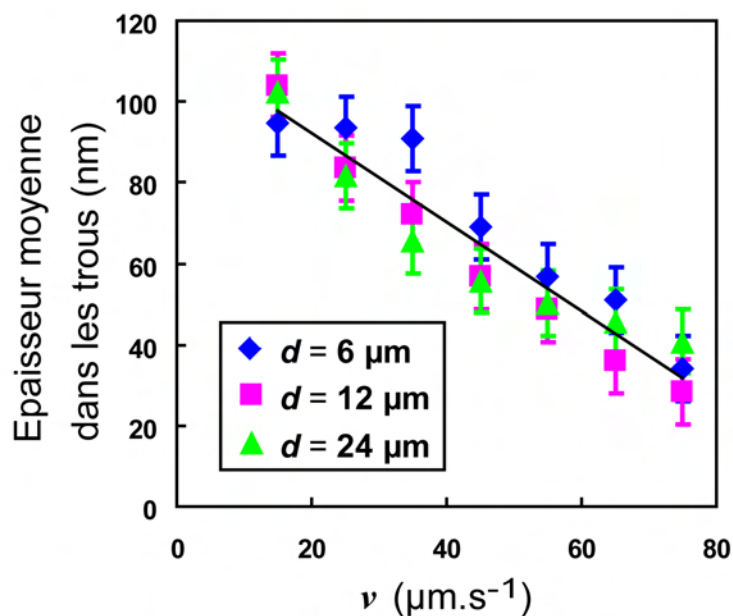


FIGURE 2.9 – Épaisseur moyenne du film de phospholipides déposé par trou en fonction de la vitesse de translation v et du diamètre d (6, 12 et 24 μm). Chaque point représente une moyenne sur une surface de $750 \times 750 \mu\text{m}^2$ sur les dépôts observés en FIGURE 2.7. La droite correspond à une régression linéaire sur l'ensemble des points (indépendamment de d). Son équation est $y = -1,1 x + 114$ ($R^2 = 0,99$).

2.3 Formation de GUV monodisperses

Nous avons finalement utilisé le motif de multicouches de phospholipides pour générer des GUV avec une taille contrôlée. Pour cela, un dépôt de DOPC (solution à $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$) a été réalisé sur silicium pour les 3 diamètres de trous, à une vitesse de $15 \text{ }\mu\text{m.s}^{-1}$ (pour obtenir une épaisseur d'environ 20 bicouches). La surface recouverte de phospholipides a été directement utilisée comme électrode dans une cellule d'électroformation, en regard d'une électrode d'ITO non recouverte (FIGURE 2.10 a). La cellule a été remplie d'une solution de sucrose à $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ et une tension alternative (2 V, 10 Hz) a été appliquée pendant 4 heures. La solution a ensuite été extraite de la cellule et ajoutée à un même volume de solution de glucose de même osmolarité. Après une heure de décantation, des GUV sont visibles par microscopie à contraste de phase (FIGURE 2.10 b).

Pour chaque taille de trous, le diamètre d'environ 300 vésicules a été mesuré manuellement. La distribution en taille des GUV est reportée FIGURE 2.10 c et comparée à celle des GUV obtenues après électroformation d'un film déposé manuellement sur une surface plane de silicium. La différence est nette entre les deux méthodes. Sur une surface plane et sans réel contrôle du dépôt, la distribution des tailles est très large (de 1 à $150 \text{ }\mu\text{m}$) et ne montre pas de maximum précis. Avec le dépôt sur surface microstructurée, les distributions sont bien plus fines et caractérisées par un maximum bien défini. De plus, une certaine tendance est visible suivant la taille des trous de la microstructure : même si le maximum n'évolue pas de façon significative, il apparaît que plus d est grand, plus le diamètre moyen des GUV est grand.

La description qualitative du mécanisme de gonflement permet d'expliquer l'élargissement progressif des trois distributions. Il est admis que la solution entre à travers les défauts de la multicouche. Ceci a principalement lieu ici au niveau des parties latérales des motifs, au niveau de la frontière avec le silicium. Dans le cas de motifs suffisamment petits, les GUV sont particulièrement monodisperses. Dans le cas des plus gros motifs, il y a plus de défauts, comme nous l'avons constaté FIGURE 2.7. La solution peut donc s'introduire dans plus d'endroits. Les membranes qui gonflent sont plus fractionnées, mais en même temps elles peuvent aussi fusionner entre elles pour former des GUV dont le diamètre est plus en lien avec celui du trou. Il en résulte des GUV plus polydisperses en taille.

Ceci montre que la restriction de l'aire du film de phospholipides initial permet d'améliorer énormément la monodispersité des GUV après électroformation. C'est la première fois qu'un tel contrôle en électroformation est réalisé. De plus, en modifiant la taille caractéristique de la microstructure pour faire varier l'étendue du film, un certain contrôle sur la taille des GUV est possible.

2.4 Conclusion

Nous avons montré ici comment une méthode de dépôt contrôlé de matière sur une surface plane pouvait être utilisée pour la préparation de motifs micrométriques de molécules biologiques. La méthode d'assemblage capillaire, auparavant utilisée pour le dépôt sélectif de colloïdes et de nanoparticules, a été appliquée pour la première fois ici à des molécules en solution. Dans notre cas, nous nous sommes intéressés aux phospholipides. Des motifs réguliers de multicouches de phospholipides ont pu être formés sur une surface de silicium microstructurée, avec des aires directement liées au design de la microstructure. En comparaison avec le micro-contact printing, la technique principale qui permet la formation de motifs de multicouches de phospholipides,

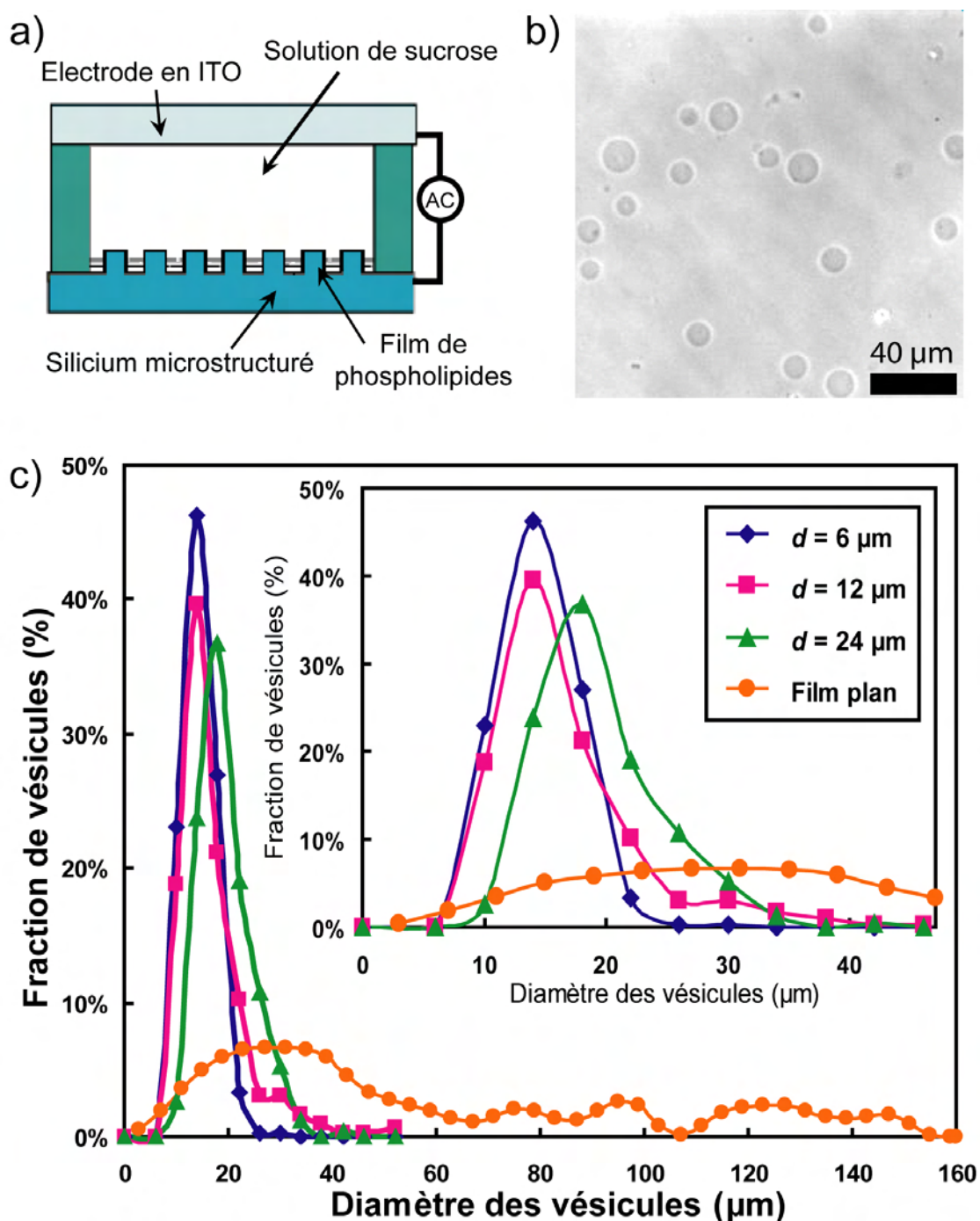


FIGURE 2.10 – Electroformation de GUV relativement monodisperses en taille à partir du dépôt de phospholipides sur silicium microstructuré. a) Schéma de principe de la cellule d'électroformation dans laquelle l'une des électrodes est en silicium microstructuré. b) Image par microscopie à contraste de phase des GUV obtenues après gonflement et sédimentation à partir d'un dépôt de DOPC à $v = 15 \mu\text{m.s}^{-1}$ sur une structure à trous de $6 \mu\text{m}$ de diamètre. c) Distribution du diamètre des GUV obtenues par électroformation à partir de dépôts sur des structures à trous de 6, 12 et $24 \mu\text{m}$ de diamètre. Pour comparer, la distribution en taille des GUV obtenues par électroformation à partir d'un dépôt manuel sur un substrat plan de silicium est aussi représentée.

notre méthode offre pour la première fois un contrôle nanométrique sur l'épaisseur du film. Le domaine de vitesse que nous avons exploré nous a permis d'obtenir des épaisseurs moyennes comprises entre 28 et 100 nm d'épaisseur, avec une précision satisfaisante de ± 10 nm. Le motif a pu être formé avec une très bonne homogénéité en quelques minutes sur une aire de l'ordre du cm^2 . Seule la dip-pen nanolithographie offre des performances supérieures, mais elle reste une technique lourde et difficilement accessible aux laboratoires de chimie et de biophysique. Il serait possible d'optimiser notre méthode en contrôlant mieux les paramètres externes qui jouent sur l'évaporation. En plus de la température, le contrôle plus précis de la convection de l'air ambiant au dessus de la goutte en translation permettrait d'augmenter la précision sur l'épaisseur du film et sa régularité sur une large zone.

En plus de la facilité à microstructurer et à contrôler sa chimie de surface, le silicium peut aussi jouer le rôle d'électrodes. Les dépôts réalisés ont ainsi permis de produire des GUV par électroformation avec une relative monodispersité en taille. Mais nous pouvons imaginer que ce type de motif peut aussi être intéressant pour le développement de nouveaux biosenseurs, en intégrant dans la multicouche des molécules fonctionnelles capables d'interagir avec des cibles précises. La structure périodique du film permet de répéter les zones de reconnaissance, pour multiplier les expériences et faire varier certains paramètres (concentration en molécule sonde, nature de l'analyte, etc...). De façon plus générale, cette technique d'assemblage capillaire pourrait être appliquée à d'autres molécules biologiques comme les protéines ou les anticorps, de façon à élargir les possibilités de fonctionnalisation des surfaces.

Chapitre 3

Interaction GUV–tensioactifs photosensibles

Comme il a été décrit dans les parties précédentes, les GUV sont le produit de l'autoassemblage de tensioactifs particuliers, les phospholipides. De ce fait, elles sont susceptibles d'interagir avec d'autres tensioactifs, donc la partie hydrophobe aura une certaine affinité pour l'intérieur de la bicouche. Ce contact peut donner lieu à des déformations voire à la rupture de la GUV. Si cette interaction est contrôlée spatio-temporellement par un stimulus extérieur, par exemple lumineux, elle représente un moyen de libérer à la demande le contenu de la vésicule.

Nous allons d'abord détailler dans ce chapitre les différentes actions externes qui existent pour modifier la structure et la stabilité des GUV, en particulier le cas de la lumière. Ensuite nous présenterons l'étude que nous avons effectuée sur l'interaction entre des GUV et l'AzoTAB, le tensioactif présenté dans les Parties I et II. Nous montrerons comment une illumination perturbe la stabilité de la bicouche et étudierons le rôle de la composition membranaire dans le cas de GUV multi-domaines sur la réponse à la lumière.

3. Interaction GUV–tensioactifs photosensibles

3.1	Lumière et vésicules	127
3.1.1	Action extérieure sur la rupture des liposomes	127
3.1.2	Les vésicules photostimulables	127
	SUV	127
	GUV	128
	Polymérosomes	128
3.1.3	Ajout d’agents photostimulables à des vésicules	128
3.2	Photodestruction de GUV	130
3.2.1	Influence de l’illumination UV	130
3.2.2	Influence de la concentration en AzoTAB et de la composition des GUV	130
3.3	Description du mécanisme	132
3.3.1	Contrainte sur la membrane	132
3.3.2	Influence de la composition de la membrane	134
3.4	Contrôle spatial de la photodestruction	135
3.5	Tentative d’électrogonflement d’un film contenant de l’AzoTAB . .	135
3.6	Conclusion	138

3.1 Lumière et vésicules

3.1.1 Action extérieure sur la rupture des liposomes

La possibilité d'utiliser les vésicules comme container pour transporter des molécules thérapeutiques dans un organisme a poussé la recherche à s'intéresser au développement de liposomes sensibles à un stimulus externe, de manière à permettre l'administration sélective de leur contenu. Lors de leur introduction *in vivo*, les vésicules relarguent leur milieu interne, en général soit par perméation continue, soit lors de fusion avec la membrane d'autres cellules. En plus de ne pas forcément interagir de manière spécifique avec l'organe cible, les temps caractéristiques de ces phénomènes sont difficilement contrôlables, pouvant être trop longs (pas d'effet) ou trop courts (mauvais ciblage, concentration trop importante en principe actif qui peut être nocive). Disposer d'un stimulus externe pour induire la rupture de la membrane, permet d'imaginer pouvoir sélectionner la manière dont se fait l'administration de la molécule d'intérêt, aussi bien dans le temps que dans l'espace.

Le stimulus dont l'effet sur des GUV a été étudié le premier est la température [231]. Une modification de température induit une variation dans l'arrangement latéral des phospholipides et modifie alors le rapport entre la surface et le volume de la vésicule. Ceci provoque des changements de géométrie : une GUV initialement sphérique (pour laquelle le rapport surface-volume est minimal) peut s'allonger sous forme oblate, montrer des régions concaves ou se diviser en deux. Ce type de changement peut aussi être observé en variant la force osmotique du milieu externe. Une différence non nulle de pression osmotique entre l'intérieur et l'extérieur d'une GUV conduit, si elle est assez grande (quelques mOsm), à sa rupture. Mais avant de rompre complètement, il est possible de voir apparaître des invaginations régulières dans la membrane [232] ou des vésicules filles [233].

Malgré leurs effets manifestes, ces deux types de facteur externe possèdent les inconvénients de pouvoir être faiblement localisables, de nécessiter un contact mécanique avec la solution (pour la température) ou l'introduction d'agents supplémentaires (pour le stress osmotique). L'action à distance sur les vésicules s'est développée, comme nous allons le voir, par l'intermédiaire de la lumière. Il est à noter que le champ magnétique a aussi été utilisé pour induire des changements de morphologies sur des GUV, en les rendant sensibles au champ en y introduisant un fluide magnétique [234].

3.1.2 Les vésicules photostimulables

Les progrès de la synthèse organique ont permis de mettre au point des molécules étant à la fois sensibles à la lumière et capable de s'autoassembler sous forme de bicouches et de vésicules. De cette façon, des capsules biomimétiques photostimulables sont constructibles. Ceci a été imaginé dès 1980 par Kunitake *et al.*, qui ont observé des changements de l'organisation en bicouches de tensioactifs contenant un groupement diazobenzène suivant l'illumination [235].

SUV

L'analyse de l'existence et de l'assemblage de SUV composées d'agents photosensibles a ensuite eu lieu. Toujours grâce aux groupements diazobenzènes, la rupture sous lumière UV de SUV a été observée par Cryo-TEM et SANS dans des solutions composées d'un mélange de tensioactifs anioniques et de molécules cationiques photosensibles tensioactives [236] ou bolaphiles

[237, 238]. Leur reformation réversible sous lumière visible a aussi été constatée. De même, la destruction photoinduite de SUV a été réalisée avec un mélange de surfactants cationiques et de surfactants anioniques photosensibles [239]. En plus de changements morphologiques, c'est aussi la perméabilité de ces édifices qui peut être augmentée sous éclairage [240], en y introduisant des phospholipides modifiés à queue photoisomérisable (diazobenzène [241, 242, 243], ou fonction stilbène [244, 21]) ou photoréticulable (groupe dièneoyl [245]) ou à l'aide d'un dérivé amphiphile du vert de malachite qui change de charge sous UV [246].

GUV

Ces changements photoinduits ont été réalisés en parallèle sur des vésicules géantes. Les molécules précédentes ne pouvant pas s'autoassembler en bicouche de faible courbure, les systèmes sont différents. Des changements de structure ont été observés sur des GUV ne contenant pas de phospholipides. Faure *et al.* ont ainsi formé des vésicules géantes à partir de tensioactifs photosensibles de type gemini cationique (la molécule AzoGEM du Chapitre 2 de la Partie II [55]) et zwitterionique [247]. Leur rupture instantanée a été observée dans certaines conditions sous illumination UV (FIGURE 3.1 a). Plus intéressant du point de vue de la biocompatibilité, des GUV phospholipidiques photostimulables ont aussi été mis au point. La lumière UV a permis de modifier la morphologie de GUV contenant une fraction de cholestérol modifié contenant une queue diazobenzène [248]. Des résultats plus prononcés ont été obtenus en utilisant une partie d'un agent bolaphile à groupement diazobenzène capable de former des GUV avec des phospholipides [233]. Cette molécule augmente sa section sous lumière UV, ce qui augmente l'aire de la vésicule et provoque de manière réversible, la formation de vésicules filles, des invaginations [249] et l'ouverture de la membrane. Il est à noter qu'en plus de la libération de son contenu, c'est aussi à l'inverse la capture de milieu qui est possible avec ce système. En dernier lieu, l'ajout d'un copolymère amphiphile modifié par des groupements diazobenzène a été effectué au moment de la formation des GUV [250]. La membrane de ces objets a montré une perméabilité photodépendante (FIGURE 3.1 b).

Polymérosomes

Enfin, c'est la mise au point de polymérosomes photosensibles qui a été réalisée. Les polymérosomes sont des vésicules sphériques dont la membrane est composée de la juxtaposition de polymères dibloc ou tribloc dont les parties ont différentes polarités. Même si le caractère biomimétique de ces objets est moins évident que celle des GUV phospholipidiques, ils sont à la fois plus robustes et plus facilement fonctionnalisables. En particulier, il est possible d'intégrer un monomère photochrome lors de la synthèse des polymères en bloc. En utilisant un groupement diazobenzène, la morphologie de ces édifices a été modifiée sous éclairage [251], et comme l'ont montré Mabrouk *et al.* c'est aussi la libération totale et rapide de leur contenu qui peut être photocontrôlée [252] (FIGURE 3.1 c).

3.1.3 Ajout d'agents photostimulables à des vésicules

L'autre stratégie pour obtenir un liposome photostimulable est de le mettre en présence d'un agent photosensible après l'avoir formé. Des modifications de la géométrie de GUV (DOPC) plongées dans un bain de molécules photochimiques (ferricyanides) ont été obtenues après que la réaction ait été initiée par la lumière [253]. L'illumination permet ici de changer la nature

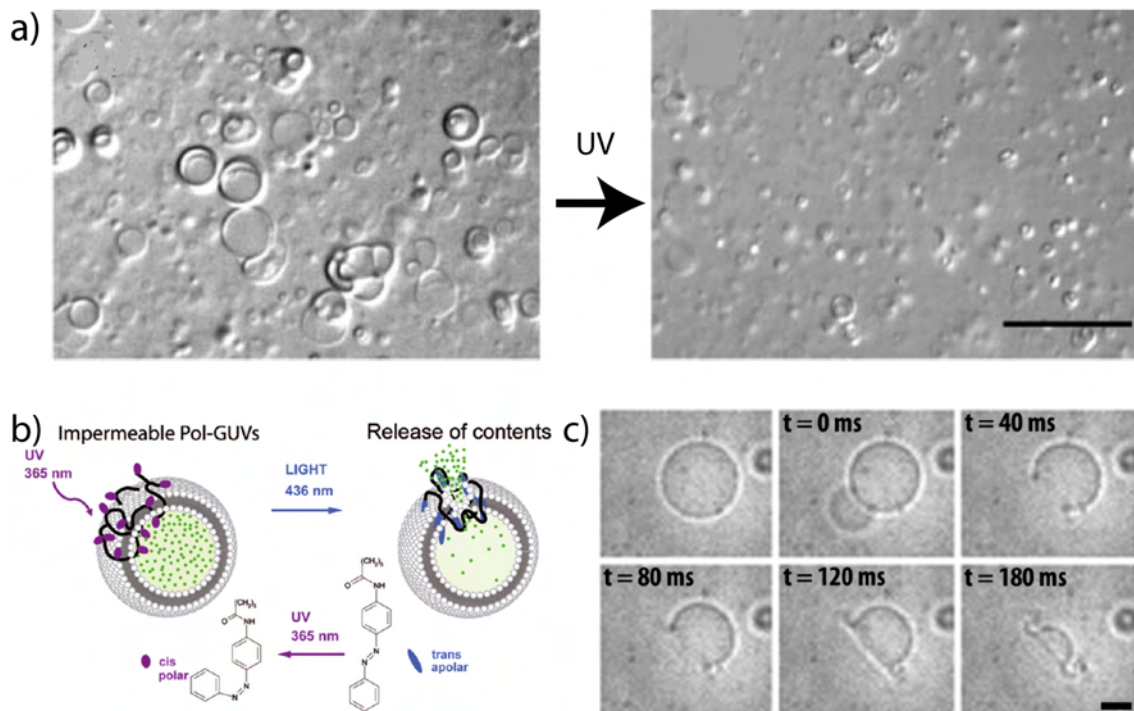


FIGURE 3.1 – Photostimulation de vésicules géantes. a) Photodestruction sous lumière UV de vésicules formées du mélange d'un tensioactif photosensible cationique de type gemini et d'un tensioactif cationique. La barre représente $100 \mu\text{m}$. Adapté de [55]. b) Illustration de la perméabilisation photoinduite d'une GUV formée d'un mélange de phospholipides et d'un copolymère amphiphile comportant des groupements diazobenzène. Extrait de [250]. c) Séquences montrant l'éclatement induit sous illumination UV d'un polymérosome fonctionnalisé par des groupements photoisomérisables. La barre d'échelle représente $5 \mu\text{m}$. Extrait de [252].

des ions environnants, ce qui modifie la charge des parois de manière asymétrique. A notre connaissance, aucun autre exemple n'existe avec des GUV phospholipidiques. Il est vrai qu'en comparaison des GUV photosensibles directement obtenues, cette méthode nécessite une seconde étape où l'agent est ajouté et limite les possibilités d'introduction ultérieures de l'objet dans un organisme. Néanmoins, cette voie permet de multiplier le nombre de molécules qui peuvent donner un caractère photosensible à une GUV phospholipidique. Et c'est dans cette optique que nous avons réalisé le travail qui suit.

3.2 Photodestruction de GUV

3.2.1 Influence de l'illumination UV

Nous avons observé l'effet d'une illumination UV sur des GUV phospholipidiques ayant sédimenté dans un bain d'AzoTAB.

Les vésicules ont été formées par électroformation dans une solution de sucrose. Leur composition consiste en trois molécules : de la DOPC et de la DPPC en proportions égales et une certaine quantité de cholestérol. Ce mélange a été choisi car il fournit les résultats les plus spectaculaires. Des manipulations similaires avec de la DOPC seule n'ont pas montré de rupture de vésicules. Les GUV ont ensuite été introduites dans un puits avec un volume similaire d'une solution de glucose de même osmolarité (112 mOsm) contenant différentes concentrations en AzoTAB (0 ; 0,25 ; 0,5 et 1 mmol.L⁻¹). Ces mélanges ont été possibles en préparant une solution de glucose à 112 mOsm et une solution d'AzoTAB à 2 mmol.L⁻¹ dans du glucose de même osmolarité. Après au moins 1 heure de sédimentation, des GUV sont visibles au fond du puits par microscopie à contraste de phase. Il est à noter qu'elles restent moins nombreuses que lorsqu'il n'y a pas d'AzoTAB, d'environ 30%. Comme tous les tensioactifs, il a une tendance à interagir avec les membranes et à les rompre.

En les illuminant avec de la lumière UV (365 nm) provenant de l'objectif d'observation, toutes les GUV montrent immédiatement une légère rétraction (leur taille diminue d'environ 5%). De plus, certaines d'entre elles éclatent après une ou deux secondes d'éclairement. Ces phénomènes ne sont pas observés en absence d'AzoTAB (FIGURE 3.2 a). La fraction de GUV éclatées peut être importante : pour des vésicules composées de 40 mol% de cholestérol, lorsque [AzoTAB] = 1 mmol.L⁻¹, plus de la moitié des GUV sont détruites après illumination (FIGURE 3.2 b).

3.2.2 Influence de la concentration en AzoTAB et de la composition des GUV

La même expérience a été réalisée en examinant précisément l'influence de deux facteurs sur la quantité de GUV qui éclatent sous UV : la concentration en AzoTAB du milieu externe (0 ; 0,25 ; 0,5 et 1 mmol.L⁻¹) et la teneur en cholestérol de leur membrane (0, 10, 20, 30, 40 mol%). Les résultats sont rassemblés dans l'histogramme de la FIGURE 3.3, qui montre le pourcentage de GUV éclatant suite à une illumination UV d'une seconde environ.

L'effet de la concentration en AzoTAB est nette. En l'absence d'AzoTAB, pratiquement toutes les GUV restent intactes. Par contre en présence d'AzoTAB, une fraction significative des GUV éclate et cette proportion augmente avec la concentration en AzoTAB. Pour [AzoTAB] = 1 mmol.L⁻¹, la fraction de GUV qui éclate varie en fonction de la concentration en cholestérol, entre 20% ([cholestérol] = 10 mol%) et 52% ([cholestérol] = 40 mol%).

L'influence de la fraction de cholestérol contenue dans la membrane présente une allure très

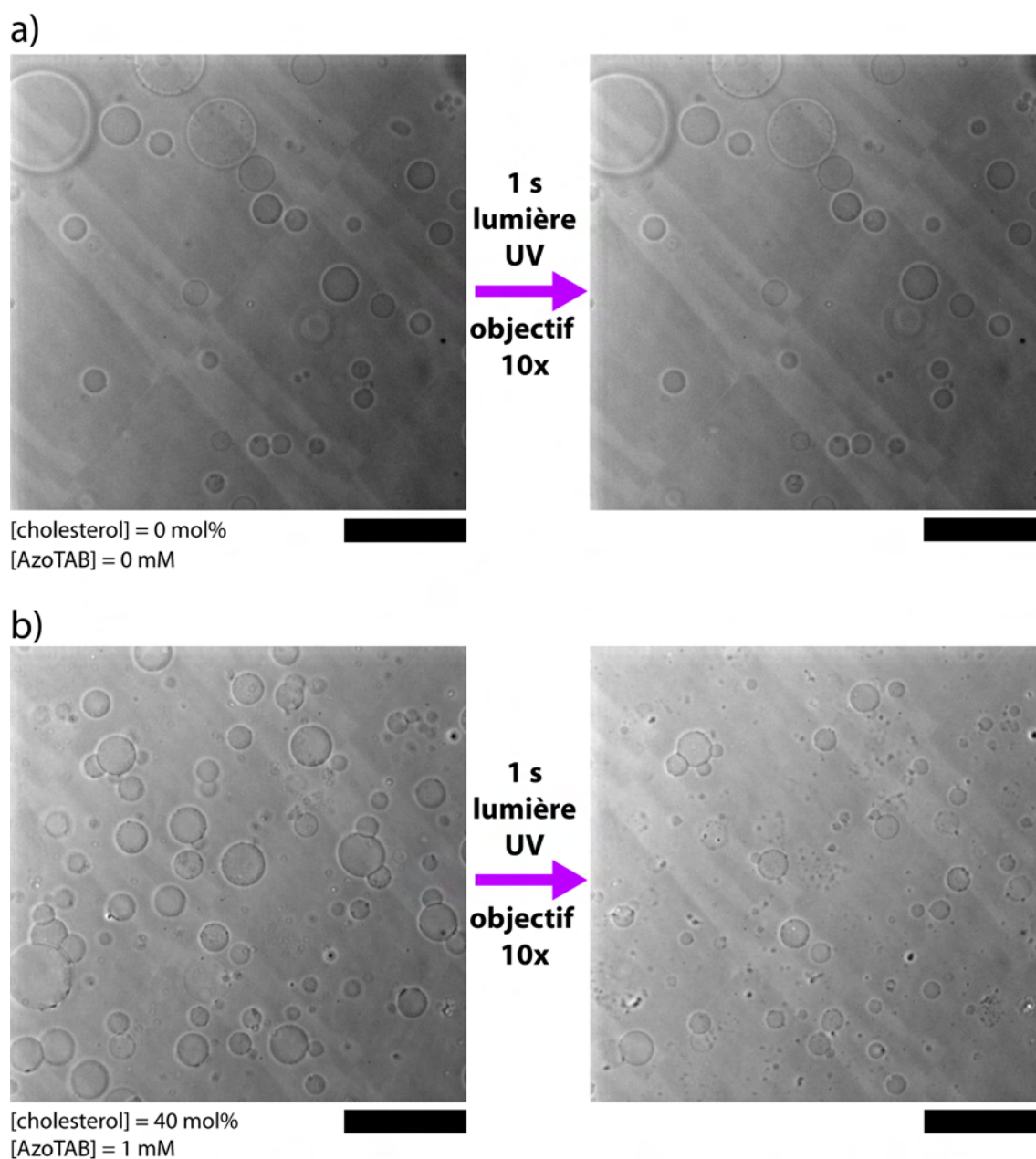


FIGURE 3.2 – Effet d’une illumination UV sur des GUV en présence ou non d’AzoTAB dans la solution de sédimentation. Les images sont obtenues par microscopie à contraste de phase après deux heures de sédimentation. Les barres d’échelle représentent $200\ \mu\text{m}$. a) Illumination UV (d’une durée d’environ 1 seconde) de GUV composées de DOPC/DPPC 1:1 sans AzoTAB présent dans la solution de sédimentation. b) Illumination UV de GUV composées de DOPC/DPPC 1:1 et 40 mol% de cholestérol dans une solution de sédimentation contenant $[\text{AzoTAB}] = 1\ \text{mmol.L}^{-1}$.

intéressante. Pour des teneurs comprises entre 10 et 40 mol%, plus il y a de cholestérol, plus la probabilité de rupture est grande et ce, quelle que soit la concentration en AzoTAB. Par contre, un comportement singulier est observé en l'absence de cholestérol. Dans ce cas, les GUV paraissent plus sensibles à la lumière que pour la plupart des autres compositions.

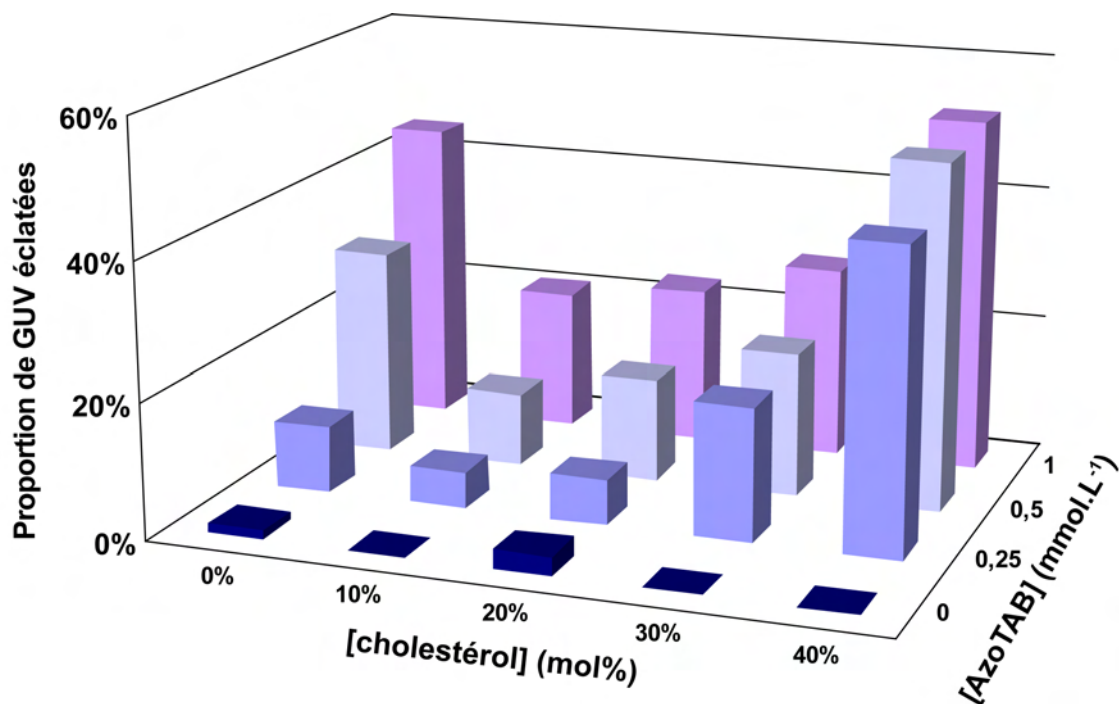


FIGURE 3.3 – Effet de la teneur en cholestérol de GUV composée de DOPC/DPPC 1:1 sur leur capacité à éclater sous illumination UV en présence de différentes concentrations d'AzoTAB. Chaque barre de l'histogramme correspond à une expérience où entre vingt et cent GUV sont observées avant et après UV.

3.3 Description du mécanisme

3.3.1 Contrainte sur la membrane

L'interprétation de ces observations s'est d'abord faite en comparant l'effet des deux configurations de l'AzoTAB. Une solution d'AzoTAB dans du glucose a été illuminée préalablement sous lumière UV pendant 15 minutes, de façon à le convertir majoritairement sous forme *cis*. Les GUV formées d'un mélange DOPC/DPPC 1:1 et 40 mol% cholestérol ont ensuite sédimenté dedans. Une illumination en lumière UV est réalisée pendant une seconde, ne montrant aucune modification ni du nombre ni de la morphologie des GUV (FIGURE 3.4 a). Une illumination successive en lumière visible (475 nm) ne provoque pas de changement. A l'inverse, lorsque l'illumination UV est appliquée sur les mêmes GUV dans le bain d'AzoTAB en configuration majoritaire *trans*, la lumière visible ne provoque pas de changement, mais une illumination UV supplémentaire provoque l'éclatement d'environ la moitié des GUV (FIGURE 3.4 b).

L'éclatement des GUV est donc provoqué par l'isomérisation de l'AzoTAB. Comment expliquer qu'une isomérisation *trans* à *cis* induise la rupture de la membrane alors que cela n'a pas

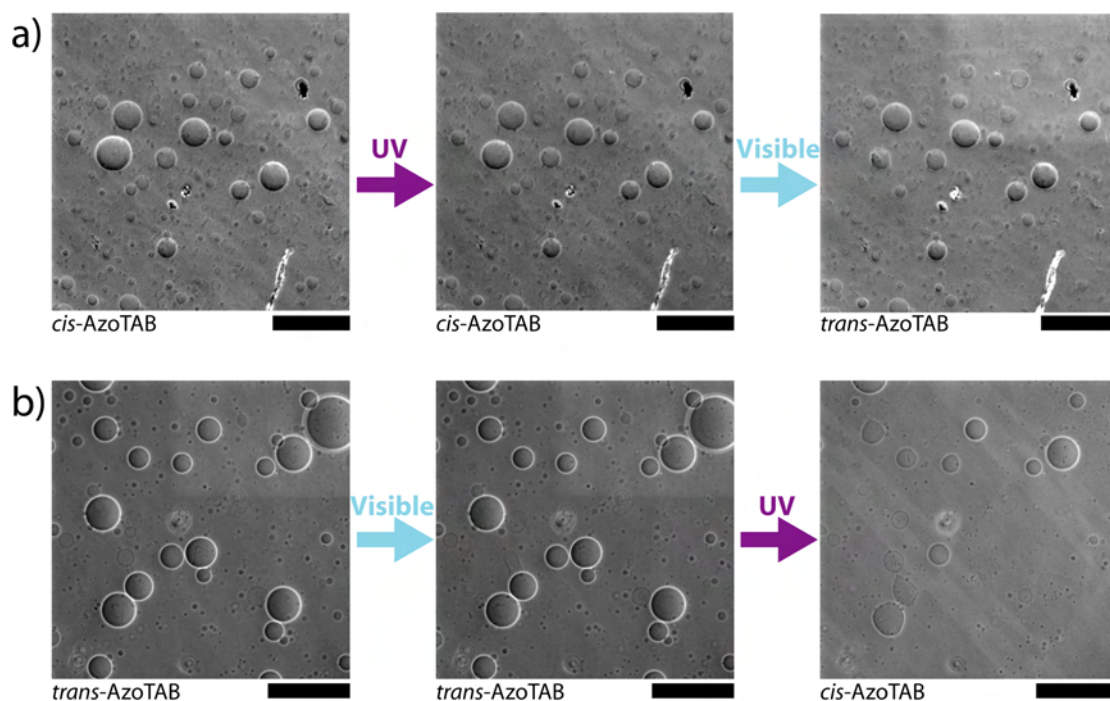


FIGURE 3.4 – Effet de la longueur d’onde de l’illumination sur des GUV ayant sédimenté dans une solution d’AzoTAB en configuration *trans* ou *cis*. Dans les deux expériences, les GUV sont composées d’un mélange DOPC/DPPC 1:1 et cholestérol 40 mol% et observées par contraste de phase. Les barres d’échelle représentent 300 μm . a) Effet d’une illumination UV (365 nm) puis visible (475 nm) d’une seconde sur des GUV ayant sédimenté dans une solution de glucose et d’AzoTAB (concentration finale de 1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) majoritairement en configuration *cis*. La solution d’AzoTAB a auparavant été exposée sous lampe UV pendant 15 minutes. b) Effet d’une illumination visible (475 nm) puis UV (365 nm) d’une seconde sur des GUV ayant sédimenté dans une solution de glucose et d’AzoTAB majoritairement en configuration *trans*.

lieu lors d'une isomérisation *cis* à *trans*? Nous interprétons cette observation par la différence de polarité des deux isomères. Les résultats précédents indiquent que la configuration de l'AzoTAB qui interagit de façon sensible avec la membrane des GUV est celle en *trans*, qui est donc celle dont la queue est la plus apolaire (moments dipolaires des groupements phénoxy qui se compensent). Ceci est en lien avec la différence de CMC que nous avons mesurée dans la partie consacrée aux dérivés AzoCx ($12,6 \text{ mmol.L}^{-1}$ pour le *trans*-AzoTAB contre $14,6 \text{ mmol.L}^{-1}$ pour le *cis*-AzoTAB). Les tensioactifs à queue purement aliphatique sont connus pour s'insérer dans les bicouches lipidiques et provoquent même leur destruction lorsque leur concentration est importante. Malgré son groupement diazobenzène, celle du *trans*-AzoTAB serait donc suffisamment hydrophobe pour pouvoir s'insérer dans la membrane. Ce phénomène ne semble pas avoir lieu sous sa forme *cis*, du fait de sa polarité supérieure.

La photoisomérisation ayant lieu sous lumière UV modifie à la fois sa géométrie (chaîne coudée) et sa polarité. Comme dans le système utilisé par Hamada *et al.* où une molécule bolaphile photoisomérisable est intercalée entre les phospholipides, l'augmentation de la section de la molécule induit une augmentation de l'aire de la membrane. Ceci se fait dans notre cas de façon brutale et *a priori* uniquement sur la monocouche externe des vésicules (l'intercalation de l'AzoTAB dans la paroi interne suppose qu'il traverse une partie très hydrophobe, ce qui est peu probable). La contrainte qui apparaît sur la bicouche ne peut visiblement pas toujours être encaissée par la GUV (les phospholipides n'ont pas le temps de se réorganiser), elle peut donc rompre.

Enfin le fait que plus il y d'AzoTAB, plus la probabilité d'éclatement est importante, est logique si l'on considère que la contrainte photoinduite sur la membrane est d'autant plus forte que la quantité d'AzoTAB insérée est grande.

3.3.2 Influence de la composition de la membrane

D'autre part, l'effet de la teneur en cholestérol mérite d'être précisé. La tendance observée FIGURE 3.3 semble contre-intuitive, car le cholestérol est d'abord connu pour rigidifier les membranes [173]. Mais le lien entre déformabilité et capacité à rompre est moins évident, d'autant plus que le mélange ternaire utilisé DOPC/DPPC/cholestérol est caractérisé par l'apparition de domaines distincts de phospholipides, comme nous l'avons vu en Section 1.3 de cette même partie.

Pour tenter de mieux décrire la nature des membranes des GUV qui ont été mises en contact de l'AzoTAB, nous avons utilisé la microscopie de fluorescence confocale (LSM 710, Zeiss) pour observer les domaines de phospholipides susceptibles d'apparaître. Pour cela, l'électroformation des GUV a été réalisée à partir d'un film de phospholipides (DOPC/DPPC 1:1 et cholestérol variant de 0 à 40 mol%) auquel ont été ajoutés deux fluorophores, la rhodamine-DPPE (2 mol%) et le pérylène (0,5 mol%). Lorsque des domaines distincts existent, ces deux molécules se répartissent de manière différente : la rhodamine-DPPE a une plus grande affinité pour la phase liquide désorganisée tandis que le pérylène qui est un petit hydrocarbure aromatique polycyclique, s'insérera préférentiellement dans les domaines liquides organisés. La microscopie confocale permet ainsi de réaliser des coupes des vésicules où les différents domaines sont distinguables.

Les observations ont été réalisées après 1 h de sédimentation dans du glucose, à une température de 20°C . Une image typique d'un échantillon de GUV à domaines est visible FIGURE 3.5 a. Les zones rouges et bleues correspondent respectivement aux domaines liquides désorganisés et organisés. En l'absence de cholestérol, un troisième type de domaine peut exister : il s'agit du

domaine solide, dans lequel les fluorophores sont exclus et qui apparaît donc noir sur la paroi de la vésicule. Cette phase est en plus caractérisée par des contours anguleux et irréguliers. Un exemple de GUV contenant un domaine solide est visible FIGURE 3.5 b. Ces observations ont été réalisées pour 5 concentrations en cholestérol (0, 10, 20, 30 et 40 mol%). L'analyse des images, sur plusieurs dizaines de GUV, a permis de quantifier la proportion de domaine liquide organisé en fonction de la teneur en cholestérol. Ces résultats sont rassemblés en FIGURE 3.5 c.

Ces observations sont conformes à ce qui a déjà été observé pour des GUV composées d'un mélange ternaire DOPC/DPPC/cholestérol [193]. Plus il y a de cholestérol, plus les GUV contiennent une grande proportion de phase liquide organisée. D'autre part, une grande partie des GUV montrent un domaine solide lorsqu'aucun cholestérol n'est ajouté. Ceci nous permet donc de relier la plus forte tendance des GUV à éclater avec une teneur plus importante en phase organisée (liquide organisé et solide) de phospholipides. Ces domaines ont beau être plus rigides que les domaines liquides désorganisés [173], il semble qu'ils ne peuvent pas autant adapter leur structure aux changements géométriques imposés par l'isomérisation de l'AzoTAB. Les GUV les plus déformables et pouvant mieux supporter la contrainte du tensioactif seraient donc celles qui ont le moins tendance à rompre.

3.4 Contrôle spatial de la photodestruction

Enfin la possibilité de sélectionner les GUV à détruire a été étudiée. Pour cela, un objectif à fort grossissement (100x) a été utilisé. La zone d'illumination couverte par cette configuration est estimée à $300 \times 300 \mu\text{m}^2$. Il est alors possible d'espacer les GUV d'une distance supérieure à cette taille en diluant de façon appropriée la solution de vésicules avant la sédimentation. $2 \mu\text{L}$ de la solution initiale de GUV ont été mélangés à $70 \mu\text{L}$ de la solution de glucose (contre 36 et $36 \mu\text{L}$ pour une observation traditionnelle). De cette manière, les GUV sont isolées et peuvent être détruites individuellement. Ceci a pu être réalisé sur trois GUV voisines, dont la membrane contient 40 mol% de cholestérol (FIGURE 3.6). Cette destruction individuelle de GUV avec une précision inférieure au millimètre est une possibilité offerte par la lumière qui n'a jamais été démontrée avec les stimuli traditionnels (variation de la température et choc osmotique).

3.5 Tentative d'électrogonflement d'un film contenant de l'AzoTAB

La volonté de mieux comprendre l'insertion de l'AzoTAB entre les phospholipides nous a poussé à réaliser une électroformation à partir d'un film de phospholipides contenant de l'AzoTAB.

Pour cela, de l'AzoTAB solide a été dissous dans une solution de chloroforme contenant un mélange DOPC/DPPC 1:1 et 20 mol% de cholestérol. Sa concentration massique est similaire à celle des phospholipides (environ 10 mg.mL^{-1}), ce qui du point de vue molaire indique environ deux fois plus d'AzoTAB que de phospholipides. $4 \mu\text{L}$ de cette solution (orangée et bien limpide) ont été étalés à deux reprises sur une électrode d'ITO. L'électroformation a été réalisée avec ces deux substrats, séparés par un joint en caoutchouc, dans une solution de sucrose à 112 mOsm (tension appliquée de 2 V, 10 Hz, pendant 3 h). Le contenu (légèrement orange) a ensuite été transféré dans une solution de glucose isoosmotique (50% en volume). Après 1 h de sédimentation, de belles GUV sont effectivement visibles, en grand nombre. L'AzoTAB n'a donc pas empêché

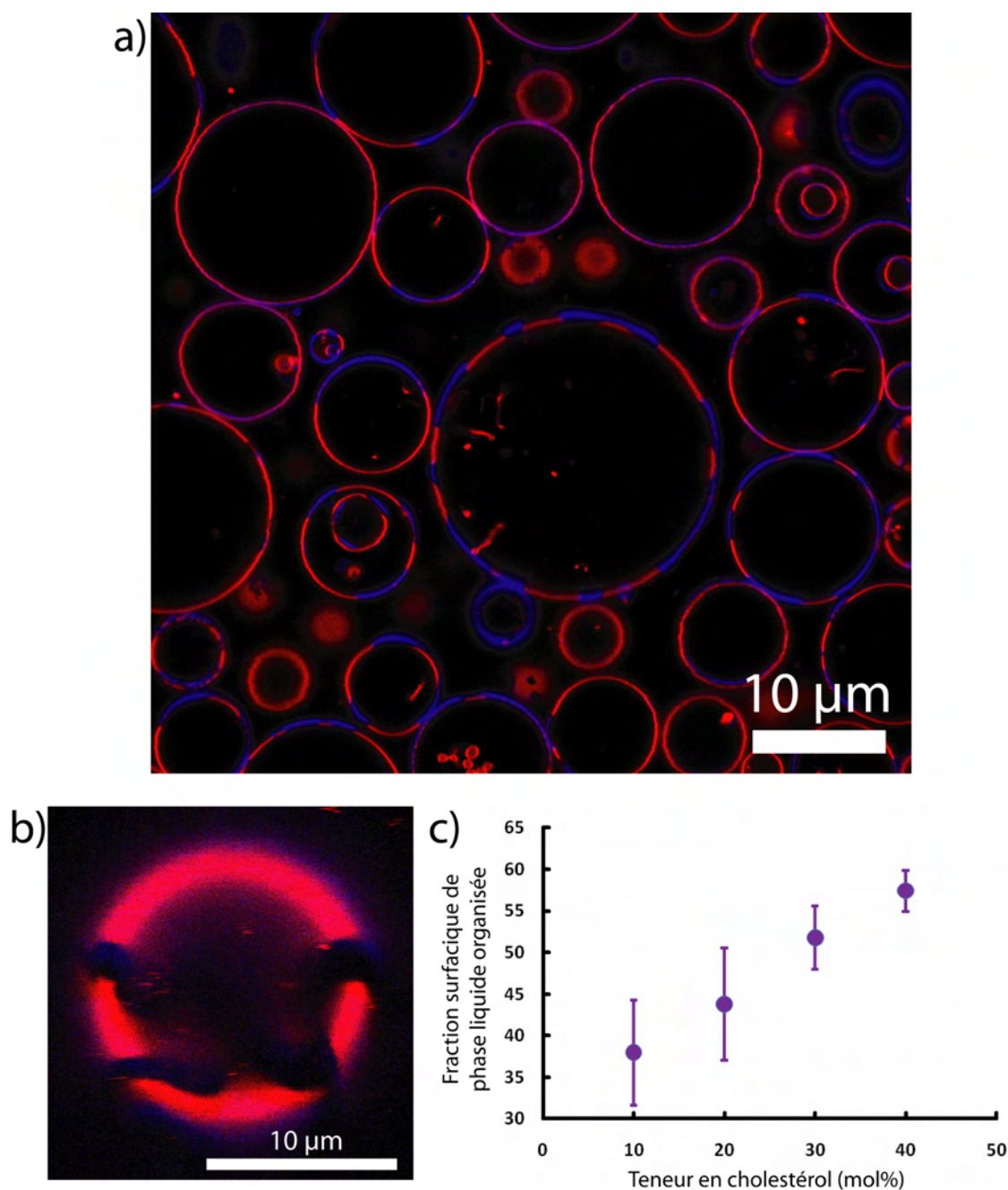


FIGURE 3.5 – Observation par microscopie confocale des domaines de phospholipides dans des GUV formées d'un mélange ternaire DOPC/DPPC 1:1 et d'une certaine teneur en cholestérol. a) GUV obtenue après électroformation d'un film de DOPC/DPPC 1:1 et 10 mol% de cholestérol. Le rouge correspond à la phase liquide désorganisée (rhodamine-PPPE). Le bleu correspond à la phase liquide organisée (pérylène). b) GUV formée d'un mélange DOPC/DPPC 1:1 sans cholestérol, montrant un domaine solide de phospholipides. c) Fraction moyenne de phase liquide organisée présente dans chaque GUV en fonction de la teneur initiale en cholestérol. La mesure a été faite après analyse des aires de différentes couleurs sur une population de plusieurs dizaines de GUV.

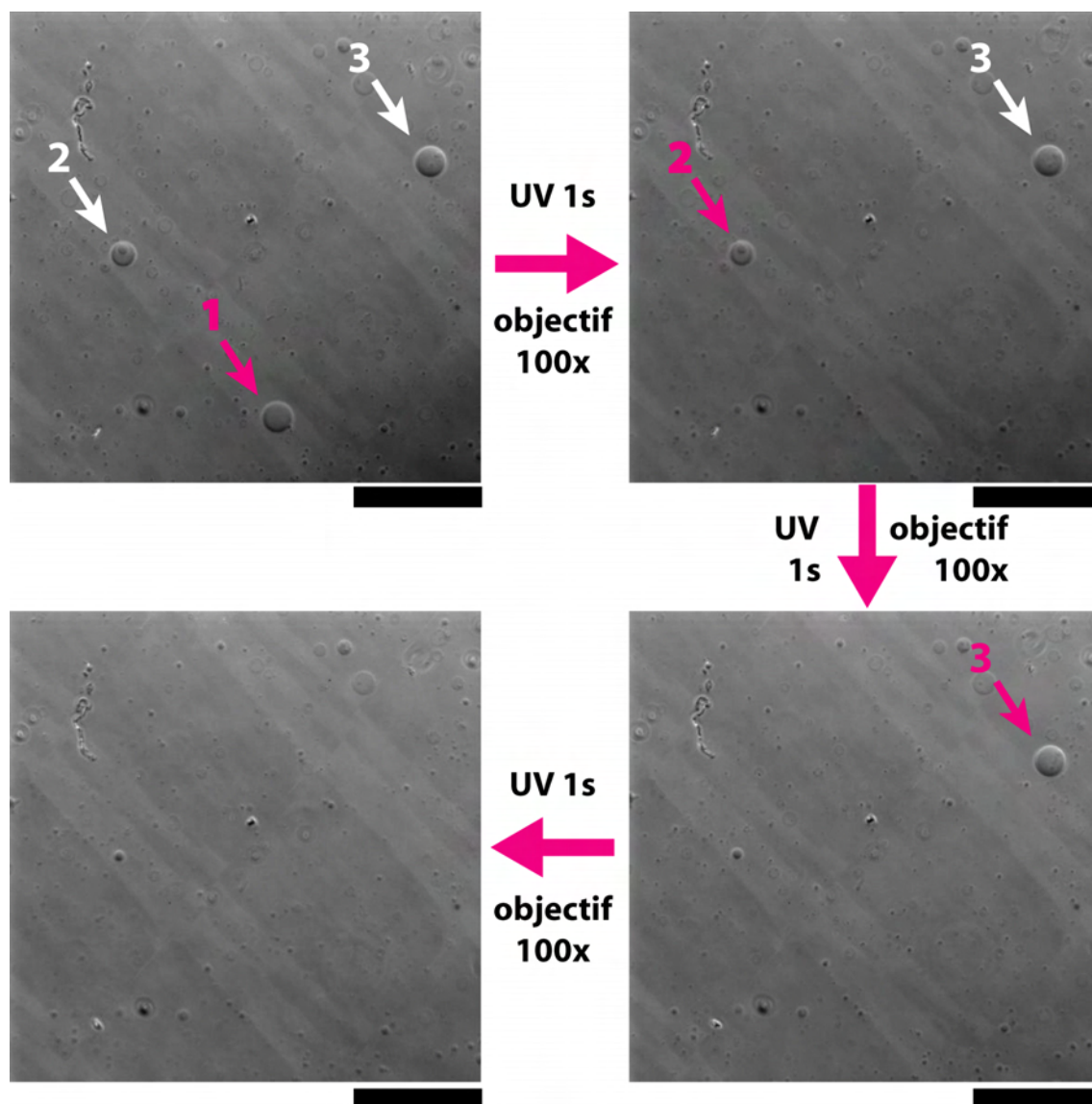


FIGURE 3.6 – Contrôle spatial de la photodestruction de GUV. Les GUV composées d'un mélange DOPC/DPPE 1:1 cholestérol 40 mol% sont observées par contraste de phase avec un objectif 10x après sédimentation dans une solution de glucose avec $[AzoTAB] = 1 \text{ mmol.L}^{-1}$. Pour être suffisamment espacées, les GUV sont fortement diluées ($2 \mu\text{L}$ dans $70 \mu\text{L}$ de solution de glucose). Les illuminations UV sont réalisées durant 1 seconde avec un grossissement total de 160x sur chacune des GUV, l'une après l'autre. La barre d'échelle représente $300 \mu\text{m}$.

leur formation.

L'effet d'une illumination UV a ensuite été évalué. Aucun éclatement n'a eu lieu. Seule une légère contraction des GUV est visible ($< 5\%$ en diamètre). Ceci semble cohérent avec l'hypothèse selon laquelle l'AzoTAB aurait diffusé en grande partie dans le volume de la solution de sucrose, au moment de l'électroformation. Il serait en contact avec les GUV comme ce qui serait obtenu après sédimentation de GUV DOPC/DPPC et 20 mol% de cholestérol dans une solution d'AzoTAB de faible concentration.

Il est possible d'évaluer la concentration finale en AzoTAB en considérant sa diffusion totale du film de phospholipides jusque dans le volume de la solution. La quantité d'AzoTAB déposée sur chaque électrode est $4 \mu\text{L} \times 10 \text{ mg.mL}^{-1} = 40 \mu\text{g}$ soit environ $0,1 \mu\text{mol}$ ($M_{\text{AzoTAB}} = 407,9 \text{ g.mol}^{-1}$). Seule environ la moitié de la surface du film subit le champ électrique. Le volume de la solution de sucrose ajoutée pour le gonflement est de $400 \mu\text{L}$, ce qui donne une concentration finale en AzoTAB de $0,1/400 = 0,25 \text{ mmol.L}^{-1}$. Après sédimentation dans une moitié de glucose, cette concentration est donc de l'ordre de $0,1 \text{ mmol.L}^{-1}$. Cette valeur correspond bien à une concentration en AzoTAB à la fois trop faible pour provoquer des éclatements, et suffisamment élevée pour y voir un certain effet sous illumination UV.

Ces résultats indiquent que l'AzoTAB n'est pas assez hydrophobe pour rester en contact avec les phospholipides pour former une membrane. L'équilibre qui régit sa répartition entre la membrane et le volume de la solution est fortement déplacé vers cette dernière. Son interaction avec la paroi de la GUV reste donc faible si sa concentration totale dans le milieu l'est aussi ($< 0,2 \text{ mmol.L}^{-1}$).

3.6 Conclusion

Nous avons montré que la mise en présence de vésicules géantes phospholipidiques et de tensioactifs photosensibles permet d'utiliser la lumière pour les photostimuler. L'éclatement de vésicules composées de DOPC et DPPC en quantité égale et d'une certaine teneur en cholestérol a été observé, et ceci de façon quasi immédiate après le début de l'illumination UV (moins de deux secondes plus tard). La probabilité d'une GUV de se voir détruite est d'autant plus grande que la concentration en AzoTAB du milieu est importante et que sa teneur en cholestérol est élevée (sauf sans cholestérol). Cette probabilité peut dépasser 50%. En plus de son temps de réponse rapide, nous avons aussi montré que la lumière permet un contrôle spatial précis dans le choix de la cible, et peut être appliquée de façon individuelle pour détruire sélectivement les GUV les unes après les autres.

L'explication de ces observations reste pour le moment qualitative. C'est bien l'isomérisation de l'AzoTAB de *trans* à *cis* qui produit les éclatements et non pas l'isomérisation inverse en partant de l'AzoTAB en configuration *cis*. Dans ce dernier état, l'affinité de la molécule pour la membrane n'est sans doute pas assez grande car sa queue est trop polaire. Ces résultats nous ont laissé imaginer que le *trans*-AzoTAB s'intercale dans la monocouche externe de phospholipides et que sa modification photoinduite de géométrie était à l'origine d'une contrainte mécanique fragilisant la GUV. Les outils permettant l'analyse de l'organisation de la membrane à l'échelle moléculaire (en particulier la diffusion de rayons X) existent et pourraient amener un nouveau point de vue sur ce mécanisme. De façon analogue, l'effet du cholestérol est clair mais nécessite une meilleure compréhension. En particulier nous ne savons pas si, pour une teneur donnée en cholestérol, les GUV qui éclatent sont celles qui contiennent plus ou moins de domaines liquides

organisés. L'observation par microscopie confocale des GUV avant et après illumination UV devrait pouvoir éclaircir ce point.

Ces résultats montrent pour la première fois que des vésicules uniquement constituées de phospholipides peuvent être détruites sélectivement par la lumière et que les tensioactifs photosensibles peuvent être utilisés dans des stratégies d'administration de médicament à l'aide de capsules biomimétiques. Notre approche reste cependant difficilement transposable *in vivo*, en particulier parce que la quantité d'AzoTAB nécessaire est bien trop élevée. Il est quand même imaginable de diminuer la proportion de tensioactif qui n'interagit pas avec la membrane. Ceci peut avoir lieu en introduisant l'agent non pas à l'extérieur, mais à directement à l'intérieur de la GUV, au moment de sa formation (les méthodes de génération de GUV par microfluidique offrent cette possibilité d'encapsulation). D'autre part, l'interaction entre la vésicule et le tensioactif pourraient être rendue bien plus forte. De cette manière, il suffirait d'un contact des GUV avec une solution concentrée pour que le tensioactif photosensible soit lié de façon irréversible à la membrane (FIGURE 3.7). L'objet pourrait ensuite être introduit dans un autre milieu et être sensible de la même manière à la lumière, pour y relarguer son contenu. Cette idée a été essayée en mélangeant des GUV avec une solution concentrée d'AzoTAB puis en les diluant fortement (10 fois) dans une solution de glucose seul. L'effet de la lumière était imperceptible, laissant supposer que l'AzoTAB n'était pas lié de façon forte à la membrane et qu'il s'était dispersé dans le volume de la solution. Cette stratégie d'élaboration d'une vésicule photosensible pourrait être effective en travaillant de deux manières :

- soit en utilisant un tensioactif photosensible à la queue bien plus hydrophobe, dont l'affinité pour la membrane serait bien plus grande et qui pourrait s'insérer de façon permanente. Ceci pourrait par exemple être essayé avec les molécules AzoCx du Chapitre 2 de la Partie II.

- soit en fonctionnalisant la membrane, pour y incorporer des groupements pouvant interagir fortement avec le tensioactif de façon à le retenir dès le premier contact, par exemple des groupements anioniques qui interagiraient avec sa tête. En modifiant aussi l'AzoTAB, des liaisons covalentes entre lui et la membrane pourraient être créées de façon spontanée (de type ester, ou après une cycloaddition de type Diels-Alder ou entre un azide et un alcyne) ou sous un stimulus externe (la lumière initierait par exemple une photopolymérisation d'alcènes).

Enfin, l'AzoTAB peut être vu comme un nouvel outil pour les biophysiciens qui s'intéressent à la mécanique des membranes. En effet, il permet d'induire localement et précisément une contrainte sur la bicouche par la lumière. Il pourrait être intéressant de coupler cette méthode de perturbation avec les mesures traditionnelles de paramètres mécaniques membranaires (en particulier la technique de microaspiration par pipette).

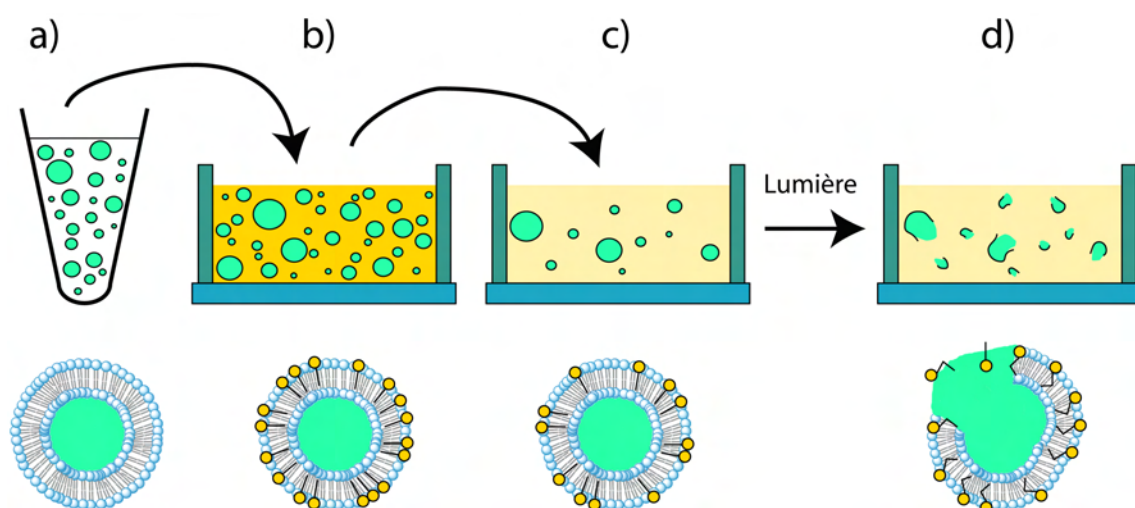


FIGURE 3.7 – Relargage photoinduit du contenu de GUV phospholipidiques dans l’hypothèse où l’affinité du tensioactif photosensible pour la membrane est forte. En haut, schéma du protocole; en bas, représentation schématique de la vésicule. a) Production de GUV dans lesquelles sont encapsulées des molécules d’intérêt. b) Mise en contact des GUV avec une solution de tensioactifs photosensibles concentrée. Les tensioactifs s’intercalent dans la membrane de manière quasi-irréversible. c) Introduction des GUV dans un autre milieu. Leur membrane contient toujours des molécules photosensibles. d) La rupture des vésicules sous stimulus lumineux permet le relargage immédiat de leur contenu.

Conclusion de la troisième partie

Nous nous sommes intéressés dans cette partie aux vésicules unilamellaires géantes (GUV), qui sont des objets biomimétiques d'intérêt dont la production et les applications sont en développement continu.

Le premier chapitre a été consacré à la description de la structure, des différentes méthodes de formation et des nombreuses applications des GUV. Parmi les manières de les générer, l'électroformation représente une technique efficace et simple à mettre en oeuvre, mais possède en particulier l'inconvénient de fournir des GUV très polydisperses en taille.

Pour subvenir à cet aspect, nous avons étudié dans un second chapitre un moyen de mieux contrôler le dépôt de matière initial sur l'électrode, qui se gonfle ensuite lors de l'application du champ électrique. Ce film est formé d'une multicouche de phospholipides, les briques élémentaires qui forment les GUV par autoassemblage. La technique de dépôt par assemblage convectif sur une surface plane a été appliquée aux phospholipides mais en modifiant la topologie de la surface. Au lieu d'être plan, le substrat de silicium utilisé a été microstructuré de manière à être creusé de trous réguliers d'une profondeur submicrométrique. Il en résulte que, dans des conditions de mouillage appropriées, la translation d'une goutte de solvant volatil contenant les phospholipides permet leur dépôt sélectif dans les microtrous. La vitesse de déplacement permet de contrôler la quantité déposée. Cette méthode apparaît comme une nouvelle possibilité de création de motifs de multicouches de phospholipides. Il est imaginable de la transposer à d'autres types de molécules, par exemple d'intérêt biologique comme les protéines, pour disposer de nouveaux moyens de fonctionnalisation de surface. Enfin le substrat recouvert a été utilisé comme électrode pour la formation de GUV monodisperses par électroformation. A notre connaissance, c'est la première fois qu'un tel contrôle de la taille est obtenu par électroformation. Cette modification préalable du film de phospholipides permet donc de rendre cette méthode de formation de GUV encore plus performante.

Le troisième chapitre s'est intéressé à la mise en contact de GUV avec l'AzoTAB. En tant que tensioactif, il est susceptible d'interagir avec la paroi lipidique des vésicules. Nous avons montré que sous illumination UV, son isomérisation peut conduire à la rupture instantanée de la membrane. Cette capacité de photodestruction est liée à la composition en phospholipides. Il a été observé que pour un mélange binaire DOPC/DPPC, plus la vésicule contient de cholestérol, plus sa probabilité de rupture photoinduite est importante. La probabilité de rupture a ainsi été connectée avec la composition de la membrane : la fragilité des GUV augmente avec leur fraction en phase liquide ordonnée. Cette technique non-invasive d'éclatement rapide de GUV présente l'avantage de pouvoir être effectuée avec des vésicules phospholipidiques, ce qui n'avait jamais été réalisé. Elle permet également, ce qui est unique, une sélection spatiale des cibles. C'est ici le changement de configuration de l'AzoTAB dans un système organisé (bicouche lipidique) qui a été exploité. Sa capacité à s'autoassembler avec des molécules similaires nous permet d'imaginer de nouveaux moyens de contrôle sur des objets mésoscopiques.

Quatrième partie

Photoactuation de systèmes macro- et microfluidiques biphasiques

Chapitre 1

Lumière et capillarité

Les manifestations de la capillarité sont omniprésentes dans la vie courante (bulle de savon, gouttes accrochées sur une toile d'araignée ou à un pare-brise,...), parfois amusantes, parfois intrigantes (insectes marchant sur l'eau, larmes de vin,...), et peuvent être le siège de problèmes physiques complexes (ondes à la surface d'un plan d'eau, vieillissement d'une mousse,...).

Toutes ces questions ont en commun l'existence d'une interface entre une phase liquide et une autre phase, gazeuse, liquide ou solide. Comme nous l'avons expliqué dans le Chapitre 2 de la Partie I, à cette discontinuité correspond toujours un coût énergétique, la tension de surface. Nous allons voir dans ce chapitre bibliographique qu'il est possible de modifier cette tension interfaciale par un stimulus extérieur. Une perturbation des interactions physico-chimiques à l'échelle moléculaire peut engendrer une modification macroscopique, en particulier le mouvement du fluide. Comme nous allons le décrire, l'actuateur de ces phénomènes peut être la lumière.

Dans le but de générer un mouvement de fluide par effet capillaire, les différentes possibilités de création de gradient de tension de surface seront d'abord détaillées. Nous nous intéresserons ensuite au cas particulier des interfaces liquide-liquide en écoulement microfluidique, qui représente un domaine où la tension de surface est un paramètre d'importance et sur lequel l'influence de la lumière n'a pourtant été exploitée que rarement.

1. Lumière et capillarité

1.1	Mouvement et tension de surface	147
1.1.1	L'effet Marangoni	147
1.1.2	Gradients d'origine thermique	148
	Gradient induit par conduction	148
	Gradient induit par illumination	150
1.1.3	Gradients d'origine chimique	151
	Les gradients chimiques statiques	153
	Induction par réaction	154
	Induction lumineuse	156
1.1.4	Les autres stimuli capillaires	157
1.2	Les interfaces microfluidiques	158
1.2.1	Écoulements biphasiques microfluidiques	158
	La microfluidique	158
	Les microgouttes	161
1.2.2	Contrôles dynamiques de la formation de microgouttes	164
	Contrôle thermique	164
	Contrôle mécanique	164
	Contrôle électrique	164
	Contrôle optique	164
1.3	Conclusion	167

1.1 Mouvement et tension de surface

1.1.1 L'effet Marangoni

Nous avons raisonné dans le Chapitre 2 de la Partie I uniquement sur des systèmes statiques, en considérant qu'à un instant donné, les différentes tensions sont uniformes le long d'une même interface. Ceci impose en particulier que l'angle de contact θ est le même le long de la ligne triple délimitant une goutte de liquide reposant sur un substrat plan. Or, il est tout à fait possible de les modifier localement, autrement dit de créer une interface dont l'énergie associée est spatialement inhomogène. Le système évolue alors pour égaliser les tensions le long de ses interfaces, pour atteindre un nouvel état d'équilibre.

Les mouvements de fluide qui ont lieu à l'interface sous l'effet d'un gradient de tension, peuvent être qualitativement compris à travers le modèle suivant. Considérons la surface d'un liquide. Lorsque γ est constante en tout point, la seule contrainte qui s'exerce sur cette surface est la pression du gaz, qui s'applique de façon normale à la surface. Lorsque l'interface est soumise à un gradient de tension $d\gamma/dx$ parallèle à l'axe Ox (FIGURE 1.1 a), les forces capillaires de surface ne sont plus équilibrées. L'élément de surface Ldx est soumis à une contrainte σ_{xy} parallèle à Ox correspondant à la somme des forces s'appliquant de part et d'autre, en 1 et 2 :

$$\sigma_{xy} = \frac{dF}{Ldx} = \frac{F_2 - F_1}{Ldx} = \frac{(\gamma_2 - \gamma_1)L}{Ldx} = \frac{d\gamma}{dx} \quad (1.1)$$

Cette contrainte de cisaillement provoque donc un écoulement parallèle à la surface, dans la direction où γ croît. Ce mouvement tangentiel sous un gradient de tension de surface constitue l'effet Marangoni. La description de cet effet est plus complexe car l'écoulement qui a lieu tangentielllement à la surface est associé à un mouvement vertical de fluide. Le liquide qui s'accumule en haut du volume est nécessairement compensé par un contre-écoulement en profondeur. La modélisation précise de l'ensemble des écoulements contenu dans le terme "effet Marangoni" est une chose qui peut s'avérer très compliquée et sur laquelle de nombreuses études continuent d'être réalisées. Nous nous contenterons par la suite d'un fait uniquement qualitatif : à tout gradient de tension de surface correspond une contrainte tangentielle orientée vers les tensions de surface les plus hautes.

La description de l'effet Marangoni est indissociable de la manifestation très courante qui est à l'origine de sa compréhension. En 1855, le physicien James Thomson publie "On certain curious motions observable at the surfaces of wine and other alcoholic liquors", qui fut la première explication du phénomène des larmes de vin [254]. Lorsqu'un film liquide de vin est étalé sur la paroi du verre qui le contient, l'éthanol contenu dans le vin s'évaporant plus vite que l'eau, l'extrémité haute du film s'appauvrit en alcool par rapport à la zone du film située plus au centre du verre. Au centre, son épaisseur est bien plus importante, l'éthanol peut y être renouvelé en surface. Puisque la tension de surface de l'eau (72 mN.m^{-1}) est nettement supérieure à celle de l'éthanol (23 mN.m^{-1}), un gradient de tension de surface apparaît, de la base du film vers le haut du film. Le liquide est donc entraîné tangentielllement à la surface, vers l'extrémité du film, où il s'accumule pour former un bourrelet. Lorsque ce bourrelet atteint une certaine taille, il se destabilise et se fracture en larmes, qui redescendent sous l'effet de leur propre poids (FIGURE 1.1 b).

Nous allons voir que depuis, plusieurs méthodes ont été mises au point pour créer des gradients de tension de surface permettant la mise en mouvement de fluide.

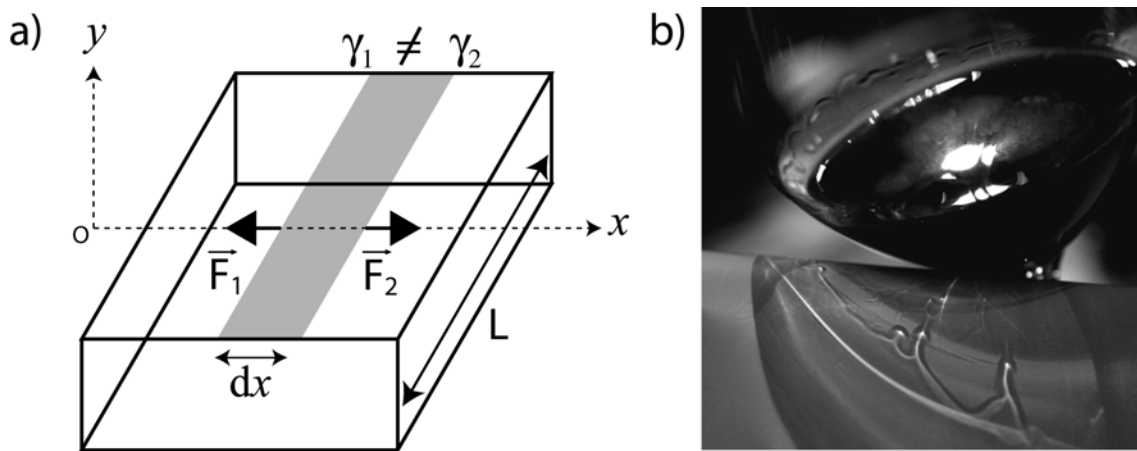


FIGURE 1.1 – L'effet Marangoni : schéma explicatif et exemple. a) Surface libre d'un liquide soumise à un gradient de tension de surface selon l'axe Ox . Une contrainte tangentielle à la surface apparaît. b) Une manifestation courante de l'effet Marangoni : les larmes de vin.

1.1.2 Gradients d'origine thermique

De façon générale, il se trouve que les différentes interactions entre molécules dans une phase liquide sont relativement dépendantes de la température. Par exemple, les interactions de Keesom qui sont l'une des trois composantes des forces de Van der Waals, ont une énergie évoluant en $-1/T$. Ceci induit à plus grande échelle une dépendance importante de la tension de surface à la température. Il n'existe que des lois empiriques pour décrire cette dépendance. Autour de la température ambiante, les liquides courants (eau, huiles, alcools) voient leur tension de surface décroître d'environ $0,1 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$. Ainsi, chauffer une partie de l'interface est l'une des stratégies les plus employées pour modifier localement γ . Avec les larmes de vin, cet effet thermocapillaire est le premier phénomène d'entraînement capillaire mis en évidence ; c'était dans les années 1870 par Marangoni. Nous distinguons ici plusieurs méthodes de contrôle thermique.

Gradient induit par conduction

Une première explication rigoureuse des mécanismes mis en jeu dans l'effet thermocapillaire a été réalisée au milieu du XX^{ème} siècle par Young *et al.* dans le cas de bulles d'air dans une colonne de liquide (*n*-hexadécane ou huile silicone) [255]. En chauffant le haut de la colonne, il a été montré que les bulles pouvaient être maintenues en équilibre dans le liquide. La description des différents flux ayant lieu sous l'action du gradient thermique vertical est visible FIGURE 1.2 a. La température de l'interface air/liquide étant inhomogène, la tension interfaciale associée est différente : elle est plus grande du côté des faibles températures, c'est à dire en haut de la bulle. Une contrainte tangentielle apparaît vers les hautes tensions pour diminuer l'énergie associée. La bulle étant un système fermé, une recirculation de gaz a lieu en son centre, qui l'entraîne globalement vers le bas, c'est à dire vers les plus faibles tensions, pour que le système soit globalement stabilisé.

Ce type de gradient thermique externe a aussi été appliqué à la surface libre d'un liquide en contact avec une paroi verticale chauffée à son extrémité inférieure (FIGURE 1.2 b) [256]. Le film de liquide (du PDMS fluide) est soumis à la fois à un effet Marangoni qui l'entraîne vers

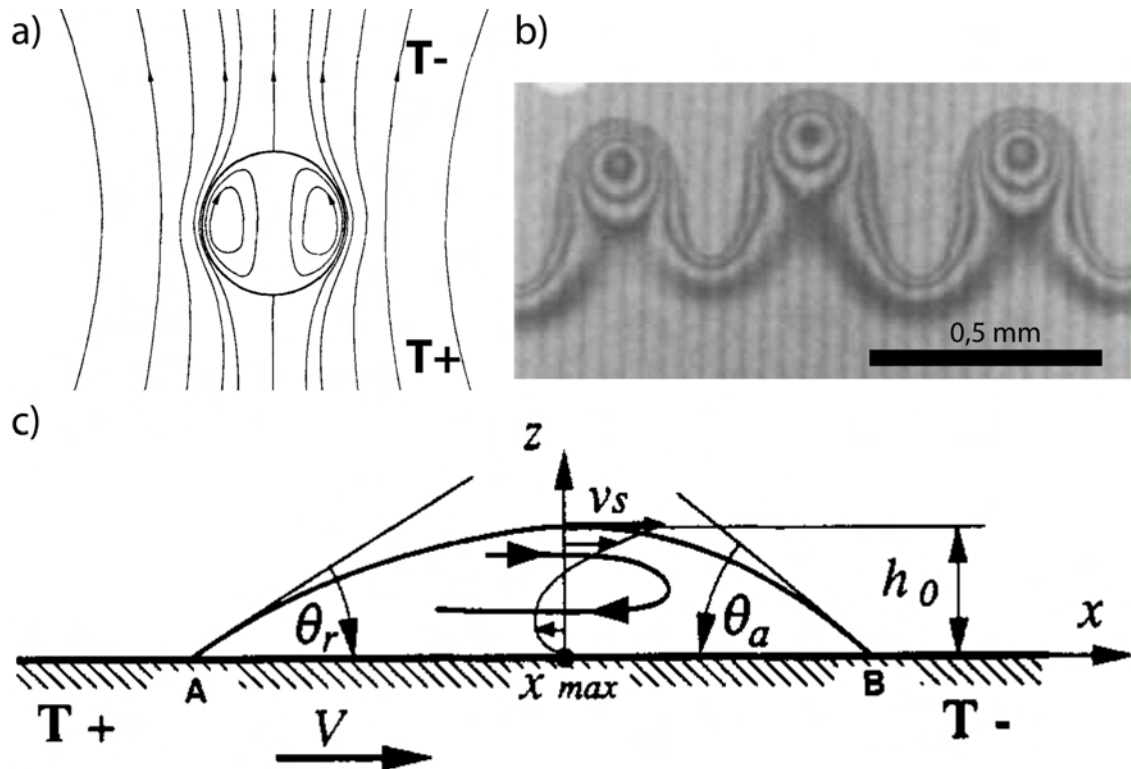


FIGURE 1.2 – Phénomènes d'entraînement sous l'action d'un gradient thermique induit par conduction. a) Bulle d'air plongée dans un liquide soumis à un gradient thermique vertical. Le flux convectif de gaz lui permet de se maintenir en suspension. Adapté de [255]. b) Instabilité en forme de doigts lorsque la surface d'un liquide est en contact avec une surface verticale chauffée par le bas. Extrait de [256]. c) Schéma d'une goutte reposant sur un substrat horizontal de température inhomogène. La mouillabilité est différente de part et d'autre de la goutte, l'angle de contact θ_a (froid) est supérieur à θ_r (chaud). Le profil de vitesse horizontal $v(x,z)$ dans la goutte est la superposition de l'écoulement du à la différence de mouillage et de l'effet Marangoni qui a lieu en surface du liquide vers les régions froides. La goutte est entraînée ici (cas d'une grande taille) vers les régions les plus froides à vitesse V . Extrait de [257].

les régions froides du substrat (de l'oxyde de silicium) et à la gravité qui le tire vers le bas. Une instabilité en forme de doigts apparaît alors (FIGURE 1.2 c). Ce phénomène de digitation peut aussi être visible à la frontière d'une goutte sur un support horizontal soumis à un gradient thermique [258].

Dans le cas d'une goutte de liquide reposant sur un substrat de température inhomogène, c'est il y a une vingtaine d'années que l'effet thermocapillaire a été étudié, par Brochard-Wyart *et al.* [257, 259]. De la même façon, les trois tensions interfaciales sont différentes le long de la ligne triple. L'angle de contact associé est donc variable : il est plus grand du côté des basses températures. La force motrice va venir de la possibilité de stabilisation au niveau des zones les plus mouillables (régions chaudes). A cela s'ajoute un effet Marangoni en surface qui induit un écoulement vers les régions froides, où la tension de surface est plus grande (FIGURE 1.2 b). La goutte est finalement entraînée vers les régions froides ou chaudes, suivant sa taille. Sa vitesse est de l'ordre du mm.min^{-1} . La modélisation de ce phénomène fait toujours l'objet de travaux actuels [260, 261].

Gradient induit par illumination

Autrement que par contact thermique direct avec une source de chaleur, la modification locale de température du système peut être réalisée à l'aide de la lumière. A condition que le matériau absorbe la radiation, le chauffage lumineux permet d'éviter tout contact mécanique avec la source et de contrôler de façon sélective, le lieu, l'intensité et l'évolution temporelle de l'excitation.

Il est malgré tout nécessaire de disposer d'un matériau fortement absorbant. Ceci a été réalisé avec un flotteur centimétrique en PDMS solide dont une paroi est recouverte de nanotubes de carbones absorbant intégralement la lumière visible [262] (FIGURE 1.3 a). En focalisant un laser à son niveau, de la chaleur est transmise à la surface du liquide, ce qui diminue localement sa tension de surface. Le flotteur est alors entraîné vers les tensions de surface les plus grandes, c'est à dire en dehors de la lumière, à une vitesse de l'ordre du cm.s^{-1} (FIGURE 1.3 b). Des mouvements de rotation contrôlés sont aussi envisageables en modifiant la géométrie de l'objet.

Pour induire le mouvement de gouttes, la lumière a d'abord été exploitée par Yoshikawa *et al.* en chauffant à l'aide d'un laser une goutte de nitrobenzène flottant sur un bain d'eau contenant des tensioactifs [263]. Pour que la lumière du laser utilisé (532 nm) soit mieux absorbée par la goutte, du diiode (5 mmol.L^{-1}) est ajouté dans l'huile pour la colorer. La focalisation du laser avec un angle d'incidence important sur la goutte permet d'induire son déplacement (FIGURE 1.3 c). Les mouvements de convection à l'intérieur de la goutte sont observables en y introduisant des particules micrométriques de polystyrène (FIGURE 1.3 d et e). La goutte bouge de façon analogue à la bulle subissant un effet thermocapillaire dans un gradient thermique vertical : l'inhomogénéité de température induit un effet Marangoni au niveau de l'interface vers les régions froides ; la recirculation du liquide à l'intérieur de la goutte provoque son déplacement global vers les zones chaudes, c'est à dire ici vers la lumière. La vitesse de la goutte est de l'ordre du cm.s^{-1} et est d'autant plus grande que la puissance du laser est élevée. Une description théorique plus rigoureuse des phénomènes thermocapillaires dans des gouttes flottantes fait l'objet d'autres travaux [264, 265], en particulier il a été montré que la façon dont la goutte est étalée sur le liquide peut changer la direction de son mouvement [265].

Cette stratégie a été rapidement appliquée à la photomanipulation de gouttes submillimétriques [266]. L'aire et la position de l'excitation lumineuse ont été plus finement contrôlées à l'aide d'un microscope (FIGURE 1.3 f). Ainsi, des gouttes d'eau immergées dans une solution

de dodécaneol reposant sur un substrat hydrophobe (une surface de polystyrène) ont été guidées par la lumière jusqu'à être mises en contact et fusionner (FIGURE 1.3 g) [267]. Lorsque leur composition est différente, ceci permet d'utiliser les gouttes comme des microréacteurs. Cette technique a été appliquée à la détection de protéines [268], montrant ainsi que la lumière peut être utilisée pour le contrôle spatiotemporel d'objets microfluidiques. Une modélisation succincte de l'effet d'un échauffement lumineux inhomogène sur une microgoutte en vue de la déplacer, a aussi été proposée par de Gennes [269].

La lumière a aussi été utilisée en exploitant l'énergie dégagée par les plasmons de surface [270]. En appliquant un pulse laser sur une surface d'or, la désexcitation due à la propagation des plasmons de surface libère de la chaleur qui modifie alors localement la tension interfaciale d'une goutte déposée sur le substrat. Un mouvement a lieu de façon analogue à ce qui est décrit dans le cas d'une goutte sur une surface localement chauffée. D'autre part, c'est la hauteur du menisque d'un liquide qui a pu être optiquement contrôlée [271]. Contenu dans un capillaire de 0,5 mm de diamètre, de l'octadécène est mélangé à des nanoparticules fluorescentes (CdTe et CdSe) qui permettent au fluide d'absorber facilement la lumière (514 nm) d'un laser le traversant. L'échauffement généré, couplé à la redistribution des nanoparticules dans le volume et la surface du liquide induisent une diminution de la hauteur du menisque de plusieurs centaines de micromètres.

Enfin les instabilités en forme de doigts en frontière de liquide sont aussi générables par la lumière [272]. En utilisant un substrat absorbant sensiblement la lumière et en l'illuminant de façon inhomogène pour le chauffer localement, une expérience analogue à celle où le gradient thermique est appliqué par conduction [256] a été effectuée.

1.1.3 Gradients d'origine chimique

Une autre méthode de création de gradient de tension consiste à modifier la nature chimique de l'interface. Il suffit en effet de remplacer partiellement les molécules superficielles par d'autres aux interactions différentes, pour en affecter directement l'énergie superficielle associée. Par exemple, un simple dépôt local d'une solution de tensioactifs sur un bain d'eau est un moyen simple pour y générer un gradient. Cette idée donne lieu à l'expérience très démonstrative du déplacement du "soap boat", qui est un objet centimétrique capable de flotter sur l'eau [273]. Possédant un petit réservoir ouvert, il est possible d'y déposer quelques gouttes de savon pour produire son mouvement. La diffusion inhomogène des tensioactifs à la surface du bain va soumettre le flotteur à une différence de tension de surface. Les tensioactifs migrent vers les zones où leur concentration interfaciale est moindre pour stabiliser le système, ce qui entraîne le flotteur vers les tensions de surface les plus grandes. Sa vitesse peut être de l'ordre de la dizaine de cm.s^{-1} . Pour éviter l'arrêt rapide du bateau, il est possible d'optimiser cette expérience en lui permettant de repasser par un même endroit. Pour cela c'est un morceau de camphre qui est accroché à une partie du flotteur [274]. Le camphre diminue localement la tension de surface et se sublime ensuite rapidement. La surface se polluant faiblement, le bateau peut être propulsé pendant plusieurs heures.

Nous allons distinguer les mouvements observables lorsque le gradient chimique est fixe et les situations où il est progressivement généré.

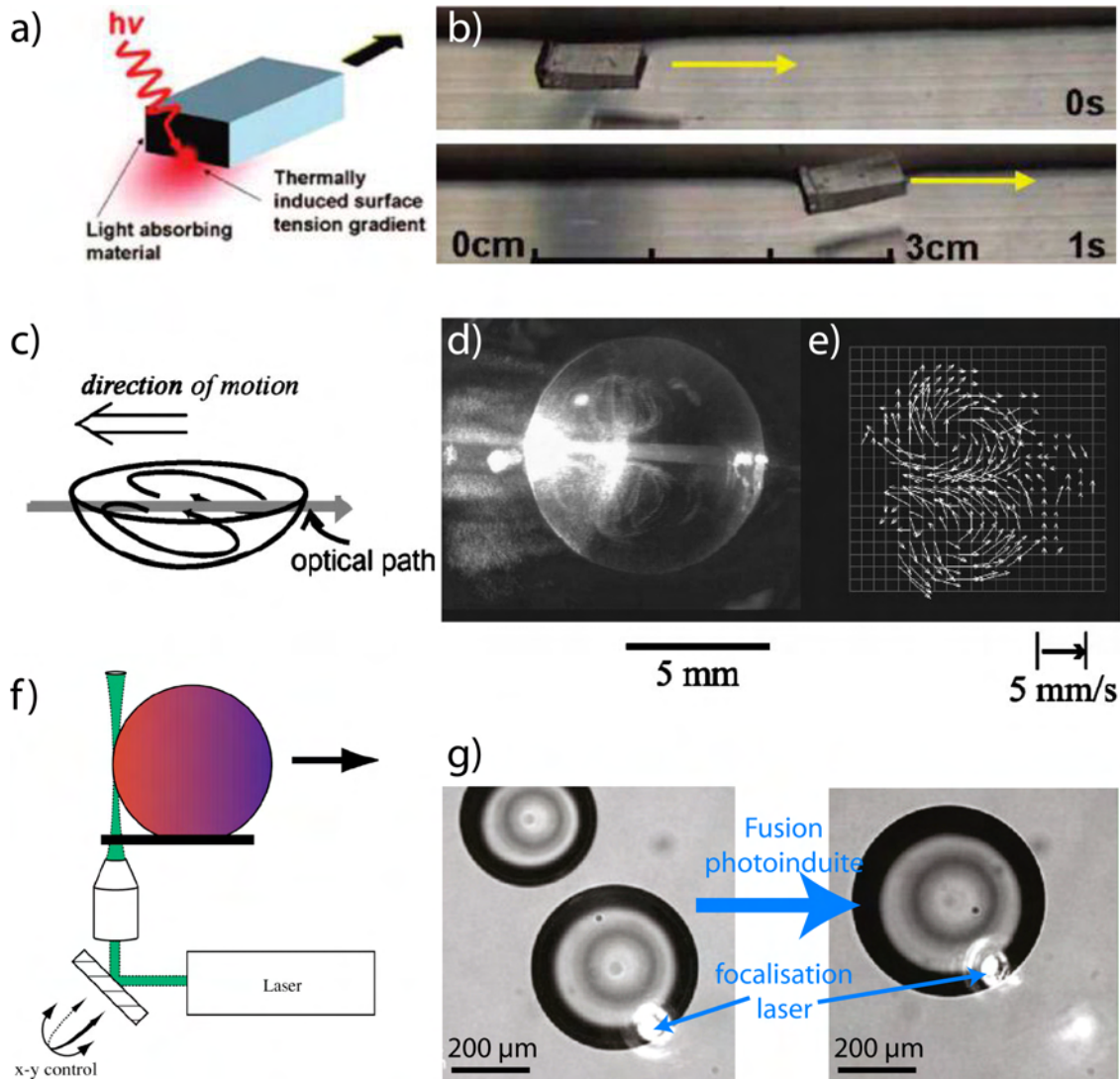


FIGURE 1.3 – Mouvement d'objets sous l'action d'un gradient thermique induit par illumination. a) Chauffage local d'un flotteur en PDMS, dont une paroi est recouverte de nanotubes de carbones pouvant absorber la totalité de la lumière visible. Un gradient de tension de surface apparaît. Extrait de [262]. b) Mouvement du flotteur lorsqu'un laser est focalisé de manière continue sur la paroi absorbante. Extrait de [262]. c) Schéma en vue latérale d'une goutte de nitrobenzène flottant sur un bain de solution aqueuse, irradiée par un rayon laser. Son mouvement global est orienté vers la lumière. d) Mouvements de convection dans la goutte sous le laser. Des microbilles de polystyrène ont été introduites dans la goutte. e) Reconstitution des courants dans la goutte après analyse d'image sur les trajectoires des particules. Extrait de [263]. f) Schéma du dispositif permettant l'induction d'effet thermocapillaire sur une goutte submillimétrique reposant sur un substrat hydrophobe. Le laser chauffant est focalisé de manière précise grâce à un objectif de microscope. Extrait de [266]. g) Fusion photoinduite de gouttes d'eau immergées dans un bain de dodécanol. Le laser est focalisé sur le bord d'une goutte de façon à la faire avancer en direction de l'autre. Une fois en contact, poursuivre l'illumination les force à fusionner. Adapté de [267].

Les gradients chimiques statiques

Le premier exemple de mouvement de goutte induit par un substrat chimiquement inhomogène a été décrit en 1992 par Whitesides *et al.* [275]. Le gradient chimique a été réalisé en exposant localement un substrat de silicium à de la vapeur de décyltrichlorosilane. En adaptant le temps d'exposition pour que la diffusion du gaz ne lui permette pas de réagir sur toute la surface, un greffage partiel est obtenu. L'hydrophobicité du substrat est alors d'autant plus grande que la zone a été en contact avec la vapeur. Sur l'ensemble de la surface, l'angle de contact d'une goutte d'eau varie de quelques degrés à une centaine de degrés. Cette variation doit avoir lieu sur une distance suffisamment petite (de l'ordre du centimètre) pour que le gradient soit suffisamment important, de façon à ce que la force générée puisse surpasser l'hystérésis d'angle de contact. Les auteurs montrent ici que déposer une goutte d'eau au niveau des zones les plus hydrophobes l'entraîne effectivement vers les zones de plus grande mouillabilité, à une vitesse de l'ordre du $\text{mm}\cdot\text{s}^{-1}$. Le gradient est tel que le mouvement peut même avoir lieu quand la surface est inclinée (FIGURE 1.4 a). Un phénomène similaire a été observé avec des gouttes micrométriques de gallium sur une surface d'arsénique de gallium [276]. De plus, lors de la condensation de gouttes d'eau sur une surface à gradient de mouillabilité, il a été mis en évidence que la coalescence avec les autres gouttelettes présentes sur son passage, peut augmenter la vitesse de la goutte d'un facteur 100 [277].

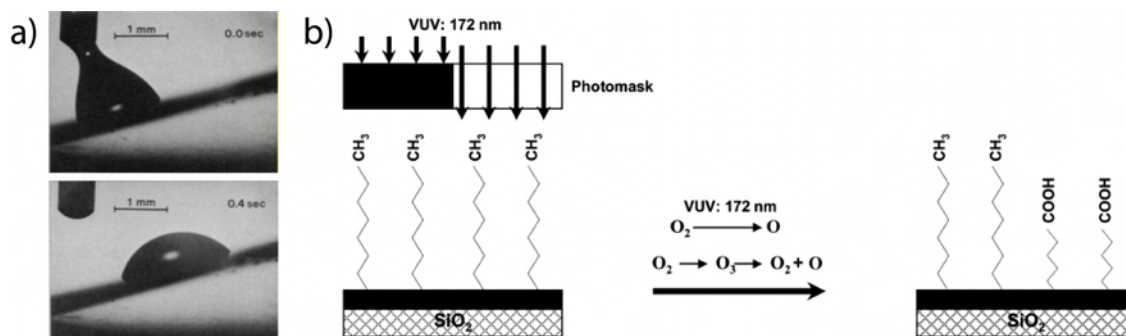


FIGURE 1.4 – Mouvements de gouttes et gradient de mouillabilité fixe. a) Dépôt d'une goutte d'eau sur une surface de silicium greffée graduellement de chaînes hydrophobes (densité plus grande à gauche qu'à droite du substrat). Le gradient de mouillabilité est suffisant pour la propulser en côte. Extrait de [275]. b) Préparation d'un gradient de mouillabilité à l'aide d'un masque optique. Des chaînes aliphatiques sont initialement chimisorbées sur une surface de silicium. Elles sont rendues plus hydrophiles par photodégradation, en présence d'oxygène et sous lumière UV de courte longueur d'onde. Extrait de [278].

L'ingénierie de surface s'est depuis beaucoup développée. Il est ainsi possible de créer des gradients à façon grâce à un masque optique : l'oxydation des chaînes aliphatiques d'une monocouche apolaire sous irradiation UV permet de réduire leur taille et d'augmenter leur polarité [278] (FIGURE 1.4 b). Enfin ce sont aussi le contrôle de la microstructuration du substrat [279] et de sa rugosité [280] qui sont exploitables pour induire le mouvement de gouttes.

Il est à noter qu'un mouvement de liquide peut être généré simplement en juxtaposant deux gouttes non miscibles dans un capillaire dont la surface est uniforme [281]. Leur contact provoque une asymétrie de mouillabilité : ce sont deux interfaces qui peuvent être créées d'un côté sans qu'elles ne le soient de l'autre. Leur énergie associée est différente. Cette anisotropie peut provoquer la migration spontanée de l'ensemble, alors que la surface est chimiquement homogène.

Induction par réaction

La modification des énergies interfaciales d'une goutte avec son environnement peut provenir d'une réaction chimique. Puisque les réactions chimiques peuvent être initiées par la chaleur, la lumière ou l'introduction d'un catalyseur, les stimuli externes offrent de nombreuses possibilités.

Il a par exemple été observé que le dépôt d'une goutte de décane contenant un acide gras perfluoré sur une lamme de verre, conduit à son mouvement spontané sur quelques centimètres à une vitesse d'environ 2 cm.s^{-1} [282]. La condensation spontanée de la tête acide carboxylique de l'agent réactif avec les groupements silanols du verre provoque la formation d'une monocouche de chaînes aliphatiques fluorées très hydrophobique. La goutte se meut de façon à éviter de se retrouver sur la zone hydrophobe qu'elle vient de générer. Le liquide est qualifié d'autophobe. Son mouvement s'arrête dès qu'il n'y a plus assez de réactif ou qu'elle repasse par un même point. Ce phénomène a été observé avec d'autres systèmes, en particulier avec des solutions d'alcanes thiolés sur une surface d'or [283] et des solutions de chlorosilanes sur une surface de silicium [284]. Un compromis entre la viscosité du solvant et la concentration du réactif doit être trouvé, car la cinétique de la réaction ne doit pas être trop rapide pour que la déformation du fluide puisse se faire lors de l'existence du gradient de mouillabilité. Néanmoins, il est nécessaire de briser la symétrie radiale du problème pour initier le mouvement. Cela peut par exemple être réalisé en déposant la goutte à la frontière entre le verre et une zone ayant subi l'adsorption de silanes fluorés.

La monocouche de mouillabilité différente peut aussi être créée non pas par réaction avec le substrat, mais par simple adsorption non covalente, en utilisant une goutte de tensioactifs aminés capables de s'autoassembler en monocouche sur un substrat hydrophile [285] (FIGURE 1.5 a). Ceci a été observé avec une goutte de nitrobenzene (contenant un tensioactif et de l'iodure de potassium) immergée dans de l'eau sur une surface de verre [286, 287] (FIGURE 1.5 b); un mouvement spontané régulier a lieu sous une simple inhomogénéité due au bruit dans le dépôt initial des tensioactifs et permet à la goutte de repasser par un même point, de franchir des marches ou d'effectuer des loopings verticaux.

Les gradients de tension interfaciale générés par réaction chimique en vue d'un mouvement ont aussi été exploités dans le cas d'une goutte flottant sur un bain. C'est le cas d'une goutte d'anhydride oléique en contact avec un bain aqueux [288] (FIGURE 1.5 c). Sa tension surfacique évolue au fur et à mesure que l'hydrolyse a lieu, car le produit de l'hydrolyse est un tensioactif qui se place directement à l'interface eau-huile. Au bout d'un certain temps de réaction, une brisure de symétrie a lieu au niveau de la tension interfaciale et induit le déplacement global de la goutte. La réaction peut être aussi simplement de nature acido-basique [289]. En plaçant une goutte contenant de l'acide 2-hexyldécanoïque sur un bain d'eau soumis à un gradient de pH, la protonation de l'acide est différente de part et d'autre de la goutte lors de sa diffusion dans le milieu aqueux. Ceci est directement lié à l'existence d'un gradient de tension interfaciale qui engendre des mouvements de fluide. La goutte se déplace vers les zones de plus grand pH et est attirée automatiquement vers la source acide, même à travers un labyrinthe millimétrique. Enfin la réaction peut avoir lieu à l'intérieur même de la goutte. En utilisant une goutte constituée d'un mélange réactif de type Belousov–Zhabotinsky (à l'origine étudié à travers les réactions oscillantes), il a pu être observé son mouvement sur un bain d'huile [290]. Dans ce cas, une vague chimique non homogène se propage dans la goutte. Elle convertit le fer présent à un autre degré d'oxydation, ce qui permet une modification locale de la tension de surface.

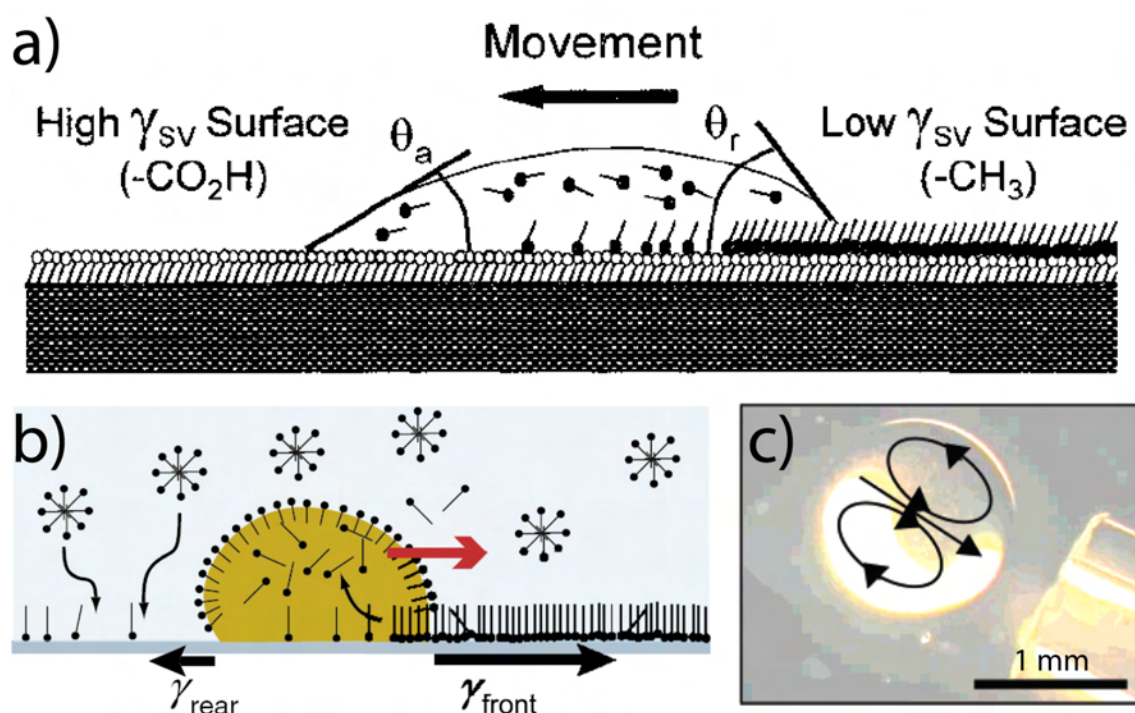


FIGURE 1.5 – Mouvement de gouttes sous un gradient de tension interfaciale induit par modification chimique. a) Schéma d'une goutte dont le déplacement est dû à l'adsorption de *n*-alkylamine sur une surface initialement recouverte de groupements carboxyles. Extrait de [285]. b) Schéma du mécanisme du mouvement d'une goutte de nitrobenzène dans de l'eau contenant des tensioactifs. Les tensioactifs ont tendance à se dissoudre dans la goutte. Une petite inhomogénéité suffit à induire un gradient de mouillabilité qui est entretenu au fur et à mesure que la goutte se déplace. Extrait de [286]. c) Mouvement d'une goutte flottante sous un gradient imposé de pH. La seringue permet une augmentation locale du pH, qui provoque l'hydrolyse de l'huile contenue dans la goutte et l'apparition de tensioactifs. Ceci provoque le déplacement de la goutte vers les zones de fort pH. Adapté de [288].

Induction lumineuse

Au-delà de la conversion de l'énergie lumineuse en chaleur, la lumière offre d'autres possibilités pour modifier certaines caractéristiques physico-chimiques des surfaces.

Le greffage de molécules organiques photochromes a d'abord été exploité pour donner un caractère photosensible à un substrat. Ce sont d'abord des groupements diazobenzène qui ont été fixés sur du silicium [291] (FIGURE 1.6 a). Ceci peut se faire soit par condensation directe d'une molécule à extrémité triéthoxysilane contenant une fonction diazobenzène, soit par création préliminaire d'une monocouche d'amines suivie de la formation d'une liaison amide par mise en contact avec un chlorure d'acyle contenant le groupement photosensible [292]. Des polyélectrolytes contenant la fonction diazobenzène et pouvant être facilement déposés en couches ont aussi été récemment synthétisés [247].

Le premier exemple de gradient de mouillabilité photoinduit suffisamment important pour engendrer un mouvement a été décrit au début des années 2000 par Ichimura *et al.* [293, 294] (FIGURE 1.6 b). Le groupement diazobenzène est ici contenu dans une molécule de type calixarène qui a été condensée sur une surface de silicium à monocouche aminée. La surface photosensible préparée a pu fournir une différence d'angle de contact plus importante que l'hystérésis pour que le déplacement ait lieu. Ainsi avec une goutte d'huile d'olive, la différence est d'une dizaine de degrés. La goutte se déplace des zones de faible mouillage (sous lumière visible, les groupements diazobenzènes sont en configuration *trans* ce qui favorise le contact avec leur tête polaire, l'angle de contact est plus grand) vers les zones de mouillage fort (lumière UV, groupement en configuration *cis*, chaînes carbonées en surface, angle plus faible). Sa vitesse est de l'ordre du $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$.

Des expériences similaires ont été menées avec des surfaces greffées de molécules contenant des groupements spiropyranes [295, 296] (FIGURE 1.6 c). Les variations d'angle de contact pour l'eau sont d'amplitude similaire à celles obtenues avec les diazobenzènes, d'environ 15° .

Enfin le greffage de molécules de type rotaxane, contenant une partie photochrome fura-ramide a aussi été utilisé [297]. Dans ce cas le changement photoinduit de configuration du groupement n'entraîne pas une modification de polarité suffisante, mais provoque le déplacement du macrocycle mobile du rotaxane sur un autre site de la molécule. Ceci modifie suffisamment l'hydrophilicité de l'ensemble et permet un mouvement sous stimulus lumineux.

La mise au point de surfaces photosensibles s'est aussi développée en parallèle à travers l'utilisation de matériaux inorganiques, en particulier parce qu'ils sont plus robustes que les groupements carbonés précédents. Le principal agent utilisé est le dioxyde de titane [298]. Introduit dans les cellules solaires à colorants [299] ou dans des dispositifs photocatalytiques [300], il nous intéresse ici par sa polarité photodépendante. Une surface couverte de TiO_2 est initialement hydrophobe et devient hydrophile sous lumière UV. L'angle de contact d'une goutte d'eau sur ce type de surface diminue fortement d'environ 70° à moins d'un degré. Le phénomène est réversible, lorsque la surface est plongée suffisamment longtemps dans le noir. De l'oxyde de zinc peut aussi être utilisé [301]. Des gradients de mouillabilité suffisamment importants ont pu être générés par la lumière pour y déplacer des gouttes [302].

Dans toutes ces expériences, contrairement aux phénomènes reposant uniquement sur des interfaces liquide-liquide, la vitesse de déplacement ne dépasse pas le $\text{mm}\cdot\text{min}^{-1}$.

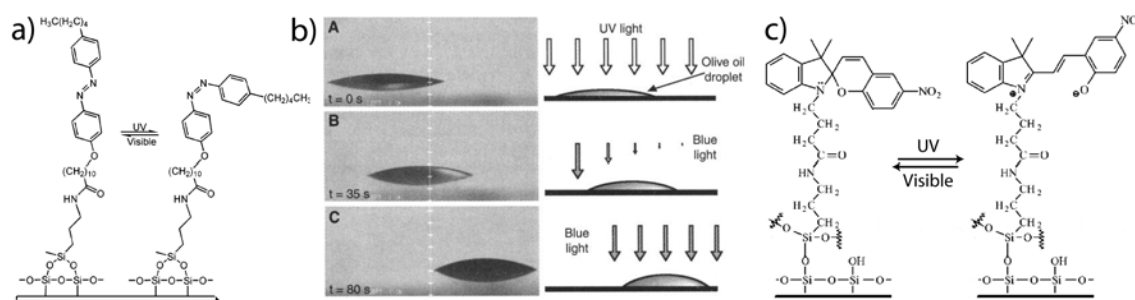


FIGURE 1.6 – Exemples de surfaces photosensibles organiques. a) Surface de silicium sur laquelle a été greffée une monocouche de molécules contenant un groupement photochrome diazobenzène. Extrait de [292]. b) Déplacement d’une goutte d’huile d’olive sur une surface photosensible contenant des groupements diazobenzène, sous l’effet d’un gradient de lumière visible. Initialement les groupements sont tous convertis en configuration *cis* sous irradiation UV. L’illumination graduelle en lumière bleue induit un gradient décroissant de molécules en configuration *trans*, pour lesquelles la goutte a moins d’affinité (angle de contact plus grand). Elle se déplace vers les zones où les groupements en *cis* sont plus nombreux, c’est à dire en dehors de l’illumination. Extrait de [293]. c) Surface sur laquelle a été greffée une monocouche de molécules contenant un groupement photochrome spiropyrane. Adapté de [296].

1.1.4 Les autres stimuli capillaires

Nous sommes limités jusqu’ici aux modifications de tension interfaciale ne faisant pas intervenir de dispositif électrique. Or des effets Marangoni et des gradients de mouillabilité engendrant des mouvements sont aussi initiés par ce type de stimulus.

D’une part ce sont des surfactants électroactifs qui ont été mis au point [303, 304, 36] (FIGURE 1.7 a). Contenant un groupement ferrocène, leur capacité à stabiliser les interfaces est directement dépendante de l’état d’oxydation de ce groupement. Introduit dans de l’eau, des variations de tension superficielle importantes allant jusqu’à $20 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ sont obtenues suivant cet état. En introduisant des électrodes dans la solution contenant ces molécules, l’application d’une tension a permis de déplacer des particules millimétriques.

D’autre part, sans faire intervenir de réaction chimique, un champ électrique peut modifier le mouillage d’une surface, à travers le phénomène d’électromouillage [305, 306]. Lorsqu’une goutte est introduite entre deux substrats la séparant de deux électrodes (schéma du dispositif représenté FIGURE 1.7 b), son angle de contact devient dépendant de la tension appliquée. Ce principe a donné lieu au développement de lentilles à focale contrôlée [307]. Lorsque le champ est inhomogène, les angles de contact deviennent différents, la goutte bouge. Suivant la complexité du système électrique, la position du liquide peut être contrôlée finement, de même que la division et la fusion de gouttes. Ce domaine constitue aujourd’hui une discipline à part entière, appelée aussi microfluidique digitale [308] et offre des applications directes en analyse biologique et en chimie combinatoire.

Ces stratégies offrant des déplacements rapides (de l’ordre du $\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$) et un contrôle simultané de plusieurs objets, nécessitent malgré tout la préparation d’un dispositif complexe et d’une interface de contrôle bien spécifique.

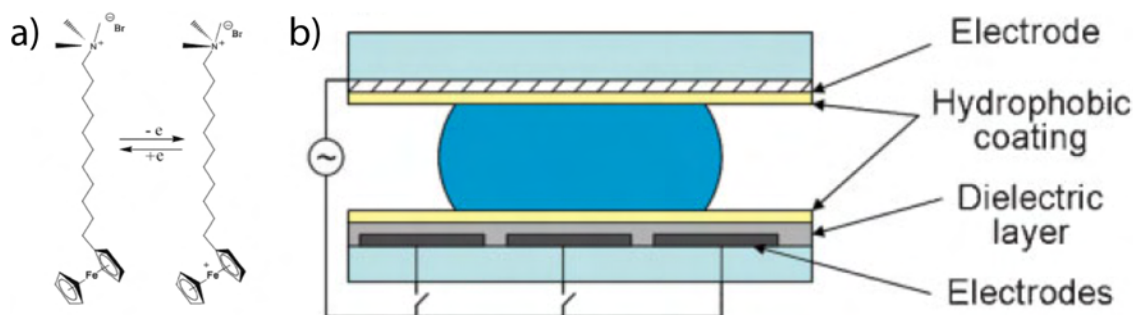


FIGURE 1.7 – Modifications de tensions interfaciales par des courants ou des champs électriques. a) Exemple d'un tensioactif électroactif, le bromure de 11-ferrocénylundécyle diméthylammonium (FTMA). L'extrémité ferrocényle de la molécule change de charge suivant son état d'oxydation. La tension de surface qui lui est associée est alors elle aussi modifiée. Extrait de [36]. b) Schéma d'un dispositif d'électromouillage, permettant de modifier l'angle de contact d'une goutte par application d'une tension. Un mouvement peut avoir lieu lorsqu'elle est inhomogène. Extrait de [308].

1.2 Les interfaces microfluidiques

1.2.1 Écoulements biphasiques microfluidiques

La microfluidique

Le terme "microfluidique" ne désigne pas une discipline scientifique précise. Il s'agit plutôt, comme le définit Whitesides [309], de la science et la technologie des systèmes qui manipulent des volumes de fluides de 10^{-9} à 10^{-18} L en utilisant des canaux dont une des dimensions est de l'ordre de la dizaine de micromètres. Son apparition eu lieu à la fin des années 90, grâce à l'adaptation des techniques de microfabrication issues de la microélectronique (en particulier de la photolithographie) pour concevoir de manière contrôlée des motifs de taille submillimétrique dans une matrice élastomérique [310, 311, 312, 313].

Indépendamment des applications, la physique des écoulements de fluide à ces dimensions est caractérisée par deux propriétés principales, qu'il est difficile d'obtenir avec les liquides usuels (solutions aqueuses, huiles) à plus grandes échelles [314]. La première concerne la nature de l'écoulement, à travers la comparaison des forces liées à l'inertie et celles liées à la viscosité. Une bonne approximation pour évaluer la prédominance d'un type de force par rapport à l'autre se fait par le calcul du nombre de Reynolds Re défini par :

$$Re = \frac{\rho U_0 L_0}{\eta} \quad (1.2)$$

avec ρ la masse volumique du fluide, U_0 sa vitesse dans le canal, L_0 la dimension caractéristique de la section du canal et η sa viscosité dynamique. Dans un dispositif microfluidique classique dans lequel circule de l'eau, $\rho = 1 \text{ kg.m}^{-3}$, $\eta = 10^{-3} \text{ kg.s}^{-1}.\text{m}^{-1}$, $U_0 \sim 10^{-3} \text{ m.s}^{-1}$ et $L_0 \sim 10^{-5} \text{ m}$ soit $Re \sim 10^{-5}$. Cette faible valeur de Re indique que les forces visqueuses sont prédominantes, l'écoulement résultant est laminaire. Ceci se traduit par une absence des phénomènes de convection et du fait du caractère déterministe de l'écoulement, il sera aisé de prévoir les trajectoires et de modéliser les lignes de courant. L'autre conséquence de l'échelle micrométrique est liée à la manière dont les mélanges ont lieu dans le canal, qui peuvent *a priori* être faits par

convection ou diffusion des molécules introduites dans le milieu liquide. Ici l'écoulement n'étant pas turbulent, les mélanges par convection qui sont réalisés de façon rapide dans le monde macroscopique n'auront pas lieu. Ceci indique qu'il sera facile de créer et contrôler des gradients de concentration [315].

Les applications issues de la microfluidique concernent plusieurs domaines distincts. Tout d'abord celle de la miniaturisation des appareils d'analyse. Même si plusieurs méthodes microanalytiques existent depuis plusieurs décennies (en particulier la chromatographie en phase gaz, la chromatographie liquide à haute pression et l'électrophorèse capillaire), la microfluidique offre de nouvelles perspectives pour la thématique du laboratoire sur puce (lab on a chip) [316]. Les techniques précédentes permettent de séparer puis de caractériser par spectroscopie les espèces présentes en sortie d'un capillaire. Au delà de l'objectif de construire des dispositifs d'analyse toujours plus petits et toujours plus sensibles, pour réduire le volume nécessaire de réactifs ou d'échantillons [317], la microfluidique permet un contrôle très précis des espèces introduites dans le microdispositif et de leur environnement. Le développement des vannes pneumatiques a permis de pouvoir contrôler l'alimentation, la répartition et le mélange de plusieurs liquides sur une même puce et d'y observer en temps réel les conséquences [318] ; par exemple pour maintenir un environnement physico-chimique constant et y faire croître des microbes [319] (FIGURE 1.8 a) ou pour y combiner des réactifs en variant progressivement un ou plusieurs paramètres (concentrations, mélange, température...) pour étudier la cristallisation de protéines [320, 321] (FIGURE 1.8 b). L'analyse n'est plus restreinte à une seule dimension spatiale, mais de plus en plus à deux dimensions et parfois trois. Ceci est mis à profit par exemple pour le suivi en temps réel de la croissance et de la variabilité phénotypique au sein de lignées bactériennes [322] ou cellulaires [323]. La variation localisée d'un paramètre peut être évaluée dans l'espace [324] et mise à profit comme par exemple les gradients contrôlés de température pour réaliser de l'amplification d'ADN (PCR) sur puce [325]. C'est aussi l'analyse d'un faible volume ($\sim\mu\text{L}$) d'échantillons complexes, notamment biologiques, qui peut être effectuée par l'intégration aisée de différentes étapes successives de caractérisation sur une même puce (concept du système de microanalyse totale, ou μTAS [326]). Ceci est mis à profit dans la découverte de nouveaux médicaments [327].

L'intégration de techniques existantes à la microfluidique s'est rapidement développée. Le couplage synergique de l'optique à la microfluidique porte un nom, l'optofluidique, qui a pour but aussi bien d'utiliser la lumière pour contrôler à distance les écoulements, que d'exploiter le guidage de la lumière par les canaux pour donner de nouvelles fonctions optiques au microdispositif [328]. L'intégration d'électrodes micrométriques au dispositif permet de créer des champs électriques pour le déplacement contrôlé d'objets ou d'interfaces [329] ou de réaliser des analyses électrochimiques [330]. De même, il est possible de coupler l'imagerie par résonance magnétique aux écoulements microscopiques [331]. Enfin, et ceci sera précisé dans la section suivante, les phénomènes capillaires étant d'autant plus importants à ces échelles, la mise en contact de fluides non miscibles peut donner lieu à la formation contrôlée de vésicules [156, 157, 158], d'émulsions [332] et d'émulsions multiples [333, 334] (FIGURE 1.8 c). Ces systèmes trouvent des applications directes en cosmétique et en pharmacologie. Enfin les analogies entre microfluidique et électronique se sont multipliées et permettent de disposer de systèmes souples servant de mémoire [335] ou de transmetteur d'information [336].

Même si ses applications commerciales ne concernent encore qu'un marché de niche, l'essor de la microfluidique se poursuit. Pour ne citer que quelques exemples du futur de ce domaine, nous pouvons souligner les efforts fournis pour permettre son interconnexion aisée à d'autres systèmes [338], la diminution de taille vers la nanofluidique [339], à l'inverse le retour vers le

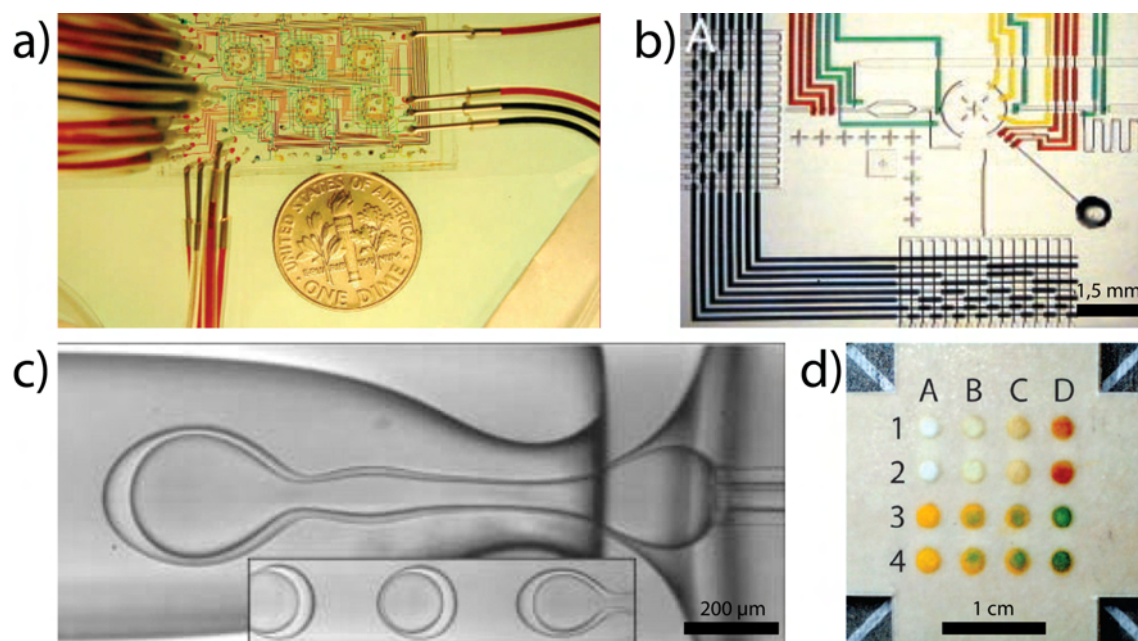


FIGURE 1.8 – Exemples de dispositifs microfluidiques. a) Dispositif utilisé pour étudier la croissance de populations microbiennes dans un environnement chimique constant (chemostat). Ce sont six chemostats qui fonctionnent en parallèle sur la puce, chacun possédant une chambre de culture, une pompe péristaltique fixant le débit du fluide traversant la chambre, plusieurs canaux d'alimentation individuellement contrôlés par des microvalves et plusieurs sorties pour les déchets. Extrait de [319]. b) Dispositif contenant un formulateur microfluidique (anneau central) permettant un mélange combinatoire de différents réactifs. Au final ce sont 32 liquides différents qui peuvent être mis en contact dans un réacteur de 5 nL. Il a en particulier été utilisé pour l'étude de la cristallisation de protéines. Adapté de [321]. c) Dispositif comportant une jonction coaxiale dans laquelle deux fluides non miscibles s'écoulent autour d'un capillaire en contenant un troisième. Ceci permet la formation contrôlée d'émulsions doubles. Adapté de [333]. d) Dépôts localisés de différents réactifs sur un dispositif en papier, après superposition de plusieurs couches de papiers microimprimés ayant permis l'écoulements et la séparation de liquides. Il en résulte un substrat de taille centimétrique très peu cher permettant la réalisation de tests rapides sur des échantillons d'urine, dont la réponse est colorimétrique. Adapté de [337].

domaine peu exploré de la millifluidique [340] ou encore son développement à travers d'autres matrices polymériques, pour permettre l'utilisation d'autres solvants [341] ou simplement grâce au papier, pour la mise au point de plate-formes de tests simples et bon marché [337] (FIGURE 1.8 d).

Les microgouttes

Nous allons nous focaliser maintenant sur les écoulements microfluidiques faisant intervenir deux liquides non miscibles. La configuration la plus intéressante est celle d'un écoulement d'eau dans l'huile car des gouttes d'eau vont pouvoir être obtenues. Néanmoins les écoulements biphasiques peuvent aussi concerner l'obtention de gouttes d'huile dans l'eau ou encore le mélange d'un liquide et d'un gaz, en particulier pour la formation de mousses aux bulles monodisperses [342].

La mise en contact de deux fluides non miscibles dans un écoulement se traduit par la compétition entre deux effets antagonistes : la tension de surface agit pour réduire la taille de l'interface créée et les forces visqueuses provoquent son étirement par cisaillement. Cette compétition destabilise l'interface, qui le plus souvent rompt pour donner des gouttes. Une taille estimée de ces gouttes peut être obtenue en égalisant les deux forces s'exerçant sur l'interface. Les forces surfaciques correspondantes sont de l'ordre de γ/R pour la tension de surface et $\eta U_0/h$ pour la viscosité. Dans notre cas précis, la taille caractéristique des gouttes sera donc de :

$$R \sim h \frac{\gamma}{\eta U_{interf}} \quad (1.3)$$

avec η_{cont} la viscosité du fluide composant la phase continue, U_{interf} sa vitesse au niveau de la création de l'interface, h la largeur du canal et γ la tension interfaciale entre les deux phases, qui s'écrit aussi

$$R \sim \frac{h}{Ca} \quad \text{avec} \quad Ca = \frac{\eta_{cont} U_{interf}}{\gamma} \quad (1.4)$$

où Ca est le nombre capillaire qui est un nombre adimensionnel permettant de caractériser la dynamique des systèmes faisant intervenir une interface soumise à une contrainte visqueuse. Si Ca est grand (environ supérieur à 1), le cisaillement étire fortement l'interface qui rompt et qui conduit à une dispersion de petite taille caractéristique. Si Ca est petit, l'interface garde son intégrité. Dans le cas d'une interface eau-huile stabilisée par des surfactants ($\gamma \sim 10^{-3} \text{ N.m}^{-1}$) dans un écoulement microfluidique standard ($\eta_{cont} \sim 10^{-1} \text{ kg.s}^{-1}.\text{m}^{-1}$ pour une huile, $U_{interf} \sim 10^{-2} \text{ m.s}^{-1}$ est plus grande que U_0 précédent du fait de la jonction des deux fluides), Ca est de l'ordre de 1. Ceci indique que les gouttes auront une taille de l'ordre de celle de la largeur du canal.

La nature déterministe des écoulements microfluidiques offre l'avantage de pouvoir adapter les conditions d'écoulement pour obtenir des gouttes régulières aussi bien au niveau de leur taille que de leur fréquence de génération. Les microdispositifs permettant la formation de gouttes ont principalement deux géométries. La première appelée jonction en T où un canal transportant la phase aqueuse intersecte orthogonalement un canal transportant la phase huile [343] (FIGURE 1.9 a). La seconde dite de "flow-focusing" (focalisation des flux) dans laquelle une arrivée de phase aqueuse est pincée de part et d'autre par deux arrivées d'huile [344] (FIGURE 1.9 b). Grâce à ces dispositifs, les microgouttes présentent plusieurs grands intérêts [345] : 1) elles permettent d'encapsuler, car elles représentent un microcompartiment pouvant isoler des objets ou des réactions,

2) elles sont relativement monodisperses et donc à même d'être l'objet de mesures quantitatives, 3) elles offrent la possibilité de travailler avec de très faibles volumes (\sim fL), des cellules ou des molécules uniques, 4) elles permettent la réalisation d'un grand nombre d'expériences en un temps réduit (leur fréquence de formation atteint le kHz).

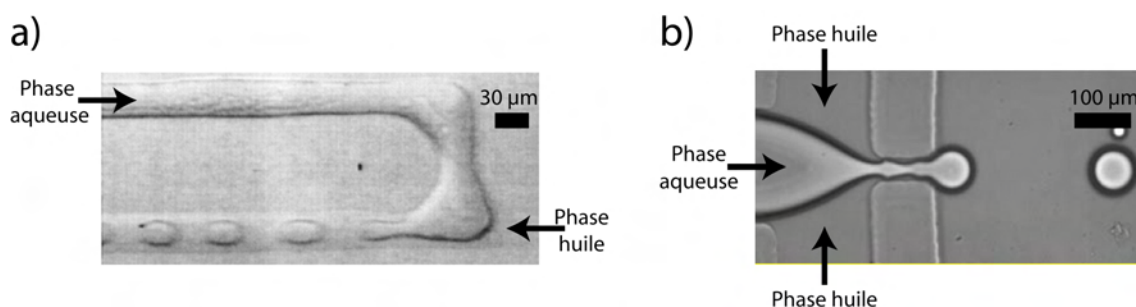


FIGURE 1.9 – Les deux principaux types de jonctions permettant la formation de microgouttes. a) La jonction en T. Adapté de [343]. b) La configuration de "flow-focusing". Adapté de [344].

Les applications liées aux microgouttes se sont rapidement multipliées en l'espace d'une dizaine d'année [346, 347, 348, 349]. Les chimistes ont rapidement transposé les réactions habituellement effectuées à l'échelle du millilitre dans les microgouttes [350]. En particulier dans le cas de réactions rapides dont la préparation du mélange ne peut pas être effectuée avant introduction dans les canaux, une amélioration de la jonction en T a été mise au point, analogue au système des cartouches d'encre d'une imprimante [332] (FIGURE 1.10 a). De cette manière le temps initial de mise en contact avec les réactifs correspond quasiment au moment de formation de la goutte. Des réactions biochimiques simples ont été étudiées en y introduisant une enzyme et son substrat de manière à étudier sa cinétique à de faibles échelles de temps (\sim ms) [351] (FIGURE 1.10 b). Du fait de la possibilité de fixer plusieurs températures le long d'un même canal, de l'amplification d'ADN a été réalisée [352] (FIGURE 1.10 c). Le contrôle précis de la composition et de l'environnement de gouttes a été utilisé pour des réactions très sensibles comme la cristallisation de protéines [353] (FIGURE 1.10 d). Le confinement imposé par l'interface a permis la synthèse de microparticules [354] et des nanoparticules [355]. C'est l'encapsulation d'objets micrométriques qui est aussi possible, notamment pour isoler individuellement des cellules [356, 357, 358] (FIGURE 1.10 e). Enfin du point de vue macroscopique, le fait de pouvoir contrôler précisément la taille de la phase dispersée permet la production d'émulsions aux caractéristiques physiques bien définies (en particulier leur viscosité), ce qui commence à être mis en oeuvre dans l'industrie du cosmétique.

La modification d'un paramètre fixe du système permet une modification immédiate de la taille des gouttes. En effet comme l'indique la relation 1.3, ceci peut être réalisé en changeant le débit des liquides [343, 344, 359, 360], la géométrie de la jonction [361] ou encore la tension interfaciale par l'ajout de tensioactifs [362, 363, 364] ou une variation de température [365]. Varier ces caractéristiques de façon dynamique et rapide, c'est à dire ici avec un temps de réponse de l'ordre de la seconde, est quelque chose qui nécessite l'intervention d'un actuateur extérieur.

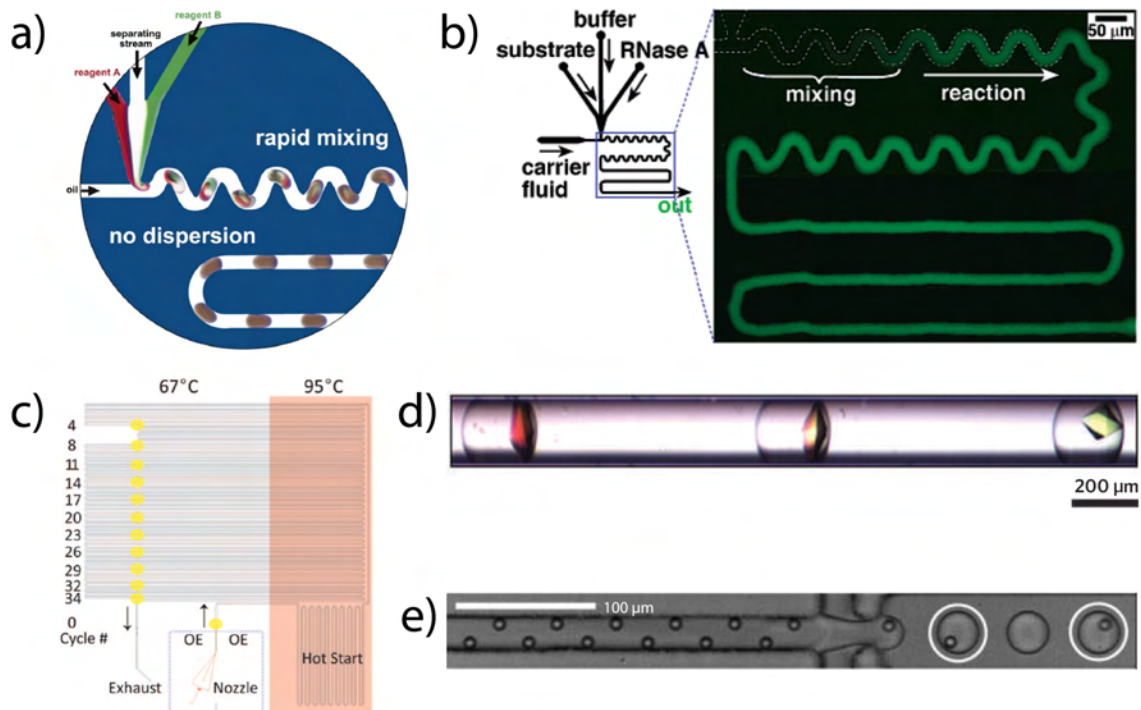


FIGURE 1.10 – Exemples d'applications des gouttes produites par microfluidique. a) Géométrie permettant l'introduction puis le mélange de différentes quantités de deux réactifs dans une microgoutte (système de cartouche). Extrait de [332]. b) Suivi d'une cinétique enzymatique après mise en contact d'une enzyme et d'un substrat fluorogénique au moment de l'encapsulation. Extrait de [351]. c) Schéma d'un dispositif permettant la PCR en microgouttes. Les gouttes formées au niveau de la jonction de type "flow-focusing" en bas du schéma, sont ensuite conduites à travers un canal soumis localement à différentes températures. Extrait de [352]. d) Cristallisation de protéine dans des microgouttes. Extrait de [353]. e) Encapsulation de cellules individuelles. Extrait de [357].

1.2.2 Contrôles dynamiques de la formation de microgouttes

Contrôle thermique

Comme nous l'avons vu, la taille des gouttes est approximativement inversement proportionnelle à tension interfaciale et cette dernière est relativement dépendante de la température, d'environ $0,1 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$ (Section 1.1.2). Pour changer rapidement la tension interfaciale, il n'est pas utile de chauffer tout le liquide présent en amont de la jonction, un échauffement local suffisamment puissant suffit. Ceci peut être réalisé en plaçant une résistance chauffante micrométrique au niveau de la jonction, directement sur le substrat [366] (FIGURE 1.11 a). Cette stratégie a l'avantage de pouvoir être intégrée à n'importe quelle type de géométrie. Par contre sa réponse temporelle, en plus de ne pas être si rapide (de l'ordre de la dizaine de secondes), est continue et ne permet pas de sauts rapides d'une taille de goutte à une autre. De plus, la variation maximale de la taille est limitée : en chauffant 50°C de plus, la taille varie d'un facteur 2. Cet ordre de grandeur se retrouve grâce à la relation 1.3 ; avec une telle variation de température, γ varie d'environ $5 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ soit de moitié. Le rayon de la goutte varie donc de la même manière. La modélisation précise de la variation de la taille est plus compliquée, car le changement de température affecte aussi les viscosités des fluides.

Contrôle mécanique

La géométrie des canaux est *a priori* fixée, mais il est quand même possible de jouer sur la flexibilité du PDMS pour la modifier. Ceci a été réalisé de façon pneumatique, en permettant à de l'air sous pression de comprimer une jonction de flow-focusing [367] (FIGURE 1.11 b). Même si la préparation d'un dispositif et d'une interface spécifiques sont nécessaires, le contrôle est à la fois important (la taille peut varier d'un facteur 10) et son temps de réponse performant (de l'ordre de 10 ms). Cette technique a aussi été appliquée pour induire une contrainte verticale sur la jonction pour générer une goutte dont la taille est directement dépendante de l'amplitude de la déformation [368].

Contrôle électrique

L'eau étant un liquide polaire, elle est sensible aux champs électriques. L'incorporation d'électrodes dans le dispositif permet ainsi d'induire le changement de taille des microgouttes, en plaçant simplement une électrode avant et après la jonction [369, 329, 370, 371] (FIGURE 1.11 c). L'application d'une tension entre ces deux éléments provoque la charge capacitive de l'interface eau-huile et sera déformée différemment par l'écoulement. La gamme de variation en taille est importante (facteur 10), mais il est nécessaire d'appliquer plusieurs centaines de volts, ce qui est une limite forte pour l'utilisation d'échantillons fragiles sous champ électrique. De façon analogue, c'est un contrôle par électromouillage qui peut être utilisé pour des résultats similaires avec un voltage ne dépassant pas la centaine de volts [372].

Contrôle optique

Enfin le dernier stimuli qui a été utilisé pour modifier la génération de microgouttes est la lumière. Contrairement aux stratégies précédentes, la lumière présente la caractéristique de pouvoir être focalisée en tout point, sans que le dispositif ne nécessite une préparation préalable. Le terme optofluidique est véritablement apparu à partir de l'année 2005 et désigne de façon

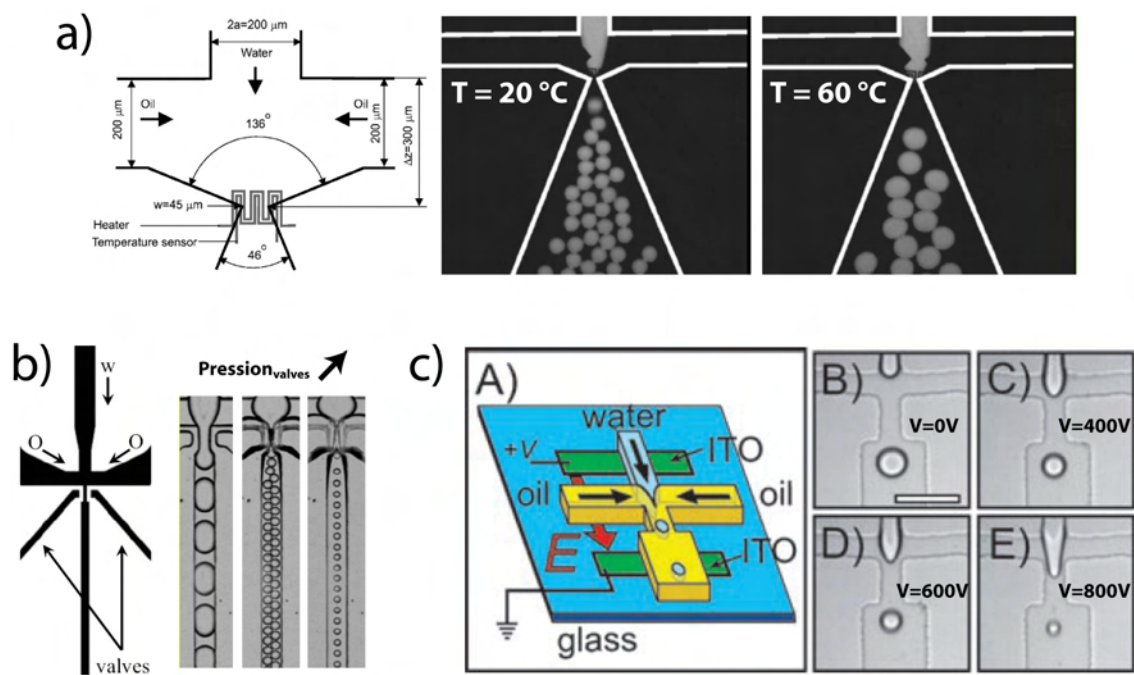


FIGURE 1.11 – Principales méthodes de contrôle de tailles de gouttes en microfluidique ne faisant pas intervenir de lumière. A gauche, schéma des dispositifs ; à droite, effet sur les gouttes. a) Contrôle thermique, en incorporant une résistance chauffante au niveau de la jonction. Adapté de [366]. b) Contrôle mécanique, en déformant le cou de la jonction à l'aide de valves pneumatiques. Adapté de [367]. c) Contrôle électrique. Un champ électrique est imposé de part et d'autre de la jonction. Adapté de [369].

large aussi bien le domaine scientifique exploitant l'interaction micrométrique entre liquides et lumières, qu'un ensemble de technologies permettant la miniaturisation d'appareils existants dans des microdispositifs compacts [328, 373, 374, 375].

Nous restreignons ici notre propos aux possibilités d'utiliser un stimulus lumineux pour modifier, toutes choses égales par ailleurs (compositions, géométrie, débits), la taille des microgouttes. Jusqu'à présent, ceci a été exclusivement réalisé à travers un effet thermique, en exploitant un échauffement local de l'interface eau-huile sous irradiation pour y modifier la tension associée [376, 377]. Baroud *et al.* ont observé ce phénomène en focalisant un laser au niveau d'une jonction de flow-focusing [378] (FIGURE 1.12 a). Sous l'effet de la chaleur, la phase aqueuse est retenue un peu plus longtemps avant d'être fragmentée. Les gouttes générées sont alors plus grosses. Cette technique, comme les autres stratégies thermiques précédentes [366, 365] ne permet pas de grandes variations de taille, à peine plus de deux fois. Malgré tout, elle est applicable à de nombreux autres types de liquides, et l'effet thermocapillaire peut être exploité après la formation de la goutte : il est possible grâce aux mécanismes décrit en 1.1.2 de l'arrêter dans un canal [379], de modifier sa trajectoire afin de trier à grande vitesse (\sim kHz) [380] (FIGURE 1.12 b) ou encore d'induire la fusion entre voisines [381].

L'unique autre exemple de génération photocontrôlée de microgouttes est à notre connaissance le récent travail portant sur l'utilisation de la cavitation induite par pulse laser [382] (FIGURE 1.12 c). Il est en effet possible d'induire l'apparition d'une bulle dans une phase aqueuse sous un pulse lumineux suffisamment intense. En réalisant ce phénomène au voisinage d'une interface eau-huile, il est possible de la déformer et de générer des gouttes lorsque cette déformation est contrainte dans une direction par les canaux. La taille des gouttes est de plus dépendante de la puissance du pulse et son contrôle se fait sur une large gamme de tailles différentes pour une même géométrie (le diamètre peut varier de plus de 10 fois). En outre, la réponse du système est la plus rapide, la génération de gouttes à la demande peut se faire à des fréquences d'environ 10 kHz. De toutes les méthodes présentées, celle-ci est la plus performante, mais en plus de nécessiter un dispositif optique conséquent, elle semble difficilement applicable aux solutions contenant des molécules sensibles à la chaleur ou aux lumières intenses.

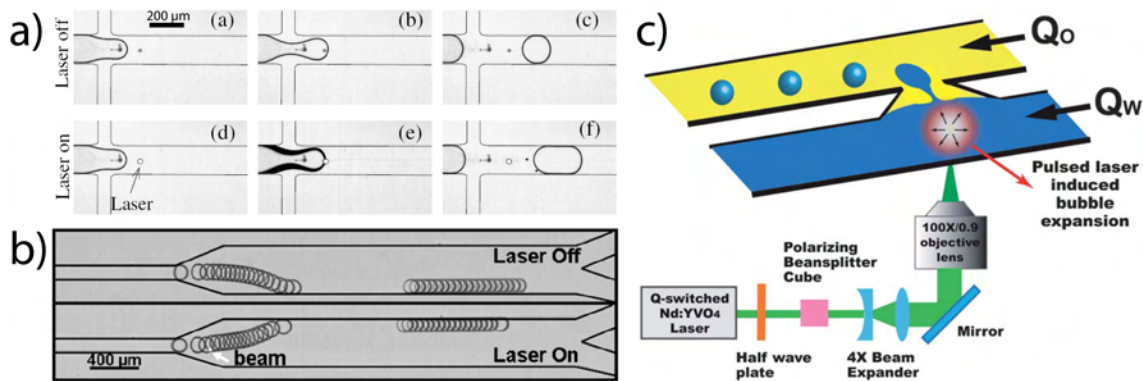


FIGURE 1.12 – Photocontrôle de la génération et de la trajectoire de microgouttes. a) Modification de la taille de microgouttes par chauffage local d'une jonction de flow-focusing. Extrait de [378]. b) Déviation induite par effet thermocapillaire sous faisceau laser. Extrait de [380]. c) Génération de microgouttes par cavitation induite par pulse laser. Extrait de [382].

1.3 Conclusion

Nous nous sommes intéressés dans ce chapitre aux possibilités d'entraînement de fluide sous l'effet d'un gradient de tension de surface. Les stratégies de mise en mouvement sous une modification des équilibres capillaires sont à la fois de natures diverses (échauffement local, inhomogénéité chimique créée *a priori* ou induite par réaction) et applicables à différents systèmes (goutte flottante, goutte déposée sur une surface, menisque). Néanmoins dans la plupart des cas, la lumière a été utilisée pour transférer son énergie sous forme de chaleur. La conversion d'énergie lumineuse en mouvement se fait dans ces situations de façon peu sélective. Il n'y a que dans le cas de gouttes posées sur une surface solide fonctionnalisée par des molécules photochromes que l'interaction entre la lumière et des groupements chimiques bien définis a été exploitée. Cette possibilité d'absorber des photons pour modifier une caractéristique des molécules n'a jamais fait l'objet de travaux dans le cas d'une goutte flottante.

Il en est de même pour les interfaces à l'échelle micrométrique. La lumière n'a été finalement que peu exploitée dans des écoulements biphasiques microfluidiques, seulement à travers des effets thermiques. En particulier, il se trouve qu'aucune molécule photochrome soluble n'a été introduite dans un dispositif microfluidique. Malgré tout, des possibilités de mouvement photoinduit à travers une interaction lumière-matière ont été mises en évidence dans des écoulements monophasiques. Le mouvement de fluide dans un microcanal a été induit par contrôle du mouvement de translation de particules par piégeage optique [383] ou de rotation d'objets colloïdaux biréfringents [384, 385], ou encore grâce à l'introduction de nanoparticules photothermiques [386]. De façon chimique, une différence de mouillabilité photoinduite (grâce à des molécules photochromes) a aussi permis de modifier l'imprégnation de microcanaux [387].

Ceci nous a poussé à étudier les possibilités offertes par l'AzoTAB. C'est ici sa capacité à se positionner aux interfaces qui sera exploitée. Nous montrerons dans les deux prochains chapitres qu'il peut être utilisé pour induire des changements de tension interfaciale sous contrôle lumineux, qui provoquent des effets spectaculaires, aussi bien à l'échelle du centimètre qu'à celle de la dizaine de micromètres.

Chapitre 2

Photomanipulation par effet chromocapillaire

La conversion de l'énergie lumineuse en énergie mécanique est un enjeu important aussi bien pour l'industrie automobile que pour actionner des objets de plus petite taille sans contact physique. Les exemples existants reposent quasi-exclusivement sur des intermédiaires de conversion de l'énergie initiale sous forme électrique (cellule photovoltaïque) ou chimique (batterie, biocarburants). Même si ces étapes supplémentaires permettent de stocker cette énergie, elles ont tendance à complexifier et surcharger le système ainsi qu'à diminuer les rendements de transformation. Ceci est d'autant plus contraignant lorsque l'on souhaite diminuer sa taille. La conversion la plus directe possible de lumière en travail mécanique est donc une question dont l'enjeu touche à la fois au volume, à la simplicité, à l'indépendance et au coût du système.

Nous avons compris dans le chapitre précédent que des mouvements macroscopiques de liquide pouvaient être engendrés par des inhomogénéités de tension de surface. En particulier, ces gradients de tension peuvent être générés par la lumière. Si on exclut l'effet thermocapillaire où l'illumination sert seulement à effectuer un échauffement local, la lumière n'a jusque là été utilisée que pour générer des gradients de mouillabilité sur des substrats solides photosensibles. Les mouvements engendrés restent relativement lents ($\sim \text{mm.min}^{-1}$). Ici nous souhaitons exploiter les propriétés dynamiques interfaciales en créant un flux de type Marangoni par la lumière. Pour cela nous avons utilisé l'AzoTAB. De part sa nature tensioactive et photosensible, il représente un moyen de modifier sélectivement la tension de surface. Nous allons montrer dans ce chapitre que convertir l'énergie lumineuse en mouvement par le seul intermédiaire de la tension de surface, est réalisable grâce à l'AzoTAB. Pour cela le système biphasique choisi, une goutte flottante millimétrique, sera d'abord détaillé. La variation de tension de surface sous illumination sera ensuite présentée. Nous décrirons enfin la possibilité de photomanipulation de cette goutte par un effet inédit baptisé effet chromocapillaire. Les résultats de ce chapitre ont été publiés dans [388].

2. Photomanipulation par effet chromocapillaire

2.1	Choix du système biphasique	171
2.1.1	Goutte d'AzoTAB dans un bain d'huile	171
2.1.2	Goutte d'huile sur un bain d'AzoTAB	171
2.2	Variation de la tension interfaciale sous lumière UV	173
2.3	Illumination partielle de la goutte	175
2.3.1	Mouvement linéaire	175
2.3.2	Mécanisme	175
2.4	Photomanipulation à façon	178
2.4.1	Utilisation simultanée de deux longueurs d'onde	178
2.4.2	Influence de la concentration en tensioactifs	179
2.5	Conclusion	181

2.1 Choix du système biphasique

L'AzoTAB se positionnant aussi bien à une interface eau-air qu'à une interface eau-autre liquide non miscible, il est théoriquement possible de modifier localement une tension interfaciale dans plusieurs systèmes sous un éclairage UV partiel. Plusieurs expériences ont été tentées.

2.1.1 Goutte d'AzoTAB dans un bain d'huile

Tout d'abord avec une goutte millimétrique d'AzoTAB à 2 mmol.L^{-1} sur un substrat plan (verre puis verre recouvert d'une fine couche de PDMS réticulé). Elle a été illuminée avec un microscope muni d'un filtre UV (365 nm). Aucun mouvement n'a pu être observé, sans doute à cause du faible changement d'angle de contact de la goutte (pas plus de 2 ou 3 degrés) par rapport à l'hystérésis importantes de ces surfaces (au moins 10 degrés, malgré leur propreté).

Ensuite c'est une goutte millimétrique de $5 \mu\text{L}$ d'AzoTAB à 2 mmol.L^{-1} qui a été immergée dans un liquide de densité similaire. Ceci a été possible avec une huile silicone qui permet à la goutte d'être en suspension dans le volume du liquide (FIGURE 2.1 a). L'illumination partielle UV de cette goutte induit un déplacement instantané de la goutte qui s'arrête après avoir parcouru quelques micromètres (FIGURE 2.1 b). Aucun déplacement n'a lieu si la même expérience est réalisée sans AzoTAB. Ces observations montrent d'abord que la goutte bouge du fait du stimulus lumineux. Ensuite, la valeur de sa vitesse initiale ($\sim 40 \mu\text{m.s}^{-1}$) est supérieure aux vitesses atteintes lors de déplacements sur les surfaces photosensibles décrites dans le chapitre précédent (plutôt inférieures à $15 \mu\text{m.s}^{-1}$). Enfin, nous avons observé les mouvements de convection à l'intérieur de la goutte lors de son déplacement. Ils sont similaires à ceux schématisés (FIGURE 2.1 c. ii). Le fluide est entraîné au niveau de l'interface AzoTAB-huile (caractérisée par une tension interfaciale γ), de la zone sombre vers la zone illuminée. Une recirculation a lieu dans le volume de la goutte, dans une direction identique à celle de son mouvement global, de manière analogue à ce qui a lieu dans l'effet thermocapillaire. Cet entraînement visible à l'interface, indique qu'il s'agit d'un effet Marangoni, qui est dans notre cas photoinduit (aucun effet si l'AzoTAB est absent). Tous ces résultats montrent pour la première fois la possibilité de générer un effet Marangoni par la lumière (sans effet thermique) pour induire un mouvement.

Pour expliquer l'arrêt rapide de la goutte, nous avons associé à la disparition des mouvements de convection à l'intérieur de celle-ci, l'annulation du gradient initial de tension interfaciale (FIGURE 2.1 c). Les molécules *trans* sont converties en *cis* au niveau du faisceau lumineux, mais les molécules *cis* ne peuvent pas avec ce dispositif subir l'isomérisation inverse. La recirculation en boucle fermée qui a lieu dans la goutte fait migrer le *cis*-AzoTAB. Il s'accumule de part et d'autre de la goutte, tandis que le *trans*-AzoTAB est aussi dispersé dans toute la goutte et disparaît progressivement. Le gradient ne peut donc pas être maintenu de cette façon.

2.1.2 Goutte d'huile sur un bain d'AzoTAB

Pour éviter la recirculation rapide à l'intérieur de la goutte qui homogénéise les deux isomères de l'AzoTAB, nous avons choisi de faire flotter l'objet sur un bain d'AzoTAB. De cette façon, l'AzoTAB est présent en grande quantité à la manière d'un réservoir, et de l'AzoTAB en configuration *trans* est disponible en tous points de l'expérience. L'objet à déplacer consiste en une goutte d'acide oleïque, qui est à la fois une huile non miscible à la solution d'AzoTAB et qui, contrairement à d'autres hydrocarbures, ne s'étale pas en fine nappe à la surface de l'eau, pour garantir une forme sphérique à la goutte (qualifiable de lentille flottante). Au final, l'expérience

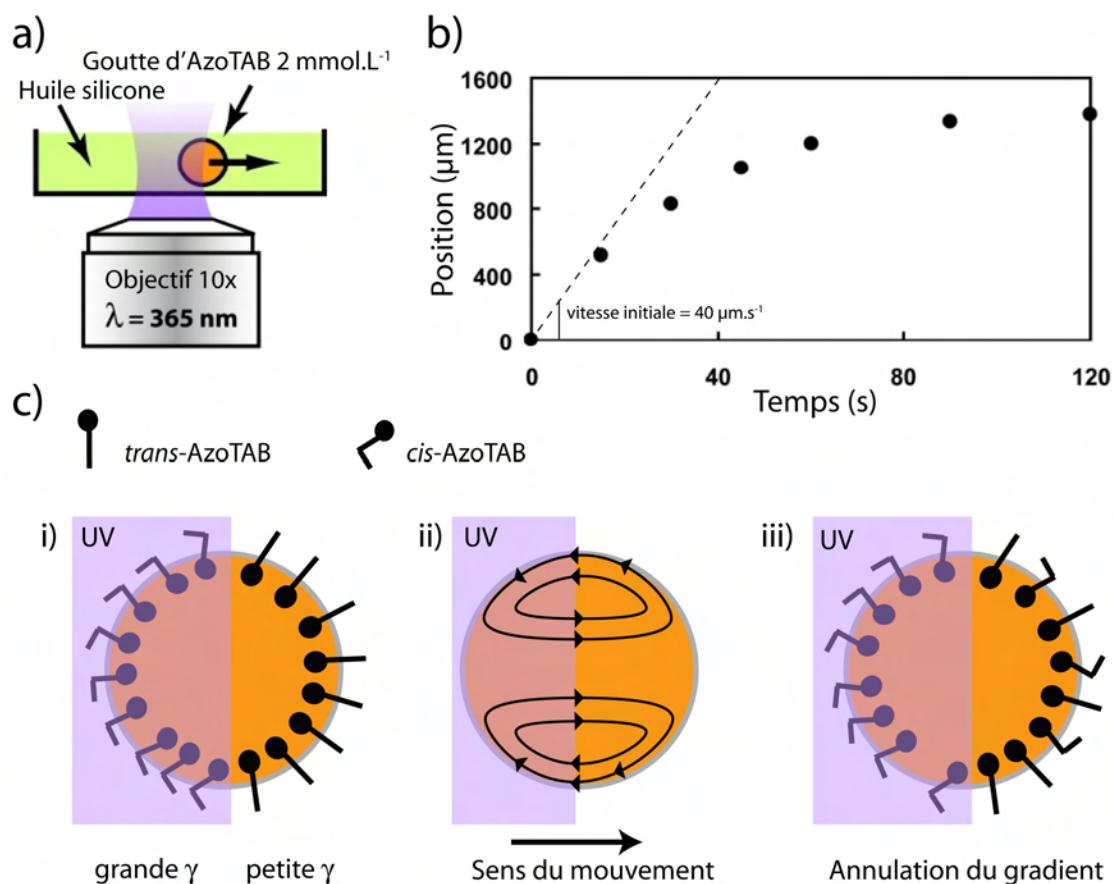


FIGURE 2.1 – Effet d'une illumination UV sur une goutte de $5 \mu\text{L}$ d'AzoTAB plongée dans un bain d'huile silicone. a) Schéma du système expérimental, vu de côté. b) Position du centre de la goutte en fonction du temps lorsque la lumière UV du microscope est focalisée en permanence sur une moitié de la goutte. c) Schéma de la photoisomérisation de l'AzoTAB à l'interface et de son mélange au cours du mouvement. La goutte est vue du bas. i) Création d'un gradient de tension interfaciale γ lors de la conversion de l'AzoTAB en configuration *cis* sous lumière UV. ii) Du fait de l'effet Marangoni, un déplacement de fluide a lieu à l'interface vers la lumière UV. La recirculation axiale du fluide dans le volume de la goutte induit son déplacement global hors de l'illumination UV. iii) Après un certain temps de convection, la plupart de l'AzoTAB a été converti en configuration *cis*. Le gradient de tension interfaciale est annulé, ce qui stoppe le mouvement.

est réalisée avec une goutte de $3 \mu\text{L}$ d'acide oléique (environ 2 mm de diamètre) déposée sur un bain d'AzoTAB à 2 mmol.L^{-1} dans une boîte de Petri de 5,1 cm de diamètre (5 mL dans la boîte, soit une hauteur de liquide de 6 mm). La transparence de la boîte de Petri permet de pouvoir irradier le système aussi bien par le haut que par le bas (FIGURE 2.2). La boîte est posée sur la platine d'un microscope (Axioobserver D1, Zeiss) pour pouvoir être déplacée de manière précise. L'objectif du microscope restant fixe dans le référentiel terrestre, le déplacement de la goutte par rapport à la boîte est observé dans le référentiel de la platine.

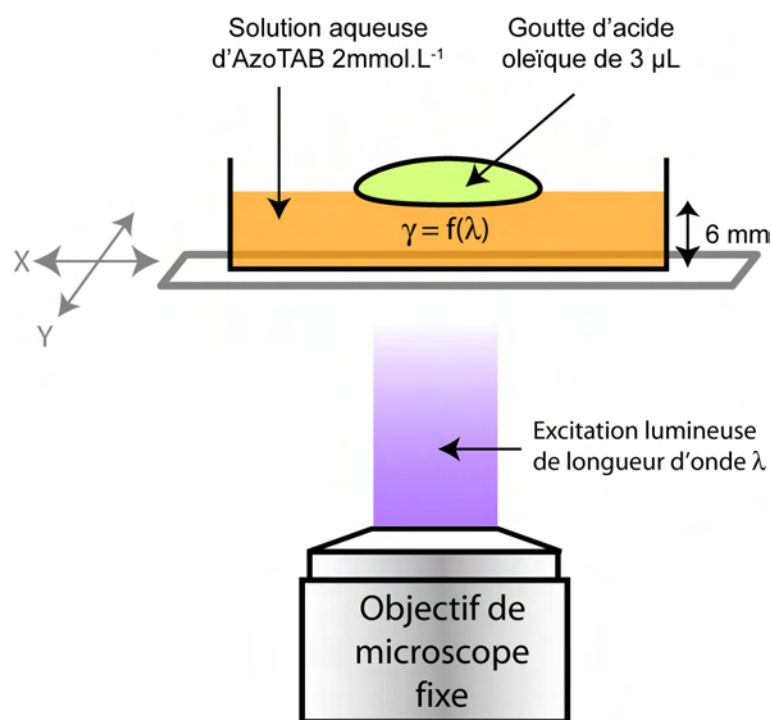


FIGURE 2.2 – Schéma du système expérimental, vu de côté. Une goutte de $3 \mu\text{L}$ d'acide oléique est déposée sur un bain d'AzoTAB à 2 mmol.L^{-1} dans une boîte de Petri de 5,1 cm de diamètre. Le fond de la boîte étant transparent, l'excitation lumineuse est faite à l'aide d'un objectif de microscope. La longueur d'onde est sélectionnée grâce à différents filtres. La boîte de Petri étant déposée sur la platine de translation du microscope, c'est elle qui sera mise en mouvement, l'objectif du microscope restant fixe. De ce fait, c'est en se plaçant dans le référentiel de la boîte de Petri que les observations auront lieu.

2.2 Variation de la tension interfaciale sous lumière UV

Il fut nécessaire de quantifier la variation de tension interfaciale entre l'acide oléique et la solution d'AzoTAB. Pour cela nous avons collaboré avec Dr. Reine-Marie Guillermic et Dr. Arnaud Saint-Jalmes de l'équipe de biophysique de l'Institut de Physique de Rennes. Leur laboratoire possède un tensiomètre à goutte pendante. Une goutte du liquide à étudier est pendue au bout d'un tube. La forme qu'elle adopte est un compromis entre la force de gravité qui l'étire et la tension de surface qui tend à minimiser son aire. L'analyse de sa forme renvoie à sa tension de surface, dont une description plus précise est reportée en Annexe D.1. Nous avons utilisé cette technique dans le cas d'une interface liquide-liquide en analysant la forme d'une goutte d'acide

oléïque immergée dans un bain d'AzoTAB à 2 mmol.L^{-1} . La configuration inverse était possible, c'est à dire d'observer une goutte d'AzoTAB pendante dans un bain d'huile. Mais les très faibles variations que nous avons vu sous UV nous ont poussé à utiliser cette autre possibilité pour disposer d'une plus grande quantité d'AzoTAB, à la manière d'un réservoir.

Une courbe typique obtenue est celle représentée FIGURE 2.3. La goutte met un certain temps à se stabiliser (autour de $7,5 \text{ mN.m}^{-1}$), du fait des vibrations, mais aussi et surtout du fait de la diffusion de l'AzoTAB vers l'interface qui se fait avec un temps caractéristique de plusieurs centaines de secondes. L'illumination UV est faite en approchant une lampe stylo tout près du système (11-SC-1 Pen-Ray, UVP). Une augmentation de la tension interfaciale est visible. En attendant suffisamment longtemps, sa valeur devient supérieure d'environ 1 mN.m^{-1} , ce qui représente approximativement 15% de plus. Mais son évolution est caractérisée par une cinétique très lente : cet écart n'est atteint qu'après 2000 s d'illumination. Ceci peut s'expliquer par deux facteurs. Le premier concerne la puissance de l'illumination UV, qui est sans doute trop faible pour pouvoir induire une photoisomérisation immédiate des molécules d'AzoTAB. Du fait de la place prise par le tensiomètre, l'expérience n'a pas pu être réalisée sous une lampe UV classique. La seconde raison provient du transport des molécules autour de l'interface. Dans ce système statique, la migration des différentes espèces a uniquement lieu par diffusion. Nous avons vu que l'accumulation de l'AzoTAB à l'interface n'est pas immédiate et que donc s'il y a remplacement d'un certain nombre de molécules *trans* par des *cis* à l'interface, ceci se produit lentement.

Malgré la faible précision de ces expériences, la différence approximative obtenue (1 mN.m^{-1}) semble suffisante pour donner lieu à un mouvement. Comme l'ont montré Yoshikawa *et al.* avec un gradient chimique [290], une différence de tension de l'ordre de $0,01 \text{ mN.m}^{-1}$ entre les deux extrémités d'une goutte flottante millimétrique permet son déplacement. Même si nous ne comptons pas avoir un gradient de 1 mN.m^{-1} sur le diamètre d'une goutte, une fraction de cette différence doit théoriquement suffire.

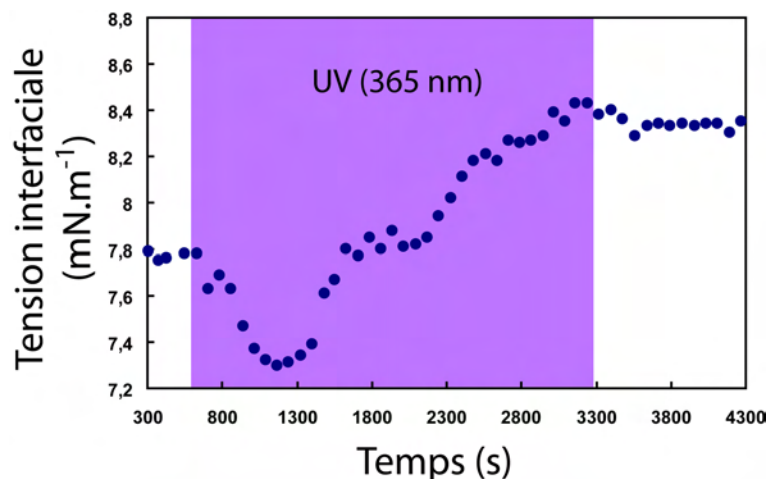


FIGURE 2.3 – Evolution de la tension interfaciale (mesurée avec un tensiomètre à goutte pendante) d'une goutte d'acide oléïque dans une solution d'AzoTAB 2 mmol.L^{-1} sous illumination UV.

2.3 Illumination partielle de la goutte

2.3.1 Mouvement linéaire

Nous avons tout d'abord illuminé la goutte avec de la lumière UV (365 nm, filtre "DAPI") provenant du microscope inversé utilisé, équipé d'une lampe à mercure. Cette excitation est focalisée sur la goutte à l'aide d'un objectif 10x et fournit ainsi une aire d'illumination de taille similaire à celle de la goutte ($\sim 5 \text{ mm}^2$).

L'excitation sous lumière UV d'une moitié de la goutte induit un déplacement immédiat de la goutte en dehors de la zone de lumière UV. En la suivant de façon à maintenir une illumination partielle, la mouvement de la goutte peut être maintenu sur une distance de quelques centimètres à une vitesse d'environ $300 \mu\text{m.s}^{-1}$ (FIGURE 2.4 a).

À la suite d'une traversée de boîte de Petri, il se trouve que l'éclairement en lumière bleue (475 nm, filtre "FITC") de la même moitié de la goutte provoque un mouvement dans le sens inverse. Le mouvement de la goutte peut être maintenu de la même façon sur une distance de quelques centimètres, à une vitesse similaire (FIGURE 2.4 b). Si cette illumination visible est réalisée en tout début d'expérience, sans qu'un éclairement UV ait eu lieu, aucun mouvement n'est visible. Ceci est signe que la solution doit être préalablement enrichie en *cis*-AzoTAB pour qu'un gradient puisse ensuite apparaître. Ce mouvement d'aller ($\lambda = 365 \text{ nm}$) et retour ($\lambda = 475 \text{ nm}$) en irradiant la même partie de la goutte peut ainsi être répété plusieurs fois (FIGURE 2.4 c).

Ce type de déplacement réversible, dont le sens dépend de la longueur d'onde d'une excitation lumineuse, est à notre connaissance le premier observé pour le déplacement d'une goutte millimétrique, quelque soit son support. La vitesse de la goutte ($300 \mu\text{m.s}^{-1}$) est certes inférieure à celle d'une goutte flottante soumise à l'effet thermocapillaire sous un laser [263] (environ $1,5 \text{ cm.s}^{-1}$), elle reste néanmoins très supérieure à celle d'une goutte en mouvement sur un substrat photosensible ou soumis à un gradient thermique (environ mm.min^{-1}).

2.3.2 Mécanisme

La description de ces mouvements est analogue à l'effet thermocapillaire décrit dans l'expérience pionnière de Young *et al.* [255]. Son origine est par contre différente car il ne s'agit pas ici d'un effet thermique. Nous pouvons l'affirmer du fait de la direction opposée du mouvement sous les deux longueurs d'onde différentes. La lumière est focalisée dans les deux cas sur la même partie de la goutte. La température augmente à ces endroits, mais la goutte se meut dans des sens différents. L'échauffement qui a lieu n'est pas suffisant pour être la force motrice. C'est bien l'isomérisation de l'AzoTAB qui est à l'origine du gradient de tension interfaciale.

Dans notre cas, l'illumination UV partielle de la goutte provoque la génération de *cis*-AzoTAB sur une partie seulement de l'interface eau-acide oléique (caractérisée par une tension interfaciale γ). C'est cette inhomogénéité qui génère un gradient de tension interfaciale et qui est à l'origine de flux Marangoni, décrit qualitativement sur la FIGURE 2.5 a.

À l'extérieur de la goutte et le long de l'interface, le flux est unidirectionnel des basses γ vers les hautes γ . La goutte étant un système fermé, ce flux induit une recirculation de l'huile en son intérieur qui l'entraîne finalement vers les γ les plus basses. Ceci est conforme à l'analyse énergétique du problème, qui prévoit que la goutte se déplacera là où son énergie d'interaction avec le bain sera globalement la plus faible, c'est à dire vers les γ les plus basses. L'existence de ce flux de recirculation a pu être facilement observée en introduisant des particules micrométriques

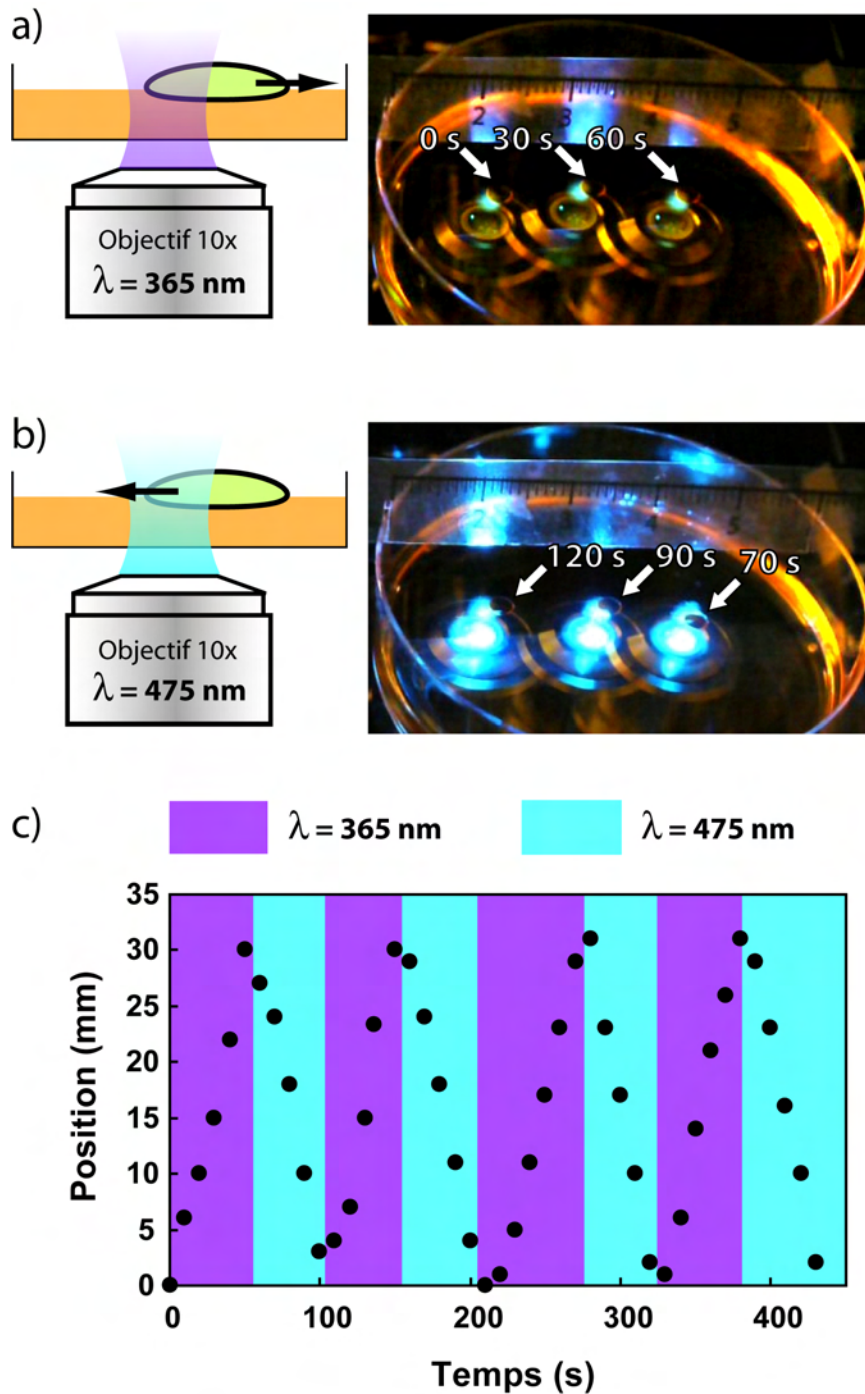


FIGURE 2.4 – Mouvement de la goutte d'acide oleïque sous une illumination partielle. a) Sous une lumière à $\lambda = 365 \text{ nm}$, la goutte fuit l'excitation lumineuse (gauche). Il est ainsi possible de la poursuivre pour la déplacer en ligne droite à travers la boîte de Petri (droite). b) A la suite d'un trajet sous lumière UV, une illumination à $\lambda = 475 \text{ nm}$ est réalisée du même côté de la goutte (gauche). Elle est alors attirée vers la lumière, ce qui permet de lui faire parcourir le chemin inverse (droite). c) La goutte peut ainsi être déplacée selon plusieurs cycles d'illumination $365 \text{ nm}/475 \text{ nm}$. Sur le graphe sont représentées ses positions selon le diamètre de la boîte de Petri en fonction du temps, pour quatre cycles d'illuminations UV et bleue successives.

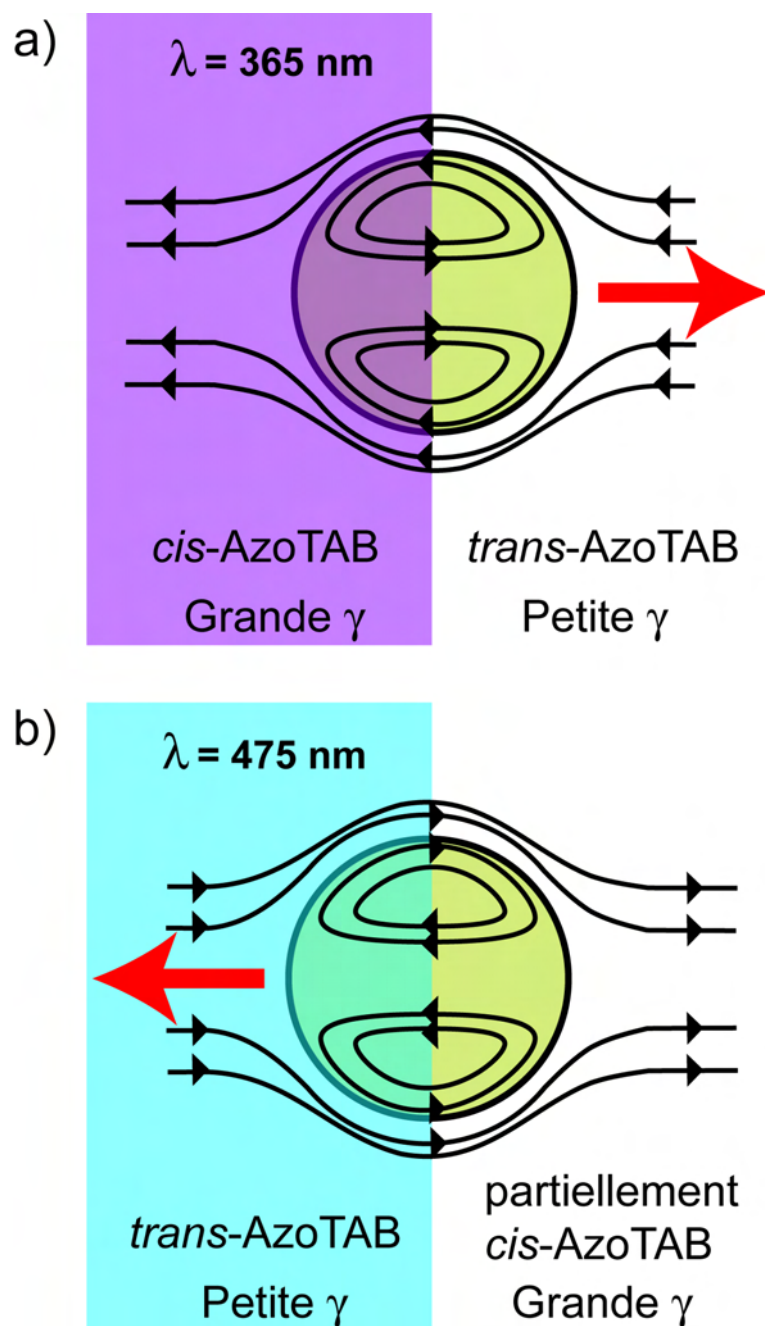


FIGURE 2.5 – Schémas de principe de l'effet chromocapillaire. La goutte d'acide oléique flottant sur le bain d'AzoTAB est vue de haut. γ est la tension interfaciale entre l'huile et la solution d'AzoTAB. a) Déplacement sous illumination UV partielle ($\lambda = 365 \text{ nm}$). L'autre moitié de la goutte n'est pas éclairée. Les flèches noires représentent qualitativement les lignes de courant des fluides à l'extérieur, à l'interface (effet Marangoni) et à l'intérieur (recirculation interne) de la goutte. La flèche rouge indique le mouvement global de la goutte. b) Déplacement sous illumination bleue ($\lambda = 475 \text{ nm}$) partielle. L'autre moitié de la goutte n'est pas éclairée. Ce type de mouvement a lieu après une traversée de boîte de Petri sous illumination UV. Une fraction de l'AzoTAB du bain a été convertie en configuration *cis* ce qui augmente γ . La lumière bleue provoque l'isomérisation en *trans*, ce qui génère une zone où γ est plus faible et où la goutte est attirée par un mécanisme analogue au trajet sous UV.

de polystyrène à l'acide oléique.

Après une traversée de boîte de Petri, une certaine fraction de l'AzoTAB *trans* a été convertie en *cis* le long du trajet. Du fait du mouvement visible sous lumière bleue, il semble que γ ait suffisamment augmenté dans le bain pour qu'une photoisomérisation *cis-trans* permette d'inverser la direction des flux de convection décrits sous lumière UV (FIGURE 2.5 b). La goutte est alors attirée par l'illumination, car c'est la zone où l'énergie globale d'interaction avec son environnement est la plus faible.

C'est pour insister sur cette nouvelle possibilité de mouvement dont le sens dépend de la longueur d'onde du stimulus, que nous avons choisi l'adjectif "chromocapillaire" pour baptiser ce phénomène. Les flux engendrés sont analogues à ceux qui apparaissent lors de l'effet thermocapillaire. Mais ici l'origine du gradient est directement liée à la couleur de l'illumination.

2.4 Photomanipulation à façon

2.4.1 Utilisation simultanée de deux longueurs d'onde

L'utilisation d'un faisceau lumineux permet donc de déplacer la goutte sur des trajectoires linéaires, mais n'offre que peu de contrôle pour la déplacer sur des chemins plus évolués. Nous avons donc utilisé une seconde source lumineuse pour créer un motif lumineux plus complexes.

Nous avons placé un filtre de lumière centré autour de 475 nm (filtre "FITC") devant la lampe à halogène du microscope servant habituellement à l'observation "par le haut" en champ clair ou contraste de phase. L'aire de cette lumière a été réduite grâce à l'iris. L'objectif de la lumière à 365 nm provenant du bas de la boîte de Petri a été réduit à 2,5x pour avoir une aire plus importante d'excitation (FIGURE 2.6 a). De cette manière, c'est un disque de lumière à 475 nm entouré d'un halo de lumière à 365 nm qui a été créé. Placée au centre de ce motif, la goutte est piégée : elle est à la fois attirée par la lumière visible et repoussée par la lumière UV. L'anneau de lumière UV agit comme une barrière énergétique qui force la goutte à rester au centre, ceci dans n'importe quelle direction. Nous avons baptisé ce système "piège chromocapillaire". De façon analogue à ce qui est réalisé avec la lumière sur des objets micrométriques, nous pouvons aussi qualifier notre dispositif de pince optique macroscopique.

De façon analogue au déplacement linéaire, la goutte est déplacée par la translation du motif lumineux. Le contrôle de sa position est bien plus aisé qu'avec une seule source lumineuse. Nous avons ainsi pu évaluer de façon plus précise sa vitesse limite de déplacement. Nous avons reporté la position de la goutte le long d'une règle graduée ainsi que celle du piège en fonction du temps (FIGURE 2.6 b). Pour des vitesses de 100 et 200 $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$, la goutte est bien centrée dans le piège et suit précisément le mouvement imposé. Pour des vitesses comprises entre 200 et 400 $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$, la goutte sort progressivement du piège, mais suit toujours son déplacement. Pour une vitesse de 420 $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$, la goutte est clairement en retard par rapport au piège et le quitte après un trajet d'environ 2 cm. Au-delà de cette vitesse, la goutte ne peut plus suivre le piège.

Enfin, pour démontrer la facilité de manipulation offerte par le piège chromocapillaire, nous avons réalisé des chemins variés de plusieurs centimètres de long. La position de la goutte a été suivie en fonction du temps et filmée avec un appareil photo. Nous avons ainsi pu reconstituer les trajectoires en fonction du temps, à la manière des expériences de chronophotographie de Muybridge et Marey au XIXème siècle (FIGURE 2.7). Des trajets de formes variées peuvent être effectués, y compris des virages importants, des aller-retours (lettre E), des angles aigus (lettre Y) et des courbes (coeur). A notre connaissance, aucune autre méthode n'a permis de déplacer

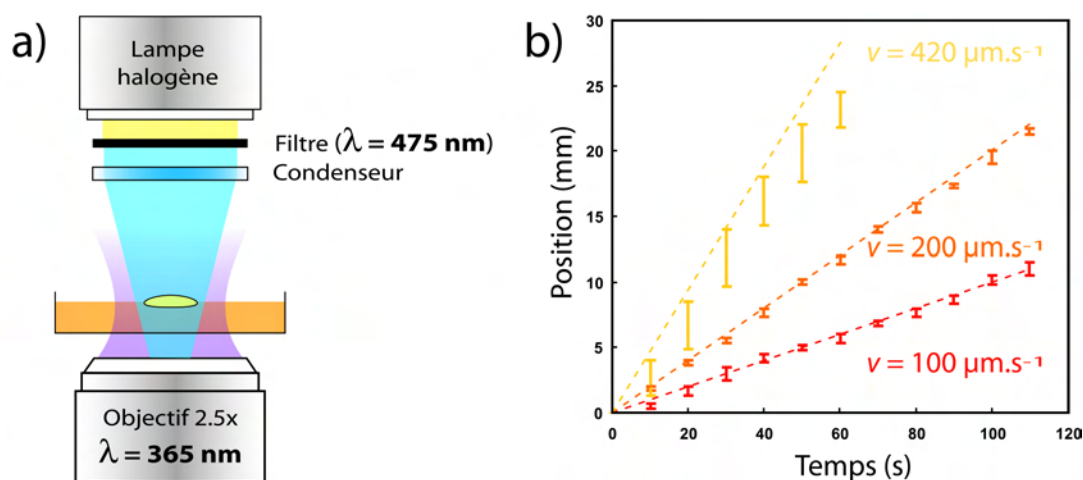


FIGURE 2.6 – Contrôle de la position d'une goutte flottante par création d'un "piège chromocapillaire" par combinaison de deux illuminations différentes. a) Schéma du piègeage de la goutte. Une excitation à $\lambda = 365 \text{ nm}$ est effectuée par le bas par l'objectif du microscope. Il est possible de placer un filtre devant la lampe à halogène de l'appareil pour obtenir une illumination à $\lambda = 475 \text{ nm}$ par le haut. b) Position de la goutte le long du diamètre de la boîte de Petri en fonction du temps, suivant une vitesse v imposée. Les barres représentent la position moyenne du centre de la goutte suivant trois expériences. La ligne hachurée représente le mouvement linéaire de la platine de translation.

une goutte de manière aussi précise avec la lumière, à ce niveau de vitesse.

2.4.2 Influence de la concentration en tensioactifs

Nous avons voulu enfin évaluer l'influence de la concentration en AzoTAB et examiner les possibilités de mouvement en utilisant les dérivés AzoCx qui avaient été initialement synthétisés pour optimiser le photocontrôle de la compaction de l'ADN (Partie II, Chapitre 2) (FIGURE 2.8 a). En plus des AzoC5 et AzoC8, une autre molécule, l'AzoC3, a été utilisée ici. La synthèse de cette dernière molécule est décrite en Annexe A. Pour chaque tensioactif, nous essayons que la goutte soit d'abord piégée par le système à deux couleurs précédent. Si elle peut effectivement être déplacée, sa vitesse maximale est ensuite mesurée en effectuant une moyenne sur trois trajets de trois centimètres de long.

La variation de la concentration en AzoTAB montre deux choses (FIGURE 2.8 b). D'une part, le mouvement n'est observé que sur une faible gamme de concentration, entre $1,5 \text{ mmol.L}^{-1}$ et 4 mmol.L^{-1} . En dessous de $1,5 \text{ mmol.L}^{-1}$, la goutte reste immobile. Pour 5 mmol.L^{-1} , la goutte est immobile, mais contrairement à la concentration précédente, elle change nettement d'aspect, même sans UV : elle est très orangée et n'est plus sphérique. D'autre part, entre ces bornes, la vitesse maximale de la goutte est d'autant plus grande que la concentration en AzoTAB est grande, atteignant presque $500 \mu\text{m.s}^{-1}$ pour $[\text{AzoTAB}] = 4 \text{ mmol.L}^{-1}$. Ceci est cohérent avec le fait que pour pouvoir induire un gradient suffisant, il est nécessaire d'avoir assez de molécules à convertir au niveau de l'interface. En dessous de $1,5 \text{ mmol.L}^{-1}$, il ne semble pas y en avoir assez pour qu'un effet Marangoni puisse vraiment entraîner un mouvement. Entre $1,5 \text{ mmol.L}^{-1}$ et 4 mmol.L^{-1} , le gradient est d'autant plus grand que la densité de molécules à l'interface est grande. Pour une concentration supérieure à 5 mmol.L^{-1} , la déformation de la goutte indique que la tension interfaciale est trop basse pour qu'elle reste suffisamment sphérique. La couleur

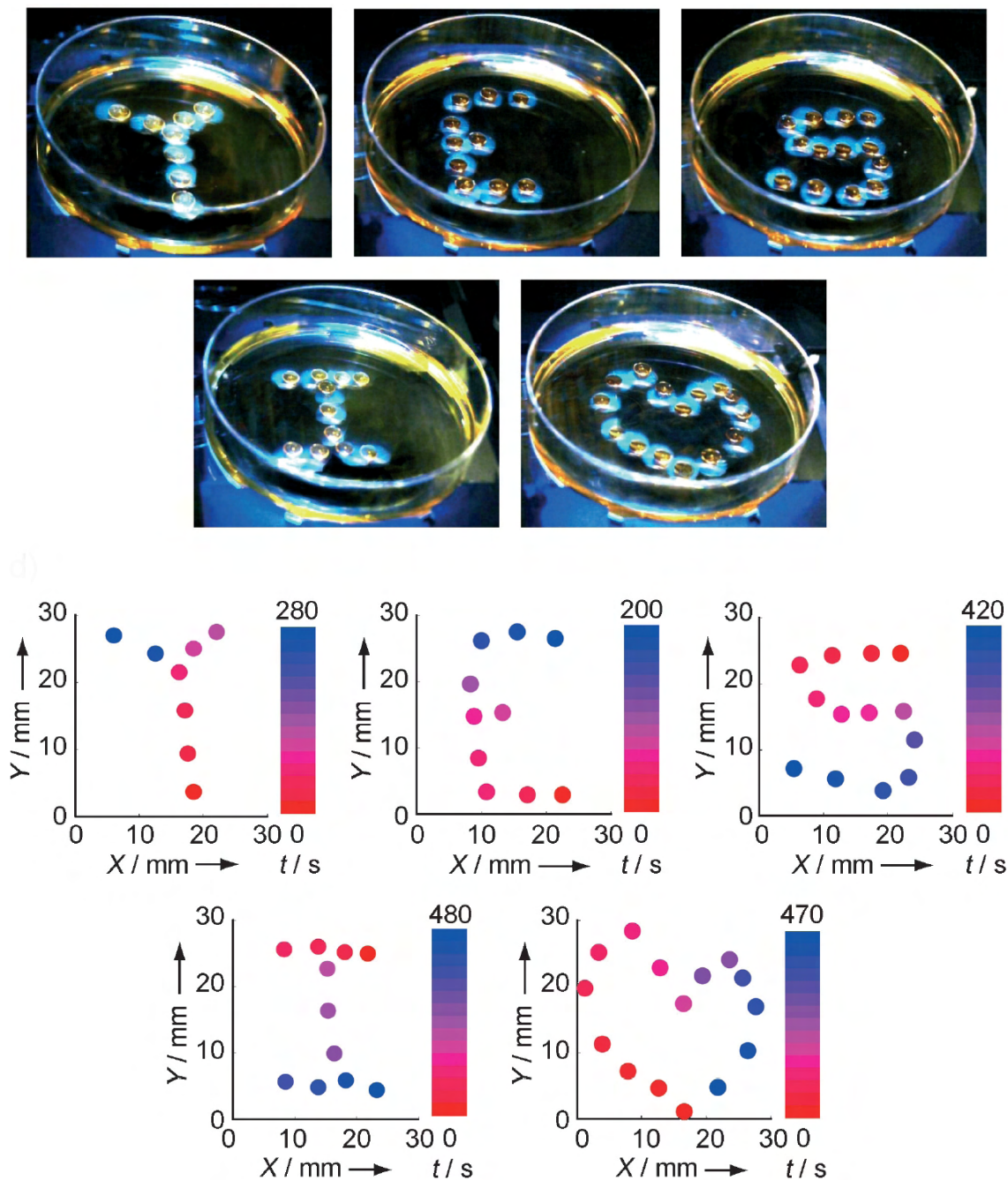


FIGURE 2.7 – Trajectoires variées offertes par l'utilisation du piège chromocapillaire. En haut, photomontages des différentes positions de la goutte selon différents chemins. En bas, positions spatiotemporelles du centre de la goutte suivant les trajectoires correspondantes aux photos.

intense orange de la goutte d'huile montre que l'AzoTAB s'y est dissous de façon importante et rapide à cette concentration.

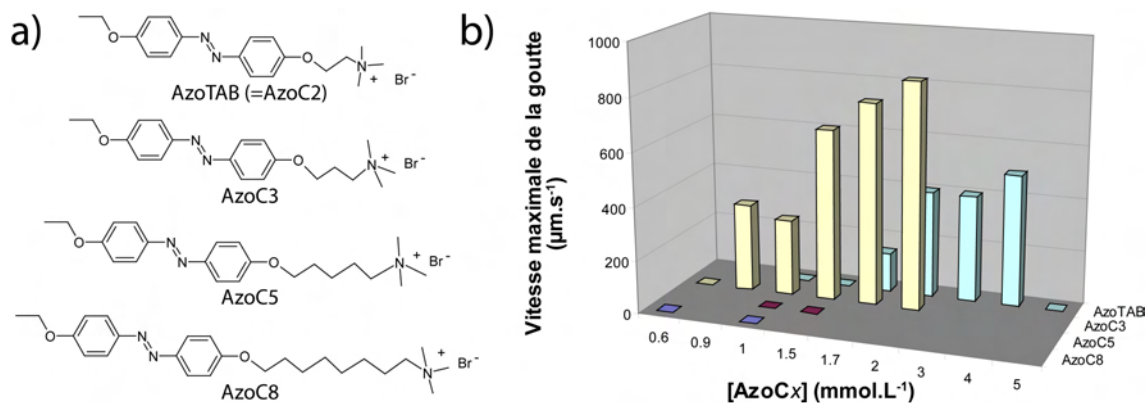


FIGURE 2.8 – a) Structure des différents dérivés AzoCx. b) Vitesse maximale de la goutte manipulée linéairement avec le piège chromocapillaire, en fonction de l'AzoCx introduit dans le bain et de sa concentration.

Les essais de mouvement avec les AzoCx montrent des comportements très différents (FIGURE 2.8 b). Même pour des concentrations proches de leur solubilité ($< 2 \text{ mmol.L}^{-1}$), aucun déplacement n'est observé avec les AzoC5 et AzoC8. La goutte a tendance à plus s'étaler que d'habitude sur l'AzoC8. Avec l'AzoC3, les vitesses obtenues sont nettement supérieures que celles de l'AzoTAB : la goutte atteint plus de $300 \mu\text{m.s}^{-1}$ pour $[\text{AzoC3}] = 0,9 \text{ mmol.L}^{-1}$ et $850 \mu\text{m.s}^{-1}$ pour $[\text{AzoC3}] = 2 \text{ mmol.L}^{-1}$. Des concentrations supérieures n'ont pas pu être testées car les quantités dont nous disposions n'étaient pas suffisantes pour constituer un bain entier.

Ces résultats sont plus difficilement interprétables. Ces trois molécules sont de meilleurs tensioactifs que l'AzoTAB (le fait que la goutte s'étale de façon plus manifeste sur le bain d'AzoC8 est une manifestation macroscopique d'une stabilisation plus forte de l'interface). Malgré tout, c'est la différence photoinduite de tension interfaciale qui permet le mouvement. De ce qui a été conclu lors de leur étude sur la compaction de l'ADN, nous savons que la différence de polarité entre les configurations *trans* et *cis* s'estompe lorsque la queue est allongée. Il semble que cette différence ne permette pas d'induire un gradient suffisant aussi bien pour l'AzoC5 que l'AzoC8. Par contre l'AzoC3 permet un déplacement plus rapide que l'AzoTAB et le rend possible à plus faible concentration. Ceci indique qu'à concentration égale, l'AzoC3 donne une différence de tension interfaciale plus importante que l'AzoTAB. Il n'est pas évident de prévoir ce résultat simplement à partir des formules des tensioactifs. Des mesures comparatives des tensions de surface entre l'acide oléique et les différentes solutions d'AzoCx sont nécessaires pour mieux expliquer ces tendances.

2.5 Conclusion

Les possibilités de déplacement induites par les flux Marangoni d'une part, les modifications photoinduites de tension de surface offertes par l'AzoTAB d'autre part, nous ont logiquement conduit à imaginer un système où la lumière engendrerait un mouvement à travers une isomérisation *cis-trans*. L'effet chromocapillaire que nous avons mis en évidence est un nouvel exemple

d'application des tensioactifs photosensibles, qui n'avaient jusqu'alors été exploités que pour des modifications globales et statiques de tension interfaciale.

Nous avons montré dans ce chapitre, qu'une goutte millimétrique d'huile flottant sur un bain d'AzoTAB, peut être mise en mouvement en l'illuminant partiellement avec de la lumière UV (365 nm). La tension interfaciale augmente dans la zone d'éclairement, ce qui génère un gradient de tension le long de l'interface huile-AzoTAB et induit son déplacement en dehors des UV. En la poursuivant de manière progressive, il est possible de la déplacer à une vitesse d'environ $300 \mu\text{m.s}^{-1}$. Après un trajet de plusieurs centimètres sous lumière UV, l'illuminer sur la même moitié avec de la lumière bleue (475 nm) provoque son mouvement vers la zone d'illumination. La déplacer dans cette autre direction sur plusieurs centimètres est possible à une vitesse similaire. Enfin pour contrôler de manière plus précise sa trajectoire, un système d'éclairement à deux longueurs d'onde a été mis en place (un disque de lumière bleue encerclé d'un halo de lumière UV). Ce dispositif permet de piéger la goutte au centre du motif lumineux et de la mouvoir à façon sur des chemins variés, à une vitesse d'environ $300 \mu\text{m.s}^{-1}$.

La suite logique de ce travail serait de faire correspondre un modèle aux observations. Cette modélisation permettrait de dégager les paramètres importants (taille de la goutte, concentration en tensioactif, viscosité des liquides...) de façon à optimiser la vitesse de déplacement de la goutte.

A plus long terme, cette nouvelle stratégie de conversion de l'énergie lumineuse en énergie mécanique peut trouver des applications certaines [389]. Par exemple, comme l'imaginent Lalloix et Jonas dans un article d'opinion paru à la suite de notre travail [390], un système multifaisceaux où chaque rayon contrôlerait indépendamment une goutte pourrait être mis en place. Il serait alors possible de manipuler un grand nombre d'objets à la surface d'un liquide pour les combiner à volonté. Cette possibilité de déplacement de faibles portions de liquide sans contact mécanique permettrait contrôler précisément leur interaction, pour créer des microréacteurs utiles à la chimie analytique et à la biochimie. Par ailleurs, il est imaginable de pouvoir déplacer des liquides toxiques non miscibles à l'eau, sans risquer de souiller des surfaces ou des instruments sensibles. A condition que les gradients de tension interfaciales restent suffisants, la taille du système peut être clairement augmentée pour par exemple déplacer des solvants industriels dangereux sur un bain aqueux plutôt que dans des conduits sensibles. D'autre part, ceci pourrait aussi être appliqué lorsque l'échantillon est sensible à son environnement, par exemple quand une contamination est à craindre par un matériel souillé.

Malgré tout, les limites actuelles à de telles applications sont aussi nombreuses. Nous ne pouvons pour l'instant déplacer qu'une goutte de liquide non miscible sur de l'eau. L'inverse serait d'autant plus valorisable, en particulier pour la manipulation d'échantillons biologiques. Ensuite la vitesse maximale d'environ $300 \mu\text{m.s}^{-1}$ reste encore trop faible. Puisque cette vitesse dépend directement du gradient de tension de surface, elle est liée à la différence de polarité des deux configurations du tensioactif. Un travail de synthèse et d'ingénierie moléculaire permettrait sans doute d'optimiser leurs performances. Enfin, l'AzoTAB n'est sans doute pas une molécule anodine pour la santé. Les groupements diazobenzène ont une certaine toxicité et fonctionnent moins bien dans les conditions du vivant. Par contre les travaux récents de Wooley *et al.* montrent qu'avec des fonctionnalisations appropriées, ces groupements peuvent être utilisés *in vivo* [391].

Chapitre 3

Photogénération réversible de gouttes en microfluidique

L'importance des tensions de surface dans la production de gouttes microfluidiques a été décrite dans le premier chapitre de cette partie. Elle concerne aussi bien la tension interfaciale entre les deux phases liquides que la tension interfaciale entre les liquides et le substrat solide. Ces paramètres déterminent l'existence des gouttes ainsi que leur taille. Les méthodes de contrôle dynamique des différentes tensions sont rares. Celles faisant intervenir un stimulus lumineux reposent uniquement sur un effet thermique et n'offrent que de faibles modifications de taille.

Nous allons décrire dans ce chapitre ce qui est à notre connaissance la première introduction d'un tensioactif photosensible dans un dispositif microfluidique, d'autant plus lorsque le dispositif a pour fonction de générer des microgouttes. Dans notre système, une solution d'AzoTAB constituera la phase dispersée. La morphologie de l'écoulement biphasique sera d'abord observée en fonction de l'illumination. Le mécanisme supposé correspondant au changement de régime sera ensuite expliqué. Enfin seront détaillées les possibilités de contrôle temporel et spatial de la transition observée.

3. Photogénération réversible de gouttes en microfluidique

3.1	Introduction d'un tensioactif photosensible dans un dispositif microfluidique	185
3.1.1	Le système de "flow-focusing"	185
3.1.2	Effet des débits et de l'illumination	185
3.1.3	Avec une concentration inférieure en AzoTAB	187
3.2	Description du mécanisme	187
3.2.1	Observations	187
	Angle de contact photodépendant	187
	Déplacement de la ligne de contact	189
3.2.2	L'insuffisance du nombre capillaire Ca	189
	Valeurs	189
	Prise en compte nécessaire du substrat	190
3.3	Contrôle temporel et réversibilité	191
3.4	Contrôle spatial	192
3.5	Conclusion	198

3.1 Introduction d'un tensioactif photosensible dans un dispositif microfluidique

3.1.1 Le système de "flow-focusing"

Nous avons d'abord travaillé avec le dispositif microfluidique 1 (FIGURE 3.1), comportant un "cou", qui a une géométrie classique de dispositif de flow-focusing [344]. Sa fabrication est décrite en Annexe C.2. La hauteur finale des canaux est de $50\ \mu\text{m}$.

La solution d'AzoTAB a été introduite dans le canal central pour deux raisons. D'une part parce qu'à la suite du protocole de microfabrication, les parois du PDMS sont relativement hydrophobes. Pour obtenir des gouttes régulières, il est préférable que ce soit la phase dispersée qui ait une moins bonne affinité pour le canal, sinon celle-ci se collera sur lui au lieu d'être cisailée pour former l'émulsion. L'huile a donc été introduite dans les deux canaux latéraux servant à "pincer" la phase dispersée. D'autre part, c'est aussi au niveau des éventuelles applications futures qu'il est préférable d'introduire la phase aqueuse dans le canal central pour la disperser. Les molécules d'intérêt que l'on souhaite encapsuler sont la plupart du temps hydrosolubles. Une concentration d'AzoTAB de $10\ \text{mmol.L}^{-1}$ permet d'obtenir des régimes stables et reste inférieure à sa limite de solubilité ($\sim 20\ \text{mmol.L}^{-1}$). Une concentration de $2\ \text{mmol.L}^{-1}$ sera aussi utilisée pour réaliser une comparaison qualitative.

Pour le choix de l'huile, c'est l'acide oléique qui a été choisi car c'est une huile relativement utilisée en microfluidique et parce que nous connaissions déjà les systèmes biphasiques AzoTAB-acide oléique à travers le travail précédent de photomanipulation.

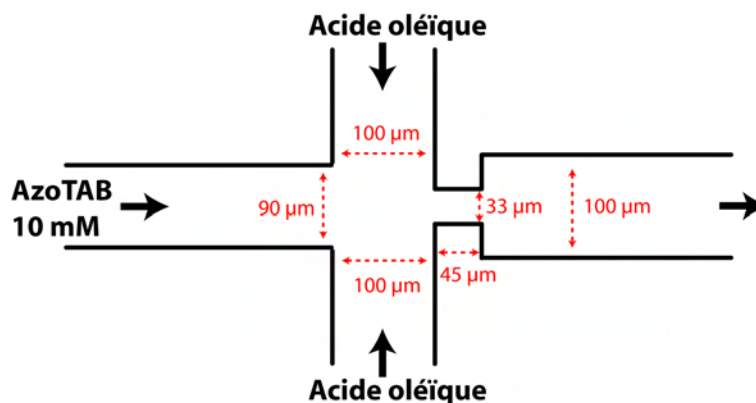


FIGURE 3.1 – Schéma du dispositif microfluidique 1.

3.1.2 Effet des débits et de l'illumination

En l'absence de lumière UV, la modification des débits de l'AzoTAB Q_{aq} et de l'acide oléique Q_{oil} font apparaître deux régimes principaux (FIGURE 3.2). A faibles Q_{aq} et Q_{oil} (chacun inférieurs ou égaux à $1\ \mu\text{L.min}^{-1}$), les forces interfaciales sont dominantes et la phase aqueuse est continuellement fragmentée en gouttelettes régulières ("régime goutte"). A Q_{oil} fixe, l'augmentation de Q_{aq} provoque au-delà d'un certain débit (environ $1,5\ \mu\text{L.min}^{-1}$) la prédominance des forces visqueuses. La phase aqueuse s'écoule de façon parallèle à l'huile, un tube continu stable est visible ("régime tube"). La frontière entre ces deux régimes est relativement nette, même

si un régime d'alternance goutte/tube peut être observé pour $1 \leq Q_{aq} \leq 1,5 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$. A Q_{aq} fixé, l'augmentation de Q_{oil} n'a pas d'influence sensible sur la nature du régime, mais induit une diminution de la taille caractéristique des gouttes ou du tube. Si Q_{oil} dépasse une certaine valeur (environ 80% de Q_{aq}), la pression de l'arrivée d'AzoTAB n'est plus suffisante pour le faire arriver à la jonction, il n'y a que l'huile qui s'écoule. Toutes ces observations sont analogues à celles réalisées sur des dispositifs de flow-focusing de géométrie similaire.

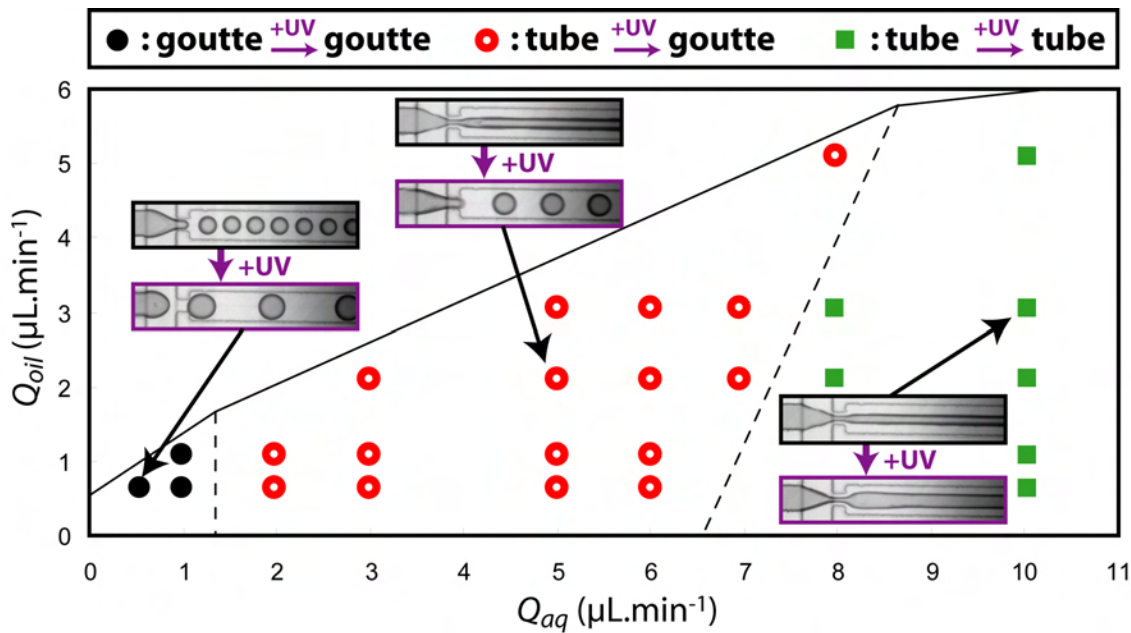


FIGURE 3.2 – Effet de l'illumination UV sur les régimes d'écoulement. En fonction des débits de l'AzoTAB (Q_{aq}) et de l'acide oléique (Q_{oil}), deux régimes (goutte et tube) sont visibles et trois types de transition sont observées sous lumière UV. Les lignes en pointillés indiquent qualitativement la séparation entre les différentes transitions induites sous UV. Au-delà de la ligne continue, l'écoulement devient monophasique (huile uniquement). Les images correspondent aux conditions des points marqués par des flèches. Celles faites sous illumination UV ont été prises trois secondes après le début de l'illumination.

Quand le dispositif est illuminé avec de la lumière UV (provenant de la lampe à mercure du microscope Axioobserver D1 utilisé, filtrée à 365 nm), 3 types de comportements sont possibles (FIGURE 3.2). Lorsque le système est en régime goutte, ($Q_{aq} < 1,5 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$), les UV ne modifient pas la nature du régime, mais induisent une augmentation du diamètre des gouttes, d'environ 5 à 30%. Quand le système est initialement en régime tube (Q_{aq} intermédiaire et grand), deux effets sont distinguables. Pour $2 \leq Q_{aq} \leq 7 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$, le régime tube est converti en régime goutte stable, pratiquement indépendamment de Q_{oil} . Lorsque $Q_{aq} \geq 8 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$, le système reste en régime tube, mais une augmentation d'environ 30 % du diamètre apparent du tube est visible.

Ces observations montrent que l'illumination UV modifie clairement l'écoulement microfluidique biphasique et que ces changements sont particulièrement radicaux pour des Q_{aq} intermédiaires où la nature même du régime est changée.

3.1.3 Avec une concentration inférieure en AzoTAB

Pour mieux comprendre l'influence de la quantité d'AzoTAB, une expérience similaire à la précédente est réalisée avec $[AzoTAB] = 2 \text{ mmol.L}^{-1}$.

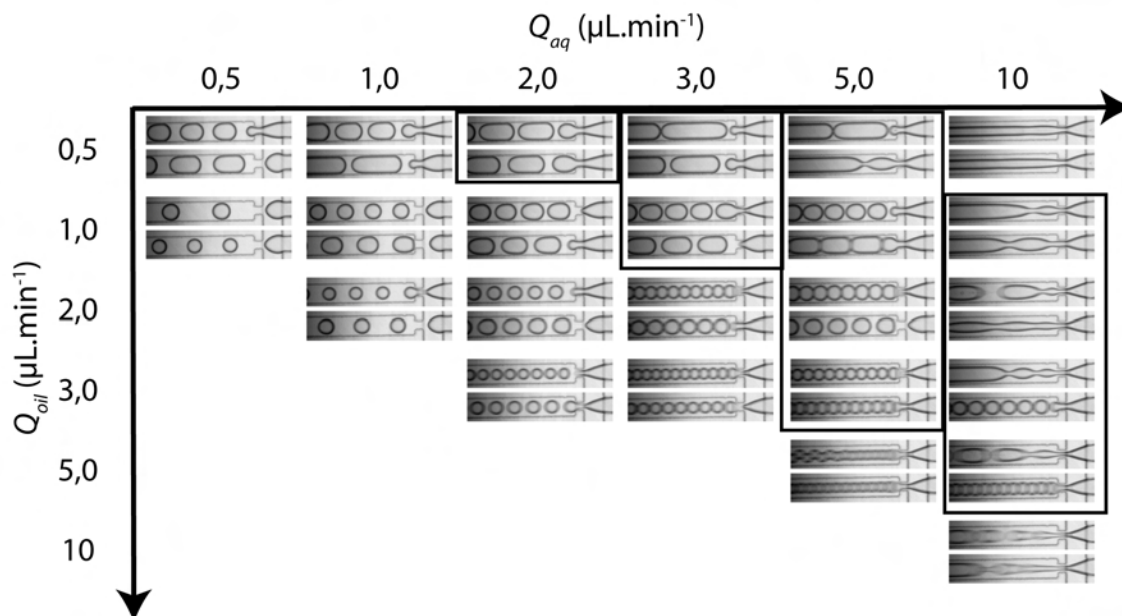


FIGURE 3.3 – Effet de l'illumination UV sur les régimes d'écoulement avec une concentration en AzoTAB de 2 mmol.L^{-1} . Pour chaque débit d'AzoTAB et d'acide oléique, chaque image est représentative de l'écoulement, en l'absence (en haut) et en présence d'UV (en bas). Les images faites sous illumination UV ont été prises trois secondes après le début de l'illumination. Les cadres indiquent un régime non stable qui montre parfois un tube.

De manière générale avec cette concentration, pour la même gamme de Q_{aq} et Q_{oil} , les régimes de gouttes sont bien plus présents. Il faut $Q_{aq} \geq 5 \mu\text{L.min}^{-1}$ pour pouvoir obtenir un tube. Mais en plus, plusieurs conditions de débit montrent un caractère instable où gouttes et tubes se succèdent périodiquement. Sur les régimes stables de gouttes, l'effet des UV est similaire à ce qui est visible pour $[AzoTAB] = 10 \text{ mmol.L}^{-1}$: la taille des gouttes augmente.

3.2 Description du mécanisme

3.2.1 Observations

Nous nous sommes focalisés sur la transition tube-goutte, qui représente celle où le changement photoinduit de régime est le plus spectaculaire et le plus intéressant du point de vue des applications liées à l'encapsulation. La compréhension du mécanisme de ce phénomène s'est faite à travers deux examens.

Angle de contact photodépendant

Le premier élément de compréhension a été étudié en dehors du dispositif microfluidique, en s'intéressant à l'effet de la lumière sur le mouillage d'une goutte d'AzoTAB 10 mmol.L^{-1}

immergée dans de l'acide oléique, déposée sur une surface de verre. Les angles de contact correspondants ont été mesurés selon le mode opératoire décrit en Annexe D.2. Pour que ce substrat soit identique à celui du dispositif microfluidique, l'expérience a eu lieu sur une lamelle de verre traitée 3 min sous plasma et cuite pendant 1 h à 150°C. L'analyse du profil de la goutte a permis d'en déduire les angles de contact d'avancée et de reculée avec une précision de $\pm 2^\circ$ (FIGURE 3.4 a). Ces deux angles augmentent quand la solution d'AzoTAB est préalablement illuminée sous lumière UV avant son dépôt (respectivement 153° et 148° sans UV, 163° et 153° après illumination) (FIGURE 3.4 b). L'illumination est réalisée en plaçant la solution dans un tube plastique de 1,5 mL environ 1 h sous une lampe UV de 12 W (VL-6.L, Vilbert Lourmat). Dans l'huile, l'affinité de la phase aqueuse pour le substrat diminue donc sensiblement sous UV.

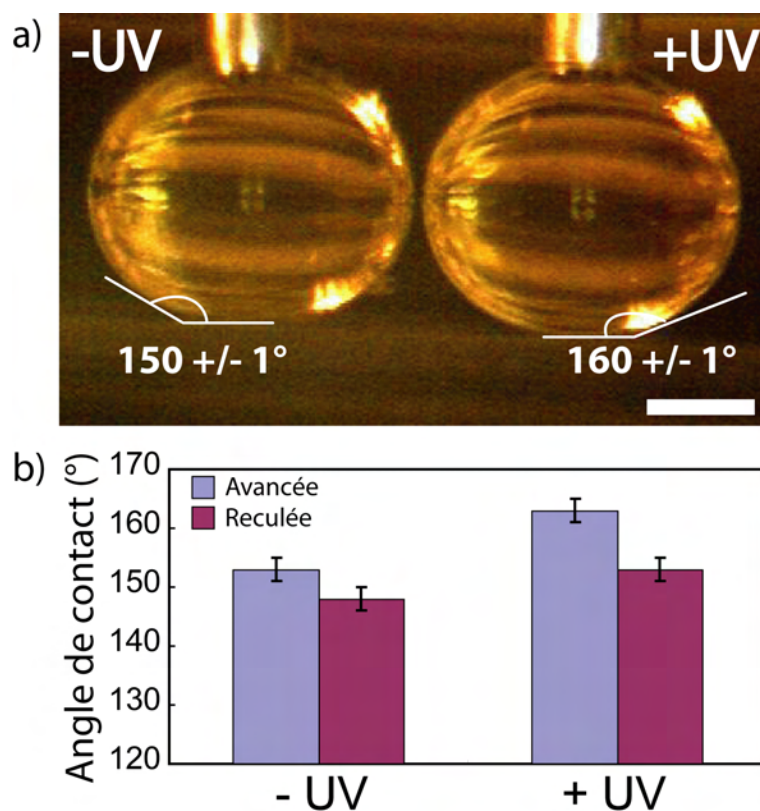


FIGURE 3.4 – Effet de l'illumination UV sur le mouillage du dispositif microfluidique par l'AzoTAB, en présence d'acide oléique. a) Mesure de l'angle de contact d'une goutte d'AzoTAB 10 mmol.L⁻¹ immergée dans un bain d'acide oléique sur le substrat utilisé dans le dispositif microfluidique (lame de verre traitée au plasma et cuite à 150°C pendant 1 h). A gauche, l'AzoTAB non modifié est principalement présent sous configuration *trans*. A droite, la solution a subi une illumination UV qui a converti la majorité des molécules en configuration *cis*. La barre d'échelle représente 1 mm. b) Valeurs des angles de contact d'avancée et de reculée avant et après illumination UV. Chaque valeur correspond à une moyenne sur 10 mesures.

La vérification expérimentale de cette tendance fut nécessaire, car à partir de la loi d'Young, la prévision de l'évolution de l'angle n'est pas si évidente. Appliquée à notre système, l'équation

2.2 du Chapitre 2 de la Partie I s'écrit ici :

$$\cos \theta = \frac{\gamma_{\text{verre-huile}} - \gamma_{\text{verre-AzoTAB}}}{\gamma_{\text{AzoTAB-huile}}} \quad (3.1)$$

Nous considérons que $\gamma_{\text{verre-huile}}$ reste constante quelque soit l'éclairement. Pour $\gamma_{\text{AzoTAB-huile}}$, les mesures de tension de surface effectuées par goutte pendante pour mieux comprendre l'effet chromocapillaire nous ont montré que les UV induisent son augmentation d'environ 7 à 8 mN.m⁻¹ pour une solution d'AzoTAB 2 mmol.L⁻¹ (Section 2.2 de cette partie), ce qui donne une idée approchée de cette variation pour une solution à 10 mmol.L⁻¹. Pour des θ compris entre 90° et 180°, ceci a tendance à faire augmenter le $\cos \theta$, donc à diminuer θ . Enfin le sens d'évolution de $\gamma_{\text{verre-azoTAB}}$ est difficile à connaître *a priori*. Sur une surface hydrophile, les tensioactifs s'orientent de façon à ce que leur tête soit au contact de la surface et leur queue du côté du liquide. Le liquide peut alors être vu comme reposant sur une monocouche de queues hydrophobes. Appliqué ici, ce modèle prévoit que la goutte est en contact avec une monocouche qui devient moins hydrophobe après illumination UV (queue en configuration *cis* moins apolaires) et que son affinité pour la surface est meilleure ($\gamma_{\text{verre-AzoTAB}}$ plus petite). Ceci va aussi dans le sens d'une augmentation du $\cos \theta$. Mais l'expérience démontre le contraire : les UV favorisent le démouillage. Ceci peut s'expliquer par le fait que le verre est bien hydrophile après le traitement plasma, mais qu'il perd une partie importante de ce caractère après chauffage. De plus, la queue de l'AzoTAB n'étant pas aussi apolaire que celle des tensioactifs classiques à queue purement aliphatique, le contact unique de la tête de la molécule sur le verre est trop simpliste.

Déplacement de la ligne de contact

La seconde observation a consisté à suivre plus précisément le régime transitoire à la jonction lors de la transition tube-goutte (FIGURE 3.5). Avant l'application des UV, dans le régime tube, le ménisque a une forme anguleuse et étirée, caractéristique d'un bon mouillage du substrat. Une fois le stimulus lumineux activé et juste avant l'apparition unique de gouttes, le déplacement d'une ligne de contact est visible sous l'arrivée de la solution d'AzoTAB. Cette ligne n'est pas visible avant illumination, car la solution aqueuse mouille continuellement le verre le long de son trajet. Sous UV, elle apparaît au niveau du cou du dispositif et se déplace en remontant la jonction. En aval de cette ligne, l'AzoTAB n'est plus en contact continu avec le substrat ; dès lors qu'il ne mouille plus assez la jonction, le système adopte ensuite le régime goutte. Dans ce cas, le ménisque adopte une forme sphérique qui confirme le démouillage. Ces observations confirment la diminution de l'affinité de la phase aqueuse pour la surface.

3.2.2 L'insuffisance du nombre capillaire Ca

Valeurs

Il est aussi possible de raisonner d'un point de vue plus théorique pour montrer que le passage du tube aux gouttes est d'abord lié au mouillage par la phase aqueuse, plutôt qu'à la tension interfaciale ou aux vitesses d'écoulement. Pour cela nous avons calculé le nombre capillaire dans les différentes situations. Nous avons vu en Section 1.2.1 que ce nombre adimensionnel correspond au rapport des forces visqueuses sur les forces capillaires. Dans le cas d'une jonction de flow-focusing, il est possible de calculer plus précisément ce nombre, en prenant en compte la géométrie

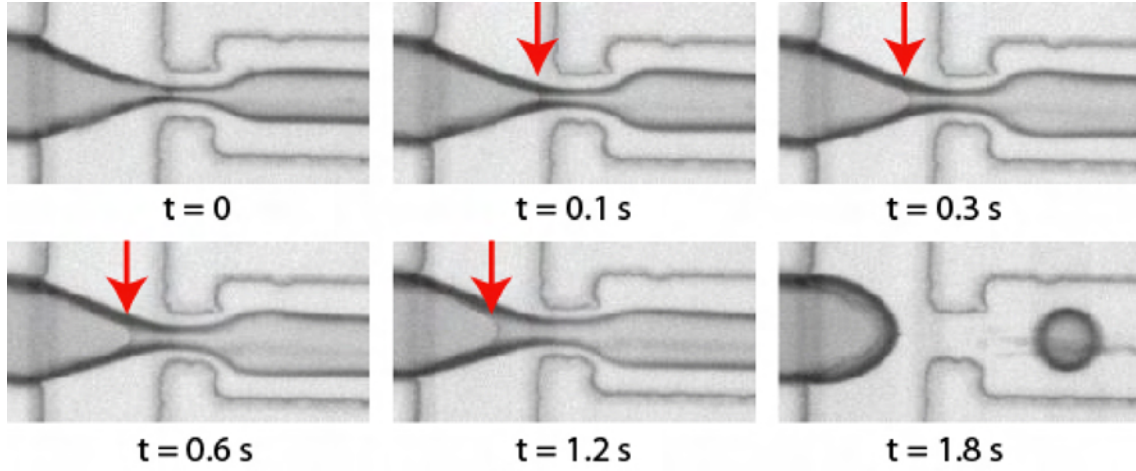


FIGURE 3.5 – Observation de la transition de démouillage entre un régime goutte et un régime tube, sous illumination UV de la jonction du dispositif 1. $t = 0$ correspond au début de l’illumination UV. La flèche rouge indique la position de la ligne de contact entre la phase aqueuse et le substrat microfluidique. Dans cette expérience, $Q_{aq} = 3 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ et $Q_{oil} = 2 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$.

de l’intersection [360] :

$$Ca = \frac{\eta_{oil}U_{interf}}{\gamma} = \frac{\eta_{oil}Ga}{\gamma} = \frac{\eta_{oil}a\Delta V}{\gamma\Delta Z} = \frac{\eta_{oil}aQ_{oil}}{\gamma h\Delta Z} \left[\frac{1}{W_{or}} - \frac{1}{2W_{up}} \right] \quad (3.2)$$

avec η_{oil} la viscosité de la phase huile, U_{interf} la vitesse de la phase huile, γ la tension interfaciale, a la moitié de la largeur du canal où arrive la phase aqueuse, G le rapport d’élongation, ΔV la différence de vitesse entre l’amont et l’orifice de la jonction, ΔZ la distance séparant le bout de l’arrivée de phase aqueuse de l’entrée de l’orifice, Q_{oil} le débit de la phase huile, h la hauteur du canal, W_{or} la largeur de l’orifice et W_{up} la largeur du canal de la phase huile. En prenant $\eta_{oil} = 27,6 \cdot 10^{-3} \text{ kg}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-1}$ pour l’acide oléique à 25°C , $h = 50 \mu\text{m}$, $a = 45 \mu\text{m}$, $W_{or} = 33 \mu\text{m}$, $W_{up} = 100 \mu\text{m}$, on obtient, avec et sans UV, des valeurs de Ca comprises entre les valeurs extrémales figurant dans le TABLEAU 3.1.

Illumination	Ca_{min}	Ca_{max}
- UV	$0,75 \cdot 10^{-2}$	$7,5 \cdot 10^{-2}$
+ UV	$0,65 \cdot 10^{-2}$	$6,5 \cdot 10^{-2}$

TABLE 3.1 – Valeurs extrémales du nombre capillaire suivant le débit de la phase huile ($Q_{oil} = 0,5 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ pour Ca_{min} , $Q_{oil} = 5 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ pour Ca_{max}) et la présence ou non d’illumination UV ($\gamma = 7 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ pour - UV, $\gamma = 8 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ pour + UV).

Prise en compte nécessaire du substrat

Les valeurs précédentes montrent d’une part que Ca est toujours inférieure à 0,1, ce qui indique, en ne considérant que l’interface liquide-liquide, une nette tendance à former des gouttes, quelles que soient les conditions. D’autre part, à débit d’huile fixé, la diminution de Ca après

illumination est de l'ordre de 15%. Cette variation est trop faible pour expliquer la présence de la transition tube/goutte sur une si grande partie du diagramme de la FIGURE 3.2. Sans illumination, que Q_{oil} soit petit ou grand, il n'y a pas de zone où une telle réduction de Q_{oil} peut provoquer la transition entre les deux régimes. Il faudrait pour cela qu'une frontière non verticale existe dans le diagramme et partage un régime de goutte et un régime tube. Cette petite variation impose donc un changement de régime, alors que le Ca indique ne pas pouvoir le réaliser. La prise en compte de la seule interface liquide-liquide n'est donc pas suffisante, c'est d'abord l'interaction des liquides avec le substrat qui est le principal paramètre.

Cette insuffisance du nombre capillaire pour décrire précisément la nature d'un écoulement biphasique en contact avec un substrat apparaît de toutes façons dans la seule prise en compte de la phase continue. La FIGURE 3.2 montre qu'à débit d'huile fixé, l'augmentation du débit de phase aqueuse permet le passage d'un régime goutte à un régime tube. Or cette tendance n'est pas descriptible avec le seul nombre capillaire.

Pour avoir émulsification, la nécessité d'avoir une affinité suffisamment faible de la phase dispersée pour la surface du microcanal est un paramètre qui a été étudié à plusieurs reprises de manière phénoménologique. Dès les débuts de la microfluidique, Kawakatsu *et al.* ont démontré que si l'angle de contact de la phase aqueuse dans une phase huile sur le microcanal est inférieur à une certaine valeur, la fragmentation du liquide ne peut avoir lieu et la production de gouttes n'est pas possible [392]. Plus récemment, une étude similaire menée sur plusieurs jonctions en parallèle ayant des substrats de différentes mouillabilités, a abouti à une même conclusion [393]. En intégrant une zone hydrophile dans un canal hydrophobe, Fidalgo *et al.* ont de plus montré que les gouttes initialement formées s'épandaient et fusionnaient au niveau de la zone hydrophile avant de se reformer dès le passage de la zone hydrophobe [394]. Le passage du régime tube au régime goutte est donc dans notre cas la conséquence du démoillage photoinduit de la phase aqueuse. Avant illumination, le *trans*-AzoTAB mouille le substrat. Après illumination et photoisomérisation en *cis*-AzoTAB, le mouillage du verre diminue, comme l'ont montré les mesures statiques d'angle de contact (FIGURE 3.4 b). Ce démoillage est tel qu'il est énergétiquement favorable pour l'écoulement biphasique de se fragmenter.

Cette modification de la forme du menisque explique l'augmentation de la taille des gouttes dans la transition goutte-goutte. La ligne de contact qui reste en retrait sous UV est moins étirée au milieu de la jonction et subit donc moins le cisaillement de l'huile.

Enfin pour expliquer les résultats obtenus avec $[AzoTAB] = 2 \text{ mmol.L}^{-1}$, aussi bien le Ca que la mouillabilité permettent de décrire cette tendance plus forte à former des gouttes. Avec cette concentration inférieure en tensioactifs, la tension interfaciale γ est plus grande, ce qui fait diminuer Ca et donc annonce un plus fort caractère à l'émulsification. La stabilisation de l'interface eau-verre est aussi réduite par rapport à une situation où il y a plus de tensioactifs. De façon analogue à ce que provoque un moins bon tensioactif comme le *cis*-AzoTAB, la mouillabilité de la phase aqueuse sur le substrat diminue, ce qui favorise la formation de gouttes. Le caractère instable (oscillations entre gouttes et tube) d'un nombre important de régimes avec cette concentration n'est en revanche pas expliqué.

3.3 Contrôle temporel et réversibilité

Pour toutes les transitions montrées dans la FIGURE 3.2, l'arrêt de l'UV provoque systématiquement un retour au régime initial. Il y a donc réversibilité totale. Ceci s'explique du

fait du remplacement continu de l'AzoTAB au niveau de la jonction, l'arrêt des UV permet la régénération rapide d'une majorité de molécules d'AzoTAB en configuration *trans*.

De façon plus précise, pour la transition du régime tube au régime goutte, nous avons étudié l'effet d'illuminations alternatives +/- UV (FIGURE 3.6). L'expérience montre tout d'abord la réversibilité et la robustesse du système. Plusieurs cycles tube-goutte peuvent être réalisés successivement dans le même dispositif. Du point de vue de la réponse temporelle, la transition de tube à goutte a lieu en moyenne en un peu moins de 2 s après allumage des UV. Le passage de goutte à tube sous arrêt des UV est plus rapide, inférieur à la seconde. Ceci est cohérent avec le temps de résidence de la phase aqueuse sous l'aire illuminée que nous avons estimé à 0,1 s. Le temps de passage de tube à goutte est un peu plus long car il s'agit d'une destabilisation du système à un état énergétiquement plus élevé ; ceci induit une cinétique plus lente avant que le démouillage ait complètement lieu.

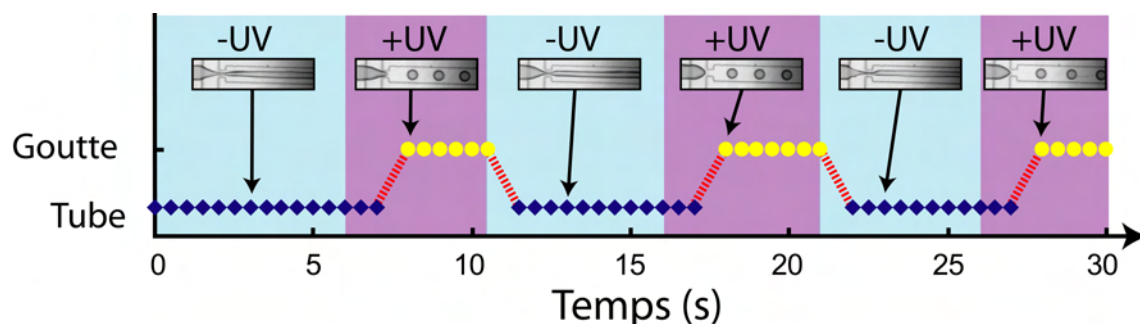


FIGURE 3.6 – Evaluation de la réversibilité et du temps de réponse des transitions tube à goutte et inversement. Alternance continue d'absence d'UV (fond bleu) et de présence d'UV (fond violet) sur la jonction du dispositif 1 à débits fixes de solution d'AzoTAB 10 mmol.L^{-1} ($Q_{aq} = 3 \mu\text{L.min}^{-1}$) et d'acide oléique ($Q_{oil} = 3 \mu\text{L.min}^{-1}$). Les carrés bleus et les disques jaunes indiquent respectivement les régimes tube et goutte. Les lignes en pointillés rouges indiquent les régimes transitoires.

Une expérience supplémentaire a été réalisée pour démontrer la réversibilité et l'effet de la lumière visible sur le système (FIGURE 3.7). La solution d'AzoTAB 10 mmol.L^{-1} a été illuminée sous lumière UV pendant 1 h pour être obtenir majoritairement l'isomère *cis*. Cette solution a été introduite dans le dispositif de flow-focusing et observée avec un minimum de lumière. Sous certaines conditions de débit, l'illumination sous lumière bleue (475 nm) a montré l'effet inverse : d'un régime montrant des gouttes, la lumière bleue induit leur fusion sous la forme d'un tube continu. L'arrêt de l'éclairement provoque le retour à un régime tube.

Toutes ces observations montrent en quoi cette stratégie de fragmentation d'un liquide par la lumière et à la fois réversible et peut être réalisée de façon dynamique avec un temps raisonnable de réponse.

3.4 Contrôle spatial

Du fait de sa jonction contenant un "cou", le dispositif 1 impose aux gouttes de se former à l'intersection des deux phases. Pour évaluer la possibilité d'une sélection spatiale sur le lieu d'apparition des gouttes, nous avons utilisé le dispositif microfluidique 2 (FIGURE 3.8). Dans ce dispositif, il n'y a pas de resserrement et l'angle d'arrivée des deux fluides est réduit (45° contre 90° pour le dispositif 1) pour qu'un écoulement parallèle suffisamment stable puisse avoir lieu.

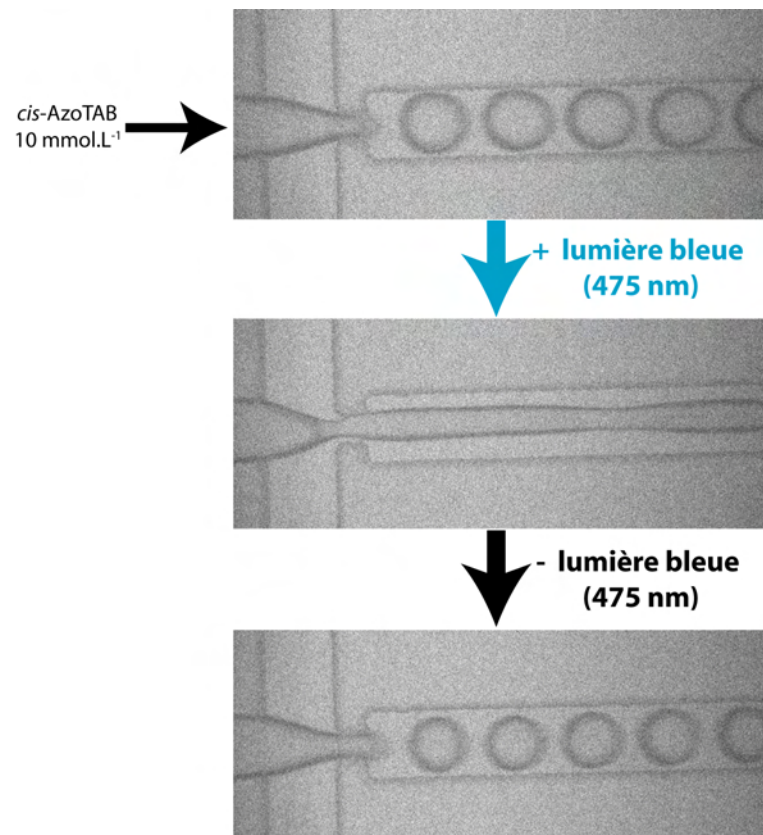


FIGURE 3.7 – Effet de la lumière bleue (475 nm) sur le régime d'écoulement lorsque la solution d'AzoTAB 10 mmol.L^{-1} est préalablement isomérisé en *cis* avant son introduction dans le microdispositif 1. Le contraste est faible pour éviter de reconvertir l'AzoTAB en *trans*. Les débits sont fixés : $Q_{aq} = 3 \mu\text{L.min}^{-1}$ et $Q_{oil} = 3 \mu\text{L.min}^{-1}$.

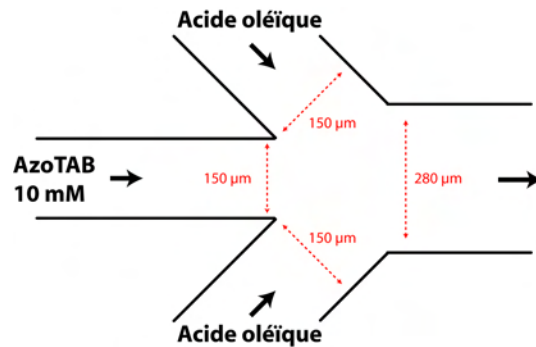


FIGURE 3.8 – Schéma du dispositif microfluidique 2.

En sortie de l'objectif, la zone d'excitation lumineuse du microscope est environ 4 fois plus grande que la zone qui est effectivement observable. Pour pouvoir découpler la position de l'aire d'excitation UV de celle de l'observation, nous avons superposé un masque opaque aux UV sous le dispositif et l'avons découpé pour y créer une fenêtre d'environ 2 mm de large. Cette fenêtre a été placée de façon arbitraire en aval de l'intersection des deux phases (FIGURE 3.9). En absence d'UV, le système montre un régime tube stable tout le long du canal pour des valeurs très différentes de débits ($1 \leq Q_{aq} \leq 15 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ et $2 \leq Q_{oil} \leq 13 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$). Quand les UV sont appliqués, seule la partie du canal située sous la fenêtre est illuminée. Après environ une seconde d'illumination sont visibles : un tube stable en amont de la fenêtre, la formation de gouttes au milieu de la zone d'illumination et un régime stable de gouttes juste en aval de la fenêtre. Cette transition a été observée de façon reproductible pour des positions très différentes du masque et pour une plage relativement large de débits ($1,5 \leq Q_{aq} \leq 5 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ et $2,4 \leq Q_{oil} \leq 13 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$). De façon analogue à ce qui est observé dans le dispositif 1, l'extinction des UV conduit à un retour rapide ($< 1 \text{ s}$) au régime tube, tout le long du canal.

L'utilisation du masque UV découpé a l'avantage de définir précisément la frontière de transparence. Mais elle ne permet pas d'être modifiée en temps réel. Pour observer l'effet d'une modification dynamique de l'aire d'illumination, nous avons ajouté au microscope un iris en sortie de la lampe d'excitation UV. Cet iris se ferme de façon concentrique pour réduire la quantité de lumière le traversant. À flux lumineux constant, l'aire d'excitation en sortie de l'objectif du microscope peut donc être diminuée. Toujours dans le dispositif 2, nous sommes partis d'un régime goutte sous UV avec l'iris complètement ouvert (FIGURE 3.10). À ce stade les gouttes sont visibles, mais aucune frontière ne peut être vue, car la transition a lieu en amont de ce qui est observé. En diminuant progressivement la zone d'éclairement, la zone d'apparition des gouttes se décale petit à petit en aval jusqu'à ce que la transition tube-goutte soit entièrement visible dans la zone d'observation.

En plus de voir plus précisément le lieu de la fragmentation (et donc les objets arrivant pouvant être encapsulés), ce système permet aussi de déplacer la zone d'illumination, par simple translation de la platine du microscope. En changeant lentement le point de focalisation de l'excitation UV le long du canal (à environ $100 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$) nous avons observé que la frontière tube-goutte se déplace à une vitesse similaire au même niveau (FIGURE 3.11). Ceci permet de pouvoir contrôler de façon encore plus fine la position du lieu de la fragmentation, en temps réel.

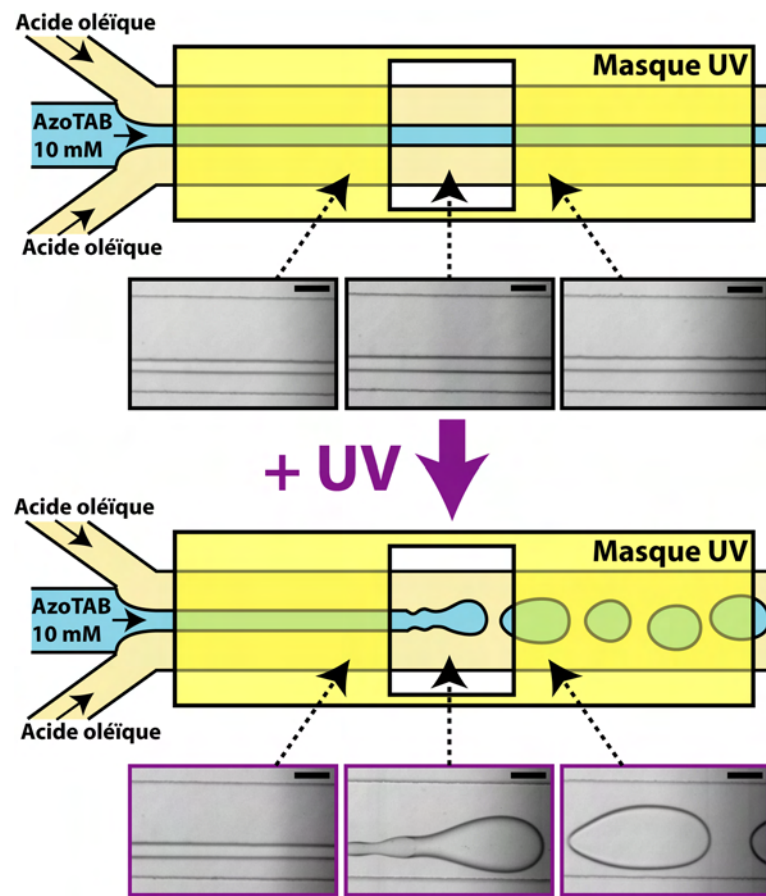


FIGURE 3.9 – Fragmentation spatio-sélective d'un écoulement biphasique par la lumière, dans le dispositif 2. Le canal du dispositif 2 est recouvert d'un masque opaque aux UV, percé d'une zone transparente aux UV. Les images montrent la nature du régime, juste avant, au milieu et juste après la fenêtre, en l'absence et en présence de lumière. Les débits sont fixés, $Q_{aq} = 1,5 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ et $Q_{oil} = 2,4 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$. Toutes les barres représentent $100 \mu\text{m}$.

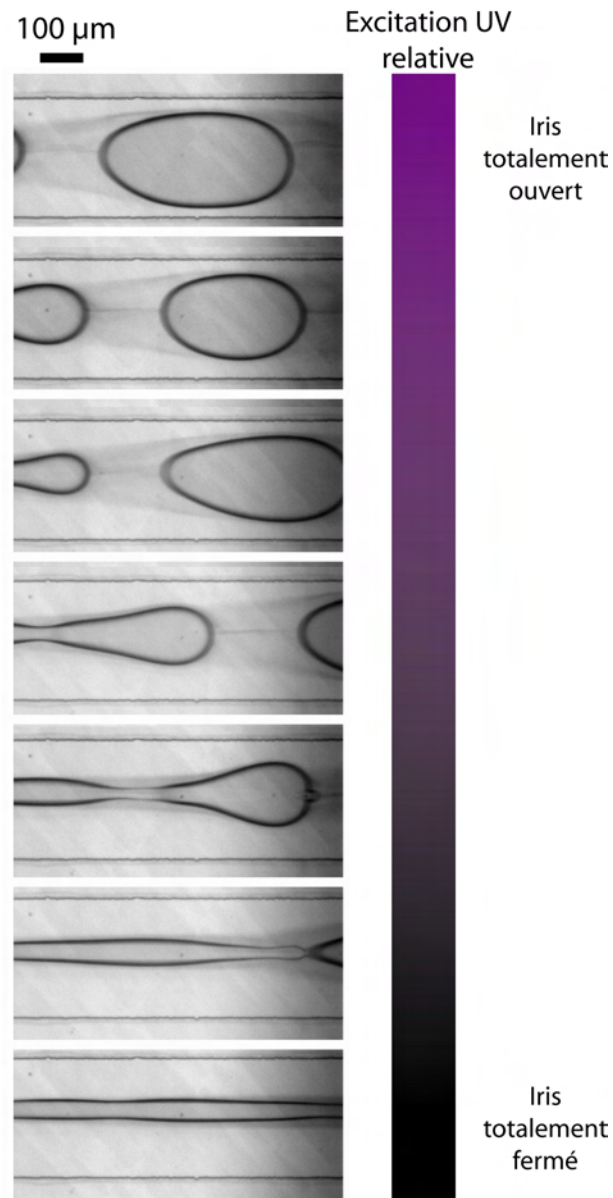


FIGURE 3.10 – Effet de la diminution de la taille de l’iris situé en sortie de la lampe d’excitation UV sur la photofragmentation de long du canal principal du dispositif 2. L’écoulement se fait de la gauche vers la droite. La taille de l’iris est progressivement diminuée. Chaque image correspond au régime stable visible correspondant à une taille d’iris fixe. Les débits sont constants, $Q_{aq} = 1,5 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ et $Q_{oil} = 2,4 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$.

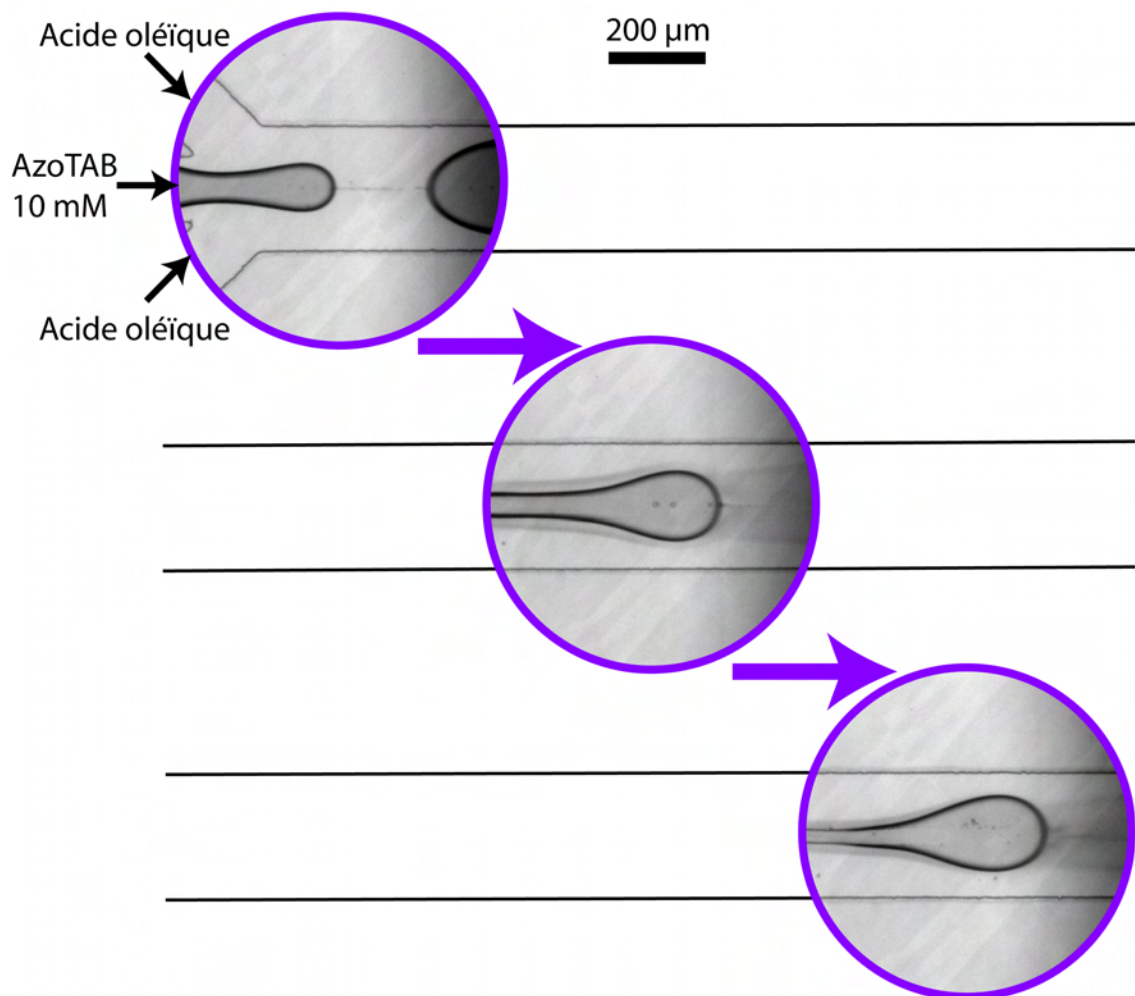


FIGURE 3.11 – Translation de la zone d’illumination UV le long du canal principal du dispositif 2, avec une faible ouverture d’iris pour que la frontière tube-goutte soit visible dans la zone d’observation. Les débits sont constants, $Q_{aq} = 1,5 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ et $Q_{oil} = 2,4 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$.

3.5 Conclusion

C'est la première fois qu'un tensioactif photosensible est introduit dans un dispositif microfluidique. Nous montrons ici que ceci offre de nouvelles perspectives pour l'optofluidique. En exploitant la modification photoinduite du mouillage du microcanal par la phase aqueuse, nous avons changé la nature du régime entre un écoulement biphasique continu et une fragmentation sous forme de gouttelettes monodisperses. Cette transition est à la fois réversible, rapide et peut être spatialement résolue.

Du point de vue du phénomène physique, c'est à notre connaissance la première fois que la lumière, à travers un phénomène capillaire, fragmente une interface continue en gouttelettes. Comme nous l'avons vu, la compréhension et la prédiction de la stabilité d'un écoulement biphasique ne peut pas se faire qu'à travers le calcul du nombre capillaire. C'est un paramètre qui permet de donner une tendance et qui est apprécié des expérimentateurs. Mais il ne suffit plus, dès que des phénomènes plus fins apparaissent, en particulier lorsque le mouillage du substrat est pris en compte. La description de la stabilité d'un écoulement biphasique s'inscrit dans le large problème de l'instabilité de Plateau-Rayleigh. Des travaux de modélisation existent pour décrire cette instabilité dans le cas où une interface solide est ajoutée au système [395]. Mais il semble que les conclusions théoriques ne soient pas assez simples pour être rapidement confrontées aux expériences et appropriées par les acteurs de la microfluidique.

D'autre part au niveau des applications, ce travail représente une nouvelle stratégie de génération de goutte à la demande. Nécessitant seulement l'ajout de la molécule photosensible dans la phase aqueuse, cette méthode peut être aisément transposée à d'autres dispositifs microfluidiques. Elle s'inscrit désormais comme un nouveau moyen pour la mise au point de puces microfluidiques entièrement optiques comme l'a imaginé Glückstad [396] : dans ces microsystèmes, les fluides présents sont à la fois les échantillons à analyser et des éléments optiques et la lumière sert à la fois d'actuateur et de senseur.

Notre approche possède néanmoins quelques limites avant d'être réellement intégrée dans des systèmes photocontrôlés d'analyse et d'encapsulation. La concentration d'AzoTAB est telle qu'il est difficile d'éviter son interaction avec les molécules d'intérêt qui seront présentes en phase aqueuse. En particulier, l'AzoTAB est capable d'induire la compaction de l'ADN et son affinité pour les membranes biologiques en font une molécule relativement cytotoxiques. D'autre part, même si le temps de réponse au stimulus lumineux de l'ordre de 2 secondes est satisfaisant pour la description du principe, il est encore trop important pour des applications d'encapsulation sélective à haut débit. Dans nos conditions, sous lumière UV continue, la fréquence de génération des gouttes est de l'ordre de 10 Hz. Notre résolution temporelle conduit donc pour le moment à ce que ce soit au minimum sur plusieurs dizaines de gouttes qu'un échantillon introduit en phase aqueuse puisse être volontairement encapsulé. Par exemple le piégeage d'une cellule unique dans une goutte ne pourrait se faire qu'avec un faible rendement. Le temps de réponse du système pourrait être optimisé à travers le contrôle plus précis de la chimie de surface du substrat, pour que la différence énergétique entre les situations de mouillage et de démouillage soit plus faible. La puissance de l'illumination UV pourrait aussi être augmentée de manière à ce que le changement de conformation *trans-cis* de l'AzoTAB soit encore plus rapide et puisse être effectué à des débits supérieurs. L'utilisation d'un laser UV pourrait être imaginée, ce qui permettrait en plus un meilleur contrôle spatial de la zone d'excitation.

D'un autre côté, il est aussi imaginable de sélectionner *a posteriori* la ou les gouttes renfermant la cible voulue. Par exemple en intégrant des électrodes après la zone d'illumination, un champ

électrique pourrait être appliqué pour pour séparer les gouttes du flux continu, ou même pour les trier entre elles.

Conclusion de la quatrième partie

Nous avons exploité dans cette partie la capacité de l'AzoTAB à se positionner aux interfaces et à agir sur la tension correspondante de manière photodépendante.

Un premier chapitre bibliographique s'est intéressé à l'importance de la capillarité et des tensoactifs dans de nombreux phénomènes. Plus particulièrement, c'est la création de mouvements de fluide sous un gradient de tension de surface ou de mouillabilité qui a été détaillée si possible quand la lumière peut en être le stimulus moteur. D'autre part, les possibilités de contrôle dynamique des écoulements microfluidiques biphasiques ont été décrites, pour comprendre en quoi la tension interfaciale peut être modifiée pour en changer la morphologie.

Nous avons démontré dans un second chapitre qu'un effet Marangoni peut être généré et contrôlé par la lumière sur les contours d'une goutte d'huile millimétrique flottant sur un bain d'AzoTAB. Cet effet, qui lie la tension de surface à la couleur de l'illumination, a été baptisé "effet chromocapillaire". En plus d'un déplacement linéaire sous une illumination UV, c'est une photomanipulation complète de la goutte qui est possible, en combinant deux éclairages UV et bleu. Ce système est un exemple de conversion directe de l'énergie lumineuse en travail mécanique et offre des perspectives dans le déplacement sans contact d'échantillons fragiles ou toxiques. Il représente de plus un phénomène où une isomérisation moléculaire a une conséquence sur un phénomène dynamique macroscopique.

L'effet de la lumière sur un dispositif microfluidique de génération de gouttes dans lequel a été introduit de l'AzoTAB, a été évalué dans le dernier chapitre. Sa présence dans la phase aqueuse permet de modifier son mouillage sur le substrat, par illumination. La conséquence de l'augmentation d'énergie interfaciale sous UV provoque en particulier un passage entre un régime où l'écoulement est laminaire et un régime où il est fragmenté en microgouttes régulières. Cette transition discrète est réalisée de façon rapide et est réversible lorsque le stimulus s'arrête. Nous avons montré que ce phénomène peut être réalisé quelle que soit la position le long de l'écoulement continu. La lumière apparaît ici comme un outil performant pour réaliser une encapsulation à la demande, avec une grande résolution spatiotemporelle.

Tous ces résultats montrent comment une isomérisation moléculaire peut être convertie en effets microscopiques et macroscopiques contrôlables par la lumière. En se positionnant aux interfaces, une molécule comme l'AzoTAB est capable de contrôler l'énergie entre les phases mises en présence. De faibles changements énergétiques peuvent alors se traduire en effets spectaculaires, notamment lorsqu'il s'agit de phénomènes dynamiques (Marangoni) ou lorsqu'une instabilité est mise en jeu (transition de démouillage).

Conclusion générale

Nous avons principalement montré à travers cette thèse de nouvelles possibilités de photoactivation. Malgré la nature variée des systèmes utilisés (ADN en milieu *in vitro*, GUV, écoulement biphasique microfluidique, goutte millimétrique), l'outil qui nous a permis de convertir une illumination en fonction est une même molécule, l'AzoTAB. A la fois petite et aux caractéristiques bien définies (amphiphilie, tête cationique, groupement photochrome), elle a pu être introduite dans de nouveaux environnements pour qu'une stimulation lumineuse puisse induire des modifications de leurs propriétés, la plupart du temps réversibles, à différentes échelles (moléculaire, micrométrique et macroscopique).

Pour un rappel des principaux résultats obtenus, nous pouvons nous reporter aux conclusions des trois parties de résultats (p. 86, 137 et 197).

Les perspectives de ces travaux se situent à la fois dans le développement des tensioactifs photosensibles et dans la mise au point de nouveaux systèmes dans lesquels ils peuvent être implantés.

Du fait de leurs structures proches, un travail de synthèse de nouveaux tensioactifs photochromes mérite d'être réalisé pour produire des molécules aux modifications photoinduites plus radicales. L'intégration de plusieurs groupements photochromes permettrait d'obtenir des effets coopératifs pour que l'amplitude des changements de géométrie, de polarité ou de capacité à s'autoassembler soit plus encore plus importante. Une variation dans leurs caractéristiques pourrait aussi faciliter leur introduction dans des milieux différents. Augmenter leur hydrophobicité favoriserait leur interaction avec des protéines hydrophobes ou des bicouches lipidiques. Accroître leur charge les rendrait plus hydrosolubles, plus aptes à se fixer sur des acides nucléiques, sur des surfaces hydrophiles ou sur des membranes cellulaires fonctionnalisées par des éléments chargés.

La recherche des nouveaux systèmes où les propriétés des tensioactifs photochromes peuvent être exploitées est aussi à poursuivre. D'un côté, dans les interfaces biphasiques, il pourrait être intéressant d'observer leur effet sous illumination dans des mousses (pour créer un drainage photodépendant), des films liquides (des bulles de savons pourraient éclater à la lumière), des monocouches de tensioactifs (un transfert de type Langmuir-Blodgett serait réalisé différemment sous éclairage), des microémulsions sur des surfaces (pour étudier leurs propriétés de détergence), des surfaces greffées d'ADN, ou encore dans le phénomène de floculation. Dans le volume d'une solution, la formulation de mélanges avec d'autres tensioactifs usuels est à approfondir pour développer des systèmes dont l'autoassemblage est encore plus contrôlable par la lumière. Ils pourraient aussi être mis en contact avec des molécules d'ADN manipulées individuellement à l'aide de pinces magnétiques pour mieux caractériser la contrainte créée par l'isomérisation de l'AzoTAB sur la macromolécule.

Enfin, en vue d'applications nouvelles, il est nécessaire de se poser la question des propriétés *in vivo* de l'AzoTAB. En effet, pour des problèmes de toxicité et de propriétés photosensibles, les

groupements diazobenzènes ont été cantonnés aux systèmes et applications *in vitro*. Néanmoins les récentes observations de Wolley *et al.* de la photoisomérisation dans un embryon de poisson zèbre, d'un peptide modifié par une fonction diazobenzène [391], laissent présager d'une certaine biocompatibilité de ces composés, sous condition d'une faible concentration.

Ces pistes s'inscrivent dans une recherche particulièrement interdisciplinaire, nécessitant une collaboration transverse entre chimistes de synthèse, physico-chimistes, théoriciens, physiciens et biologistes.

Annexes

Annexe A

Synthèse de l'AzoTAB et de ses dérivés

Toutes ces synthèses s'inspirent de l'article de Hayashita *et al.* [34].

Synthèse de AzoH

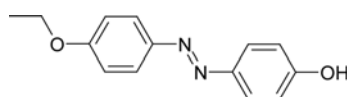


FIGURE A.1 – Structure de l'AzoH.

De l'acide chlorhydrique concentré (17 mL) et de la glace (80 g) sont ajoutés à une solution d'eau/éthanol (1:1, 160 mL) contenant de la *p*-éthoxyaniline (10.4 mL, 80 mmol) et du nitrite de sodium (5.5 g, 80 mmol). Le tout est plongé dans un bain de glace. De l'eau froide contenant du phénol (7.5 g, 80 mmol) et de l'hydroxyde de sodium (6.4 g, 160 mmol) sont ensuite lentement ajoutés à la solution. Le mélange est agité pendant 90 minutes. Le pH de la solution est ajusté à 1,0 avec de l'acide chlorhydrique. Après une attente de 30 minutes, l'ensemble est filtré. Le précipité résultant est lavé à l'eau et séché sous vide. Une poudre marron est obtenue (92%).

^1H NMR (250 MHz, CDCl_3) : δ = 7.89 (d, $^3\text{J}(\text{H,H})$ = 9.0 Hz, 2H ; Ar-H), 7.84 (d, $^3\text{J}(\text{H,H})$ = 8.7 Hz, 2H ; Ar-H), 7.01 (d, $^3\text{J}(\text{H,H})$ = 8.9 Hz, 2H ; Ar-H), 6.95 (d, $^3\text{J}(\text{H,H})$ = 8.6 Hz, 2H ; Ar-H), 4.13 (q, $^3\text{J}(\text{H,H})$ = 7.0 Hz, 2H ; CH_2), 1.48 ppm (t, $^3\text{J}(\text{H,H})$ = 7.0 Hz, 3H ; CH_3).

^{13}C NMR (250 MHz, CDCl_3) : δ = 161.1 (Ar-C), 158.2 (Ar-C), 147.0 (Ar-C), 146.8 (Ar-C), 124.6 (Ar-C), 124.4 (Ar-C), 115.9 (Ar-C), 114.8 (Ar-C), 63.9 (CH_2), 14.8 ppm (CH_3).

MS (CI) : m/z : calculé pour $\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2$: 242.3 $[\text{M}]^+$; obtenu : 242.1.

Synthèse de AzoTriBr

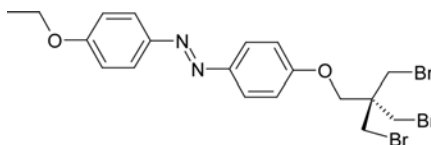


FIGURE A.2 – Structure de l'AzoTriBr.

Le précurseur AzoH (1.07 g, 4.4 mmol) est dissous dans du DMF anhydre (80 mL). Il est déprotoné par NaH à 60% (360 mg, 8.8 mmol), sous atmosphère d'azote. A la fin du dégagement gazeux, cette solution est transférée rapidement dans un ballon contenant une solution de 1,3-dibromo-2,2-bis(bromométhyl)propane (10,3 mg, 26.6 mmol) dans du DMF anhydre (120 mL). L'ensemble est agité à température ambiante sous atmosphère d'azote pendant 5 jours. Le solvant est évaporé sous pression réduite. Le brut réactionnel est redissout dans de l'éther anhydre (300 mL) et extrait avec de l'eau (10x20 mL). Le solvant de la phase organique est évaporé sous pression réduite. Après purification sur gel de silice (éluants successifs cyclohexane pur, cyclohexane/AcOEt 20:1, cyclohexane/AcOEt 10:1, cyclohexane/AcOEt 5:1), et évaporation du solvant sous pression réduite, AzoTriBr est obtenu sous forme d'une poudre orange (46%).

^1H NMR (250 MHz, CDCl_3) : δ = 7.92 (d, $^3\text{J}(\text{H,H})$ = 8.8 Hz, 4H ; Ar-H), 7.07 (d, $^3\text{J}(\text{H,H})$ = 9.3 Hz, 2H ; Ar-H), 7.02 (d, $^3\text{J}(\text{H,H})$ = 9.3 Hz, 2H ; Ar-H), 4.25-4.10 (m, 4H ; $\text{CH}_2\text{O} + \text{CH}_2\text{O}$), 3.72 (s, 6H ; CH_2Br), 1.50 ppm (t, $^3\text{J}(\text{H,H})$ = 7.0 Hz, 3H ; CH_3).

^{13}C NMR (250 MHz, CDCl_3) : δ = 161.2 (Ar-C), 159.9 (Ar-C), 147.8 (Ar-C), 146.1 (Ar-C), 124.5 (Ar-C), 124.3 (Ar-C), 115.3 (Ar-C), 114.7 (Ar-C), 67.7 (CH_2O), 63.8 (OCH_2CH_3), 43.6 ($\text{C}(\text{CH}_2)_4$), 34.4 (CH_2Br), 14.8 ppm (CH_3).

MS (CI) : m/z : calculé pour $\text{C}_{19}\text{H}_{21}\text{N}_2\text{O}_2\text{Br}_3$: 549.1 $[\text{M}]^+$; obtenu : 548.9.

Synthèse de AzoTriN3

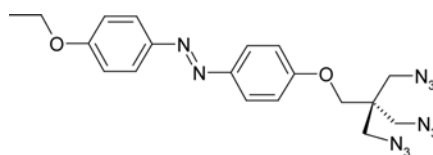


FIGURE A.3 – Structure de l'AzoTriN3.

Le précurseur AzoTriBr (50 mg, 92.5 μmol) est dissous dans du THF anhydre (8 mL). De l'azidure de sodium NaN_3 (120 mg, 1.83 mmol) est ajouté. Le tout est porté au reflux à 120°C et agité pendant 3 jours. Le mélange est ramené à température ambiante et le solvant est évaporé sous pression réduite. Le brut réactionnel est redissout dans du chloroforme (10 mL) et lavé à l'eau (4 mL+2x2 mL). La phase organique est séchée sur MgSO_4 et évaporée sous pression réduite. AzoTriN3 est obtenu sous forme d'une poudre orange (99%).

^1H NMR (250 MHz, CDCl_3) : δ = 7.82 (d, $^3\text{J}(\text{H,H})$ = 8.9 Hz, 4H ; Ar-H), 6.96 (d, $^3\text{J}(\text{H,H})$ = 6.7 Hz, 2H ; Ar-H), 6.91 (d, $^3\text{J}(\text{H,H})$ = 6.7 Hz, 2H ; Ar-H), 4.05 (q, $^3\text{J}(\text{H,H})$ = 6.8 Hz, 2H ; CH_2O), 3.86 (s, 2H ; OCH_2C_4), 3.44 (s, 6H ; CH_2N), 1.39 ppm (t, $^3\text{J}(\text{H,H})$ = 6.9 Hz, 3H ; CH_3).

^{13}C NMR (250 MHz, CDCl_3) : δ = 159.9 (Ar-C), 147.7 (Ar-C), 146.9 (Ar-C), 124.5 (Ar-C), 124.36 (Ar-C), 114.9 (Ar-C), 114.7 (Ar-C), 66.8 (CH_2O), 63.8 (OCH_2CH_3), 51.5 (CH_2N), 44.3 ($\text{C}(\text{CH}_2)_4$), 14.8 ppm (CH_3).

MS(CI) : m/z : $\text{C}_{19}\text{H}_{21}\text{N}_{11}\text{O}_2$: 435.5 $[\text{M}]^+$; obtenu : 435.3.

Synthèse de AzoTriNH2

A une solution de triphénylphosphine PPh_3 (95 mg, 360 μmol) dans du THF anhydre (1.5 mL) est ajoutée la solution de AzoTriN3 (50 mg, 92.5 μmol) préalablement dissout dans du THF anhydre (1.5 mL), à température ambiante, sous atmosphère d'azote. Après 18 h d'agitation, 2

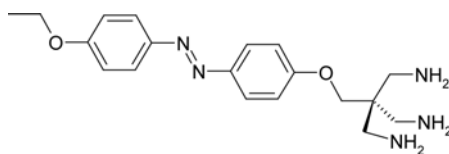


FIGURE A.4 – Structure de l’AzoTriNH2.

mL d’eau sont ajoutés au milieu réactionnel. L’ensemble est agité 24 h puis le solvant est évaporé sous pression réduite. Le mélange est purifié sur gel de silice (éluant EtOH+1% NH₃). Le solvant est évaporé sous vide. Une poudre orange est obtenue (31%).

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃) : δ = 7.80 (d, ³J(H,H) = 8.8 Hz, 4H ; Ar-H), 6.96 (d, ³J(H,H) = 9.0 Hz, 2H ; Ar-H), 6.91 (d, ³J(H,H) = 8.9 Hz, 2H ; Ar-H), 4.05 (q, ³J(H,H) = 7.0 Hz, 2H ; CH₂O), 3.91 (s, 2H ; CH₂O), 3.10-2.80 (m, 6H ; CH₂N), 2.15-1.64 (m, 9H ; NH₂), 1.40 ppm (t, ³J(H,H) = 6.9 Hz, 3H ; CH₃).

¹³C NMR (250 MHz, CDCl₃) : δ = 161.1 (Ar-C), 160.8 (Ar-C), 147.3 (Ar-C), 146.9 (Ar-C), 124.4 (Ar-C), 124.3 (Ar-C), 114.7 (Ar-C), 114.7 (Ar-C), 70.1 (CH₂O), 63.8 (OCH₂CH₃), 54.1 (CC₄), 44.2 (CH₂N), 14.8 (CH₃).

Synthèse de l’AzoTAB

L’AzoTAB utilisé à travers toute cette thèse a été synthétisé en 2007 par Dr. Samuel Guieu dans l’équipe du Prof. Matthieu Sollogoub de l’Université Pierre et Marie Curie.

Le précurseur AzoH (610 mg, 2.5 mmol) est dissous dans de l’éthanol anhydre (12.5 mL) contenant de l’hydroxyde de sodium (120 mg, 3.0 mmol). Le mélange est agité pendant 30 minutes. De l’éthanol anhydre (5.4 mL) contenant du 1,2-dibromoéthane (0.8 mL, 7.5 mmol) est ajouté lentement (10 minutes) et chauffé au reflux pendant 15 heures. Le solvant est évaporé sous pression réduite. Le solide restant est dissous dans du dichlorométhane (10 mL). Le mélange est extrait par une solution d’hydroxyde de sodium (1 mol.L⁻¹, 2x4 mL) et de l’eau pure (2x4 mL). La phase organique est séchée sur MgSO₄ et concentrée sous pression réduite. Une poudre orange est obtenue.

Le produit précédent (\approx 1 mmol) est dissous dans du THF sec (10 mL). De la triméthylamine gazeuse est mise à buller dans le mélange pendant 30 minutes. La solution est ensuite agitée pendant 6 jours. Le précipité résultant est filtré, lavé avec du THF et séché sous vide. Le produit est recristallisé deux fois dans l’éthanol. Une poudre orange est obtenue. Le rendement global de la synthèse est d’environ 20%.

¹H NMR (250 Mhz, CDCl₃) : δ = 7.82 (q, ³J(H,H) = 4.8 Hz, 4H ; Ar-H), 6.94 (t, ³J(H,H) = 8.8 Hz, 4H ; Ar-H), 4.51 (s, 2H ; CH₂O), 4.40 (s, 2H ; CH₂Br), 4.05 (q, ³J(H,H) = 6.9 Hz, 2H ; OCH₂CH₃), 3.64 (s, 9H ; CH₃N), 1.49 ppm (t, ³J(H,H) = 8.6 Hz, 3H ; CH₃).

¹³C NMR (250 Mhz, CDCl₃) : δ = 158.4 (Ar-C), 148.1 (Ar-C), 124.6 (Ar-C), 114.7 (Ar-C), 65.2 (CH₂O), 63.8 (CH₂O), 62.7 (CH₂N), 55.0 (CH₃N), 14.8 ppm (CH₃).

Synthèse de Azo3Br

Le précurseur AzoH (610 mg, 2.5 mmol) est dissous dans de l’éthanol anhydre (12.5 mL) contenant de l’hydroxyde de sodium (120 mg, 3.0 mmol). Le mélange est agité pendant 30 minutes. De l’éthanol anhydre (5.4 mL) contenant du 1,3-dibromopropane (0.8 mL, 7.5 mmol)

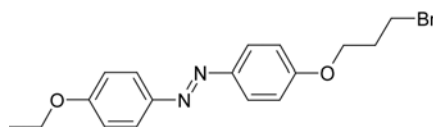


FIGURE A.5 – Structure de l'Azo3Br.

est ajouté lentement (10 minutes) et chauffé au reflux pendant 15 heures. Le solvant est évaporé sous pression réduite. Le solide restant est dissous dans du dichlorométhane (10 mL). Le mélange est extrait par une solution d'hydroxyde de sodium (1 mol.L^{-1} , $2 \times 4 \text{ mL}$) et de l'eau pure ($2 \times 4 \text{ mL}$). La phase organique est séchée sur MgSO_4 et concentrée sous pression réduite. Une poudre orange est obtenue (35%).

$^1\text{H NMR}$ (250 Mhz, CDCl_3) : $\delta = 7.72$ (d, $^3\text{J}(\text{H,H}) = 8.6 \text{ Hz}$, 4H ; Ar-H), 7.00 (d, $^3\text{J}(\text{H,H}) = 8.8 \text{ Hz}$, 2H ; Ar-H), 6.94 (d, $^3\text{J}(\text{H,H}) = 8.8 \text{ Hz}$, 2H ; Ar-H), 4.09 - 4.21 (m, 4H ; $\text{CH}_2\text{O} + \text{CH}_2\text{O}$), 3.61 (t, $^3\text{J}(\text{H,H}) = 6.4 \text{ Hz}$, 2H ; CH_2Br), 2.40 - 2.25 (m, 2H ; CH_2), 1.42 ppm (t, $^3\text{J}(\text{H,H}) = 6.9 \text{ Hz}$, 3H ; CH_3).

$^{13}\text{C NMR}$ (250 Mhz, CDCl_3) : $\delta = 160.8$ (Ar-C), 160.6 (Ar-C), 147.2 (Ar-C), 146.9 (Ar-C), 124.3 (Ar-C), 114.7 (Ar-C), 65.6 (CH_2O), 64.7 (CH_2O), 32.3 (CH_2), 29.8 (CH_2Br), 14.8 ppm (CH_3).

MS (IC) : m/z : calculé pour $\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{N}_2\text{O}_2\text{Br}$: 363.3 $[\text{M}]^+$; obtenu : 362.1 .

Synthèse de AzoC3

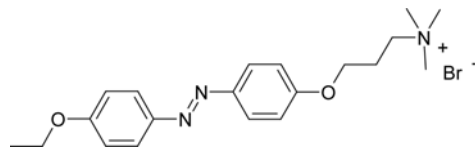


FIGURE A.6 – Structure de l'AzoC3.

Le produit Azo3Br (314 mg, 0.87 mmol) est dissous dans du THF sec (10 mL). De la triméthylamine gazeuse est mise à buller dans le mélange pendant 30 minutes. La solution est ensuite agitée pendant 6 jours. Le précipité résultant est filtré, lavé avec du THF et séché sous vide. Le produit est recristallisé deux fois dans l'éthanol. Une poudre orange est obtenue (53%).

$^1\text{H NMR}$ (250 Mhz, DMSO) : $\delta = 7.78$ (d, $^3\text{J}(\text{H,H}) = 7.1 \text{ Hz}$, 2H ; Ar-H), 7.75 (d, $^3\text{J}(\text{H,H}) = 7.1 \text{ Hz}$, 2H ; Ar-H), 7.16 (d, $^3\text{J}(\text{H,H}) = 7.7 \text{ Hz}$, 2H ; Ar-H), 7.11 (d, $^3\text{J}(\text{H,H}) = 7.7 \text{ Hz}$, 2H ; Ar-H), 4.22 - 4.12 (m, 4H ; CH_2O), 3.53 (t, $^3\text{J}(\text{H,H}) = 8.4 \text{ Hz}$, 2H ; CH_2N), 3.13 (s, 9H ; CH_3N), 2.26 (m, 2H ; CH_2), 1.40 ppm (t, $^3\text{J}(\text{H,H}) = 6.9 \text{ Hz}$, 3H ; CH_3).

$^{13}\text{C NMR}$ (250 Mhz, DMSO) : $\delta = 160.8$ (Ar-C), 160.3 (Ar-C), 146.38 (Ar-C), 146.0 (Ar-C), 124.1 (Ar-C), 114.9 (Ar-C), 65.2 (CH_2O), 63.6 (CH_2O), 62.9 (CH_2N), 52.2 (CH_3N), 22.5 (CH_2), 14.6 ppm (CH_3).

MS (ESI) : m/z : calculé pour $\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{N}_3\text{O}_2$: 342.5 $[\text{M}-\text{Br}]^+$; obtenu : 342.4 .

Synthèse de Azo5Br

Le précurseur AzoH (610 mg, 2.5 mmol) est dissous dans de l'éthanol anhydre (12.5 mL) contenant de l'hydroxyde de sodium (120 mg, 3.0 mmol). Le mélange est agité pendant 30

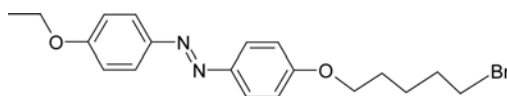


FIGURE A.7 – Structure de l'Azo5Br.

minutes. De l'éthanol anhydre (5.4 mL) contenant du 1,5-dibromopentane (1.0 mL, 7.5 mmol) est ajouté lentement (pendant 10 minutes) et le mélange est chauffé au reflux pendant deux jours. Le solvant est évaporé sous pression réduite. Le solide restant est dissous dans du dichlorométhane (10 mL). Le mélange est extrait par une solution d'hydroxyde de sodium (1 mol.L⁻¹, 2x4 mL) et de l'eau pure (2x4 mL). La phase organique est séchée sur MgSO₄ et concentrée sous pression réduite. Une poudre orange est obtenue (62%).

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃) : δ = 7.92 (q, ³J(H,H) = 8.9 Hz, 4H; Ar-H), 7.02 (d, ³J(H,H) = 8.8 Hz, 4H; Ar-H), 4.16 (q, ³J(H,H) = 7.0 Hz, 2H; CH₂O), 4.11 (t, ³J(H,H) = 6.3 Hz, 2H; CH₂O), 3.50 (t, ³J(H,H) = 6.7 Hz, 2H; CH₂Br), 2.06–1.90 (m, 2H; CH₂), 1.95–1.82 (m, 2H; CH₂), 1.70–1.60 (m, 2H; CH₂), 1.50 ppm (t, ³J(H,H) = 6.9 Hz, 3H; CH₃).

¹³C NMR (250 MHz, CDCl₃) : δ = 161.0 (Ar-C), 147.0 (Ar-C), 124.4 (Ar-C), 114.7 (Ar-C), 67.9 (CH₂O), 63.8 (CH₂O), 33.5 (CH₂), 32.5 (CH₂), 28.4 (CH₂Br), 24.8 (CH₂), 14.8 ppm (CH₃).

MS (IC) : m/z : calculé pour C₁₉H₂₃N₂O₂Br : 391.3 [M]⁺ ; obtenu : 390.2.

Synthèse de AzoC5

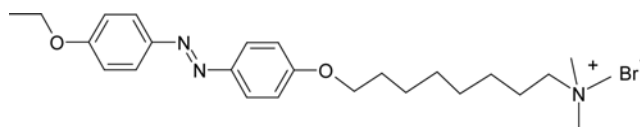


FIGURE A.8 – Structure de l'AzoC5.

Le produit Azo5Br (605 mg, 0.87 mmol) est dissous dans du THF sec (50 mL). De la triméthylamine gazeuse est mise à buller dans le mélange pendant 30 minutes, sous agitation. La solution est ensuite agitée pendant six jours. Le précipité résultant est filtré, lavé avec du THF et séché sous vide. Le produit est recristallisé deux fois dans l'éthanol. Une poudre orange est obtenue (53%).

¹H NMR (500 MHz, DMSO) : δ = 7.84 (d, ³J(H,H) = 6.6 Hz, 2H; Ar-H), 7.82 (d, ³J(H,H) = 6.6 Hz, 2H; Ar-H), 7.12 (d, ³J(H,H) = 6.7 Hz, 2H; Ar-H), 7.10 (d, ³J(H,H) = 6.7 Hz, 2H; Ar-H), 4.10 (m, 2H; CH₂O), 3.99 (q, ³J(H,H) = 8.4 Hz, 2H; CH₂O), 3.39–3.34 (m, 2H; CH₂N), 3.06 (s, 9H; CH₃N), 1.85–1.71 (m, 4H; CH₂), 1.34–1.49 (m, 2H; CH₂), 1.34 ppm (t, ³J(H,H) = 6.8 Hz, 3H; CH₃).

¹³C NMR (250 MHz, DMSO) : δ = 160.8 (Ar-C), 146.0 (Ar-C), 124.1 (Ar-C), 114.9 (Ar-C), 67.5 (CH₂O), 65.2 (CH₂N), 63.6 (CH₂O), 52.2 (CH₃N), 28.0 (CH₂), 22.4 (CH₂), 21.8 (CH₂), 14.6 ppm (CH₃).

MS (ESI) : m/z : calculé pour C₂₂H₃₂N₃O₂ : 370.5 [M-Br⁻]⁺ ; obtenu : 370.3.

Synthèse de Azo8Br

Le précurseur AzoH (610 mg, 2.5 mmol) est dissous dans de l'éthanol anhydre (12.5 mL) contenant de l'hydroxyde de sodium (100 mg, 2.5 mmol). Le mélange est agité pendant 30

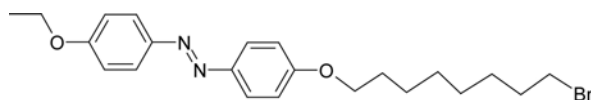


FIGURE A.9 – Structure de l'Azo8Br.

minutes. Du 1,8-dibromoocétane (1.4 mL, 7.5 mmol) est lentement ajouté (10 minutes). Le milieu est chauffé au reflux pendant deux jours. Le solvant est évaporé sous vide. Le solide restant est dissous dans du dichlorométhane (10 mL) et l'ensemble est extrait par une solution d'hydroxyde de sodium (1 mol.L⁻¹, 2x4 mL) et de l'eau pure (2x4 mL). La phase organique est séchée sur MgSO₄ et concentrée sous pression réduite. Un solide orange est obtenu (71%).

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃) : δ = 7.72 (d, ³J(H,H) = 8.9 Hz, 4H ; Ar-H), 6.92 (d, ³J(H,H) = 8.9 Hz, 4H ; Ar-H), 4.10 (q, ³J(H,H) = 7.0 Hz, 2H ; CH₂O), 3.98 (t, ³J(H,H) = 6.6 Hz, 2H ; CH₂O), 3.35 (t, ³J(H,H) = 6.7 Hz, 2H ; CH₂Br), 1.89–1.71 (m, 4H ; CH₂), 1.42–1.22 ppm (m, 8H ; CH₂+CH₃).

¹³C NMR (250 MHz, CDCl₃) : δ = 160.8 (Ar-C), 147.0 (Ar-C), 124.3 (Ar-C), 114.7 (Ar-C), 68.2 (CH₂O), 63.8 (CH₂O), 33.9 (CH₂), 32.0 (CH₂), 29.7 (CH₂Br), 29.2 (CH₂), 28.7 (CH₂), 28.1 (CH₂), 25.9 (CH₂), 14.8 ppm (CH₃).

MS (IC) : m/z : calculé pour C₂₂H₂₉N₂O₂Br : 433.4 [M]⁺ ; obtenu : 432.2.

Synthèse de AzoC8

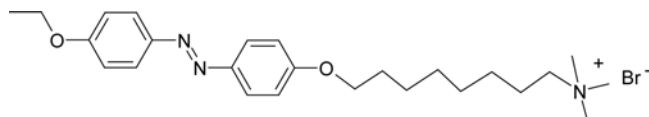


FIGURE A.10 – Structure de l'AzoC8.

Le précurseur Azo8Br (766 mg, 1.77 mmol) est dissous dans du THF (30 mL). De la triméthylamine gazeuse est mise à buller dans le mélange pendant 30 minutes, sous agitation. La solution est ensuite agitée pendant deux jours. Le précipité résultant est filtré, lavé avec du THF et séché sous vide. Le produit est recristallisé deux fois dans l'isopropanol. Une poudre orange est obtenue (46%).

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ = 7.80 (d, ³J(H,H) = 8.9 Hz, 4H ; Ar-H), 6.90 (d, ³J(H,H) = 8.9 Hz, 4H ; Ar-H), 4.05 (q, ³J(H,H) = 8.7 Hz, 2H ; CH₂O), 3.97 (t, ³J(H,H) = 8.0 Hz, 2H ; CH₂O), 3.56–3.51 (m, 2H ; CH₂N), 3.37 (s, 9H ; CH₃N), 1.81–1.62 (m, 4H ; CH₂), 1.43 (t, ³J(H,H) = 8.7 Hz, 3H ; CH₃), 1.35–1.25 ppm (m, 8H ; CH₂).

¹³C NMR (250 MHz, CDCl₃) : δ = 161.1 (Ar-C), 147.0 (Ar-C), 124.3 (Ar-C), 114.7 (Ar-C), 68.1 (CH₂O), 67.0 (CH₂N), 63.8 (CH₂O), 53.5 (CH₃N), 29.1 (CH₂+CH₂), 29.0 (CH₂), 26.1 (CH₂), 25.8 (CH₂), 23.2 (CH₂), 14.8 ppm (CH₃).

MS (ESI) : m/z : calculé pour C₂₅H₃₈N₃O₂ : 412.6 [M-Br]⁺ ; obtenu : 412.3.

Annexe B

Expression génétique *in vitro*

Transcription

Préparation du milieu

Le tampon, les ribonucléotides triphosphates (NTP) et le dithiothréitol (DTT) sont d'abord assemblés. L'AzoTAB, l'ADN et la RNA polymérase sont ensuite ajoutés de manière à avoir un volume final de 30 μL . La composition finale du milieu de transcription pour la *E. coli* RNA polymérase est : 0.02 U. μL^{-1} RNA polymérase de *E. coli*, 40 mmol.L $^{-1}$ Tris-HCl, pH = 7.5, 150 mmol.L $^{-1}$ KCl, 10 mmol.L $^{-1}$ MgCl $_2$, 0.5 mmol.L $^{-1}$ NTP et 10 mmol.L $^{-1}$ DTT. La composition finale du milieu de transcription pour la T7 RNA polymérase est : 5 U. μL^{-1} T7 RNA polymérase, 40 mmol.L $^{-1}$ Tris-HCl, pH = 7.5, 25 mmol.L $^{-1}$ NaCl, 8 mmol.L $^{-1}$ MgCl $_2$, 0.5 mmol.L $^{-1}$ NTP et 5 mmol.L $^{-1}$ DTT.

Le tube est divisé en deux parties de 15 μL , l'une pour le noir, l'autre pour subir l'illumination UV. Pour chaque concentration en AzoTAB, une fraction de 5 μL est immédiatement retirée et diluée 20 fois dans une solution composée de 10 mmol.L $^{-1}$ Tris-HCl, pH = 7,5 et 1 mmol.L $^{-1}$ EDTA. Cet aliquot correspond au temps initial de la réaction de transcription. Les tubes sont ensuite introduits dans une étuve à 37°C. Lorsqu'elle a lieu, l'illumination UV est réalisée pendant les 10 premières minutes de la transcription. Après 20 minutes de réaction, un second aliquot de 5 μL est prélevé et dilué 20 fois dans le tampon précédent.

Mesures de fluorescence

La concentration totale en ARN et ADN dans chaque tube est quantifiée par ajout de Ribogreen (Invitrogen), qui est une molécule qui fluoresce en présence d'acides nucléiques. Pour cela, les échantillons dilués 20 fois sont immédiatement dénaturés pendant 10 minutes à 85°C, puis refroidis à 4°C. Le Ribogreen, dilué dans une solution de 10 mmol.L $^{-1}$ Tris-HCl, pH = 7,5 et 1 mmol.L $^{-1}$ EDTA, est ensuite ajouté. Les spectres de fluorescence sont réalisés à 20°C avec un spectrophotomètre de fluorescence (Hitachi F-7000), en excitant à $480 \pm 2,5$ nm. L'intensité de fluorescence enregistrée à 532 nm est proportionnelle à la quantité totale d'ARN et d'ADN. Des corrections doivent être apportées à l'intensité mesurée. D'une part parce que l'AzoTAB absorbe entre 200 et 550 nm et donc contribue à diminuer la fluorescence du Ribogreen. Une calibration a été faite pour différentes concentrations d'ARN connues et d'AzoTAB. De ces courbes sont issus des facteurs correctifs. D'autre part, il est nécessaire de soustraire l'intensité de fluorescence

issue de l'ADN de départ. Cette valeur provient de la mesure des échantillons prélevés au temps initial. Finalement pour chaque concentration en AzoTAB, l'activité transcriptionnelle est définie comme le rapport de l'intensité corrigée mesurée après 20 minutes de réaction sur l'intensité corrigée après 20 minutes de réaction sans AzoTAB.

Diffusion statique de la lumière (SLS)

La solution contenant le milieu de transcription et la quantité voulue d'AzoTAB est introduite dans un tube pour être conservée à 37°C dans le noir. L'ADN est ensuite ajouté, de manière à avoir une concentration de 1 ou 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, suivant son signal. 50 μL du mélange sont introduits dans la cuve de mesure. Les mesures de l'intensité de diffusion sont réalisées avec un zetasizer NanoZS équipé d'un laser à 633 nm (Malvern Instruments Ltd).

Electrophorèse d'ARN sur gel non dénaturant

Le mélange issu de la transcription du plasmide pQBi-T7-GFP linéarisé avec l'enzyme de restriction BglII est analysé sur un gel d'agarose à 1,5% dans un tampon Mops. Les ARN de référence utilisés proviennent de Ambion (Century-Plus markers). Le gel est marqué avec du SYBR Green II (Invitrogen).

Préparation de l'ARN messenger

En vue de la translation *in vitro*, le mARN de 759 bases codant pour l'EGFP, a été préparé par MEGAscript™ (Ambion) selon les instructions du manuel. Après la réaction de transcription, la TURBO DNase (Ambion) est ajoutée à la solution pour détruire l'ADN contaminant. Le mARN est purifié à l'aide du kit RNeasy MinElute™ Cleanup (QIAGEN).

Préparation du plasmide T7lac

Le plasmide T7lac est un plasmide contenant un gène (I) codant pour la β -lactamase, dont la séquence est celle du transposon Tn3 identifié par Heffron *et al.* en 1979 [126]. Pour pouvoir être exprimé dans le PURExpress, la gène est précédé d'un promoteur T7 et se termine par un terminateur T7. Pour le préparer, nous avons d'une part commandé le gène I. Il est livré dans un vecteur pBluescript II SK (+), qui contient un gène de résistance à l'ampicilline, pour faciliter sa sélection et son amplification. Ce gène de résistance est assez proche de celui que nous avons commandé, car il repose aussi sur la synthèse d'une β -lactamase, qui permet de rendre l'ampicilline inactive. Pour ne pas créer d'ambiguïté, il convient de se séparer de ce gène de résistance à l'ampicilline et donc d'inclure le gène commandé dans un autre vecteur V.

Préparation du vecteur V :

Le vecteur sans résistance à l'ampicilline est issu d'un plasmide appelé pBss1 (2,3 kbp), disponible dans le laboratoire du Prof. Michel Volovitch au Collège de France. Il contient un gène de résistance à l'ampicilline et une séquence d'environ 1,3 kb qui constituera notre vecteur V. Ces deux fragments sont clivables par l'enzyme de restriction BspHI.

La digestion par BspHI est réalisée dans le tampon NEB 4 (New England Biolabs), avec une concentration finale de $0,2 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ en plasmide et de $1 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ en enzyme. La réaction a lieu pendant 2 h à 37°C . Une déphosphorylation des extrémités a ensuite lieu par la CIP (Calf Intestinal Phosphatase), pour éviter que les deux fragments ne se referment sur eux-mêmes. Elle est réalisée dans le milieu précédent en ajoutant la CIP (concentration finale d'environ $0,4 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) et un tampon Tris-HCl pH = 9 (concentration finale d'environ $0,08 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$). Le mélange est porté à 37°C pendant 30 minutes, puis à 65°C pendant 15 minutes.

La séparation des deux fragments a lieu par électrophorèse sur gel. Le gel (0,8% en masse d'agarose) est marqué au SYBR Safe (Invitrogen) et formé dans un tampon TAE 1x (Tris, Acétate, EDTA). Le dépôt d'ADN est fait en mélangeant $2 \mu\text{L}$ du mélange précédent avec $1,5 \mu\text{L}$ de bleu de charge (New England Biolabs), puis dilué avec de l'eau pour avoir un volume total de $10 \mu\text{L}$. Un mélange de fragments standards est déposé en parallèle (Quick-Load 1 kb DNA Ladder, New England Biolabs). La migration a lieu pendant environ 1 h sous une tension de 100 V. Pour isoler le vecteur V, le fragment situé vers 1,3 kbp est excisé. Le morceau de gel est purifié à l'aide du kit QIAquick Gel extraction kit (QIAGEN).

Préparation du gène I :

Le plasmide commercial (Eurofins) contenant le gène I a une taille de 4,2 kbp. La taille de I est d'environ 1,2 kbp. Pour le séparer du vecteur pBluescript II SK (+), deux enzymes de restriction sont utilisées : le plasmide est mis en présence de PciI ($0,3 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, 2 h, 37°C) puis de BspHI ($0,3 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, 2 h, 37°C) dans le tampon NEB 4.

Les deux fragments sont ensuite séparés par électrophorèse sur gel (100 V, 2 h). Le fragment visible vers 1,2 kbp est excisé et purifié comme précédemment.

Ligation du gène I avec le vecteur V :

Les deux fragments sont mélangés en présence de T4 DNA ligase (concentration finale d'environ $27 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) dans le tampon "buffer for T4 DNA ligase with 10 mM ATP" (New England Biolabs). Pour servir de contrôle, la réaction est aussi faite avec le vecteur seul. Le volume de V et de I représente environ $7 \mu\text{L}$ sur un volume totale de $20 \mu\text{L}$. La réaction est réalisée pendant 3 h à température ambiante.

Amplification du produit de ligation :

Le mélange issu de la ligation de V avec I est amplifié dans les bactéries DH5 α .

Pour la transfection, les bactéries compétentes initialement dans un congélateur à -80°C , sont dégelées dans de la glace. Pour chaque solution de ligation, environ $7,5 \mu\text{L}$ sont délicatement introduits dans un tube de compétentes ($\sim 100 \mu\text{L}$), sous flamme. Les tubes sont laissés à reposer 30 minutes dans la glace. Un choc thermique est effectué pendant 1,5 minute dans un bain à 42°C . Les tubes sont immédiatement replongés dans la glace pendant 2 minutes. Dans chaque tube sont mélangés $200 \mu\text{L}$ de milieu SOC (Super Optimal Broth, Invitrogen), sous flamme. L'ensemble est agité à 37°C pendant 30 minutes. Pour chaque tube, le liquide est étalé sur une boîte de Petri contenant le milieu de culture gélifié (initialement conservée à 4°C). Une dizaine de billes de verre sont utilisées pour répartir le liquide sur l'ensemble de la boîte, avant d'être jettées. Le tout est placé à 37°C pendant une nuit.

En vue du repiquage des colonies, une solution de culture est d'abord préparée en mélangeant de l'ampicilline à du milieu LB (Lysogeny Broth). 2 mL de ce liquide sont introduits dans des tubes transparents d'une dizaine de mL de contenant (Greiner), sous flamme. A l'aide d'un cône de pipette, la colonie à sélectionner est touchée et le cône est lâché dans un tube. Les tubes sont placés à 37°C sous agitation (160 rpm) pendant une nuit.

Pour récupérer le plasmide amplifié, le kit de purification GenElute Plasmid Miniprep (Sigma) est utilisé. T7lac fait environ 2,5 kbp, ce qui est vérifié par électrophorèse sur gel.

Annexe C

Microfabrication

C.1 Microstructuration d'une surface de silicium

La microstructuration des surfaces de silicium décrites au Chapitre III.2 se décompose en deux parties, la photolithographie et la gravure sèche.

Photolithographie

La création du moule correspondant au motif micrométrique voulu s'est faite à l'aide de la résine photosensible AZ5215 (Clariant), utilisée ici comme résine positive. Son dépôt est fait sur un morceau de silicium cristallin (Siltronix). Les étapes du procédé de photolithographie sont les suivantes :

1. Passage du substrat de silicium dans un plasma d'air, 2 min, 500 mTorr (Plasma Cleaner, Harricks)
2. Exposition 5 min de la surface à une atmosphère de triméthylchlorosilane
3. Etalement de la résine par spin-coating, 5 s à 5000 rpm (accélération 100 rpm.s^{-1}) puis 30 s à 4000 rpm (accélération 2000 rpm.s^{-1})
4. Recuit sur plaque chauffante 1 min à 125°C
5. Exposition sous lampe UV (Hamamatsu) avec le masque en contact 2,6 s à 30 mW.cm^{-2}
6. Refroidissement
7. Recuit sur plaque chauffante 1 min à 125°C
8. Trempe dans une solution de développeur "AZ 710 MIF" (Clariant) environ 70 s
9. Rinçage à l'isopropanol

Gravure sèche

L'étape précédente fournit une surface de silicium qui est recouverte de résine sauf aux endroits qui n'ont pas été exposés à la lumière UV. Au niveau de ces trous, le silicium n'est pas protégé et peut réagir de façon à être retiré de manière progressive. Ceci est réalisé dans une machine de RIE "Reactive Ion Etching" (NE100 RIE Machine, Nextral), qui crée un plasma contenant des ions fluorures qui ont une forte affinité pour le silicium.

La pièce est exposée au plasma 2 min, sous une pression de 30 mTorr et une puissance de 10 W. La résine restante est dissoute dans un bain d'acétone. La profondeur des trous (environ 400 nm) a été mesurée à l'aide d'un AFM (Veeco Instruments) sous atmosphère ambiante. L'aspect

précis des microstructures est contrôlé à l'aide d'un microscope électronique à balayage (5-800, Hitachi).

C.2 Fabrication d'un dispositif microfluidique

Les dispositifs microfluidiques 1 et 2 du Chapitre IV.3 ont été préparés suivant un protocole standard de photolithographie molle.

Photolithographie

La création du moule correspondant au motif micrométrique voulu s'est faite à l'aide de la résine photosensible SU8 2050 (Clariant), qui est une résine époxy, épaisse et négative. Son dépôt est fait sur un morceau de silicium cristallin (Siltronix). Les différentes étapes du procédé de fabrication sont les suivantes :

1. Passage du substrat de silicium dans un plasma d'air, 2 min, 500 mTorr (Plasma Cleaner, Harricks)
2. Etalement de la résine par spin-coating, 30 s à 2000 rpm (accélération (500 rpm.s^{-1}))
3. Recuit sur plaque chauffante 2 min à 65°C
4. Recuit sur plaque chauffante 4 min à 95°C
5. Recuit sur plaque chauffante 2 min à 65°C
6. Refroidissement
7. Exposition avec le masque en contact 7 s à 40 mW.cm^{-2}
8. Recuit sur plaque chauffante 2 min à 65°C
9. Recuit sur plaque chauffante 3 min à 95°C
10. Recuit sur plaque chauffante 2 min à 65°C
11. Trempage dans une solution de développeur "SU8 developer" environ 17 s
12. Rinçage à l'isopropanol

Lithographie molle

La microstructure créée dans la partie précédente est mise en contact avec un polymère, dans notre cas le polydiméthylsiloxane ou PDMS (RTV 615, GE Toshiba Silicones Co. Ltd) de façon à l'imprimer pour qu'elle y soit ensuite figée dans la matrice polymérique [311]. Du fait de l'élasticité du PDMS, le démoulage est aisé. Ceci permet de disposer d'une pièce moulée reproduisant fidèlement le motif micrométrique, faite dans matériau bon marché, qui peut être reproduite plusieurs dizaines de fois à partir du même moule.

Le PDMS se prépare à partir du mélange des monomères et d'un agent réticulant en proportion massique 10:1. Pour éviter les bulles, c'est un mélangeur planétaire qui peut être utilisé (UM-103S, Uni-cyclone). L'ensemble est ensuite versé dans une boîte de Petri contenant le moule (résine photosensible solidifiée sur silicium) pour obtenir une hauteur d'environ 1 cm. Un dégazage sous vide modéré (3 min à 500 mTorr dans le Plasma Cleaner, Harricks) est effectué pour éliminer les bulles encore présentes au sein du mélange visqueux. La solidification du PDMS a ensuite lieu dans une étuve à 80°C pendant 2 h.

Assemblage du PDMS imprimé sur verre

Le bloc de PDMS est découpé verticalement à l'aide d'un scalpel et retiré par simple torsion. Les accès aux chambres et aux canaux sont réalisés en perçant verticalement le matériau avec une aiguille épointée. Le PDMS est lavé à l'isopropanol puis séché sous air. Une lame de verre de 1 mm d'épaisseur (Menzel-Gläser) est lavée de la même façon. Les deux éléments sont exposés à un plasma d'air 3 min à 500 mTorr (Plasma Cleaner, Harricks) puis la face imprimée du PDMS immédiatement mise en contact avec le verre. Les liaisons alors créées entre les deux surfaces sont suffisantes pour y injecter des liquides sous plusieurs dizaines de mBar de pression.

Annexe D

Mesures capillaires

Sous l'appellation "mesures capillaires" sont regroupées les protocoles utilisés pour la détermination d'une tension interfaciale et d'un angle de contact.

D.1 Mesure de tension interfaciale

Plusieurs méthodes existent pour mesurer une tension de surface, entre un liquide et sa vapeur ou entre deux liquides. A une interface courbée est associée une pression (la pression de Laplace), qui est proportionnelle à la tension de surface. La mesure de pression à l'intérieur de gouttes ou de bulles permet de remonter à la tension associée. La tension de surface étant aussi une force par unité de longueur, la mesure de la force capillaire s'exerçant sur un objet solide en contact avec l'interface est une autre voie pour la déterminer. Enfin, l'effet de la tension de surface étant de minimiser l'aire des interfaces, l'analyse de la forme d'une goutte soumise à une force qui l'étire, mène aussi à sa mesure.

C'est ce dernier moyen que nous avons utilisé, à travers la méthode de la goutte pendante, dans laquelle la force mise en jeu provient de la gravité. Une variante consiste à utiliser la rotation pour la déformer (méthode de la goutte tournante). Notre mesure est réalisée avec un tensiomètre Tracker-STD (Teclis) utilisé dans l'équipe de Dr. Arnaud Saint-Jalmes à l'Institut de Physique de Rennes (FIGURE D.1 a). Cet appareil est composé d'une partie de contrôle de la goutte et d'une partie d'observation de sa forme (FIGURE D.1 b). Le liquide composant la goutte est introduit dans une seringue verticale dont la quantité injectée est contrôlée à l'aide d'un moteur. Durant l'expérience, son volume fait environ $4 \mu\text{L}$ et peut être maintenu constant par rétroaction. Pendue au bout du tube, la forme qu'elle adopte est un compromis entre la force de gravité qui l'étire et la tension de surface qui tend à diminuer son aire. Une lampe projette l'ombre de la goutte sur un capteur CCD. Dans le cas d'une goutte pendante dans l'air, l'étude de sa forme permet de remonter à la tension de surface du liquide. Ceci peut aussi avoir lieu avec une goutte pendante dans un liquide moins dense non miscible pour remonter à la tension interfaciale entre ces deux liquides. En courbant l'extrémité du tube vers le haut, cette méthode peut aussi être appliquée à des bulles d'air dans un liquide ou comme nous l'avons fait, à des gouttes de liquides dans un autre liquide plus dense.

Du point de vue de l'analyse du contour, le modèle suppose que l'équilibre des pressions en tout point de la surface est du à l'égalité entre un terme hydrostatique et un terme de Laplace. Dans le cas d'une tension de surface γ d'un liquide de densité ρ et en notant la courbure C ,

l'équilibre s'écrit :

$$\gamma C = \rho g z \quad (\text{D.1})$$

avec z l'ordonnée le long d'un axe vertical, en supposant que la goutte est axisymétrique autour de cet axe (FIGURE D.1 c). En coordonnées cylindriques, la courbure s'écrit aussi :

$$C = -\frac{r_{zz}}{(1+r_z^2)^{\frac{3}{2}}} + \frac{1}{r(1+r_z^2)^{\frac{1}{2}}} \quad (\text{D.2})$$

$$\text{avec } r_{zz} = \frac{dr}{dz} \quad \text{et} \quad r_z^2 = \frac{d^2r}{dz^2}. \quad (\text{D.3})$$

Le remplacement de C dans l'égalité D.2 permet de résoudre l'équation et de comparer le résultat à l'observation en traitant la tension de surface comme un paramètre ajustable. Dans le cas de deux liquides non miscibles, il suffit de remplacer ρ par la différence de leur densité. Cette méthode fournit une précision satisfaisante de l'ordre de 1%.

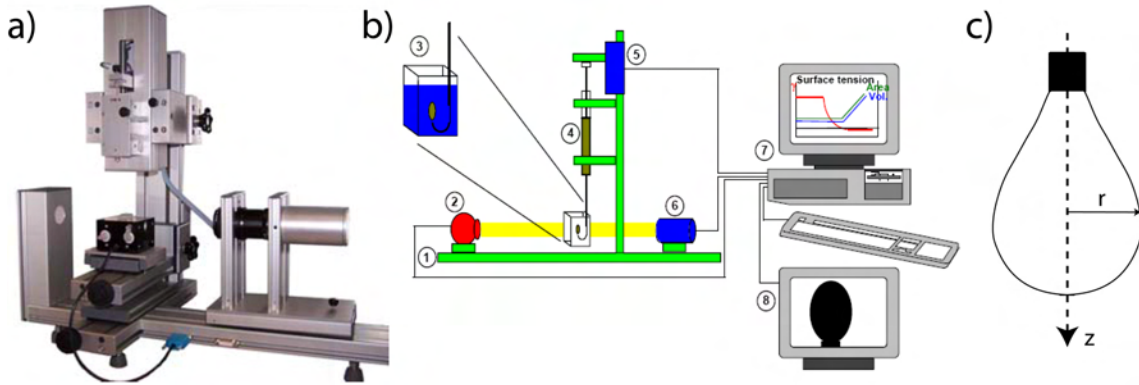


FIGURE D.1 – Principe de fonctionnement de la mesure d'une tension de surface par la méthode de la goutte pendante. a) Photographie du tensiomètre utilisé, le Tracker-STD de Teclis. b) Schéma de description de la mesure de tension de surface dans le cas d'une goutte de liquide immergée dans un liquide plus dense. Les principaux éléments sont : 1) banc optique ; 2) source lumineuse ; 3) cuvette contenant la phase en contact avec la goutte ; 4) seringue alimentant la goutte ; 5) moteur contrôlant la seringue ; 6) caméra CCD sur laquelle est projetée l'ombre de la goutte ; 7) interface informatique ; 8) analyse de la forme de la goutte à l'écran. Extrait de la documentation de l'appareil. c) Goutte pendante axisymétrique et les coordonnées cylindriques associées.

D.2 Mesure d'angle de contact

Un angles de contact étant une grandeur géométrique, sa méthode de mesure est en général liée à leur valeur.

Pour de faibles valeurs (quelques degrés), la technique fournissant la meilleure précision (moins de $0,1^\circ$) est d'utiliser la microscopie à contraste interférentiel en réflexion. La lumière traversante étant réfléchiée par un substrat réfléchissant, ce sont des franges d'interférences qui apparaissent. L'angle est indirectement obtenu, par analyse de l'écartement entre les rayures.

Dans le cas du système que nous avons étudié (goutte d'AzoTAB plongée dans de l'acide oléique et reposant sur du verre), les angles sont relativement grands (d'au moins 100°), c'est

par simple analyse du contour de la goutte que nous avons travaillé. Le liquide est introduit dans une seringue puis elle est disposée dans un pousse-seringue (Harvard Apparatus). Dans le cas d'une solution d'AzoTAB ayant subi une illumination UV, l'ensemble est protégé par du papier aluminium. Un tube est connecté à l'extrémité de la seringue, son diamètre final est d'environ 1 mm. A la suite de sa préparation, le substrat est disposé au fond d'une boîte de Petri de 5 cm de diamètre. L'acide oléique est ensuite ajouté par dessus, de manière à avoir une hauteur de liquide de 5 mm environ. La phase aqueuse est injectée à l'extrémité du tube. Celui-ci est partiellement introduit dans l'huile, en le maintenant perpendiculairement avec une pince, pour qu'une hauteur d'environ 3 mm existe entre lui et la surface. Le volume de la goutte est progressivement augmenté à une vitesse de $3 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$. L'observation de sa forme est faite à l'aide d'une caméra ayant une focale d'environ 5 cm (GE-5, Aigo). Une fois en contact avec le substrat, elle est gonflée jusqu'à atteindre un diamètre d'environ 2 mm. Son volume est ensuite diminué avec un même débit, jusqu'à ce qu'il n'y ait plus contact. L'analyse géométrique est réalisée sur plusieurs clichés avec le logiciel ImageJ. Ce logiciel permet de tracer des tangentes au niveau de la ligne triple et d'en déduire l'angle les séparant. Les valeurs des angles d'avancée et de reculée sont déterminées après moyenne sur 10 mesures à travers plusieurs expériences. Cette technique a l'intérêt d'être facilement mise en oeuvre, mais fournit une précision faible à $\pm 1^\circ$, due aux incertitudes sur la focalisation de l'image et le repérage des tangentes.

Du fait de ce manque de précision, pour les angles inférieurs à 40° tout en étant trop grands pour fournir des interférences, il est conseillé de travailler avec la technique de réflectométrie optique de la goutte "miroir" [31]. Cette méthode consiste à disposer la goutte sur une surface réfléchissante et à l'éclairer avec un faisceau laser perpendiculaire au substrat. La goutte jouant le rôle de lentille, le faisceau réfléchi est un cône, dont l'inclinaison est directement reliée à l'angle de contact. La précision est de l'ordre de $0,1^\circ$.

Bibliographie

- [1] H. BOUAS-LAURENT et H. DÜRR. Organic photochromism. *Pure Appl. Chem.*, **73**, 639–665 (2001).
- [2] Y. HIRSHBERG. Photochromie dans la série de la bianthrone. *Compt. Rend. Acad. Sci.*, **231**, 903–904 (1950).
- [3] F. ERCOLE, T. P. DAVIS et R. A. EVANS. Photo-responsive systems and biomaterials : photochromic polymers, light-triggered self-assembly, surface modification, fluorescence modulation and beyond. *Polym. Chem.*, **1**, 37–54 (2010).
- [4] J. C. CRANO, T. FLOOD, D. KNOWLES, A. KUMAR et B. Van GEMERT. Photochromic compounds : Chemistry and application in ophthalmic lenses. *Pure Appl. Chem.*, **68**, 1395–1398 (1996).
- [5] B. L. FERGINGA, R. A. van DELDEN, N. KOUMURA et E. M. GEERTSEMA. Chiroptical molecular switches. *Chem. Rev.*, **5**, 1789–1816 (2000).
- [6] A. FISSI, O. PIERONI, G. RUGGERI et F. CIARDELLI. Photoresponsive polymers. Photo-modulation of the macromolecular structure in poly(L-lysine) containing spiropyran units. *Macromol.*, **28**, 302–309 (1995).
- [7] D. PIJPER, M. G. M. JONGEJAN, A. MEETSMA et B. L. FERGINGA. Light-controlled supra-molecular helicity of a liquid crystalline phase using a helical polymer functionalized with a single chiroptical molecular switch. *J. Am. Chem. Soc.*, **130**, 4541–4552 (2008).
- [8] G. BERKOVIC, V. KRONGAUZ et V. WEISS. Spiroyrans and spirooxazines for memories and switches. *Chem. Rev.*, **100**, 1741–1753 (2000).
- [9] H. JIANG, S. KELCH et A. LENDLEIN. Polymers move in response to light. *Adv. Mater.*, **18**, 1471–1475 (2006).
- [10] C. J. BARRET, J.-I. MAMIYA, K. G. YAGER et T. IKEDA. Photo-mechanical effects in azobenzene-containing soft materials. *Soft Matter*, **3**, 1249–1261 (2007).
- [11] Y. YU, M. NAKANO et T. IKEDA. Directed bending of a polymer film by light. *Nature*, **425**, 145 (2003).
- [12] Y. LI, Y. HE, X. TONG et X. WANG. Photoinduced deformation of amphiphilic azo polymer colloidal spheres. *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 2402–2403 (2005).
- [13] K. UCHIDA, N. IZUMI, S. SUKATA, Y. KOJIMA, S. NAKAMURA et M. IRIE. Photoinduced reversible formation of microfibrils on a photochromic diarylethene microcrystalline surface. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **45**, 6470–6473 (2006).
- [14] A. M. KETNER, R. KUMAR, T. S. DAVIES, P. W. ELDER et S. R. RAGHAVAN. A simple class of photorheological fluids : surfactant solutions with viscosity tunable by light. *J. Am. Chem. Soc.*, **129**, 1553–1559 (2007).

- [15] A. MAMADA, T. TANAKA, D. KUNGWATCHAKUN et M. IRIE. Photoinduced phase transition of gels. *Macromolecules*, **23**, 1517–1519 (1990).
- [16] G. MAYER et A. HECKEL. Biologically active molecules with a "light switch". *Angew. Chem. Int. Ed.*, **45**, 4900–4921 (2006).
- [17] S. SHINKAI, T. NAKAJI, T. OGAWA, K. SHIGEMATSU et O. MANABE. Photoresponsive crown ethers. 2. Photocontrol of ion extraction and ion transport by a bis(crown ether) with a butterfly-like motion. *J. Am. Chem. Soc.*, **103**, 111–115 (1981).
- [18] S. YAGAI, T. KARATSU et A. KITAMURA. Photocontrollable self-assembly. *Chem. Eur. J.*, **11**, 4054–4063 (2005).
- [19] M. S. VOLLMER, T. D. CLARK, C. STEINEM et M. R. GHADIRI. Photoswitchable hydrogen-bonding in self-organized cylindrical peptide systems. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **38**, 1598–1601 (1999).
- [20] B. SONG, Y. HU et J. ZHAO. A single-component photo-responsive fluid based on a gemini surfactant with an azobenzene spacer. *J. Colloid Interface Sci.*, **333**, 820–822 (2009).
- [21] D. G. WHITTEN, L. CHEN, H. CRISTINA GEIGER, J. PERLSTEIN et X. SONG. Self-assembly of aromatic-functionalized amphiphiles : The role and consequences of aromatic-aromatic noncovalent interactions in building supramolecular aggregates and novel assemblies. *J. Phys. Chem. B*, **102**, 10098–10111 (1998).
- [22] F. ZHANG, A. ZARRINE-AFSAR, M. S. AL-ABDUL-WAHID, R. S. PROSSER, A. R. DAVIDSON et G. A. WOOLLEY. Structure-based approach to the photocontrol of protein folding. *J. Am. Chem. Soc.*, **131**, 2283–2289 (2009).
- [23] C. RENNER et L. MORODER. Azobenzene as conformational switch in model peptides. *ChemBioChem*, **7**, 868–878 (2006).
- [24] U. KRAUSS, T. DREPPER et K.-E. JAEGER. Enlightened enzymes : Strategies to create novel photoresponsive proteins. *Chem. Eur. J.*, **17**, 2552–2560 (2011).
- [25] B. SCHIERLING, A.-J. NOËL, W. WENDE, L. THI HIEN, E. VOLKOV, E. KUBAREVA, T. ORETSKAYA, M. KOKKINIDIS, A. RÖMPP, B. SPENGLER et A. PINGOUD. Controlling the enzymatic activity of a restriction enzyme by light. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 1361–1366 (2010).
- [26] U. KUSEBAUCH, S. A. CADAMURO, H.-J. MUSIOL, M. O. LENZ, J. WACHTVEITL, L. MORODER et C. RENNER. Photocontrolled folding and unfolding of a collagen triple helix. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **45**, 7015–7018 (2006).
- [27] P. GOROSTIZA et E. Y. ISACOFF. Optical switches for remote and noninvasive control of cell signaling. *Science*, **322**, 395–399 (2008).
- [28] M. R. BANGHART, A. MOUROT, D. L. FORTIN, J. Z. YAO, R. H. KRAMER et D. TRAUNER. Photochromic blockers of voltage-gated potassium channels. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **48**, 9097–9101 (2009).
- [29] G. MILLER. Optogenetics : Shining new light on neural circuits. *Science*, **314**, 1674–1676 (2006).
- [30] E. GUYON, J.-P. HULIN et L. PETIT. Hydrodynamique physique. CNRS Editions, 2001.
- [31] P.-G. de GENNES, F. BROCHARD-WYART et D. QUÉRÉ. Gouttes, bulles, perles et ondes. Belin, 2005.

- [32] F. XIA et L. JIANG. Bio-inspired, smart, multiscale interfacial materials. *Adv. Mater.*, **20**, 2842–2858 (2008).
- [33] S. SHINKAI, K. MATSUO, A. HARADA et O. MANABE. Photocontrol of micellar catalyses. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. II*, 1261–1265 (1982).
- [34] T. HAYASHITA, T. KUROSAWA, T. MIYATA, K. TANAKA et M. IGAWA. Effect of structural variation within cationic azo-surfactant upon photoresponsive function in aqueous solution. *Colloid Polym. Sci.*, **272**, 1611–1619 (1994).
- [35] J. EASTOE et A. VESPERINAS. Self-assembly of light-sensitive surfactants. *Soft Matter*, **1**, 338–347 (2005).
- [36] X. LIU et N. L. ABBOTT. Spatial and temporal control of surfactant systems. *J. Colloid Interface Sci.*, **339**, 1–18 (2009).
- [37] K. FAN, M. BRADLEY, B. VINCENT et C. F. J. FAUL. Effect of chain length on the interaction between modified organic salts containing hydrocarbon chains and poly(N-isopropylacrylamide-co-acrylic acid) microgel particles. *Langmuir*, **27**, 4362–4370 (2011).
- [38] Y. ORIHARA, A. MATSUMURA, Y. SAITO, N. OGAWA, T. SAJI, A. YAMAGUCHI, H. SAKAI et M. ABE. Reversible release control of an oily substance using photoresponsive micelles. *Langmuir*, **17**, 6072–6076 (2001).
- [39] H. SAKAI, Y. ORIHARA, H. KODASHIMA, A. MATSUMURA, T. OHKUBO, K. TSUCHIYA et M. ABE. Photoinduced reversible change of fluid viscosity. *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 13454–13455 (2005).
- [40] R. F. TABOR, R. J. OAKLEY, J. EASTOE, C. F. J. FAUL, I. GRILLO et R. K. HEENAN. Reversible light-induced critical separation. *Soft Matter*, **5**, 78–80 (2009).
- [41] A.-L. M. LE NY et C. T. JR. LEE. Photoreversible DNA condensation using light-responsive surfactants. *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 6400–6408 (2006).
- [42] T. SHANG, K. A. SMITH et T. A. HATTON. Photoresponsive surfactants exhibiting unusually large, reversible surface tension changes under varying illumination conditions. *Langmuir*, **19**, 10764–10773 (2003).
- [43] B. A. CICCARELLI, T. A. HATTON et K. A. SMITH. Dynamic surface tension behaviour in a photoresponsive surfactant system. *Langmuir*, **23**, 4753–4764 (2007).
- [44] H. SAKAI, H. EBANA, K. SAKAI, K. TSUCHIYA, T. OHKUBO et M. ABE. Photoisomerization of spiropyran-modified cationic surfactants. *J. Colloid Interface Sci.*, **316**, 1027–1030 (2007).
- [45] J. Y. SHIN et N. L. ABBOTT. Using light to control dynamic surface tensions of aqueous solutions of water soluble surfactants. *Langmuir*, **15**, 4404–4410 (1999).
- [46] M. BONINI, D. BERTI, J. M. DI MEGLIO, M. ALMGREN, J. TEIXEIRA et P. BAGLIONI. Surfactant aggregates hosting a photoresponsive amphiphile : structure and photoinduced conformational changes. *Soft Matter*, **1**, 444–454 (2005).
- [47] J. EASTOE, M. SANCHEZ DOMINGUEZ, P. WYATT, A. BEEBY et R. K. HEENAN. Properties of a stilbene-containing gemini photosurfactant : Light-triggered changes in surface tension and aggregation. *Langmuir*, **18**, 7837–7844 (2002).
- [48] J. EASTOE, M. SANCHEZ DOMINGUES, P. WYATT et A. J. ORR-EWING. UV causes dramatic changes in aggregation with mixtures of photoactive and inert surfactants. *Langmuir*, **20**, 6120–6126 (2004).

- [49] B. SONG, J. ZHAO, B. WANG et R. JIANG. Synthesis and self-assembly of new light-sensitive gemini surfactants containing an azobenzene group. *Colloids and Surfaces A : Physicochem. Eng. Aspects*, **352**, 24–30 (2009).
- [50] C. T. JR. LEE, K. A. SMITH et T. A. HATTON. Photoreversible viscosity changes and gelation in mixtures of hydrophobically modified polyelectrolytes and photosensitive surfactants. *Macromolecules*, **37**, 5397–5405 (2004).
- [51] C. T. JR. LEE, K. A. SMITH et T. A. HATTON. Photocontrol of protein folding : The interaction of photosensitive surfactants with bovine serum albumin. *Biochemistry*, **44**, 524–536 (2005).
- [52] C. T. JR. LEE, K. A. SMITH et T. A. HATTON. Small-angle neutron scattering study of the micellization of photosensitive surfactants in solution and in the presence of a hydrophobically modified polyelectrolyte. *Langmuir*, **25**, 13784–13794 (2009).
- [53] S.-C. WANG et C. T. JR. LEE. Protein secondary structure controlled with light and photoresponsive surfactants. *J. Phys. Chem. B*, **110**, 16117–16123 (2006).
- [54] S.-C. WANG et C. T. JR. LEE. Enhanced enzymatic activity through photoreversible conformational changes. *Biochemistry*, **46**, 14557–14566 (2007).
- [55] D. FAURE, J. GRAVIER, T. LABROT, B. DESBAT, R. ODA et D. M. BASSANI. Photoinduced morphism of gemini surfactant aggregates. *Chem. Comm.*, 1167–1169 (2005).
- [56] R. K. AHMAD, D. FAURE, P. GODDARD, R. ODA et D. M. BASSANI. Photosensitive vesicles from a cis-azobenzene gemini surfactant show high photoresponse. *Org. Biomol. Chem.*, **7**, 3173–3178 (2009).
- [57] J. EASTOE, M. SANCHEZ DOMINGUEZ, H. CUMBER et P. WYATT. Light-sensitive microemulsions. *Langmuir*, **20**, 1120–1125 (2004).
- [58] N. MAKITA, M. ULLNER et K. YOSHIKAWA. Conformational change of giant DNA with added salt as revealed by single molecular observation. *Macromolecules*, **39**, 6200–6206 (2006).
- [59] G. S. MANNING. Limiting laws and counterion condensation in polyelectrolyte solutions I. Colligative properties. *J. Chem. Phys.*, **51**, 924–933 (1969).
- [60] F. OOSAWA. Polyelectrolytes. New York, 1971.
- [61] A. ZINCHENKO, D. BAIGL et K. YOSHIKAWA. Polymeric nanostructures and their applications. American Scientific Publishers, 2007.
- [62] V. V. VASILEVSKAYA, A. R. KHOKHLOV, S. KIDOAKI et K. YOSHIKAWA. Structure of collapsed persistent macromolecule : Toroid vs. spherical globule. *Biopolymers*, **41**, 51–60 (1997).
- [63] P. G. ARSCOTT, A.-Z. LI et V. A. BLOOMFIELD. Condensation of DNA by trivalent cations. 1. Effects of DNA length and topology on the size and shape of condensed particles. *Biopolymers*, **30**, 619–630 (1990).
- [64] K. YOSHIKAWA, Y. YOSHIKAWA et T. KANBE. All-or-none folding transition in giant mammalian DNA. *Chem. Phys. Lett.*, **354**, 354–359 (2002).
- [65] L. C. GOSULE et J. A. SCHELLMAN. Compact form of DNA induced by spermidine. *Nature*, **259**, 333–335 (1976).

- [66] N. V. HUD et K. H. DOWNING. Cryoelectron microscopy of λ phage DNA condensates in vitreous ice : The fine structure of DNA toroids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 14925–14930 (2001).
- [67] M. E. CERRITELLI, N. Q. CHENG, A. H. ROSENBERG, C. E. MCPHERSON, F. P. BOOY et A. C. STEVEN. Encapsidated conformation of bacteriophage T7 DNA. *Cell*, **91**, 271 (1997).
- [68] A. A. ZINCHENKO, F. LUCKEL et K. YOSHIKAWA. Transcription of giant DNA complexed with cationic nanoparticles as a simple model of chromatin. *Biophys. J.*, **92**, 1318–1325 (2007).
- [69] F. THOMA, T. KOLLER et A. KLUG. Involvement of histone-H1 in the organization of the nucleosome and of the salt-dependent superstructures of chromatin. *J. Cell. Biol.*, **83**, 403–427 (1979).
- [70] M. GEOFFROY, D. FAURE, R. ODA, D. M. BASSANI et D. BAIGL. Photocontrol of genomic DNA conformation by using a photosensitive gemini surfactant : Binding affinity versus reversibility. *ChemBioChem*, **9**, 2382–2385 (2008).
- [71] A. A. ZINCHENKO, K. YOSHIKAWA et D. BAIGL. Compaction of single-chain DNA by histone-inspired nanoparticles. *Phys. Rev. Lett.*, **95**, 228101 (2005).
- [72] N. MIYAZAWA, T. SAKAUE, K. YOSHIKAWA et R. ZANA. Rings-on-a-string chain structure in DNA. *J. Chem. Phys.*, **122**, 044902 (2005).
- [73] A. ESTÉVEZ-TORRES et D. BAIGL. DNA compaction : fundamentals and applications. *Soft Matter*, *in press*, (2011).
- [74] K. YOSHIKAWA, M. TAKAHASHI, V. V. VASILEVSKAYA et A. R. KHOKHLOV. Large discrete transition in a single DNA molecule appears continuous in the ensemble. *Phys. Rev. Lett.*, **76**, 3029–3031 (1996).
- [75] D. K. CHATTORAJ, L. C. GOSULE et J. A. SCHELLMAN. DNA condensation with polyamines. 2. Electron-microscopic studies. *J. Mol. Biol.*, **121**, 327–337 (1978).
- [76] R. W. WILSON et V. A. BLOOMFIELD. Counterion-induced condensation of deoxyribonucleic acid. A light-scattering study. *Biochemistry*, **18**, 2192–2196 (1979).
- [77] D. BAIGL et K. YOSHIKAWA. Dielectric control of counterion-induced single-chain folding transition of DNA. *Biophys. J.*, **88**, 3486–3493 (2005).
- [78] J. WIDOM et R. L. BALDWIN. Monomolecular condensation of λ -DNA induced by cobalt hexammine. *Biopolymers*, **22**, 1595–1620 (1983).
- [79] R. AHMAD, M. NAOUI, J. F. NEAULT, S. DIAMANTOGLOU et H. A. TAJMIR-RIAHI. An FTIR spectroscopic study of calf-thymus DNA complexation with Al(III) and Ga(III) cations. *J. Biomol. Struct. Dyn.*, **13**, 795–802 (1996).
- [80] H. ARAKAWA, R. AHMAD, M. NAOUI et H. A. TAJMIR-RIAHI. A comparative study of calf thymus DNA binding to Cr(III) and Cr(VI) ions - Evidence for the guanine N-7-chromium-phosphate chelate formation. *J. Biol. Chem.*, **275**, 10150–10153 (2000).
- [81] H. A. TAJMIR-RIAHI, M. NAOUI et R. AHMAD. The effect of Cu²⁺ and Pb²⁺ on the solution structure of calf thymus DNA - DNA condensation and denaturation studied by Fourier-transform IR difference spectroscopy. *Biopolymers*, **33**, 1819–1827 (1993).

- [82] Y. YAMASAKI et K. YOSHIKAWA. Higher Order Structure of DNA Controlled by the Redox State of $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$. *J. Am. Chem. Soc.*, **119**, 10573–10578 (1997).
- [83] H. A. TAJMIR-RIAHI, R. AHMAD, M. NAOUI et H. A. TAJMIR-RIAHI. Interaction of calf-thymus DNA with trivalent La, Eu, and Tb ions - Metal-ion binding, DNA condensation and structural features. *J. Biomol. Struct. Dyn.*, **10**, 865–877 (1993).
- [84] T. IWAKI, T. SAITO et K. YOSHIKAWA. How are small ions involved in the compaction of DNA molecules. *Colloids and Surfaces B*, **56**, 126–133 (2007).
- [85] T. AKITAYA, A. SENO, T. NAKAI, N. HAZEMOTO, S. MURATA et K. YOSHIKAWA. Weak interaction induces an on/off switch, whereas strong interaction causes gradual change : Folding transition of a long duplex DNA chain by poly-L-lysine. *Biomacromolecules*, **8**, 273–278 (2007).
- [86] U. K. LAEMMLI. Characterization of DNA Condensates Induced by Poly(ethylene oxide) and Polylysine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **72**, 4288–4292 (1975).
- [87] R. S. DIAS, A. A. C. C. PAIS et M. G. MIGUEL. Modeling of DNA compaction by polycations. *J. Chem. Phys.*, **119**, 8150–8157 (2003).
- [88] A. A. ZINCHENKO, T. SAKAUE, S. ARAKI, K. YOSHIKAWA et D. BAIGL. Single-chain compaction of long duplex DNA by cationic nanoparticles : modes of interaction and comparison with chromatin. *J. Phys. Chem. B*, **111**, 3019–3031 (2007).
- [89] W. CHEN, N. J. TURRO et D. A. TOMALIA. Using ethidium bromide to probe the interactions between DNA and dendrimers. *Langmuir*, **16**, 15–19 (2000).
- [90] K. HAYAKAWA, J. P. SANTERRE et J. C. T. KWAK. The binding of cationic surfactant by DNA. *Biophys. Chem.*, **17**, 175–181 (1983).
- [91] S. M. MEL'NIKOV, V. G. SERGEYEV et K. YOSHIKAWA. Discrete coil-globule transition of large DNA induced by cationic surfactant. *J. Am. Chem. Soc.*, **117**, 2401–2408 (1995).
- [92] R. DIAS, S. MEL'NIKOV, B. LINDMAN et M. G. MIGUEL. DNA phase behavior in the presence of oppositely charged surfactants. *Langmuir*, **16**, 9577–9583 (2000).
- [93] S. M. MEL'NIKOV, M. O. KHAN, B. LINDMAN et B. JÖNSSON. Phase behavior of single DNA in mixed solvents. *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 1130–1136 (1999).
- [94] K. B. ROY, T. ANTONY, A. SAXENA et H. B. BOHIDAR. Ethanol-induced condensation of calf thymus DNA studied by laser light scattering. *J. Phys. Chem. B*, **103**, 5117–5121 (1999).
- [95] V. V. VASILEVSKAYA, A. R. KHOKHLOV, Y. MATSUZAWA et K. YOSHIKAWA. Collapse of single DNA molecule in poly(ethylene glycol) solutions. *J. Chem. Phys.*, **102**, 6595–6602 (1995).
- [96] U. K. LAEMMLI, J. R. PAULSON et V. HITCHINS. Maturation of the head of bacteriophage T4. V. A possible DNA packaging mechanism : in vitro cleavage of the head proteins and the structure of the core of the polyhead. *J. Supramol. Struct.*, **2**, 276–301 (1974).
- [97] H. MURAYAMA et K. YOSHIKAWA. Thermodynamics of the collapsing phase transition in a single duplex DNA molecule. *J. Phys. Chem. B*, **103**, 10517–10523 (1999).
- [98] T. SAITO, T. IWAKI et K. YOSHIKAWA. Why is the compact state of DNA preferred at higher temperature? Folding transition of a single DNA chain in the presence of a multivalent cation. *Europhys. Lett.*, **71**, 304–310 (2005).

- [99] H. MAYAMA, T. IWAKI et K. YOSHIKAWA. Thermodynamics in the folding phase-transition of single T4 DNA molecules in poly(ethylene glycol) solution. *Chem. Phys. Lett.*, **318**, 113–117 (2000).
- [100] N. MAKITA et K. YOSHIKAWA. Proton concentration (pH) switches the higher-order structure of DNA in the presence of spermine. *Biophys. Chem.*, **99**, 43–53 (2002).
- [101] N. MAKITA et K. YOSHIKAWA. ATP/ADP switches the higher-order structure of DNA in the presence of spermidine. *FEBS Lett.*, **460**, 333–337 (1999).
- [102] A. DIGUET et D. BAIGL. Control of the compaction/unfolding transition of genomic DNA by the addition/disruption of lipid assemblies. *Langmuir*, **24**, 10604–10607 (2008).
- [103] M. SOLLOGOUB, S. GUIEU, M. GEOFFROY, A. YAMADA, A. ESTÉVEZ-TORRES, K. YOSHIKAWA et D. BAIGL. Photocontrol of single-chain DNA conformation in cell-mimicking microcompartments. *ChemBioChem*, **9**, 1201–1206 (2008).
- [104] A.-L. M. LE NY et C. T. JR. LEE. Conformation and dynamics of DNA molecules during photoreversible condensation. *Biophys. Chem.*, **142**, 76–83 (2009).
- [105] Y.-C. LIU, A.-L. M. LE NY, J. SCHMIDT, Y. TALMON, B. F. CHMELKA et C. T. JR. LEE. Photo-assisted gene delivery using light-responsive cationic vesicles. *Langmuir*, **25**, 5713–5724 (2009).
- [106] A. BIRD. Perceptions of epigenetics. *Nature*, **447**, 396–398 (2007).
- [107] E. BALLEZA, L. N. LOPEZ-BOJORQUEZ, A. MARTINEZ-ANTONIO, O. RESENDIS-ANTONIO, I. LOZADA-CHAVEZ, Y. I. BALDERAS-MARTINEZ, S. ENCARNACION et J. COLLADO-VIDES. Regulation by transcription factors in bacteria : beyond description. *FEMS Microbiol. Rev.*, **33**, 133–151 (2009).
- [108] B. WASYLYK, G. THEVENIN, P. OUDET et P. CHAMBON. Transcription of in vitro assembled chromatin by Escherichia coli RNA polymerase. *J. Mol. Biol.*, **128**, 411–440 (1979).
- [109] D. F. BROWNING et S. J. W. BUSHY. The regulation of bacterial transcription initiation. *Nat. Rev. Microbiol.*, **2**, 57–65 (2004).
- [110] S. C. DILLON et C. J. DORMAN. Bacterial nucleoid-associated proteins, nucleoid structure and gene expression. *Nat. Rev. Microbiol.*, **8**, 185–195 (2010).
- [111] I. BAEZA, P. GARIGLIO, L. M. RANGEL, P. CHAVEZ, L. CERVANTES, C. ARGUELLO, C. WONG et C. MONTANEZ. Electron microscopy and biochemical properties of polyamine-compacted DNA. *Biochemistry*, **26**, 6387–6392 (1987).
- [112] K. TSUMOTO, F. LUCKEL et K. YOSHIKAWA. Giant DNA molecules exhibit on/off switching of transcriptional activity through conformational transition. *Biophys. Chem.*, **106**, 23–29 (2003).
- [113] A. TSUJI et K. YOSHIKAWA. ON-OFF switching of transcriptional activity of large DNA through a conformational transition in cooperation with phospholipid membrane. *J. Am. Chem. Soc.*, **132**, 12464–12471 (2010).
- [114] A. DIGUET, N. K. MANI, M. GEOFFROY, M. SOLLOGOUB et D. BAIGL. Photosensitive surfactants with various hydrophobic tail lengths for the photocontrol of genomic DNA conformation with improved efficiency. *Chem. Eur. J.*, **16**, 11890–11896 (2010).
- [115] A. CHOTIPONG, J. F. SCAMEHORN, T. RIRKSOMBON, S. CHAVADEJ et P. SUPAPHOL. Removal of solvent-based ink from printed surface of high-density polyethylene bottles by

- alkyltrimethylammonium bromides : Effects of pH, temperature, and salinity. *Colloids Surf., A*, **297**, 163–171 (2007).
- [116] P. HABERFIELD. Phototropic molecules. 1. Phase transfer as a method for detecting transient species. *J. Am. Chem. Soc.*, **109**, 6177–6178 (1987).
- [117] M. EMOND, T. Le SAUX, S. MAURIN, J.-B. BAUDIN, R. PLASSON et L. JULLIEN. 2-Hydroxyazobenzenes to tailor pH pulses and oscillations with light. *Chem. Eur. J.*, **16**, 8822–8831 (2010).
- [118] M. EMOND, J. SUN, J. GRÉGOIRE, S. MAURIN, C. TRIBET et L. JULLIEN. Photoinduced pH drops in water. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **13**, 6493–6499 (2011).
- [119] A. ESTÉVEZ-TORRES, C. CROZATIER, A. DIGUET, T. HARA, H. SAITO, K. YOSHIKAWA et D. BAIGL. Sequence-independent and reversible photocontrol of transcription/expression systems using a photosensitive nucleic acid binder. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 12219–12223 (2009).
- [120] J. PELTA, F. LIVOLANT et J.-L. SIKORAV. DNA aggregation induced by polyamines and cobalthexamine. *J. Biol. Chem.*, **271**, 5656–5662 (1996).
- [121] Y. T. SATO, T. HAMADA, A. YAMADA, T. KISHIDA, O. MZADA et K. YOSHIKAWA. Folding transition into a loosely collapsed state in plasmid DNA as revealed by single-molecule observation. *FEBS Lett.*, **579**, 3095–3099 (2005).
- [122] Y. SHIMIZU, A. INOUE, Y. TOMARI, T. SUZUKI, T. YOKOGAWA, K. NISHIKAWA et T. UEDA. Cell-free translation reconstituted with purified components. *Nat. Biotechnol.*, **19**, 751–755 (2001).
- [123] P. D. SENTER et C. J. SPRINGER. Selective activation of anticancer prodrugs by monoclonal antibody-enzyme conjugates. *Adv. Drug Delivery Rev.*, **53**, 247–264 (2001).
- [124] M. L. RODRIGUES, P. CARTER, C. WIRTH, S. MULLINS, A. LEE et B. K. BLACKBURN. Synthesis and β -lactamase-mediated activation of a cephalosporin-taxol prodrug. *Chem. Biol.*, **2**, 223–227 (1995).
- [125] C. O'CALLAGHAN, A. MORRIS, S. M. KIRBY et A. H. SHINGLER. Novel method for detection of β -lactamases by using a chromogenic cephalosporin substrate. *Antimicrob. Ag. Chemother.*, **1**, 283–288 (1972).
- [126] F. HEFFRON, B. J. MCCARTHY, H. OHTSUBO et E. OHTSUBO. DNA sequence analysis of the transposon Tn3 : Three genes and three sites involved in transposition of Tn3. *Cell*, **18**, 1153–1163 (1979).
- [127] G. C. R. ELLIS-DAVIES. Caged compounds : photorelease technology for control of cellular chemistry and physiology. *Nat. Methods*, **4**, 619–628 (2007).
- [128] H.-M. LEE, D. R. LARSON et D. S. LAWRENCE. Illuminating the chemistry of life : Design, synthesis, and applications of "caged" and related photoresponsive compounds. *ACS Chem. Biol.*, **4**, 409–427 (2009).
- [129] J.N. ISRAELACHVILI. Intermolecular and surface forces. Academic Press, 1985.
- [130] A. D. BANGHAM et R. W. HORNE. Negative staining of phospholipids and their structural modification by surface active agents as observed in the electron microscope. *J. Mol. Biol.*, **8**, 660–668 (1964).

- [131] F. M. MENGER, M. E. CHLEBOWSKI, A. L. GALLOWAY, H. LU, V. A. SEREDYUK, J. L. SORRELLS et H. ZHANG. A tribute to the phospholipid. *Langmuir*, **21**, 10336–10341 (2005).
- [132] M. P. SHEETZ et S. I. CHAN. Effect of sonication on structure of lecithin bilayers. *Biochemistry*, **11**, 4573–4581 (1972).
- [133] J. PEREIRA-LACHATAIGNERAI, R. PONS, P. PANIZZA, L. COURBIN, J. ROUCH et O. LOPEZ. Study and formation of vesicle systems with low polydispersity index by ultrasound method. *Chem. Phys. Lipids*, **140**, 88–97 (2006).
- [134] L. D. MAYER, M. J. HOPE et P. R. CULLIS. Vesicles of variable sizes produced by a rapid extrusion procedure. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.*, **858**, 161–168 (1986).
- [135] P. WALDE, K. COSENTINO, H. ENGEL et P. STANO. Giant vesicles : Preparations and applications. *ChemBioChem*, **11**, 848–865 (2010).
- [136] J. P. REEVES et R. M. DOWBEN. Formation and properties of thin-walled phospholipid vesicles. *J. Cell. Physiol.*, **73**, 49–60 (1969).
- [137] K. AKASHI, H. MIYATA et K. Jr. KINOSITA. Preparation of giant liposomes in physiological conditions and their characterization under an optical microscope. *Biophys. J.*, **71**, 3242–3250 (1996).
- [138] N. RODRIGUEZ, F. PINCET et S. CRIBIER. Giant vesicles formed by gentle hydration and electroformation : A comparison by fluorescence microscopy. *Colloids Surf., B*, **42**, 125–130 (2005).
- [139] M. I. ANGELOVA et D. S. DIMITROV. Liposome electroformation. *Faraday Discuss. Chem. Soc.*, **81**, 303–311 (1986).
- [140] M. I. ANGELOVA, S. SOLÉAU, P. MÉLÉARD, J. F. FAUCON et P. BOTHOREL. Preparation of giant vesicles by external AC electric fields. Kinetic and applications. *Prog. Colloid Polym. Sci.*, **89**, 127–131 (1992).
- [141] D. J. ESTES et M. MAYER. Electroformation of giant liposomes from spin-coated films of lipids. *Colloids and Surfaces*, **42**, 115–123 (2005).
- [142] D. DONG, D. BAIGL, Y. CUI, P. SINAY, M. SOLLOGOUB et Y. ZHANG. Amphiphilic bipolar duplex α -cyclodextrine forming vesicles. *Tetrahedron*, **63**, 2973–2977 (2007).
- [143] M. LE BERRE, A. YAMADA, L. RECK, Y. CHEN et D. BAIGL. Electroformation of giant phospholipid vesicles on a silicon substrate : Advantages of controllable surface properties. *Langmuir*, **24**, 2643–2649 (2008).
- [144] Y. OKUMURA, H. ZHANG, T. SUGIYAMA et Y. IWATA. Electroformation of giant vesicles on a non-electroconductive substrate. *J. Am. Chem. Soc.*, **129**, 1490–1491 (2007).
- [145] T. POTT, H. BOUVRAIS et P. MÉLÉARD. Giant unilamellar vesicle formation under physiologically relevant conditions. *Chem. Phys. Lipids*, **154**, 115–119 (2008).
- [146] L. A. BAGATOLLI, T. PARASASSI et E. GRATTON. Giant phospholipid vesicles : comparison among the whole lipid sample characteristics using different preparation methods. A two photon fluorescence microscopy study. *Chem. Phys. Lipids*, **105**, 135–147 (2000).
- [147] M. LE BERRE, A. YAMADA, Yong CHEN et D. BAIGL. Preparation of cell-sized liposomes on silicon : controlling liposome size by surface micro-engineering. *Proc. of microTAS*, **45**, 1613–1615 (2007).

- [148] P. TAYLOR, C. XU, P. D. I. FLETCHER et V. N. PAUNOV. Fabrication of 2D arrays of giant liposomes on solid substrates by microcontact printing. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **5**, 4918–4922 (2003).
- [149] A. YAMADA, T. YAMANAKA, T. HAMADA, M. HASE, K. YOSHIKAWA et D. BAIGL. Spontaneous transfer of phospholipid coated oil-in-oil and water-in-oil micro-droplets through an oil-water interface. *Langmuir*, **22**, 9824–9828 (2006).
- [150] A. YAMADA, M. Le BERRE, K. YOSHIKAWA et D. BAIGL. Spontaneous generation of giant liposomes from oil/water interface. *ChemBioChem*, **8**(18), 2215–2218 (2007).
- [151] E. A. KUBATTA et H. REHAGE. Characterization of giant vesicles formed by phase transfer processes. *Colloid Polym. Sci.*, **287**, 1117–1122 (2009).
- [152] L.-L. PONTANI, J. VAN DER GUCHT, G. SALBREUX, J. HEUVINGH, J.-F. JOANNY et C. SYKES. Reconstitution of an actin cortex inside a liposome. *Biophys. J.*, **96**, 192–198 (2009).
- [153] S. PAUTOT, B. J. FRISKEN et D. A. WEITZ. Engineering asymmetric vesicles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 10718–10721 (2003).
- [154] Y.-C. TAN, K. HETTIARACHCHI, M. SIU, Y.-R. PAN et A. P. LEE. Controlled microfluidic encapsulation of cells, proteins, and microbeads in lipid vesicles. *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 5656–5658 (2006).
- [155] K. FUNAKOSHI, H. SUZUKI et S. TAKEUCHI. Formation of giant lipid vesiclelike compartments from a planar lipid membrane by a pulsed jet flow. *J. Am. Chem. Soc.*, **129**, 12608–12609 (2007).
- [156] J. C. STACHOWIAK, D. L. RICHMOND, T. H. LI, A. P. LIU, S. H. PAREKH et D. A. FLETCHER. Unilamellar vesicle formation and encapsulation by microfluidic jetting. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 4697–4702 (2008).
- [157] J. C. STACHOWIAK, D. L. RICHMOND, T. H. LI, F. BROCHARD-WYART et D. A. FLETCHER. Inkjet formation of unilamellar lipid vesicles for cell-like encapsulation. *Lab Chip*, **9**, 2003–2009 (2009).
- [158] S. OTA, S. YOSHIKAWA et S. TAKEUCHI. Microfluidic formation of monodisperse, cell-sized, and unilamellar vesicles. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **48**, 6533–6537 (2009).
- [159] H. C. SHUM, D. LEE, I. YOON, T. KODGER et D. A. WEITZ. Double emulsion templated monodisperse phospholipid vesicles. *Langmuir*, **24**, 7651–7653 (2008).
- [160] SCHUBER, KICHLER, C. BOECKLER et B. FRISCH. Liposomes : From membrane models to gene therapy. *Pure Appl. Chem.*, **70**, 89–96 (1998).
- [161] Y. YAMASHITA, M. OKA, T. TANAKA et M. YAMAZAKI. A new method for the preparation of giant liposomes in high salt concentrations and growth of protein microcrystals in them. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.*, **1561**, 129–134 (2002).
- [162] A. JESORKA, M. MARKSTRÖM, M. KARLSSON et O. ORWAR. Controlled hydrogel formation in the internal compartment of giant unilamellar vesicles. *J. Phys. Chem. B*, **109**, 14759–14763 (2005).
- [163] K. TAKIGUCHI, A. YAMADA, M. NEGISHI, Y. TANAKA-TAKIGUCHI et K. YOSHIKAWA. Entrapping desired amounts of actin filaments and molecular motor proteins in giant liposomes. *Langmuir*, **24**, 11323–11326 (2008).

- [164] D. MERKLE, N. KAHYA et P. SCHWILLE. Reconstitution and anchoring of cytoskeleton inside giant unilamellar vesicles. *ChemBioChem*, **9**, 2673–2681 (2008).
- [165] A. KARLSSON, R. KARLSSON, M. KALSSON, A. S. CANS, A. STRÖMBERG, F. RYTTSÉN et O. ORWAR. Networks of nanotubes. *Science*, **409**, 150–152 (2001).
- [166] M. DAVIDSON, M. KARLSSON, J. SINCLAIR, K. SOTT et O. ORWAR. Nanotube-vesicle networks with functionalized membranes and interiors. *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 374–378 (2003).
- [167] M. DAVIDSON, P. DOMMERSNES, M. MARKSTRÖM, J.-F. JOANNY, M. KARLSSON et O. ORWAR. Fluid mixing in growing microscale vesicles conjugated by surfactant nanotubes. *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 1251–1257 (2005).
- [168] J. HURTIG et O. ORWAR. Injection and transport of bacteria in nanotube-vesicle networks. *Soft Matter*, **4**, 151–1520 (2008).
- [169] D. STAMOU, C. DUSCHL, E. DELAMARCHE et H. VOGEL. Self-assembled microarrays of attoliter molecular vessels. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **42**, 5580–5583 (2003).
- [170] N. D. KALYANKAR, M. K. SHARMA, S. V. VAIDYA, D. CALHOUN, C. MALDARELLI, A. COUZIS et L. GILCHRIST. Arraying of intact liposomes into chemically functionalized microwells. *Langmuir*, **22**, 5403–5411 (2006).
- [171] S. M. CHRISTENSEN et D. STAMOU. Surface-based lipid vesicle reactor systems : fabrication and applications. *Soft Matter*, **3**, 828–836 (2007).
- [172] P.-Y. BOLINGER, D. STAMOU et H. VOGEL. Integrated nanoreactor systems : Triggering the release and mixing of compounds inside single vesicles. *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 8594–8595 (2004).
- [173] E. EVANS et D. NEEDHAM. Physical properties of surfactant bilayer membranes : thermal transitions, elasticity, rigidity, cohesion, and colloidal interactions. *J. Phys. Chem.*, **91**, 4219–4228 (1987).
- [174] K. OLBRICH, W. RAWICZ, D. NEEDHAM et E. EVANS. Water permeability and mechanical strength of polyunsaturated lipid bilayers. *Biophys. J.*, **79**, 321–327 (2000).
- [175] W. RAWICZ, K. C. OLBRICH, T. MCINTOSH, D. NEEDHAM et E. EVANS. Effect of chain length and unsaturation on elasticity of lipid bilayers. *Biophys. J.*, **79**, 328–339 (2000).
- [176] K. J. TIERNEY, D. E. BLOCK et M. L. LONGO. Elasticity and phase behavior of DPPC membrane modulated by cholesterol, ergosterol, and ethanol. *Biophys. J.*, **89**, 2481–2493 (2005).
- [177] D. NEEDHAM et E. EVANS. Structure and mechanical properties of giant lipid (DMPC) vesicles bilayers from 20°C below to 10°C above the liquid crystal-crystalline phase transition at 24°C. *Biochemistry*, **27**, 8261–8269 (1988).
- [178] P. MÉLÉARD, C. GERBEAUD, T. POTT, L. FERNANDEZ-PUENTE, I. BIVAS, M. D. MITOV, J. DUFOURCQ et P. BOTHOREL. Bending elasticities of model membranes : Influence of temperature and sterol content. *Biophys. J.*, **72**, 2616–2629 (1997).
- [179] L. LIMOZIN, A. ROTH et E. SACKMANN. Microviscoelastic moduli of biomimetic cell envelopes. *Phys. Rev. Lett.*, **95**, 178101 (2005).
- [180] M. HONDA, K. TAKIGUCHI, S. ISHIKAWA et H. HOTANI. Morphogenesis of liposomes encapsulating actin depends on the type of actin-crosslinking. *J. Mol. Biol.*, **287**, 293–300 (1999).

- [181] R. DIMOVA, K. A. RISKE, S. ARANDA, N. BEZLYEPKINA, R. L. KNORR et R. LIPOWSKY. Giant vesicles in electric fields. *Soft Matter*, **3**, 817–827 (2007).
- [182] J. HEUVINGH et S. BONNEAU. Asymmetric oxidation of giant vesicles triggers curvature-associated shape transition and permeabilization. *Biophys. J.*, **97**, 2904–2912 (2009).
- [183] M. OHNO, T. HAMADA, K. TAKIGUCHI et M. HOMMA. Dynamic behavior of giant liposomes at desired osmotic pressures. *Langmuir*, **25**, 11680–11685 (2009).
- [184] D. J. ESTES, S. R. LOPEZ, A. O. FULLER et M. MAYER. Triggering and visualizing the aggregation and fusion of lipid membranes in microfluidic chambers. *Biophys. J.*, **91**, 233–243 (2006).
- [185] A.-S. CANS, N. WITTENBERG, R. KARLSSON, L. SOMBERS, M. KARLSSON, O. ORWAR et A. EWING. Artificial cells : Unique insights into exocytosis using liposomes and liquid nanotubes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 400–404 (2003).
- [186] N. KHALIFAT, N. PUFF, S. BONNEAU, J.-B. FOURNIER et M. I. ANGELOVA. Membrane deformation under local pH gradient : Mimicking mitochondrial cristae dynamics. *Biophys. J.*, **95**, 4924–4933 (2008).
- [187] M. OSAWA, D. E. ANDERSON et H. P. ERICKSON. Reconstitution of contractile FtsZ rings in liposomes. *Science*, **320**, 792–794 (2008).
- [188] A.-S. SMITH, B. G. LORZ, U. SEIFERT et E. SACKMANN. Antagonist-induced deadhesion of specifically adhered vesicles. *Biophys. J.*, **90**, 1064–1080 (2006).
- [189] J. SOLON, P. STREICHER, R. RICHTER, F. BROCHARD-WYART et P. BASSEREAU. Vesicles surfing on a lipid bilayer : Self-induced haptotactic motion. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **103**, 12382–12387 (2006).
- [190] K. SIMONS et E. IKONEN. Functional rafts in cell membranes. *Nature*, **387**, 569–572 (1997).
- [191] T. BAUMGART, S. T. HESS et W. W. WEBB. Imaging coexisting fluid domains in biomembrane models coupling curvature and line tension. *Nature*, **425**, 821–824 (2003).
- [192] S. SEMRAU, T. IDEMA, L. HOLTZER, T. SCHMIDT et C. STORM. Accurate determination of elastic parameters for multicomponent membranes. *Phys. Rev. Lett.*, **100**, 088101 (2008).
- [193] S. L. VEATCH et S. L. KELLER. Separation of liquid phases in giant vesicles of ternary mixtures of phospholipids and cholesterol. *Biophys. J.*, **85**, 3074–3083 (2003).
- [194] S. L. VEATCH et S. L. KELLER. Miscibility phase diagrams of giant vesicles containing sphingomyelin. *Phys. Rev. Lett.*, **94**, 148101 (2005).
- [195] S. L. VEATCH et S. L. KELLER. Organization in lipid membranes containing cholesterol. *Phys. Rev. Lett.*, **89**, 268101 (2002).
- [196] J. KORLACH, P. SCHWILLE, W. W. WEBB et G. W. FEIGENSON. Characterization of lipid bilayer phases by confocal microscopy and fluorescence correlation spectroscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 8461–8466 (1999).
- [197] L. LI et J.-X. CHENG. Coexisting stripe- and patch-shaped domains in giant unilamellar vesicles. *Biochemistry*, **45**, 11819–11826 (2006).
- [198] D. SAEKI, T. HAMADA et K. YOSHIKAWA. Domain-growth kinetics in a cell-sized liposome. *J. Phys. Soc. Jpn.*, **75**, 013602 (2006).
- [199] M. YANAGISAWA, M. IMAI, T. MASUI, S. KOMURA et T. OHTAZ. Growth dynamics of domains in ternary fluid vesicles. *Biophys. J.*, **92**, 115–125 (2007).

- [200] M. D. COLLINS et S. L. KELLER. Tuning lipid mixtures to induce or suppress domain formation across leaflets of unsupported asymmetric bilayers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 124–128 (2008).
- [201] A. C. FORSTER et G. M. CHURCH. Towards synthesis of a minimal cell. *Mol. Syst. Biol.*, **2**, 45 (2006).
- [202] G. MURTAS, Y. KURUMA, P. BIANCHINI, A. DIASPRO et P. L. LUISI. Protein synthesis in liposomes with a minimal set of enzymes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **363**, 12–17 (2007).
- [203] Y. KURUMA, P. STANO, T. UEDA et P. L. LUISI. A synthetic biology approach to the construction of membrane proteins in semi-synthetic minimal cells. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.*, **1788**, 597–574 (2009).
- [204] T. SUNAMI, K. SATO, T. MATSUURA, K. TSUKADA, I. URABE et T. YOMO. Femtoliter compartment in liposomes for in vitro selection of proteins. *Anal. Biochem.*, **357**, 128–136 (2006).
- [205] H. SAITO, Y. KATO, M. LE BERRE, A. YAMADA, T. INOUE, K. YOSHIKAWA et D. BAIGL. Time-resolved tracking of a minimum gene expression system reconstituted in giant liposomes. *ChemBioChem*, **10**, 1640–1643 (2009).
- [206] T. SUNAMI, K. HOSODA, H. SUZUKI, T. MATSUURA et T. YOMO. Cellular compartment model for exploring the effect of the lipidic membrane on the kinetics of encapsulated biochemical reactions. *Langmuir*, **26**, 8544–8551 (2010).
- [207] V. NOIREAUX et A. LIBCHABER. A vesicle bioreactor as a step toward an artificial cell assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **101**, 17669–17674 (2004).
- [208] A. DIGUET, M. Le BERRE, Y. CHEN et D. BAIGL. Preparation of phospholipid multilayer patterns of controlled size and thickness by capillary assembly on a microstructured substrate. *Small*, **5**, 1661–1666 (2009).
- [209] M. TANAKA et E. SACKMANN. Polymer-supported membranes as models of the cell surface. *Nature*, **437**, 656–663 (2005).
- [210] E. SACKMANN. Supported membranes : scientific and practical applications. *Science*, **271**, 43 (1996).
- [211] S. LENHERT, F. BRINKMANN, T. LAUE, S. WALHEIM, C. VANNAHME, S. KLINKHAMMER, M. XU, S. SEKULA1, T. MAPPES, T. SCHIMMEL et H. FUCHS. Lipid multilayer gratings. *Nature Nanotech.*, **5**, 275–279 (2010).
- [212] G. ROBERTS. *Langmuir-Blodgett Films*. Plenum Press, 1990.
- [213] M. Le BERRE, Y. CHEN et D. BAIGL. From convective assembly to Landau-Levich deposition of multilayered phospholipid films of controlled thickness. *Langmuir*, **25**, 2554–2557 (2009).
- [214] J. T. GROVES et S. G. BOXER. Micropattern formation in supported lipid membranes. *Acc. Chem. Res.*, **35**, 149–157 (2002).
- [215] J. T. GROVES, N. ULMAN et S. G. BOXER. Micropatterning fluid lipid bilayers on solid supports. *Science*, **275**, 651–653 (1997).
- [216] C. K. YEE, M. L. AMWEG et A. N. PARIKH. Direct photochemical patterning and refunctionalization of supported phospholipid bilayers. *J. Am. chem. Soc.*, **126**, 13962–13972 (2004).

- [217] R. N. ORTH, M. WU, D. A. HOLOWKA, H. G. CRAIGHEAD et B. A. BAIRD. Mast cell activation on patterned lipid bilayers of subcellular dimensions. *Langmuir*, **19**, 1599–1605 (2003).
- [218] J. SHI, J. CHEN et P. S. CREMER. Sub-100 nm patterning of supported bilayers by nano-shaving lithography. *J. Am. Chem. Soc.*, **130**, 2718–2719 (2008).
- [219] M. GLEICHE, L. F. CHI et H. FUCHS. Nanoscopic channel lattices with controlled anisotropic wetting. *Nature*, **403**, 173–175 (2000).
- [220] X. CHEN, M. HIRTZ, H. FUCHS et L. CHI. Fabrication of gradient mesostructures by Langmuir-Blodgett rotating transfer. *Langmuir*, **23**, 2280–2283 (2007).
- [221] R. D. PINER, J. ZHU, F. XU, S. HONG et C. A. MIRKIN. "Dip-pen" nanolithography. *Science*, **283**, 661–663 (1999).
- [222] S. LENHERT, P. SUN, Y. WANG, H. FUCHS et C. A. MIRKIN. Massively parallel dip-pen nanolithography of heterogeneous supported phospholipid multilayer patterns. *Small*, **3**, 71–75 (2006).
- [223] Y. YIN, Y. LU, B. GATES et Y. XIA. Template-assisted self-assembly : a practical route to complex aggregates of monodispersed colloids with well-defined sizes, shapes, and structures. *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 8718–8729 (2001).
- [224] Y. CUI, M. T. BJORK, J. A. LIDDLE, C. SONNICHSEN, B. BOUSSERT et A. P. ALIVISATOS. Integration of colloidal nanocrystals into lithographically patterned devices. *Nano Lett.*, **4**, 1093–1098 (2004).
- [225] T. KRAUS, L. MALAQUIN, E. DELAMARCHE, H. SCHMID, N. D. SPENCER et H. WOLF. Closing the gap between self-assembly and microsystems using self-assembly, transfer, and integration of particles. *Adv. Mater.*, **17**, 2438–2442 (2005).
- [226] Z. YUAN, D. B. BURCKEL, P. ATANASSOV et H. FAN. Convective self-assembly to deposit supported ultra-thin mesoporous silica films. *J. Mater. Chem.*, **16**, 4637–4641 (2006).
- [227] T. KRAUS, L. MALAQUIN, H. SCHMID, W. RIESS, N. D. SPENCER et H. WOLF. Nanoparticle printing with single-particle resolution. *Nat. Nanotech.*, **2**, 570–576 (2007).
- [228] L. MALAQUIN, T. KRAUS, H. SCHMID, E. DELAMARCHE et H. WOLF. Controlled particle placement through convective and capillary assembly. *Langmuir*, **23**, 11513–11521 (2007).
- [229] P. M. MORAN et F. F. LANGE. Microscale lithography via channel stamping : relationships between capillarity, channel filling, and debonding. *Appl. Phys. Lett.*, **74**, 1332–1334 (1999).
- [230] R. D. DEEGAN, O. BAKAJIN, T. F. DUPONT, G. HUBER, S. R. NAGEL et T. A. WITTEN. Capillary flow as the cause of ring stains from dried liquid drops. *Nature*, **389**, 827–829 (1997).
- [231] J. KÄS et E. SACKMANN. Shape transitions and shape stability of giant phospholipid vesicles in pure water induced by area-to-volume changes. *Biophys. J.*, **60**, 825–844 (1991).
- [232] A.-L. BERNARD, M.-A. GUEDEAU-BOUDEVILLE, L. JULLIEN et J.-M. di MEGLIO. Raspberry vesicles. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.*, **1567**, 1–5 (2002).
- [233] T. HAMADA, Y. T. SATO et K. YOSHIKAWA. Reversible photoswitching in a cell-sized vesicle. *Langmuir*, **21**, 7626–7628 (2005).
- [234] C. MÉNAGER, D. GUEMGHAR, R. PERZYNSKI, S. LESIEUR et V. CABUIL. Lipid bilayer elasticity measurements in giant liposomes in contact with a solubilizing surfactant. *Langmuir*, **24**, 4968–4971 (2008).

- [235] T. KUNIKATE, N. NAKASHIMA, M. SHIMOMURA, Y. OKAHATA, K. KANO et T. OGAWA. Unique properties of chromophore-containing bilayer aggregates : Enhanced chirality and photochemically induced morphological change. *J. Am. Chem. Soc.*, **102**, 6642–6644 (1980).
- [236] H. SAKAI, A. MATSUMURA, S. YOKOYAMA, T. SAJI et M. ABE. Photochemical switching of vesicle formation using an azobenzene-modified surfactant. *J. Phys. Chem. B*, **103**, 10737–10740 (1999).
- [237] F. P. HUBBARD, G. SANTONICOLA, E. W. KALER et N. L. ABBOTT. Small-angle neutron scattering from mixtures of sodium dodecyl sulfate and a cationic, bolaform surfactant containing azobenzene. *Langmuir*, **21**, 6131–3136 (2005).
- [238] F. P. HUBBARD et N. L. ABBOTT. Effect of light on self-assembly of aqueous mixtures of sodium dodecyl sulfate and a cationic, bolaform surfactant containing azobenzene. *Langmuir*, **23**, 4819–4829 (2007).
- [239] J. EASTOE, A. VESPERINAS, A.-C. DONNEWIRTH, P. WYATT, I. GRILLO, R. K. HEENAN et S. DAVIS. Photodestructible vesicles. *Langmuir*, **22**, 851–854 (2006).
- [240] P. SHUM, J.-M. KIMB et D. H. THOMPSON. Phototriggering of liposomal drug delivery systems. *Adv. Drug Delivery Rev.*, **53**, 273–284 (2001).
- [241] X. SONG, J. PERLSTEIN et D. G. WHITTEN. Supramolecular aggregates of azobenzene phospholipids and related compounds in bilayer assemblies and other microheterogeneous media : Structure, properties, and photoreactivity. *J. Am. Chem. Soc.*, **119**, 9144–9159 (1997).
- [242] Y. LEI et J. K. HURST. Photoregulated potassium ion permeation through dihexadecyl phosphate bilayers containing azobenzene and stilbene surfactants. *Langmuir*, **15**, 3424–3429 (1999).
- [243] J. M. KUIPER et J. B. F. ENGBERTS. H-aggregation of azobenzene-substituted amphiphiles in vesicular membranes. *Langmuir*, **20**, 1152–1160 (2004).
- [244] X. SONG, C. GEIGER, S. VADAY, J. PERLSTEIN et D. G. WHITTEN. Supramolecular aggregates of photoreactive aromatics. Structure, photophysics and photochemistry of stilbene and azobenzene phospholipids. *J. Photoch. Photobio. A*, **102**, 39–45 (1996).
- [245] B. BONDURANT, A. MUELLER et D. F. O'BRIEN. Photoinitiated destabilization of sterically stabilized liposomes. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.*, **1511**, 113–122 (2001).
- [246] R. M. UDA, E. HIRAISHI, R. OHNISHI, Y. NAKAHARA et K. KIMURA. Morphological changes in vesicles and release of an encapsulated compound triggered by a photoresponsive malachite green leuconitrile derivative. *Langmuir*, **26**, 5444–5450 (2010).
- [247] N. M. AHMAD, X. LU et C. J. BARRETT. Stable photo-reversible surface energy switching with azobenzene polyelectrolyte multilayers. *J. Mater. Chem.*, **20**, 244–247 (2010).
- [248] K. YASUHARA, Y. SASAKI et J.-I. KIKUCHI. A photo-responsive cholesterol capable of inducing a morphological transformation of the liquid-ordered microdomain in lipid bilayers. *Colloid Polym. Sci.*, **286**, 1675–1680 (2008).
- [249] K.-I. ISHII, T. HAMADA, M. HATAKEYAMA, R. SUGIMOTO, T. NAGASAKI et M. TAKAGI. Reversible control of exo- and endo-budding transitions in a photosensitive lipid membrane. *ChemBioChem*, **10**, 251–256 (2009).

- [250] S. C. SEBAL, S. CRIBIER, A. KARIMI, D. MASSOTTE et C. TRIBET. Permeabilization of lipid membranes and cells by a light-responsive copolymer. *Langmuir*, **26**, 14135–14141 (2010).
- [251] W. SU, K. HAN, Y. LUO, Z. WANG, Y. LI et Q. ZHANG. Formation and photoresponsive properties of giant microvesicles assembled from azobenzene-containing amphiphilic diblock copolymers. *Macromol. Chem. Phys.*, **208**, 955–963 (2007).
- [252] E. MABROUK, D. CUVELIER, F. BROCHARD-WYART, P. NASSOY et M-H. LI. Bursting of sensitive polymersomes induced by curling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 7294–7298 (2009).
- [253] P. G. PETROV, J. B. LEE et H.-G. DÖBEREINER. Coupling chemical reactions to membrane curvature : A photochemical morphology switch. *Europhys. Lett.*, **48**, 435–441 (1999).
- [254] L. E. SCRIVEN et C. V. STERNLING. The Marangoni effects. *Nature*, **187**, 186–188 (1960).
- [255] N. O. YOUNG, J. S. GOLSTEIN et M. J. BLOCK. The motion of bubbles in a vertical temperature gradient. *J. Fluid. Mech.*, **6**, 350–356 (1959).
- [256] A. M. CAZABAT, F. HESLOT, S. M. TROIAN et P. CARLES. Fingering instability of thin spreading films driven by temperature gradients. *Nature*, **346**, 824–826 (1990).
- [257] J. B. BRZOSKA, F. BROCHARD-WYART et F. RONDELEZ. Motions of droplets on hydrophobic model surfaces induced by thermal gradients. *Langmuir*, **9**, 2220–2224 (1993).
- [258] J. B. BRZOSKA, F. BROCHARD-WYART et F. RONDELEZ. Exponential-growth of fingering instabilities of spreading films under horizontal thermal-gradients. *Europhys. Lett.*, **19**, 97–102 (1992).
- [259] F. BROCHARD-WYART. Motions of droplets on solid surfaces induced by chemical or thermal gradients. *Langmuir*, **5**, 432–438 (1989).
- [260] R. S. SUBRAMANIAN, N. MOUMEN et J. B. MCCLAUGHLIN. Motion of a drop on a solid surface due to a wettability gradient. *Langmuir*, **21**, 11844–11849 (2005).
- [261] V. PRATAP, N. MUOMEN et R. S. SUBRAMANIAN. Thermocapillary motion of a liquid drop on a horizontal solid surface. *Langmuir*, **24**, 5185–5193 (2008).
- [262] D. OKAWA, S. J. PASTINE, A. ZETTL et J. M. J. FRÉCHET. Surface tension mediated conversion of light to work. *J. Am. Chem. Soc.*, **131**, 5396–5398 (2009).
- [263] S. RYBALKO, N. MAGOME et K. YOSHIKAWA. Forward and backward laser-guided motion of an oil droplet. *Phys. Rev. E*, **70**, 046301 (2004).
- [264] E. F. GRECO et R. O. GRIGORIEV. Thermocapillary migration of interfacial droplets. *Phys. Fluids*, **21**, 042105 (2009).
- [265] E. YAKHSHI-TAFTI, H. J. CHO et R. KUMAR. Droplet actuation on a liquid layer due to thermocapillary motion : Shape effect. *Appl. Phys. Lett.*, **96**, 264101 (2010).
- [266] K. T. KOTZ, K. A. NOBLE et G. W. FARIS. Optical microfluidics. *Appl. Phys. Lett.*, **85**, 2658–2660 (2004).
- [267] S. S. DIXIT, H. KIM, A. VASILYEV, A. EID et G. W. FARIS. Light-driven formation and rupture of droplet bilayers. *Langmuir*, **26**, 6193–6200 (2010).
- [268] K. T. KOTZ, Y. GU et G. W. FARIS. Optically addressed droplet-based protein assay. *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 5736–5737 (2005).

- [269] P.-G. de GENNES. Guidage d'une microgoutte par un faisceau laser. *C. R. Physique*, **6**, 1149–1152 (2005).
- [270] R. H. FARABI, A. PASSIAN, T. L. FERRELL et T. THUNDAT. Marangoni forces created by surface plasmon decay. *Opt. Lett.*, **30**, 616–618 (2005).
- [271] Y. LAMHOT, A. BARAK, C. ROTSCCHILD, M. SEGEV, M. SARAF, E. LIFSHITZ, A. MARMUR, R. EL-GANAINY et D. N. CHRISTODOULIDES. Optical control of thermocapillary effects in complex nanofluids. *Phys. Rev. Lett.*, **103**, 264503 (2009).
- [272] N. GARNIER, R. O. GRIGORIEV et M. F. SCHATZ. Optical manipulation of microscale fluid flow. *Phys. Rev. Lett.*, **91**, 054501 (2003).
- [273] M. SHANAHAN. Bateau à savon. *Pour la science*, **244**, 106–107 (1998).
- [274] M. I. KOHIRA, Y. HAYASHIMA, M. NAGAYAMA et S. NAKATA. Synchronized self-motion of two camphor boats. *Langmuir*, **17**, 7124–7129 (2001).
- [275] M. K. CHAUDHURY et G. M. WHITESIDES. How to make water run uphill. *Science*, **256**, 1539–1541 (1992).
- [276] J. TERSOFF, D. E. JESSON et W. X. TANG. Running droplets of gallium from evaporation of gallium arsenide. *Science*, **324**, 236–238 (2009).
- [277] S. DANIEL, M. K. CHAUDHURY et J. C. CHEN. Fast drop movements resulting from the phase change on a gradient surface. *Science*, **291**, 633–636 (2001).
- [278] Y. ITO, M. HEYDARI, A. HASHIMOTO, T. KONNO, A. HIRASAWA, S. HORI, K. KURITA et A. NAKAJIMA. The movement of a water droplet on a gradient surface prepared by photodegradation. *Langmuir*, **23**, 1845–1850 (2007).
- [279] J.-T. YANG, Z.-H. YANG, C.-Y. CHEN et D.-J. YAO. Conversion of surface energy and manipulation of a single droplet across micropatterned surfaces. *Langmuir*, **24**, 9889–9897 (2008).
- [280] C. SUN, X.-W. ZHAO, Y.-H. HAN et Z.-Z. GU. Control of water droplet motion by alteration of roughness gradient on silicon wafer by laser surface treatment. *Thin Solid Films*, **516**, 4059–4063 (2008).
- [281] J. BICO et D. QUÉRÉ. Liquid trains in a tube. *Europhys. Lett.*, **51**, 546–550 (2000).
- [282] C. D. BAIN, G. D. BURNET-HALL et R. R. MONTGOMERIE. Rapid motion of liquid drops. *Nature*, **372**, 414–415 (1994).
- [283] C. D. BAIN et G. M. WHITESIDES. A study by contact angle of the acid-base behavior of monolayers containing o-mercaptocarboxylic acids adsorbed on gold : An example of reactive spreading. *Langmuir*, **5**, 1370–1378 (1989).
- [284] F. DOMINGUES DOS SANTOS et T. ONDARÇUHU. Free-running droplets. *Phys. Rev. Lett.*, **16**, 2972–2975 (1995).
- [285] S.-W. LEE et P. E. LAIBINIS. Directed movement of liquids on patterned surfaces using noncovalent molecular adsorption. *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 5395–5396 (2000).
- [286] Y. SUMINO, N. MAGOME, T. HAMADA et K. YOSHIKAWA. Self-running droplet : emergence of regular motion from nonequilibrium noise. *Phys. Rev. Lett.*, **94**, 068301 (2005).
- [287] Y. SUMINO, H. KITAHATA, K. YOSHIKAWA, M. NAGAYAMA, S. M. NOMURA, N. MAGOME et Y. MORI. Chemosensitive running droplet. *Phys. Rev. E*, **72**, 041603 (2005).

- [288] M. M. HANCZYC, T. TOYOTA, T. IKEGAMI, N. PACKARD et T. SUGAWARA. Fatty acid chemistry at the oil-water interface : self-propelled oil droplets. *J. Am. Chem. Soc.*, **129**, 9386–9391 (2007).
- [289] I. LAGZI, S. SOH, P. J. WESSON, K. P. BROWNE et B. A. GRZYBOWSKI. Maze solving by chemotactic droplets. *J. Am. Chem. Soc.*, **132**, 1198–1199 (2010).
- [290] H. KITAHATA, R. AIHARA, N. MAGOME et K. YOSHIKAWA. Convective and periodic motion driven by a chemical wave. *J. Chem. Phys.*, **116**, 5666–5672 (2002).
- [291] L. M. SIEWIERSKI, W. J. BRITAIN, S. PETRASCH et M. D. FOSTER. Photoresponsive monolayers containing in-chain azobenzene. *Langmuir*, **12**, 5838–5844 (1996).
- [292] D. YANG, M. PIECH, N. S. BELL, D. GUST, S. VAIL, A. A. GARCIA, J. SCHNEIDER, C.-D. PARK, M. A. HAYES et S. T. PICRAUX. Photon control of liquid motion on reversibly photoresponsive surfaces. *Langmuir*, **23**, 10864–10872 (2007).
- [293] K. ICHIMURA, S.-K. OH et M. NAKAGAWA. Light-driven motion of liquids on a photoresponsive surface. *Science*, **288**, 1624–1626 (2000).
- [294] S.-K. OH, K. ICHIMURA et M. NAKAGAWA. Photocontrol of liquid motion on an azobenzene monolayer. *J. Mater. Chem.*, **12**, 2262–2269 (2002).
- [295] R. ROSARIO, D. GUST, M. HAYES, F. JAHNKE, J. SPRINGER et A. A. GARCIA. Photon-modulated wettability changes on spiropyran-coated surfaces. *Langmuir*, **18**, 8062–8069 (2002).
- [296] R. ROSARIO, D. GUST, A. A. GARCIA, M. HAYES, J. L. TARACI, T. CLEMENT, J. W. DAILEY et S. T. PICRAUX. Lotus effect amplifies light-induced contact angle switching. *J. Phys. Chem. B*, **108**, 12640–12642 (2004).
- [297] J. BERNA, D. A. LEIGH, M. LUBOMSKA, S. M. MENDOZA, E. M. PÉREZ, P. RUDOLF, G. TEOBALDI et F. ZERBETTO. Macroscopic transport by synthetic molecular machines. *Nat. Mater.*, **4**, 704–710 (2005).
- [298] R. WANG, K. HASHIMOTO, A. FUJISHIMA, M. CHIKUNI, E. KOJIMA, A. KITAMURA, M. SHIMOHIGOSHI et T. WATANABE. Light-induced amphiphilic surfaces. *Nature*, **388**, 431–432 (1997).
- [299] B. OREGAN et M. GRÄTZEL. A low-cost, high-efficiency solar-cell based on dye-sensitized colloidal TiO₂ films. *Nature*, **353**, 737–740 (1991).
- [300] O. CARP, C. L. HUISMAN et A. RELLER. Photoinduced reactivity of titanium dioxide. *Prog. Solid State Chem.*, **1-2**, 33–177 (2004).
- [301] R.-D. SUN, A. NAKAJIMA, A. FUJISHIMA, T. WATANABE et K. HASHIMOTO. Photoinduced surface wettability conversion of ZnO and TiO₂ thin films. *J. Phys. Chem. B*, **105**, 1984–1990 (2001).
- [302] F. V. MONTELEONE, G. CAPUTO, C. CANALE, P. D. COZZOLI, R. CINGOLANI, D. FRAGOULI et A. ATHANASSIOU. Light-controlled directional liquid drop movement on TiO₂ nanorods-based nanocomposite photopatterns. *Langmuir*, **26**, 18557–18563 (2010).
- [303] D. E. BENNETT, B. S. GALLARDO et N. L. ABBOTT. Dispensing surfactants from electrodes : Marangoni phenomenon at the surface of aqueous solutions of (11-ferrocenylundecyl)trimethylammonium bromide. *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, 6499–6505 (1996).

- [304] B. S. GALLARDO, V. K. GUPTA, F. D. EAGERTON, L. I. JONG, V. S. CRAIG, R. R. SHAH et N. L. ABBOTT. Electrochemical principles for active control of liquids on submillimeter scales. *Science*, **2283**, 57–60 (1999).
- [305] M. G. POLLACK, R. B. FAIR et A. D. SHENDEROV. Electrowetting-based actuation of liquid droplets for microfluidic applications. *Appl. Phys. Lett.*, **77**, 1725–1726 (2000).
- [306] M. G. POLLACK, A. D. SHENDEROV et R. B. FAIR. Electrowetting-based actuation of droplets for integrated microfluidics. *Lab Chip*, **2**, 96–101 (2002).
- [307] B. BERGE et J. PESEUX. Variable focal lens controlled by an external voltage : An application of electrowetting. *Eur. Phys. J. E.*, **3**, 159–163 (2000).
- [308] M. ABDELGAWAD et A. R. WHEELER. The digital revolution : A new paradigm for microfluidics. *Adv. Mater.*, **21**, 920–925 (2009).
- [309] G. M. WHITESIDES. The origins and the future of microfluidics. *Nature*, **442**, 368–373 (2006).
- [310] D. C. DUFFY, J. C. McDONALD, O. J. A. SCHUELLER et G. M. WHITESIDES. Rapid prototyping of microfluidic systems in poly(dimethylsiloxane). *Anal. Chem.*, **70**, 4974–4984 (1998).
- [311] Y. N. XIA et G. M. WHITESIDES. Soft lithography. *Annu. Rev. Mater. Sci.*, **153**, 153–184 (1998).
- [312] J. C. McDONALD, D. C. DUFFY, J. R. ANDERSON, D. T. CHIU, H. WU, O. J. A. SCHUELLER et G. M. WHITESIDES. Fabrication of microfluidic systems in poly(dimethylsiloxane). *Electrophoresis*, **21**, 27–40 (2000).
- [313] G. M. WHITESIDES et A. D. STROOCK. Flexible methods for microfluidics. *Phys. Today*, **54**, 42–48 (2001).
- [314] T. M. SQUIRES et S. R. QUAKE. Microfluidics : Fluid physics at the nanoliter scale. *Rev. Mod. Phys.*, **77**, 977–1026 (2005).
- [315] R. F. ISMAGILOV, A. D. STROOCK, P. J. A. KENIS, G. WHITESIDES et H. A. STONE. Experimental and theoretical scaling laws for transverse diffusive broadening in two-phase laminar flows in microchannels. *Appl. Phys. Lett.*, **76**, 2376–2378 (2000).
- [316] J. KNIGHT. Honey, I shrunk the lab. *Nature*, **418**, 474–475 (2002).
- [317] A. J. DEMELLO. Control and detection of chemical reactions in microfluidic systems. *Nature*, **442**, 394–402 (2006).
- [318] T. THORSEN, S. J. MAERKL et S. R. QUAKE. Microfluidic large-scale integration. *Science*, **298**, 580–584 (2002).
- [319] F. K. BALAGADDÉ, L. YOU, C. L. HANSEN, F. H. ARNOLD et S. R. QUAKE. Long-term monitoring of bacteria undergoing programmed population control in a microchemostat. *Science*, **309**, 137–140 (2005).
- [320] C. L. HANSEN, E. SKORDALAKES, J. M. BERGER et S. R. QUAKE. A robust and scalable microfluidic metering method that allows protein crystal growth by free interface diffusion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 16531–16536 (2002).
- [321] C. L. HANSEN, M. O. A. SOMMER et S. R. QUAKE. Systematic investigation of protein phase behavior with a microfluidic formulator. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 14431–14436 (2004).

- [322] L. XU, L. ROBERT, Q. OUYANG, F. TADDEI, Y. CHEN, A. B. LINDNER et D. BAIGL. Microcontact printing of living bacteria arrays with cellular resolution. *Nano Lett.*, **7**, 2068–2072 (2007).
- [323] A. C. ROWAT, J. C. BIRD, J. J. AGRESTI, O. J. RANDO et D. A. WEITZ. Tracking lineages of single cells in lines using a microfluidic device. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 18149–18154 (2009).
- [324] A. YAMADA, F. BARBAUD, L. CINQUE, L. WANG, Q. ZENG, Y. CHEN et D. BAIGL. Oil microsealing : A robust micro-compartmentalization method for on-chip chemical and biological assays. *Small*, **6**, 2169–2175 (2010).
- [325] C. S. ZHANG, J. L. XU et W. L. ZHENG. PCR microfluidic devices for DNA amplification. *Biotechnol. Adv.*, **24**, 243–284 (2006).
- [326] T. VILKNER, D. JANASEK et A. MANZ. Micro total analysis systems. Recent developments. *Anal. Chem.*, **76**, 3373–3385 (2004).
- [327] P. S. DITTRICH et A. MANZ. Lab-on-a-chip : microfluidics in drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discovery*, **5**, 210–218 (2006).
- [328] D. PSALTIS, S. R. QUAKE et C. YANG. Developing optofluidic technology through the fusion of microfluidics and optics. *Nature*, **442**, 381–386 (2006).
- [329] M. HE, J. S. KUO et D. T. CHIU. Effects of ultrasmall orifices on the electrogeneration of femtoliter-volume aqueous droplets. *Langmuir*, **22**, 6408–6413 (2006).
- [330] C. AMATORE, S. ARBAULT, Y. CHEN, C. CROZATIER et I. TAPSOBA. Electrochemical detection in a microfluidic device of oxidative stress generated by macrophage cells. *Lab Chip*, **7**, 233–238 (2007).
- [331] V. S. BAJAJ, J. PAULSEN, E. HAREL et A. PINES. Zooming in on microscopic flow by remotely detected MRI. *Science*, **330**, 1078–1081 (2010).
- [332] H. SONG, J. D. TICE et R. F. ISMAGILOV. A microfluidic system for controlling reaction networks in time. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **42**, 768–772 (2003).
- [333] A. S. UTADA, E. LORENCEAU, D. R. LINK, P. D. KAPLAN, H. A. STONE et D. A. WEITZ. Monodisperse double emulsions generated from a microcapillary device. *Science*, **308**, 537–541 (2005).
- [334] A. R. ABATE et D. A. WEITZ. High-order multiple emulsions formed in poly(dimethylsiloxane) microfluidics. *Small*, **5**, 2030–2032 (2009).
- [335] A. GROISMAN, M. ENZELBERGER et S. R. QUAKE. Microfluidic memory and control devices. *Science*, **300**, 955–958 (2003).
- [336] M. HASHIMOTO, J. FENG, R. L. YORK, A. K. ELLERBEE, G. MORRISON, S. W. THOMAS, L. MAHADEVAN et G. M. WHITESIDES. Infochemistry : Encoding information as optical pulses using droplets in a microfluidic device. *J. Am. Chem. Soc.*, **131**, 12420–12429 (2009).
- [337] A. W. MARTINEZ, S. T. PHILLIPS et G. M. WHITESIDES. Three-dimensional microfluidic devices fabricated in layered paper and tape. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 19606–19611 (2008).
- [338] G. M. WHITESIDES. What comes next? *Lab Chip*, **11**, 191–193 (2011).

- [339] R. B. SCHOCH, J. HAN et P. RENAUD. Transport phenomena in nanofluidics. *Rev. Mod. Phys.*, **80**, 839–883 (2008).
- [340] N. LORBER, F. SARRAZIN, P. GUILLOT, P. PANIZZA, A. COLIN, B. PAVAGEAU, C. HANY, P. MAESTRO, S. MARRE, T. DELCLOS, C. AYMONIER, P. SUBRA, L. PRAT, C. GOURDONE et E. MIGNARD. Some recent advances in the design and the use of miniaturized droplet-based continuous process : Applications in chemistry and high-pressure microflows. *Lab Chip*, **11**, 779–787 (2011).
- [341] R. MUKHOPADHYAY. When PDMS isn't the best. *Anal. Chem.*, **79**, 3248–3253 (2008).
- [342] P. GARSTECKI, I. GITLIN, G. M. WHITESIDES, E. KUMACHEVA et H. A. STONE. Formation of monodisperse bubbles in a microfluidic flow-focusing device. *Appl. Phys. Lett.*, **85**, 2649–2651 (2004).
- [343] T. THORSEN, R. W. ROBERTS, F. H. ARNOLD et S. R. QUAKE. Dynamic pattern formation in a vesicle-generating microfluidic device. *Phys. Rev. Lett.*, **86**, 4163–4166 (2001).
- [344] S. L. ANNA, N. BONTOUX et H. A. STONE. Formation of dispersions using "flow focusing" in microchannels. *Appl. Phys. Lett.*, **82**, 364–366 (2003).
- [345] A. B. THEBERGE, F. COURTOIS, Y. SCHAEPLI, M. FISCHLECHNER, C. ABELL, F. HOLLFELDER et W. T. S. HUCK. Microdroplets in microfluidics : An evolving platform for discoveries in chemistry and biology. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **49**, 5846–5868 (2010).
- [346] M. JOANICOT et A. AJDARI. Droplet control for microfluidics. *Science*, **309**, 887–888 (2005).
- [347] J. ATENCIA et D. J. BEEBE. Controlled microfluidic interfaces. *Nature*, **437**, 648–655 (2005).
- [348] S.-Y. TEH, R. LIN, L.-H. HUNG et A. P. LEE. Droplet microfluidics. *Lab Chip*, **8**, 198–220 (2008).
- [349] A. HUEBNER, S. SHARMA, M. SRISA-ART, F. HOLLFELDER, J. B. EDEL et A. J. DEMELLO. Microdroplets : A sea of applications? *Lab Chip*, **8**, 1244–1254 (2008).
- [350] H. SONG, D. L. CHEN et R. F. ISMAGILOV. Reactions in droplets in microfluidic channels. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **45**, 7336–7356 (2006).
- [351] H. SONG et R. F. ISMAGILOV. Millisecond kinetics on a microfluidic chip using nanoliters of reagents. *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 14613–14619 (2003).
- [352] M. M. KISS, L. ORTOLEVA-DONNELLY, N. R. BEER, J. WARNER, C. G. BAILEY, B. W. COLSTON, J. M. ROTHBERG, D. R. LINK et J. H. LEAMON. High-throughput quantitative polymerase chain reaction in picoliter droplets. *Anal. Chem.*, **80**, 8975–8981 (2008).
- [353] B. ZHENG, J. D. TICE, L. S. ROACH et R. F. ISMAGILOV. A droplet-based, composite PDMS/glass capillary microfluidic system for evaluating protein crystallization conditions by microbatch and vapor-diffusion methods with on-chip X-Ray diffraction. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **43**, 2508–2511 (2004).
- [354] S. XU, Z. NIE, M. SEO, P. LEWIS, E. KUMACHEVA, H. A. STONE, P. GARSTECKI, D. B. WEIBEL, I. GITLIN et G. M. WHITESIDES. Generation of monodisperse particles by using microfluidics : Control over size, shape, and composition. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **44**, 724–728 (2005).

- [355] S. A. KHAN, A. GUNTHER, M. A. SCHMIDT et K. F. JENSEN. Microfluidic synthesis of colloidal silica. *Langmuir*, **20**, 8604–8611 (2004).
- [356] S. KÖSTER, F. E. ANGILÈ, H. DUAN, J. J. AGRESTI, A. WINTNER, C. SCHMITZ, A. C. ROWAT, C. A. MERTEN, D. PISIGNANO, A. D. GRIFFITHS et D. A. WEITZ. Drop-based microfluidic devices for encapsulation of single cells. *Lab Chip*, **8**, 1110–1115 (2008).
- [357] J. F. EDD, D. D. CARLO, K. J. HUMPHRY, S. KÖSTER, D. IRIMIA, D. A. WEITZ et M. TÖNER. Controlled encapsulation of single-cells into monodisperse picolitre drops. *Lab Chip*, **8**, 1262–1264 (2008).
- [358] M. CHABERT et J.-L. VIOVY. Microfluidic high-throughput encapsulation and hydrodynamic self-sorting of single cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 3191–3196 (2008).
- [359] R. DREYFUS, P. TABELING et H. WILLAIME. Ordered and disordered patterns in two-phase flows in microchannels. *Phys. Rev. Lett.*, **90**, 144505 (2003).
- [360] S. L. ANNA et H. C. MAYER. Microscale tipstreaming in a microfluidic flow focusing device. *Phys. Fluids*, **18**, 121512 (2006).
- [361] W. LEE, L. M. WALKER et S. L. ANNA. Role of geometry and fluid properties in droplet and thread formation processes in planar flow focusing. *Phys. Fluids*, **21**, 032103 (2009).
- [362] T. WARD, M. FAIVRE et H. A. STONE. Drop production and tip-streaming phenomenon in a microfluidic flow-focusing device via an interfacial chemical reaction. *Langmuir*, **26**, 9233–9239 (2010).
- [363] K. WANG, Y. C. XU et G. S. LUO. Determination of dynamic interfacial tension and its effect on droplet formation in the T-shaped microdispersion process. *Langmuir*, **25**, 2153–2158 (2009).
- [364] L. SHUI, A. VAN DER BERG et J. C. T. EIJKEL. Interfacial tension controlled W/O and O/W 2-phase flows in microchannel. *Lab Chip*, **9**, 795–801 (2009).
- [365] C. A. STAN, S. K. T. TANG et G. M. WHITESIDES. Independent control of drop size and velocity in microfluidic flow-focusing generators using variable temperature and flow rate. *Anal. Chem.*, **81**, 2399–2402 (2009).
- [366] N.-T. NGUYEN, T.-H. TING, Y.-F. YAP, T.-N. WONG, J. C.-K. CHAI, W.-L. ONG, J. ZHOU, S.-H. TAN et L. YOBAS. Thermally mediated droplet formation in microchannels. *Appl. Phys. Lett.*, **91**, 084102 (2007).
- [367] A. R. ABATE, M. B. ROMANOWSKY, J. J. AGRESTI et D. A. WEITZ. Valve-based flow focusing for drop formation. *Appl. Phys. Lett.*, **94**, 023503 (2009).
- [368] A. BRANSKY, N. KORIN, M. KHOURY et S. LEVENBERG. A microfluidic droplet generator based on a piezoelectric actuator. *Lab Chip*, **9**, 516–520 (2009).
- [369] D. R. LINK, E. GRASLOND-MONGRAIN, A. DURI, F. SARRAZIN, Z. CHENG, G. CRISTOBAL, M. MARQUEZ et D. A. WEITZ. Electric control of droplets in microfluidic devices. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **45**, 2556–2560 (2006).
- [370] H. KIM, D. LUO, D. LINK, D. A. WEITZ, M. MARQUEZ et Z. CHENG. Controlled production of emulsion drops using an electric field in a flow-focusing microfluidic device. *Appl. Phys. Lett.*, **91**, 133106 (2007).
- [371] P. HE, H. KIM, D. LUO, M. MARQUEZ et Z. CHENG. Low-frequency ac electro-flow-focusing microfluidic emulsification. *Appl. Phys. Lett.*, **96**, 174103 (2010).

- [372] H. GU, F. MALLOGGI, S. A. VANAPALLI et F. MUGELE. Electrowetting-enhanced microfluidic device for drop generation. *Appl. Phys. Lett.*, **93**, 183507 (2008).
- [373] C. MONAT, P. DOMACHUK et B. J. EGGLETON. Integrated optofluidics : A new river of light. *Nat. Photonics*, **1**, 106–114 (2007).
- [374] V. R. HOROWITZ, D. D. AWSCHALOM et S. PENNATHUR. Optofluidics : field or technique ? *Lab Chip*, **8**, 1856–1863 (2008).
- [375] U. LEVY et R. SHAMAI. Tunable optofluidic devices. *Microfluid. Nanofluid.*, **4**, 97–105 (2008).
- [376] J.-P. DELVILLE, M. ROBERT DE SAINT VINCENT, R. D. SCHROLL, H. CHRAÏBI, B. ISSENMANN, R. WUNENBURGER, D. LASSEUX, W. W. ZHANG et E. BRASSELET. Laser microfluidics : fluid actuation by light. *J. Opt. A : Pure Appl. Opt.*, **11**, 034015 (2009).
- [377] C. N. BAROUD, F. GALLAIRE et R. DANGLA. Dynamics of microfluidic droplets. *Lab Chip*, **10**, 2032–2045 (2010).
- [378] C. N. BAROUD, J.-P. DELVILLE, F. GALLAIRE et R. WUNENBURGER. Thermocapillary valve for droplet production and sorting. *Phys. Rev. E*, **75**, 046302 (2007).
- [379] E. VERNEUIL, M. L. CORDERO, F. GALLAIRE et C. N. BAROUD. Laser-induced force on a microfluidic drop : Origin and magnitude. *Langmuir*, **25**, 5127–5134 (2009).
- [380] M. ROBERT DE SAINT VINCENT, R. WUNENBURGER et J.-P. DELVILLE. Laser switching and sorting for high speed digital microfluidics. *Appl. Phys. Lett.*, **92**, 154105 (2008).
- [381] C. N. BAROUD, M. ROBERT DE SAINT VINCENT et J.-P. DELVILLE. An optical toolbox for total control of droplet microfluidics. *Lab Chip*, **7**, 1029–1033 (2007).
- [382] S.-Y. PARK, T.-H. WU, Y. CHEN, M. A. TEITELL et P.-Y. CHIOU. High-speed droplet generation on demand driven by pulse laser-induced cavitation. *Lab Chip*, **11**, 1010–1012 (2011).
- [383] A. TERRAY, J. OAKLEY et D. W. M. MARR. Microfluidic control using colloidal devices. *Science*, **296**, 1841–1844 (2002).
- [384] S. L. NEALE, M. P. MACDONALD, K. DHOLAKIA et T. F. KRAUSS. All-optical control of microfluidic component using form birefringence. *Nat. Mater.*, **4**, 530–533 (2005).
- [385] J. LEACH, H. MUSHFIQUE, R. DI LEONARDO, M. PADGETTA et J. COOPER. An optically driven pump for microfluidics. *Lab Chip*, **6**, 735–739 (2006).
- [386] G.L. LIU, J. KIM, Y. LU et L. P. LEE. Optofluidic control using photothermal nanoparticles. *Nat. Mater.*, **5**, 27–32 (2006).
- [387] L. CAPRIOLI, E. MELE, F. E. ANGILÈ et S. GIRARDO. Photocontrolled wettability changes in polymer microchannels doped with photochromic molecules. *Appl. Phys. Lett.*, **91**, 113113 (2007).
- [388] A. DIGUET, R.-M. GUILLERMIC, N. MAGOME, A. SAINT-JALMES, Y. CHEN, K. YOSHIKAWA et D. BAIGL. Photomanipulation of a droplet by the chromocapillary effect. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **48**, 9281–9284 (2009).
- [389] A. DIGUET, A. SAINT-JALMES et D. BAIGL. Conversion d'énergie lumineuse en travail mécanique par chromocapillarité. *Techniques de l'ingénieur*, **in123** (2011).
- [390] X. LALOYLAUX et A. M. JONAS. Photoactuation of droplet motion. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **49**, 3262–3263 (2010).

- [391] A. A. BEHARRY, L. WONG, V. TROPEPE et G. A. WOOLEY. Fluorescence imaging of azobenzene photoswitching in vivo. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **50**, 1325–1327 (2011).
- [392] T. KAWAKATSU, G. TRÄGARDH, C. TRÄGARDH, M. NAKAJIMA, N. ODA et T. YONEMOTO. The effect of the hydrophobicity of microchannels and components in water and oil phases on droplet formation in microchannel water-in-oil emulsification. *Colloids Surf., A*, **179**, 29–37 (2001).
- [393] W. LI, Z. NIE, H. ZHANG, C. PAQUET, M. SEO, P. GARSTECKI et E. KUMACHEVA. Screening of the effect of surface energy of microchannels on microfluidic emulsification. *Langmuir*, **23**, 8010–8014 (2007).
- [394] L. M. FIDALGO, C. ABELL et W. T. S. HUCK. Surface-induced droplet fusion in microfluidic devices. *Lab Chip*, **7**, 984–986 (2007).
- [395] J. A. DIEZ, A. G. GONZÁLEZ et L. KONDIC. On the breakup of fluid rivulets. *Phys. Fluids*, **21**, 082105 (2009).
- [396] J. GLÜCKSTAD. Sorting particles with light. *Nat. Mater.*, **3**, 9–10 (2004).

Récapitulatif des articles issus de ce travail

Articles publiés

- 1) A. ESTÉVEZ-TORRES, C. CROZATIER, A. DIGUET, T. HARA, H. SAITO, K. YOSHIKAWA et D. BAIGL. Sequence-independent and reversible photocontrol of transcription/expression systems using a photosensitive nucleic acid binder. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 12219–12223 (2009).
- 2) A. DIGUET, M. LE BERRE, Y. CHEN et D. BAIGL. Preparation of phospholipid multilayer patterns of controlled size and thickness by capillary assembly on a microstructured substrate. *Small*, **5**, 1661–1666 (2009).
- 3) A. DIGUET, R.-M. GUILLERMIC, N. MAGOME, A. SAINT-JALMES, Y. CHEN, K. YOSHIKAWA et D. BAIGL. Photomanipulation of a droplet by the chromocapillary effect. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **48**, 9281–9284 (2009).
- 4) A. DIGUET, N. K. MANI, M. GEOFFROY, M. SOLLOGOUB et D. BAIGL. Photosensitive surfactants with various hydrophobic tail lengths for the photocontrol of genomic DNA conformation with improved efficiency. *Chem. Eur. J.*, **16**, 11890–11896 (2010).
- 5) A. DIGUET, A. SAINT-JALMES et D. BAIGL. Conversion d'énergie lumineuse en travail mécanique par chromocapillarité. *Techniques de l'Ingénieur*, **in123** (2011).
- 6) A. DIGUET, H. LI, N. QUEYRIAUX, Y. CHEN et D. BAIGL. Photoreversible fragmentation of a liquid interface for micro-droplet generation by light actuation. *Lab Chip*, (2011) DOI :10.1039/c1lc20328b.

Article soumis

- 7) A. VENANCIO-MARQUES, Y. LIU, A. DIGUET, T. DI MAIO, A. GAUTIER et D. BAIGL. Modification-free photocontrol of enzymatic activity for prodrug-drug conversion with spatio-temporal resolution. *Submitted*, (2011).

Article en préparation

- 8) A. DIGUET, E. BRUN, S. ABADIE, M. YANAGISAWA et D. BAIGL. Selective photostimulation of giant phospholipid vesicles. *En préparation*, (2011).

Abréviations

AFM	microscope à force atomique (Atomic Force Microscope)
AzoTAB	bromure d'azobenzène triméthylammonium (Azobenzentriméthylammonium bromide)
CMC	concentration micellaire critique
CTAB	bromure d'hexadécyltriméthylammonium
DAPI	4',6-diamidino-2-phénylindole
DLS	diffusion dynamique de la lumière (Dynamic Light Scattering)
DMF	diméthylformamide
DOPC	1,2-dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine
DPPE	1,2-dipalmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine
DTAB	bromure de dodécyltriméthylammonium
DTT	dithioltréitol
EGFP	protéine fluorescente verte augmentée (Enhanced Green Fluorescent Protein)
FITC	fluorescéine isothiocyanate
GFP	protéine fluorescente verte (Green Fluorescent Protein)
GUV	vésicule unilamellaire géante (Giant Unilamellar Vesicle)
ITO	oxyde d'indium et d'étain (Indium Tin Oxide)
NBD-PC	1-oleoyl-2-[12-[(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino]hexanoyl]- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine
NTP	nucléotide triphosphate
PCR	amplification en chaîne par polymérase (Polymerase Chain Reaction)
PDMS	polydiméthylsiloxane
pNAB	liant photosensible d'acide nucléiques (photosensitive nucleic acid binder)
RMN	résonance magnétique nucléaire
SANS	diffusion de neutrons au petits angles (Small Angle Neutron Scattering)
SEM	microscopie électronique à balayage (Scanning Electron Microscopy)
SLS	diffusion statique de la lumière (Static Light Scattering)
TEM	microscopie électronique à transmission (Transmission Electron Microscopy)
THF	tétrahydrofurane
Tris	tris(hydroxyméthyl)aminométhane
TTAB	bromure de tétradécyltriméthylammonium
YOYO-1	1,1-[1,3-propanediylbis[(diméthyliminio)-3,1-propanediyl]]bis[4-[(3-méthyl-2(3H)-benzoxazolylidene)méthyl]-quinolinium iodide]

Index

- ADN, **41**, 106, 113, 162
 - Conformation, **39**
 - Mesure du grand axe, 67
 - Neutralisation des charges, 41
 - Préparation de plasmide, 214
 - Structure, 41
 - Transcription, 51
- Angle de contact, **28**, 30, 150, 153, 156, 157, 171, 188
 - Hystérésis, 29, 156, 171
 - Méthode de mesure, 222
- ARN
 - Conformation, 53, 81
 - Electrophorèse sur gel, 76
 - Préparation, 214
 - Production, 53, 75, 79
 - Translation, 80
- Cellule artificielle, 106
- Chromocapillaire (effet), 169
- Cinétique
 - D'expression, 85
 - De démouillage, 189, 192
 - De photoisomérisation, 61, 77
 - De transcription, 79
 - Enzymatique, 33, 85
 - enzymatique, 23
- Concentration micellaire critique (CMC), 31, 63
- Diazobenzène, 17, **18**, 21
 - Polymère, 20
 - Surface greffée, 156
 - Tensioactif, 30, 59, 130, 171, 185, 207
- Electroformation, **98**, 107
 - Microstructuration de l'électrode, 99, 122
 - Nature de l'électrode, 99
- Electrophorèse
 - Capillaire, 159
 - Sur gel, 76, 214–216
- Encapsulation
 - Goutte, 162, 198
 - Vésicule, 97, 99, 100, 106
- Enzyme
 - β -lactamase, 83
 - Cinétique, 23, 33, 85
 - De restriction, 214
 - Substrat
 - chromogénique, 84
 - pro-drogue, 84
- Fonctionnalisation
 - De membrane, 105
 - De surface, 116, 153, 156
- GFP
 - Expression, 81, 108
 - Translation, 80
- Guidage capillaire, 113
- ITO, 99, 101, 122
- Landau-Levich (régime de), 112, 115
- Manning-Oosawa (condensation), 41
- Marangoni (effet), 147
 - Chimique, 151, 154
 - Electrochimique, 157
 - Thermique, 148, 150
- Mesure
 - Angle de contact, 187, 222
 - De fluorescence, 213
 - Epaisseur de multicouches, 116, 119
 - Fluorescence
 - ARN produit, 75
 - GFP exprimée, 80
 - Profondeur de microtrous, 115

- Taille
 - de GUV, 122
 - grand axe de l'ADN, 67
- Tension de surface, 173, 221
- Micelle, 48, 63, 95
- Micro-contact printing, 99
- Microfluidique, 158
 - Fabrication d'un dispositif, 218
 - Microgouttes, 100, **161**
 - fréquence, 162, 166, 198
 - taille, 162, 164
 - Vésicules, 100
 - Valve, 164
- Microréacteur, 105, 162
- Mouillage, 21, **28**, 116, 187
 - Electromouillage, 157
- Nitrocéfine
 - Cinétique de décomposition, 85
 - Structure, 84
- Nombre
 - Capillaire, 161, 189
 - De Reynolds, 158
- Optofluidique, 159, 164, 198
- PDMS, 164, 171, 185, 218
- Phospholipides, **95**
 - Bicouche, 89, 95
 - Bicouche supportée, 111
 - Dépôt, **111**
 - bicouche, 111
 - multicouche, 111
 - Domaines, 105
 - Fluorescents, 116
- Photochromisme, **15**, 156
 - Applications, 18
 - Groupement photochrome, 17
- Photolithographie
 - Protocole, 218
- Piranha, 116, 118
- Plasma, 118, 188, 189, 217
- Plasmide
 - Pour synthèse de β -lactamase (T7lac)
 - préparation, 214
 - Pour synthèse de β -lactamase (T7lac)
 - utilisation, 84
 - Pour synthèse de GFP (pQBi-T7-GFP),
 - 76
 - circulaire, 77, 81
 - linéaire, 76, 81
- Plateau-Rayleigh (instabilité de), 198
- Polymérosomes, 128
- RMN, 207
- SANS, 31, 33
- Silicium, 20, 150
 - Electroformation sur, 99, 122
 - Fonctionnalisation de surface, 116, 153, 154, 156
 - Microstructuré, 99, **115**
 - Microstructuration, 217
- Spin-coating, 99, 111, 217
- Spiropyrane, 17, 31, 156
- Synthèse
 - De l'AzoTAB, 207
 - Des dérivés AzoCx, 207
 - Des dérivés AzoCx, 55
- Tensioactif, **29**
 - Agent compactant, 48, 55, 73
 - Applications, 30, 31, 49
 - Autoassemblage, 63, 95
 - Electroactif, 157
 - Monocouche, 29
 - Photochrome, **25**, 169, 183
- Tension de surface, **27**
 - Dépendance thermique, 148, 164
 - Valeurs, 27, 28, 30, 33, 147, 157, 164, 174, 189
- Thermocapillaire (effet), **148**
 - Par conduction, 148
 - Par illumination, 150
- Transition
 - De conformation, 41
 - De mouillage, 187
- Vésicule
 - GUV, **93**
 - applications, 89, 104, 108
 - distribution des tailles, 122
 - formation, 97, 122, 159
 - SUV, 31, 97, 127

applications, 49, 104
formation, 97

Utilisation de tensioactifs photosensibles pour le photocontrôle de systèmes biomimétiques, macro- et microfluidiques

Cette thèse a pour objectif de montrer de nouvelles possibilités de contrôle lumineux sur des systèmes biochimiques et physico-chimiques à l'aide de tensioactifs cationiques photosensibles. Leur groupement diazobenzène peut subir une photoisomérisation *trans-cis* réversible qui est à l'origine d'une modification de polarité, exploitée en particulier pour l'une de ces molécules appelée AzoTAB.

La mise en présence d'ADN, d'AzoTAB et d'un milieu d'expression génétique *in vitro* a d'abord permis de montrer que le niveau de production d'une protéine pouvait être accru après illumination UV. Le changement de polarité photoinduit provoque ici une modification de la conformation de l'ADN et l'ARN et ce qui change les vitesses des réactions de transcription et translation. A travers la synthèse de deux nouveaux analogues de l'AzoTAB comportant une queue plus hydrophobe, c'est aussi une amélioration de la concentration de molécules nécessaires à la transition de conformation de l'ADN qui a été évaluée.

Ensuite, la déformation et la rupture photoinduite de vésicules géantes unilamellaires (GUV) dans un bain d'AzoTAB a été étudiée suivant leur composition. La formation de GUV relativement monodisperses a aussi été effectuée, grâce au dépôt contrôlé d'une multicouche de phospholipides sur du silicium plan microstructuré.

La polarité photodépendante de ce tensioactif a enfin été exploitée pour modifier localement l'énergie d'une interface. D'une part à travers la photomanipulation d'une goutte d'huile millimétrique flottant sur un bain d'AzoTAB. D'autre part dans un dispositif microfluidique, où la fragmentation par la lumière d'un écoulement biphasique laminaire en microgouttes a été montrée, avec une sélectivité spatiale.

Mots clefs : tensioactif, diazobenzène, ADN, vésicule, goutte, microfluidique

Use of photosensitive surfactants for the photocontrol of biomimetic, macro- and microfluidic systems

This thesis shows new possibilities of photocontrol of biochemical and physico-chemical systems with photosensitive cationic surfactants. Their diazobenzene group undergoes a reversible *trans-cis* photoisomerization that induces a polarity modification, which has been exploited, in particular for one of these molecules called AzoTAB.

First, the mixing of DNA, AzoTAB and a *in vitro* gene expression medium allows one to increase the production level of a protein after UV illumination. In this case, the photodependant polarity leads to a modification of the conformation of DNA and RNA and thus changes speeds of transcription and translation reactions. Through the synthesis of two new AzoTAB analogues with a longer hydrophobic tail, we also studied the optimisation of concentration of molecules which is necessary to observe the DNA conformation transition.

Then, the deformation and the rupture of giant unilamellar vesicles (GUV) in an AzoTAB bath has been studied, depending on the external illumination and their composition. The formation of GUV with a narrow size distribution has also been obtained, while performing the controlled deposition of a multilayer of phospholipids on a flat microstructured substrate.

Finally, the photodependant polarity of this surfactant has been exploited to locally modify the energy of an interface. On the one hand, through the photomanipulation of a millimetric oil droplet floating on an AzoTAB bath. On the other hand, in a microfluidic device, where the fragmentation by light of a biphasic laminar flow into microdroplets has been realized, with a spatial selectivity.

Key words : surfactant, diazobenzene, DNA, vesicle, drop, microfluidics