

Dynamique des bicouches lipidiques supportées

Carole Scomparin

▶ **To cite this version:**

Carole Scomparin. Dynamique des bicouches lipidiques supportées. Physique [physics]. Université de la Méditerranée - Aix-Marseille II, 2007. Français. NNT : . tel-00202669

HAL Id: tel-00202669
https://theses.hal.science/tel-00202669

Submitted on 7 Jan 2008

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.

UNIVERSITE DE LA MEDITERRANEE – AIX-MARSEILLE II
FACULTE DES SCIENCES DE LUMINY

CRMC-N
Centre de Recherche en Matière Condensée et Nanosciences

CNRS CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

N° attribué par la bibliothèque

THÈSE

Présentée en vue de l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ

Spécialité : Sciences des matériaux, Physique, Chimie et Nanosciences

par

Carole SCOMPARIN

DYNAMIQUE DES BICOUCHES LIPIDIQUES SUPPORTÉES

Soutenue le 12 décembre 2007 devant la commission d'examen composée de :

Philippe DEJARDIN	IEM - Montpellier	Rapporteur
Didier MARGUET	CIML - Marseille	Rapporteur
James STURGIS	LISM - Marseille	Président du jury
Bernard TINLAND	CRMCN - Marseille	Directeur de thèse

Remerciements

Ce travail a été réalisé au Centre de Recherche en Matière Condensée et Nanosciences dirigé successivement par Viatcheslav Safarov et Claude Henry. Je les remercie tous les deux pour m'avoir accueillie durant ces trois années de thèse.

Je tiens à remercier Bernard Tinland qui a dirigé cette thèse et qui a su me guider dans mes travaux, pour sa disponibilité et sa patience, même dans les moments les plus difficiles. Je souhaite le remercier pour son aide et ses conseils autant sur les aspects techniques que sur l'interprétation des résultats et la rédaction.

Je tiens ensuite à remercier James Sturgis, Professeur au Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Macromoléculaires de Marseille, de m'avoir fait l'honneur de présider ce jury de thèse.

Je suis très sensible à l'honneur que me font Messieurs Philippe Dejardin, Directeur de Recherche à l'Institut Européen des Membranes de Montpellier, et Didier Marguet, Directeur de Recherche au Centre d'Immunologie Marseille-Luminy, en acceptant d'être les rapporteurs de ce travail. Je leur adresse mes sincères remerciements.

J'exprime toute ma reconnaissance à Natalie Ferté pour sa disponibilité et son aide pour la préparation des bicouches avec la cuve de Langmuir. Merci pour les nombreuses discussions que nous avons eues et pour les précieux conseils que tu m'as prodigués.

Merci à l'équipe biomolécule pour son appui technique.

Durant ces trois années, j'ai eu l'opportunité de pouvoir enseigner en tant que monitrice. A cet égard, je voudrais remercier Yves Mathey, directeur du CIES PACA et tuteur, ainsi que Carole Fauquet pour leurs conseils et leur présence.

Je remercie également Constance Hammond, présidente de l'association Hippocampe à l'INMED, ainsi que toute son équipe qui m'ont permis de découvrir une aventure pédagogique innovante de la création à l'encadrement d'un nouveau stage sur les biotechnologies. Merci à Eve, François et Yannick avec qui j'ai partagé ce projet de monitorat.

Je voudrais exprimer toute ma considération aux ingénieurs et techniciens qui ont participé au bon fonctionnement de ce travail : Philippe Bindzi et Marcel Fernandez de l'atelier de mécanique, Michel Dayez et Franck Jandard du service électronique, Frédéric Augier et Bruno Gély du service informatique, ainsi que Frédéric Bedu et Daniel Pailharey.

Je remercie tout le laboratoire, et plus particulièrement les personnes du quatrième étage, pour m'avoir permis de travailler dans une ambiance sympathique.

Un grand merci à tous les thésards avec qui j'ai passé de très bon moments et auprès desquels j'ai trouvé du soutien et de l'amitié. Thanks « my friend Aurore ».

Je ne pourrais terminer ces remerciements sans citer ma famille qui m'a soutenue et encouragée pendant ce périple de trois ans.

Sommaire

SYMBOLES ET ABREVIATIONS

INTRODUCTION GENERALE……..1

1 REVUE BIBLIOGRAPHIQUE 2

1.1 DES MEMBRANES BIOLOGIQUES AUX MEMBRANES ARTIFICIELLES 2

1.1.1 Composition et structure des membranes biologiques 2
1.1.1.1 Composition chimique 2
1.1.1.2 Dynamique et fluidité 4
1.1.2 Les différents modèles de membranes artificielles 5
1.1.2.1 Les liposomes 6
1.1.2.2 Les bicouches planes 7
1.1.3 Tension de surface dans les membranes 8
1.1.4 Transitions de phase dans les membranes 9

1.2 LES BICOUCHES PHOSPHOLIPIDIQUES SUPPORTEES, UN SYSTEME MODELE : FABRICATION 12

1.2.1 Fusion de vésicules 12
1.2.2 La balance à film de Langmuir 14

1.3 DYNAMIQUE DES SYSTEMES ETUDIES 16

1.3.1 Techniques de mesure utilisées 16
1.3.2 Dynamique dans les vésicules libres et les bicouches lipidiques supportées .. 18
1.3.3 Diffusion transversale 19

1.4 TRANSITIONS DE PHASE DANS LES BICOUCHES LIPIDIQUES SUPPORTEES 20

1.4.1 Bicouches formées par fusion de vésicules 20
1.4.2 Bicouches formées par la technique de Langmuir 22
1.4.3 Transition principale dans les membranes libres 22
1.4.4 Effet de la proximité du substrat : couplage entre les deux feuillets 23

2 MATERIELS ET METHODES 25

2.1 STRUCTURE DES PHOSPHOLIPIDES UTILISES 25

2.2 PREPARATION DES BICOUCHES LIPIDIQUES SUPPORTEES 27

2.2.1 Balance à film de Langmuir 27
2.2.1.1 Principe 27

2.2.1.2 Transfert de Langmuir-Blodgett (LB) 30
2.2.1.3 Transfert de Langmuir-Schaeffer (LS) 32
2.2.2 Fusion de vésicules 33
2.2.2.1 Principe 33
2.2.2.2 Protocole expérimental 33
2.2.3 Comparaison des deux méthodes 34
2.2.4 Substrats utilisés 35

2.3 LA TECHNIQUE DE FRAPP 37

2.3.1 Principe 37
2.3.2 Dispositif expérimental 37
2.3.3 Mesures en température 44
2.3.4 Qualité des mesures effectuées 45

2.4 SIGNAUX ET ANALYSE 45

3 RESULTATS ET DISCUSSION 47

3.1 TAUX DE TRANSFERT DES COUCHES DE LANGMUIR 47

3.1.1 Dépôt de la première monocouche 48
3.1.2 Dépôt de la seconde monocouche 49
3.1.3 Dépôt d'une troisième monocouche 50
3.1.4 Qualité des bicouches sur mica 52
3.1.5 Conclusion 53

3.2 DIFFUSION DE LIPIDES DANS LES BICOUCHES SUPPORTEES ET ETUDE DE LA TRANSITION GEL-FLUIDE 54

3.2.1 Loi de diffusion 54
3.2.2 Transition principale gel-fluide des bicouches de DMPC et DPPC 55
3.2.3 Effet de la pression initiale de dépôt et de la force ionique 58
3.2.4 Influence de la nature du substrat sur le coefficient de diffusion 61
3.2.4.1 Dynamique de la bicouche 61
3.2.4.2 Marquage alternatif des feuillets sur mica 67
3.2.4.3 Dynamique d'une quadricouche sur mica 67
3.2.5. Détermination des énergies d'activation et des enthalpies de transition. Données thermodynamiques. 69
3.2.6 Influence de la méthode de préparation : comparaison fusion de vésicules/dépôts de Langmuir 71
3.2.7 Conclusion 75

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES……..…….77

ANNEXE 1……..……..…79

REFERENCES……80

Symboles et abréviations

Symboles

Ea	énergie d'activation (J/mol)
D	coefficient de diffusion (cm^2/s)
ΔH	variation d'enthalpie
ΔS	variation d'entropie
ΔH_{tr}	enthalpie de transition (J/mol^{-1})
γ	tension de surface (mN/m)
Π	pression de surface (mN/m)
q	vecteur d'onde de transfert (cm^{-1})
R	constante universelle des gaz (8.314 J/mol/k)
Tm	température de transition principale gel-fluide
Tr	taux de transfert

Abréviations

FRAP	Fluorescence Recovery After Photobleaching
FRAPP	Fluorescence Recovery After Patterned Photobleaching
LB	Langmuir-Blodgett
LS	Langmuir-Schaeffer
DMPE	1,2-Dimyristoyl-sn-Glycero-3-Phosphoethanolamine
DMPC	1,2-Dimyristoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholine
DPPC	1,2-Dipalmitoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholine
DSPC	1,2-Distearoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholine
DOPC	1,2-Dioleoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholine
SOPC	1-Stearoyl-2-Oleoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholine
NBD	7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl

Introduction générale

Les bicouches lipidiques ont souvent été étudiées comme modèle de système à 2 dimensions dans le domaine de la matière molle. L'utilisation de systèmes modèles simplifiés de membrane cellulaire est de plus en plus utilisées en biophysique, par exemple pour étudier les interactions membrane/membrane ou membrane/protéine. Elles sont aussi un milieu logiquement pressenti pour des applications biotechnologiques du type bio-senseur. Le fait de les adsorber sur un substrat rend leur étude plus facile mais implique de prendre en compte les modifications de comportement induites par les interactions substrat/bicouche. Ces interactions sont potentiellement intéressantes puisqu'elles peuvent permettre à la fois d'exacerber l'influence de certains paramètres pour en mieux comprendre l'effet et à la fois de choisir certaines conditions afin de sélectionner une(des) propriété(s) particulière(s) en vue d'une application donnée.

A travers une abondante littérature, rappelée dans le chapitre I, on constate qu'un certain nombre de résultats, comme la variation de température de transition gel-fluide due à la présence du substrat ou le couplage des deux feuillets de la bicouche, reste encore en discussion. Le chapitre II décrit les matériels et méthodes mis en oeuvre dans ce travail. En utilisant des outils adaptés et optimisés, le but de ce travail a été d'établir un corpus de données le plus précis et le plus rigoureux possible concernant le comportement dynamique latéral des phospholipides dans une bicouche supportée. Pour cela nous nous sommes attachés à la préparation d'échantillons les mieux définis possible à l'aide des dépôts de Langmuir (Blodgett ou Schaeffer) afin d'effectuer des mesures qui soient fiables. En utilisant la technique du retour de fluorescence après photoblanchiment, nous avons effectué des mesures de diffusion latérale des sondes lipidiques fluorescentes servant à retracer les propriétés de la bicouche. Le comportement diffusif a été étudié en fonction des différents paramètres qui régissent la dynamique d'une bicouche et dont la relation fait l'objet du chapitre III. Au travers de mesures en température, nous avons pu notamment mettre en évidence l'interaction de différents supports avec les deux feuillets de la bicouche. Nous essayons dans la discussion qui accompagne les résultats de relier nos observations avec les résultats de la bibliographie et d'obtenir une vision globale et cohérente de ces systèmes à travers la description des comportements. Ce travail constitue une étape primordiale dans la compréhension des mécanismes diffusifs de systèmes plus complexes.

1 Revue bibliographique

1.1 Des membranes biologiques aux membranes artificielles

Les membranes biologiques représentent un élément fondamental de l'organisation cellulaire. Elles assurent l'individualité cellulaire et sont responsables de la compartimentation de l'espace cytoplasmique en organites fonctionnellement spécialisées ainsi que des échanges contrôlés entre l'intérieur de la cellule et le milieu extra-cellulaire.

Ces membranes sont loin d'être des enveloppes inertes. Le modèle de « mosaïque fluide » a été introduit dès 1972 par Singer et Nicolson [1]. Ce modèle décrit les membranes biologiques comme étant constituées d'une double couche de phospholipides, dans laquelle les chaînes hydrophobes se font face, traversée par des protéines membranaires. Les lipides y sont en perpétuel mouvement de diffusion latérale, via le mouvement brownien [2], et les protéines membranaires se déplacent également, mais plus lentement que les lipides qui les entourent.

Grâce au développement de nouvelles techniques telles que les pièges optiques ou la spectroscopie de corrélation de fluorescence, de récentes études [3, 4] ont montré une grande complexité de l'organisation dynamique des membranes, les lipides (et les protéines) ne diffusent pas aussi librement que le proposait le modèle originel mais s'organisent en domaines lipo-protéiques temporaires. L'existence de micro-domaines et de phases diverses au sein même des membranes a révélé toute leur complexité et la nécessité d'utiliser des modèles moins élaborés pour en comprendre le fonctionnement.

1.1.1 Composition et structure des membranes biologiques

1.1.1.1 Composition chimique

Les membranes sont majoritairement composées de lipides et de protéines dont les quantités relatives varient d'une cellule à l'autre. Il existe une variété importante de lipides possédant une structure différente, et donc des caractéristiques géométriques et physiques différentes.

On répertorie trois familles de lipides dans les membranes : les glycérophospholipides (ou phospholipides), les sphingolipides et les stérols.

Les phospholipides sont les lipides les mieux représentés. Ils sont composés d'une tête polaire hydrophile (surface moyenne de 50 Å²) et d'une queue apolaire hydrophobe, comportant deux chaînes d'acides gras de longueur différente, dont l'une porte une ou plusieurs doubles liaisons. La longueur moyenne de ces chaînes est de l'ordre de 2-3 nm. Suivant le lipide, la tête peut être ionique (charge positive ou négative), zwitterionique (deux charges opposées) ou neutre. Ils sont également classés selon la structure de leur squelette carboné (nombre de carbones, présence d'insaturations…).

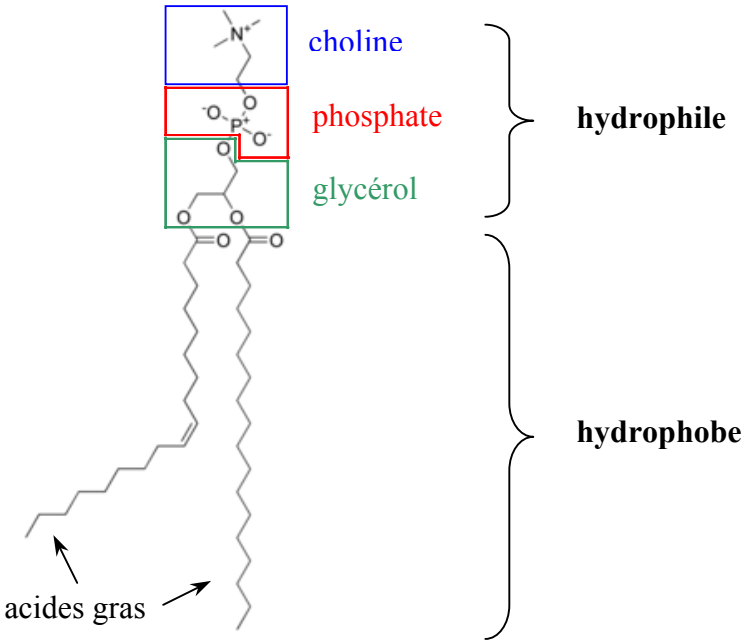


Figure 1.1 : Structure de la phosphatidylcholine.

L'exemple le plus classique de phospholipide, et sur lequel nous avons porté notre attention, est la phosphatidylcholine (figure 1.1). Cette molécule est un ester bâti sur le glycérol (trialcool). Elle comporte deux chaînes aliphatiques, issues des acides gras engagés dans l'estérification de deux groupements alcool du glycérol. Le troisième groupement alcool est estérifié par l'acide phosphorique (sous forme d'un groupement phosphate, ionisé, donc chargé, au pH cellulaire). L'ensemble forme un groupement phosphatidyl. Ce dernier est ici

lié à la choline, groupement chargé positivement. C'est donc un phospholipide zwitterionique.. Comme le groupement phosphate est chargé négativement au pH cellulaire, l'ensemble de la molécule est neutre.
Suivant la nature de la tête polaire, on retrouve les phospholipides suivants :

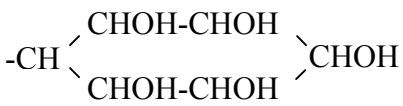
tête polaire	**nom classique**	**symbole**
-H	acide phosphatidique	PA
$-CH_2CH_2NH_3^+$	phosphatidyléthanolamine	PE
$-CH_2CH_2N^+(CH_3)_3$	phosphatidylcholine	PC
	phosphatidylinositol	PI
$-CH_2CH(COO)NH_3^+$	phosphatidylsérine	PS
$-CH_2CHOH-CH_2OH$	phosphatidylglycérol	PG

Tableau 1.1 : Nomenclature des phospholipides suivant la tête polaire.

1.1.1.2 Dynamique et fluidité

Dans le vivant, les deux feuillets constitutifs des membranes sont asymétriques et il a été montré qu'il existait des échanges de lipides entre ces deux hémimembranes.
La phase lipidique des membranes biologiques est fluide dans les conditions physiologiques et permet donc le déplacement des constituants. Les lipides peuvent se déplacer soit par une simple rotation sur eux-même, soit par diffusion latérale dans le feuillet dont ils font partie, soit, beaucoup plus rarement, en changeant de feuillet (flip-flop). Une enzyme, la flipase, est en générale requise pour permettre le changement de feuillet.
L'amplitude de ces mouvements dépend à la fois de la température et de la concentration lipidique elle-même. La fluidité est facilitée par une augmentation de la température et par la présence d'insaturations dans les queues hydrophobes des phospholipides, et ralentie par la présence de chaînes saturées ainsi qu'une forte proportion de cholestérol. En effet la présence

d’insaturations induit un encombrement stérique plus volumineux de la chaîne carbonée. Cette géométrie engendre un désordre plus important dans l’agencement des lipides dans la bicouche, ce qui se traduit finalement par une plus grande fluidité de celle-ci.
Les mouvements dans le plan de la membrane concernent les protéines et les lipides. Ils sont rendus possibles par l'agitation moléculaire, et, surtout, par le fait que les interactions entre molécules de la membrane sont des interactions faibles. Tous les facteurs modifiant les interactions faibles entre constituants de la membrane pourront influencer sa fluidité. La mobilité des phospholipides est donc un facteur important qui conditionne de nombreuses fonctions biologiques.
La grande variété de lipides et de protéines au sein d’une même cellule en fait un système complexe fortement inhomogène. Les membranes sont ainsi caractérisées par des hétérogénéités de distribution et d’état de phase.

La complexité des membranes biologiques et leurs interactions avec les composants intra et extracellulaires rendent les investigations directes difficiles. Les nombreux modèles de membranes artificielles développés ont joué un rôle important dans la compréhension de leurs caractéristiques chimiques et fonctionnelles.

1.1.2 Les différents modèles de membranes artificielles

Les lipides amphiphiles peuvent, dans certaines conditions, s'organiser en structures sphériques, monocouche (les micelles), si leur molécule comprend une seule molécule d'acide gras. La morphologie des phases formées dépend de plusieurs paramètres dont la concentration, la température, mais aussi la forme géométrique des molécules. Ainsi, les glycérophospholipides comportent deux queues hydrophobes et forment des bicouches planes ou sphériques.
La figure 1.2 montre les différents types d’organisation possible des molécules amphiphiles en solution qui ont toutes en commun la mise en contact des parties hydrophiles avec l’eau et le masquage des parties hydrophobes.

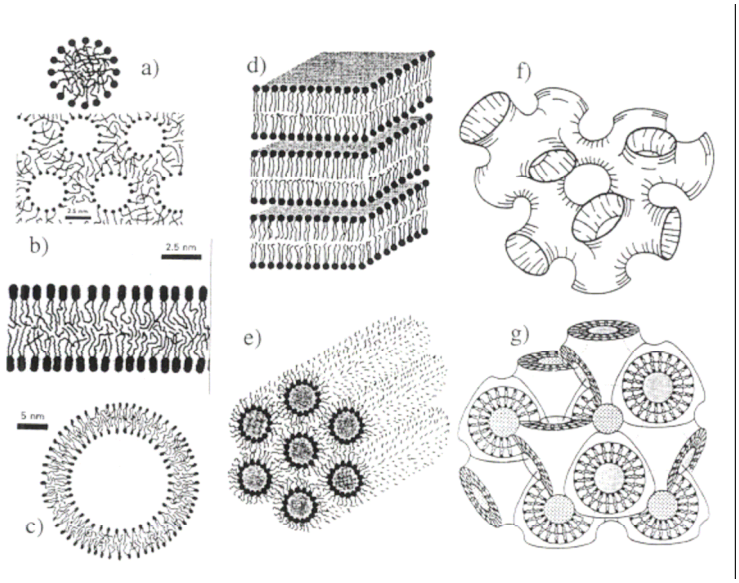


Figure 1.2 : a) micelles et micelles inverses, b) bicouche, c) liposome, d) phase lamellaire, e) phase hexagonale inverse (micelles cylindriques inverses), f) phase éponge, g) phase cubique inverse bicontinue. D'après [5, 6].

1.1.2.1 Les liposomes

Les liposomes constituent le modèle le plus simple de structure cellulaire, considérée comme le niveau zéro de la modélisation (objet constitué d'une membrane lipidique sans autres constituants).

Les liposomes sont des vésicules sphériques de quelques dizaines à quelques milliers de nanomètres de diamètre. Ces vésicules sont composées d'une ou de plusieurs bicouches lipidiques qui permettent de séparer un milieu intravésiculaire d'un milieu extérieur. Les phospholipides naturels forment spontanément des liposomes en milieu aqueux car l'organisation la plus stable est celle qui permet de minimiser les interactions entre les parties hydrophobes et les molécules d'eau. Les liposomes ne se forment qu'à une température supérieure à leur transition de phase [7].

Ils sont classés selon leur taille et le nombre de bicouches lipidiques concentriques. On distingue :

- les SUV (small unilamelar vesicle) ou vésicules unilamellaires de petite taille : diamètre inférieur à 200 nm

- les LUV (large unilamelar vesicles) ou vésicules unilamellaires de grande taille : 200 à 1000 nm de diamètre

- les GUV (giant unilamelar vesicles) ou vésicules unilamellaires géantes : diamètre supérieur à 1000 nm

- les MLV (multilamelar vesicles) ou vésicules multilamellaires

Pour former un liposome, il est nécessaire que l'aire de la tête hydrophile des lipides soit légèrement supérieure à la section de la chaîne aliphatique. Les molécules qui remplissent ces conditions s'auto-assemblent spontanément en vésicules, c'est-à-dire en structures fermées. Le rayon minimum de la paroi de la vésicule est alors fixé par la géométrie du lipide. Il en découle automatiquement que le nombre de molécules lipidiques est différent sur le feuillet lipidique externe et sur le feuillet lipidique interne. Mais dans la limite où le rayon de la vésicule devient grand par rapport à la longueur d'une molécule, le nombre de molécules lipidiques sur le feuillet interne tend à devenir égal à celui sur le feuillet externe.

Lorsqu'elles forment des vésicules, les bicouches lipidiques limitent les échanges entre le compartiment interne et l'extérieur. Les bicouches pures sont imperméables aux ions et aux grosses molécules polaires, et seulement partiellement perméables à l'eau qui peut s'immiscer entre les lipides sous l'effet de la pression osmotique. Ceci signifie que les fonctions physiologiques des membranes biologiques ne peuvent reposer simplement sur la bicouche mais nécessitent la présence d'autres composants tels que les protéines membranaires pour permettre des échanges contrôlés entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule.

1.1.2.2 Les bicouches planes

Les bicouches lipidiques, supportées ou libres (figure 1.3), sont des systèmes biomimétiques à deux dimensions facilement accessibles à des techniques de caractérisation de surface du fait de leur localisation dans l'espace [8, 9, 10]. L'épaisseur de la bicouche varie entre 4 et 7 nm suivant les lipides qui la constituent.

Les bicouches libres sont surtout utilisées pour déterminer les mécanismes de régulation des canaux ioniques et autres protéines membranaires localisées dans la membrane.

Grâce aux travaux de McConnel et al. [11], les membranes déposées sur des supports solides ont été de plus en plus utilisées pour étudier les processus membranaires d'adhésion et

d'interaction cellulaire [12, 13, 14] et pour le développement de nouvelles surfaces biofonctionnalisées. Actuellement, elles sont de loin les systèmes modèles de membrane cellulaire les plus utilisés [15, 13, 16, 17], avec notamment le développement de « nouveaux » supports tels que les coussins de polymère qui permettent d'éloigner la membrane du substrat et d'éviter ainsi les effets de leur proximité [18].

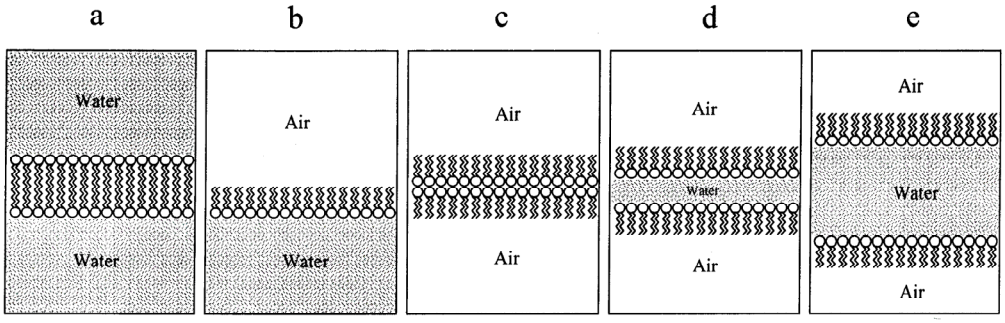


Figure 1.3 : Représentation schématique des différents systèmes membranaires modèles de bicouches planes : (a) film noir (BLM : black lipid membrane), (b) monocouche, (c) film noir de Newton (NBF : Newton black film), (d) film noir commun, (e) film de savon. D'après [20].

1.1.3 Tension de surface dans les membranes

A l'intérieur d'une phase condensée, les interactions entre atomes ou molécules sont des interactions à courte portée. Une molécule placée à l'intérieur d'une phase volumique interagit avec tous ses voisins avec une énergie de cohésion négative. Par contre, les molécules au voisinage de la surface n'interagiront pas de la même façon avec les molécules situées de l'autre côté de la surface et auront donc une énergie différente. Le système va donc chercher à minimiser son énergie interfaciale. Ainsi un liquide libre, à l'équilibre, adoptera la forme d'une sphère.

Pour augmenter l'aire du système, il faut lui fournir de l'énergie. Cette énergie vient des liaisons moléculaires ou atomiques qu'il a fallu briser pour amener des molécules du volume vers la surface. Pour accroître l'aire du système (membrane par exemple) de dA, le travail à fournir au système s'exprime :

$$\delta W = \gamma_0 \, dA$$

où γ_0 désigne la tension de surface (en N/m) et correspond à une force de rappel par unité de longueur. On peut également dire qu'elle est une mesure de l'énergie de cohésion à une interface. L'unité employée est le milliNewton par mètre (mN/m) mais on peut parfois l'exprimer en dyne par centimètre (dyn/cm).

Les liquides polaires comme l'eau ont des interactions moléculaires très fortes et donc une tension de surface élevée. On comprend donc aisément que tout facteur diminuant ces fortes interactions aura pour conséquence de diminuer la tension de surface. C'est le cas des molécules amphiphiles qui s'organisent spontanément à l'interface eau-air, ce qui amène parfois à les appeler tensioactifs ou surfactants.
Théoriquement, une membrane « au repos » a donc une tension de surface nulle alors qu'une monocouche n'est à l'équilibre que si on lui applique une pression de surface externe [19].
Il a d'ailleurs été montré qu'une monocouche de Langmuir de DMPC (1,2-Dimyristoyl-sn-Glycéro-3-Phosphocholine) comprimée à 31.5 mN/m était dans un état équivalent à celui d'une bicouche composée du même phospholipide (sa pression effective étant de 30.5 mN/m, le petit écart provenant du couplage monocouche-monocouche à l'intérieur de la bicouche) [21].
De même, Blume [22] a établi une comparaison des caractéristiques des deux systèmes sur les transitions de phase gel/fluide et fluide-condensé/fluide-expansé. Il ressort de son étude que le comportement de la bicouche est fortement similaire à celui de la monocouche respective comprimée à 30 mN/m.

1.1.4 Transitions de phase dans les membranes

Lors de la reconstitution de membranes phospholipidiques *in vitro*, les différents états thermodynamiques des membranes ont pu être mis en évidence. En fonction de la température, on distingue plusieurs phases [23, 24] (figure 1.4) :

- une phase cristalline L_c, à très basse température. Les molécules sont dans un état ordonné. La diffusion transversale des lipides y est quasi inexistante.

- une phase gel L_β. Les interactions de Van der Waals entre les chaînes d'acides gras sont optimisées et la diffusion translationnelle est très faible.

- une phase fluide L_α à plus haute température. La structure est bidimensionnellement fluide, le niveau d'entropie des chaînes d'acide gras et de diffusion translationnelle est élevé [25].

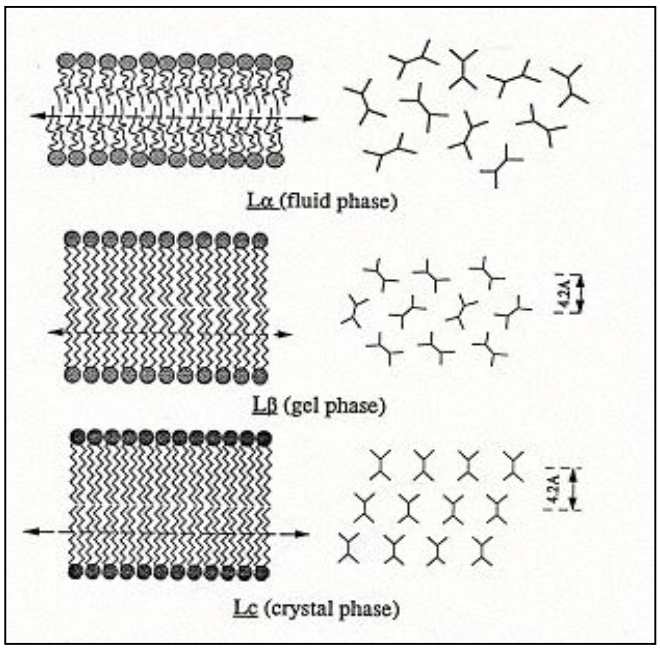


Figure 1.4 : Représentation des différentes phases d'une bicouche lipidique.

La température de transition entre la phase gel L_β et la phase fluide L_α est appelée température de transition principale gel-fluide (notée Tm pour melting Temperature). Elle est définie comme étant la température pour laquelle les variations d'enthalpie contrebalancent le gain d'entropie généré principalement par le désordre des chaînes ($\Delta H = Tm\ \Delta S$). Elle rend compte de la quantité d'énergie qu'il a fallu fournir pour rompre la haute cohésion moléculaire caractéristique d'un système membranaire dans un état ordonné. Cette cohésion est assurée par des liaisons de faible énergie tant au niveau des chaînes hydrophobes (liaisons de Van der Waals) que des parties polaires (liaisons hydrogènes, attractions électrostatiques).

La transition principale est une transition du premier ordre et est associée à la transition des chaînes carbonées d'un état désordonné vers un état *trans* (par rapport à la liaison C-C). La

configuration *trans* va créer une structure plus étendue par rapport à la liaison *cis* qui formera un coude.

La température de transition Tm varie en fonction de la longueur et du degré d'insaturation des chaînes d'acide gras, ainsi que de la nature du groupement polaire. Pour les lipides ayant une même tête polaire, Tm augmente avec la longueur des chaînes (le nombre de carbones) car les interactions de Van der Waals augmentent. La variation de Tm en fonction de la longueur de chaîne augmente avec le même incrément pour les phosphatidylcholines et les phosphatidyléthanolamines, montrant bien que la transition en température est principalement déterminée par la cohésion des chaînes hydrocarbonées. La présence d'insaturations, qui défavorise les interactions entre chaînes, va au contraire abaisser Tm.
Pour les mélanges de lipides miscibles, la température de transition du système sera intermédiaire entre celles des lipides purs [26].

Certains lipides possèdent une phase intermédiaire entre les phases gel et fluide, nommée phase *ripple* P_β [27, 28]. Cette prétransition est liée à la formation d'ondulations périodiques à la surface membranaire.

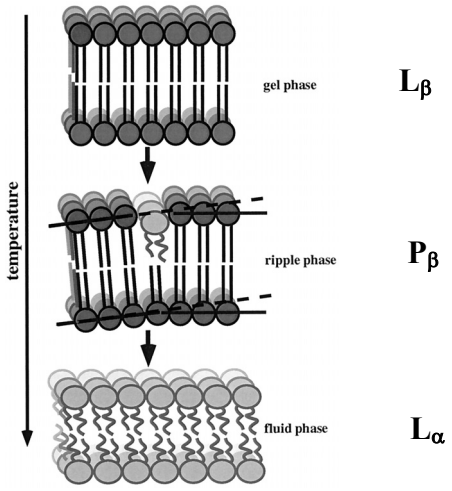


Figure 1.5 : Représentation de la phase *ripple*, d'après [27].

Cette phase *ripple* a été observée sur des bicouches libres mais jamais sur des bicouches supportées.

1.2 Les bicouches phospholipidiques supportées, un système modèle : fabrication

1.2.1 Fusion de vésicules

Une des manières les plus simples et rapides pour former des membranes supportées est l'adsorption des vésicules phospholipidiques sur une surface et consécutivement leur transformation en bicouche plane. Pour que la fusion se produise, il faut que l'interaction entre les lipides soit la plus faible possible, ce qui signifie qu'ils doivent se trouver à l'état fluide. Expérimentalement, cela se traduit par le fait que la température à laquelle se fait la fusion doit être supérieure à la température de transition principale gel/fluide du lipide considéré. De nombreuses études théoriques et expérimentales ont permis de comprendre et donc de mieux contrôler la cinétique et les propriétés de formation des bicouches supportées [29-34].

Plusieurs processus peuvent se produire lorsqu'un liposome rencontre une surface [33, 35, 36]. Adsorbés à la surface, les liposomes se déforment et lorsque cette déformation est suffisante, ils peuvent se rompre et se transformer en bicouche lipidique ayant la forme d'un disque. Parallèlement, les vésicules voisines peuvent interagirent entre elles et fusionner avant de se rompre sous forme de domaines (disques lipidiques). Ces domaines coalescent et peuvent induire la fusion d'autres vésicules adsorbées. Le type de comportement observé, adhésion de vésicules intactes ou éclatement sur la surface, dépend de l'énergie d'interaction entre les lipides et le substrat. La contribution de ces interactions est liée à la nature du substrat (charge, structure, rugosité) et aux vésicules lipidiques (composition, charge, taille, état physique) aussi bien qu'à l'environnement aqueux dans lequel ils se trouvent (pH et force ionique).

La cinétique et le mécanisme de formation des bicouches lipidiques supportées par fusion de vésicules a été étudié en utilisant des techniques telles que la microbalance à cristal de quartz (QCM-D) [37], la résonance de plasmons de surface [38], la réflectivité de neutrons [39], la microscopie à force atomique [33, 34], la spectroscopie de corrélation de fluorescence et l'ellipsométrie [40].

Kasemo et al. [36, 37] ont tenté d'élucider le mécanisme d'interaction entre des liposomes et des substrats solides par le biais de l'utilisation de la microbalance à cristal de quartz (QCM-D) qui permet de suivre en temps réel l'adsorption, la fusion et la rupture des vésicules sur différents types de surfaces. Des liposomes cationiques (DOTAP) exposés à une surface de silice (chargée négativement) s'adsorbent puis se rompent individuellement jusqu'à ce que le support soit entièrement recouvert d'une bicouche. A l'inverse, des liposomes chargés négativement (DOPS) ne s'adsorberont pas. En revanche, pour des liposomes ayant une charge moyenne neutre, un taux de couverture critique est nécessaire avant d'amorcer la transformation des liposomes adsorbés en bicouche continue. A l'issue de leurs investigations, ils ont conclu que les vésicules s'adsorbaient irréversiblement sur du SiO_2, Si_3N_4, TiO_2, Pt oxydé et Au oxydé, mais que le passage des vésicules à la bicouche ne se faisait que pour les deux premières surfaces après avoir atteint un taux de couverture critique, alors que dans les autres cas, les vésicules restaient intactes mais déformées.

Les différentes étapes du processus de fusion de vésicules sont résumées dans la figure 1.6. Initialement, les vésicules en solution diffusent à la surface. Le coefficient de diffusion peut être estimé à partir du modèle de diffusion des sphères dures de Stokes-Einstein. L'adsorption des vésicules à la surface se poursuit jusqu'à une concentration critique et la déformation due aux interactions stériques entre les vésicules va augmenter la tension latérale dans la membrane [41]. Pour une tension latérale suffisamment élevée, la formation d'un pore va permettre de diminuer l'énergie de la vésicule et le rayon du pore va s'agrandir jusqu'à ce que la tension diminue suffisamment pour que l'équilibre de la vésicule soit atteint.

L'énergie d'un pore est donnée par :

$$F_{pore} = 2\pi L\Sigma_e - \pi L^2\Sigma$$

avec : L : rayon du pore

Σ_e : tension de ligne due aux effets hydrophobes

Σ : tension latérale dans la membrane

l'équilibre est atteint lorsque $\frac{dF_{pore}}{dL} = 0$ d'où $\Sigma = \Sigma_e/L$

qui traduit bien que l'augmentation de L entraîne une diminution de Σ.

Les domaines de vésicules éclatées vont ensuite diffuser à la surface pour donner une bicouche quasi sans défauts :

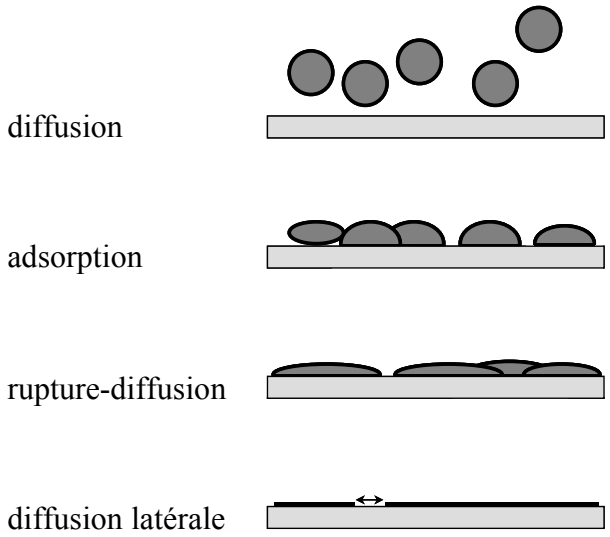


Figure 1.6 : Représentation du processus de fusion de vésicules sur un support solide. D'après [29].

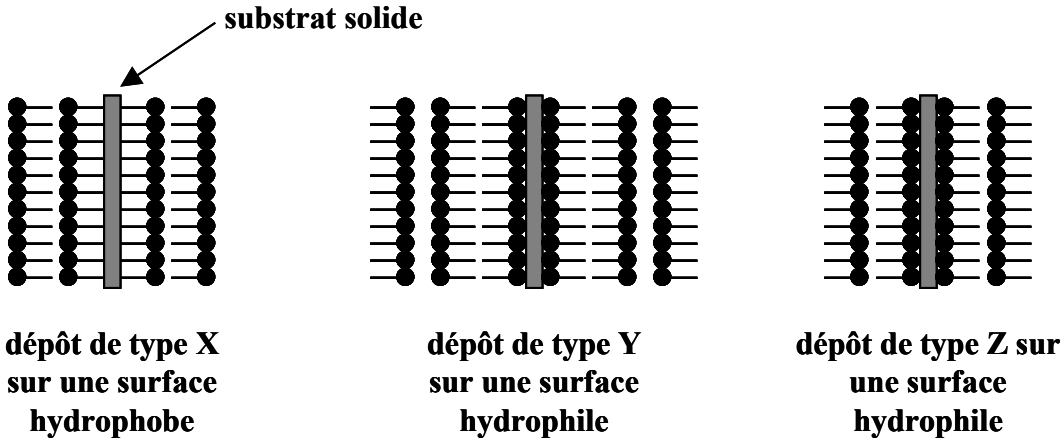
Lors du processus de fusion, la surface interne de la vésicule devient la monocouche proximale de la bicouche supportée.
La fusion de vésicules est une technique flexible autorisant des dépôts aussi bien sur des surfaces planes que texturées.

1.2.2 La balance à film de Langmuir

Les films de Langmuir-Blodgett sont constitués de couches de Langmuir monomoléculaires empilées les unes sur les autres à la surface d'un substrat solide.
C'est en 1920 qu'Irving Langmuir introduit la technique du transfert d'une monocouche de molécules amphiphiles sur un support solide en descendant lentement le support hydrophile à travers la monocouche à l'interface eau-air. Ce n'est que quelques années plus tard, au début des années 30, que Katharine Blodgett réussira le transfert de monocouches successives sur des substrats en verre. La technique utilisée à cette époque n'a que très peu changé, des améliorations techniques ont certes été apportées, mais le principe est resté identique.

Les mesures de la pression de surface en fonction de l'aire moléculaire à température constante (isothermes de compression) peuvent être considérées comme l'équivalent à deux dimensions des isothermes pression-volume. Associée à des techniques telles que la microscopie à angle de Brewster (BAM) et la diffraction de rayons X, de nombreuses informations sur la structure des phases bidimensionnelles aussi bien que les transitions de phases ont pu être mises à jour [42, 43].

Plusieurs types de dépôts peuvent avoir lieu suivant la nature du substrat et des molécules tensioactives :



L'avantage de cette méthode de déposition est de permettre le contrôle de l'organisation et de l'arrangement du film à l'échelle moléculaire, donnant ainsi accès à l'étude de la structure et des transitions de phase.

Bien que simple en apparence, le dépôt de monocouche et/ou de multicouches par cette technique nécessite de nombreux critères. Les facteurs en question relèvent des interactions lipide-substrat, englobant les caractéristiques de la monocouche (sa composition, le nombre de phases…et tous les autres aspects définissant son équilibre), du substrat (nature chimique, rugosité) et de la sous-phase aqueuse (température, présence de sels).

Le transfert de la première monocouche reste une opération réussie dans presque tous les cas alors que le transfert de la seconde relève parfois du challenge. Osborn et al. [44] ont étudié les transferts de phospholipides sur du silicium, et plus particulièrement le transfert de deux monocouches de type Y. Ils ont montré que le dépôt d'une seconde monocouche n'était possible que dans une certaine gamme de pression (en général supérieure à 42 mN/m), alors que pour des pressions inférieures, la seconde couche était partiellement formée ou la première déjà déposée est ré-entraînée à la surface (« pelage » ou désorption).

De plus, pendant le transfert, la charge de surface du substrat peut conduire à un phénomène de condensation de la monocouche dans un autre état que celui où elles étaient à la surface de la cuve [46, 47].

Cette technique s'avère parfaitement adaptée pour élaborer des films constitués de plusieurs couches bien organisées, de nature différente, en particulier avec les acides gras. Cependant, elle présente quelques inconvénients :

- il est difficile de déposer des monocouches qui ne se trouvent pas en phase « condensée », les films devant présenter une rigidité suffisante.
- les films très « rigides » subissent des contraintes importantes (notamment de cisaillement) qui peuvent modifier leur structure lors des transferts.

D'autres techniques sont alors exploitables suivant les systèmes que l'on souhaite obtenir, notamment la technique de Langmuir-Schaeffer (dépôt avec le substrat à l'horizontale) ou bien les films auto-assemblés, ces derniers donnant des films plus résistants avec une meilleure stabilité thermique. Cependant, ils présentent une organisation moléculaire plus difficilement modulable que les films obtenus par la technique de Langmuir-Blodgett.

1.3 Dynamique des systèmes étudiés

1.3.1 Techniques de mesure utilisées

L'étude de la diffusion utilise couramment des montages de microscopie optique, le plus souvent de fluorescence, mais d'autres méthodes ont été développées :

- la résonance magnétique nucléaire utilisant des gradients de champ pulsés (NMR : Nuclear Magnetic Resonance) [56, 78]

- la diffraction de neutrons (technique intéressante et lourde) [97, 98]

- le retour de fluorescence après photoblanchiment (FRAP : Fluorescence Recovery After Photobleaching) permet de mesurer la diffusion translationnelle des molécules [73]. Elle peut être mise en oeuvre *via* un simple faisceau laser (FRAP spot, [52, 76, 75]) ou par formation d'un réseau d'interférences lumineuses dont la largeur peut être variée ($FRAP_{patterned}P$) [51]. Nous reviendrons sur les principes de la technique dans la partie expérimentale.

- la spectroscopie de corrélation de fluorescence (FCS : Fluorescence Correlation Spectroscopy) [50, 96]. C'est une méthode d'étude des fluctuations de fluorescence produites par un petit nombre de molécules entrant et sortant d'un volume d'observation d'une fraction de femtolitre, défini par un faisceau laser focalisé. Le temps de diffusion τ_d d'une espèce moléculaire est déduit de la fonction d'auto-corrélation temporelle $g(\tau) = \langle I(t)\, I(t+\tau) \rangle / \langle I(t) \rangle^2$, où *I(t)* est l'intensité de fluorescence. Dans le cas simple d'une diffusion brownienne libre, $g(\tau) = 1 + \frac{1}{N} \times \frac{1}{1+\tau/\tau_d}$, où *N* est le nombre moyen de molécules dans la surface d'observation. τ_d est relié au rayon transversal *w* du faisceau laser focalisé et à la constante de diffusion D par $\tau_d = w^2/(4D)$.

- le suivi de particules uniques (SPT : Single Particle Tracking, ou SMT : Single Molecule Tracking). Cette technique relativement récente permet le suivi du déplacement de molécules individuelles par vidéomicroscopie couplée à l'analyse d'images. Les sondes utilisées sont soit des particules submicrométriques (particules de latex, nanocristaux ou colloïdes d'or, couplés à la molécule d'intérêt par un anticorps), et on parle alors de suivi de particule unique ou SPT [3, 99], soit des molécules fluorescentes (suivi de molécule unique ou SMT [94, 95]). La résolution spatiale est de l'ordre du nanomètre et la résolution temporelle, généralement imposée par la cadence vidéo, peut atteindre la centaine de Hertz. A partir des trajectoires des molécules, le calcul du déplacement quadratique moyen de la position en fonction du temps permet de déterminer les modes de diffusion.

La méthode de FRAP réalise une mesure moyenne sur un grand nombre de molécules. La FCS effectue une mesure moyenne sur un petit nombre de molécules et nécessite de ce fait un certain nombre de répétitions pour obtenir une valeur finale significative. Les SPT et SMT permettent une caractérisation plus fine des sous-populations. A contrario, ces trois dernières

techniques autorisent la mise en évidence de phénomènes qui auraient pu être masqués par l'effet de moyenne de la FRAP. Dans certaines situations ce sont donc des techniques complémentaires

Bien que ces techniques soient sensibles pour des échelles de temps différentes, les coefficients de diffusion obtenus varient considérablement (FRAP et FCS : D = 4.10^{-8} cm²/s alors que par diffraction de neutrons D = 10^{-7} à 4.10^{-6} cm²/s). Un tel écart provient des différents modes de diffusion. Pour des échelles de temps très courtes, on considère que la diffusion est dominée par un mouvement de confinement dans un volume libre défini par les lipides voisins les plus proches alors que la diffusion de l'ordre de la milliseconde ressemble à du mouvement Brownien dans un fluide visqueux.

1.3.2 Dynamique dans les vésicules libres et les bicouches lipidiques supportées

Les molécules de lipides peuvent diffuser librement dans la bicouche lipidique (figure 1.7).

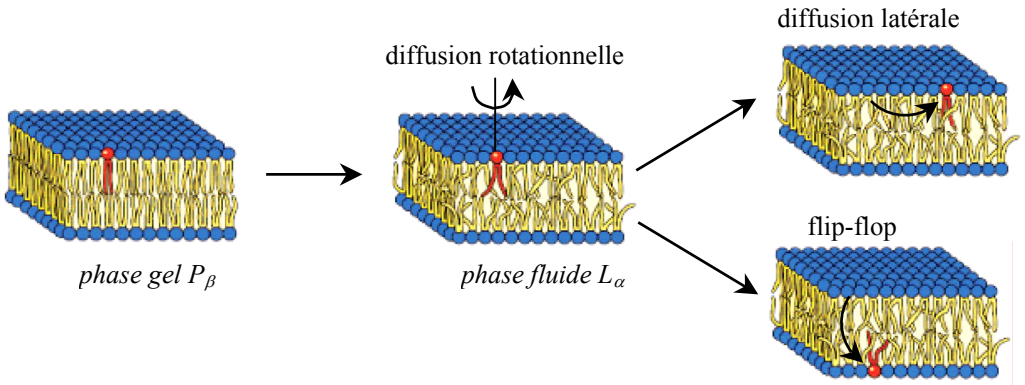


Figure 1.7 : Représentation schématique de la dynamique des lipides au sein des membranes.

De nombreux travaux [50-53] ont rapporté que les coefficients de diffusion des lipides marqués dans les GUV (l'avantage des GUV est que leur membrane est libre) et dans les bicouches lipidiques supportées par les techniques de FRAP et de FCS étaient comparables. Plus récemment, une étude par FCS [54] a montré que la diffusion dans les GUV était deux

fois plus rapide que dans les bicouches lipidiques supportées dans les mêmes conditions (force ionique, pression osmotique).
Forstner et al. [60] ont étudié par SPT la diffusion brownienne des monocouches de Langmuir en phase fluide. Ils ont pu calculer un coefficient de diffusion moyen de l'ordre de $1.1 \pm 0.2 \times 10^{-8}$ cm²/s pour des monocouches comprimées de 5 à 35 mN/m.

Malgré la présence d'un film d'eau entre la bicouche et le substrat qui permet de conserver une certaine fluidité, les conséquences de la proximité du support sur la diffusion et la réorganisation des molécules restent activement discutées [56, 57].
Quelques exemples sont fournis dans le tableau 1.2.

lipides	**système**	**T °C**	**D × 10^8(cm²/s)**	**références**
POPC (Tm = 5°C)	multicouches	20	3.4 ± 0.3	[55]
DLPC (Tm = -2°C)	multicouches	20	4.6 ± 0.3	[55]
DPPC (Tm = 41°C)	MLV	< Tm	0.4×10^{-2}	[67]
DPPC	MLV	> Tm	1	[67]
DMPC (Tm = 24°C)	MLV	< Tm	1×10^{-2}	[67]
DMPC	MLV	> Tm	1.6	[67]
DMPC	bicouche sur silicium	20	0.66	[68]
DMPC	bicouche sur silicium	30	3.7	[68]

Tableau 1.2 : Exemples de coefficients de diffusion latérale mesurés dans différents systèmes en utilisant le FRAP en spot.

1.3.3 Diffusion transversale

La diffusion transversale est associée au passage d'un lipide d'une monocouche à l'autre. Cette diffusion transversale est également appelée « flip-flop » (figure 1.7). C'est un processus lent et peu fréquent car il implique de faire passer la tête polaire d'une molécule lipidique à l'intérieur de la zone hydrophobe constituée par les queues des autres molécules. Le temps associé à ce processus est généralement admis comme étant de l'ordre de l'heure voire du jour suivant la nature du phospholipide (les phospholipides ayant au moins une chaîne insaturée ont un temps de flip-flop plus rapide) [58]. Dans les membranes biologiques,

le passage d'un feuillet à l'autre a effectivement lieu et est en général associé à des protéines membranaires telles que les flipases [59].

En utilisant la spectroscopie vibrationnelle par génération des fréquence sommes (SFVS), Liu et al. [61] ont mesuré directement les temps de diffusion transverse dans des bicouches phospholipidiques supportées. Les demi-temps de flip-flop vont d'environ 8.4 à 1.3 minutes entre 12.1 et 20.4 °C respectivement pour le DMPC, et de 59.8 à 9.2 minutes entre 30.5 et 36.6 °C pour le DPPC, ceci pour des bicouches déposées à une pression de surface de 30 mN/m, et en dessous de leur transition de phase. Il est communément admis que la tension de surface dans une membrane fluide varie entre 30 et 35 mN/m [19]. La tension de surface pouvant affecter la dynamique du flip-flop, Liu et al. suggèrent que la dynamique du flip-flop sera augmentée d'un facteur 1.3 pour une tension de surface réduite de 10 mN/m. Ce qui appelle à penser que cette dynamique est plus lente pour des pressions de dépôts supérieures. Ils ont également montré que l'addition de marqueurs altérait significativement ces taux d'échange.
La cinétique du flip-flop est également fortement dépendante de l'état dans lequel se trouve le système et est fortement augmentée au delà de la température de transition principale gel-fluide [62].

1.4 Transitions de phase dans les bicouches lipidiques supportées

Bien qu'il ait déjà été mis en évidence une influence de la proximité du substrat sur la mobilité et la transition gel-fluide, ces points restent cependant sujets à de nombreuses controverses.

1.4.1 Bicouches formées par fusion de vésicules

Ces travaux concernent ceux de Xie et al. [71], Keller et al. [69] et Charrier et al. [70]. Ces différentes équipes ont étudié pas AFM la/les transitions de phase dans des bicouches de phospholipides zwitterioniques, sur mica.

Les travaux de Xie et al. [71] sur des bicouches de DMPC (température de transition gel-fluide = 24°C) ont montré que la transition est fortement affectée par l'état initial de la phase gel qui induit une structure présentant des défauts. En refroidissant leurs échantillons pour passer de la phase fluide à la phase gel, ils ont observé un nouveau type de défaut visible sous forme de trou, qu'ils attribuent à une persistance de la phase fluide (phénomène de « surfusion »). Ces défauts tendent ensuite à disparaître en diminuant encore la température. Lorsque la bicouche amorce sa transition, un ordonnancement des lipides s'effectue et la bicouche « se déchire » en formant des trous. Au cours de la transition, il y a formation de trous dans la bicouche, apparition de la phase gel, ordonnée, mais aussi une région ayant une hauteur intermédiaire entre celle des trous et celle de la phase gel. Ils attribuent cette région intermédiaire à une phase désordonnée mobile dont la densité a été réduite pendant le déchirement. Leurs expériences révèlent le lent équilibrage de la transition gel-fluide (thermodynamiquement du premier ordre, transition classique de Van't Hoff).

Keller et al. [69] quant à eux ont mis en évidence une transition de phase découplée sur le système 80 % mol DPPC et 20 % mol SOPC. Le mélange utilisé forme une structure granulaire sur le mica et il est aisé d'observer la transition gel-fluide qui s'amorce initialement au niveau des joints de grains. Le milieu utilisé est de l'eau déionisée. Il en va de même pour la transition inverse. La structure des grains est identique dans les deux feuillets de la bicouche. Au cours du chauffage, le changement de phase de la monocouche « proximale » (la plus proche du substrat) commence une fois que la monocouche « distale » (la plus éloignée) a complètement terminé sa transition. Le support en mica « stabilise » la phase gel de la monocouche proximale, via des interactions fortes. La différence de température de transition entre le premier et le second feuillet est de l'ordre de 10°C. Il semble y avoir peu d'effet sur la monocouche distale.
D'autre part les travaux de Xie et al. font état d'un rôle important du sel. En effet, la présence de sel écranterait les charges locales présentes à la surface. C'est ce qui pourrait expliquer les résultats de Xie et al. alors que dans le cas de l'eau, c'est la charge du support qui se fait fortement ressentir sur la transition.
Charrier et al [70] attribuent le découplage des feuillets à l'interaction privilégiée entre le feuillet proximal et le substrat. Le décalage de la température de transition est interprété comme étant la résultante d'une transition effectuée à surface constante plutôt qu'à tension de surface constante. En effet, dans leurs conditions, le gain de surface nécessaire pour que la

transition s'effectue à tension de surface constante est estimé à 12 % alors que la seule surface disponible est celle des trous, estimée à 2 %.

1.4.2 Bicouches formées par la technique de Langmuir

Les premières expériences effectuées sur les transitions de phase par FRAP en frange (réseau Ronchi : une seule largeur de frange, non précisée dans l'article) ont été réalisées par Tamm et al. en 1985 [51, 68]. Outre la transition de phase abrupte observée sur des bicouches supportées de DMPC sur des *wafer* de silicium, ils ont également montré, en marquant alternativement chaque feuillet de la bicouche, grâce à la technique de Langmuir-Blodgett/Langmuir-Schaeffer, que les deux feuillets avaient la même dynamique et que l'ajout d'ions mono ou divalents avait peu ou pas d'effet (36 mN/m dans de l'eau déionisée). On notera toutefois les concentrations élevées en marqueurs fluorescents (2 et 4 mol %) et la possibilité d'un biais dans les mesures compte-tenu du temps de flip-flop relativement court de leur système comparé au temps nécessaire pour effectuer une mesure.

La diffusion mesurée par FRAP à l'état fluide dans des multicouches de DMPC apparaît relativement insensible à la nature du marqueur fluorescent, à sa position sur le lipide ou encore à sa longueur de chaîne. Les énergies d'activation pour la diffusion latérale sont de l'ordre de 43.7 kJ/mol.

1.4.3 Transition principale dans les membranes libres

La transition principale dans les membranes libres a été mesurée dans des multicouches et des LUV de DMPC et de DPPC [67]. La figure 1.8 représente l'évolution du coefficient de diffusion mesuré par FRAP « en spot » en fonction de la température. La dynamique des deux phospholipides augmente d'un facteur 100 de la phase gel à la phase fluide, avec une diffusion lente en dessous de Tm de l'ordre de 10^{-10} cm²/s.

En 1977, Wu et al. [66] ont effectué des mesures par FRAP « en spot » de deux sondes différentes sur des multicouches de DMPC et DPPC. En utilisant un taux de marqueur de 1/1000, les coefficients de diffusion mesurés pour le DMPC à 20 et 30°C sont respectivement

de 1×10^{-10} et 5.5×10^{-8} cm²/s, et pour le DPPC à 30 et 45°C de 5×10^{-10} et 7×10^{-8} cm²/s. Au delà de 24°C, pour le DMPC, la faible dépendance de la température sur le coefficient de diffusion est estimée à 1.7×10^{-9} cm²/s/°C. Pour des températures inférieures à 22°C, le coefficient est considéré inférieur à 5×10^{-10} cm²/s. Ils estiment la largeur de la transition des multicouches de DMPC à 2°C (de 22 à 24°C). Concernant le DPPC, la largeur de la transition est de 3°C et a lieu entre 41 et 53°C, la dynamique de la phase fluide est plus rapide que celle du DMPC avec une pente de 2.2×10^{-9} cm²/s/°C.

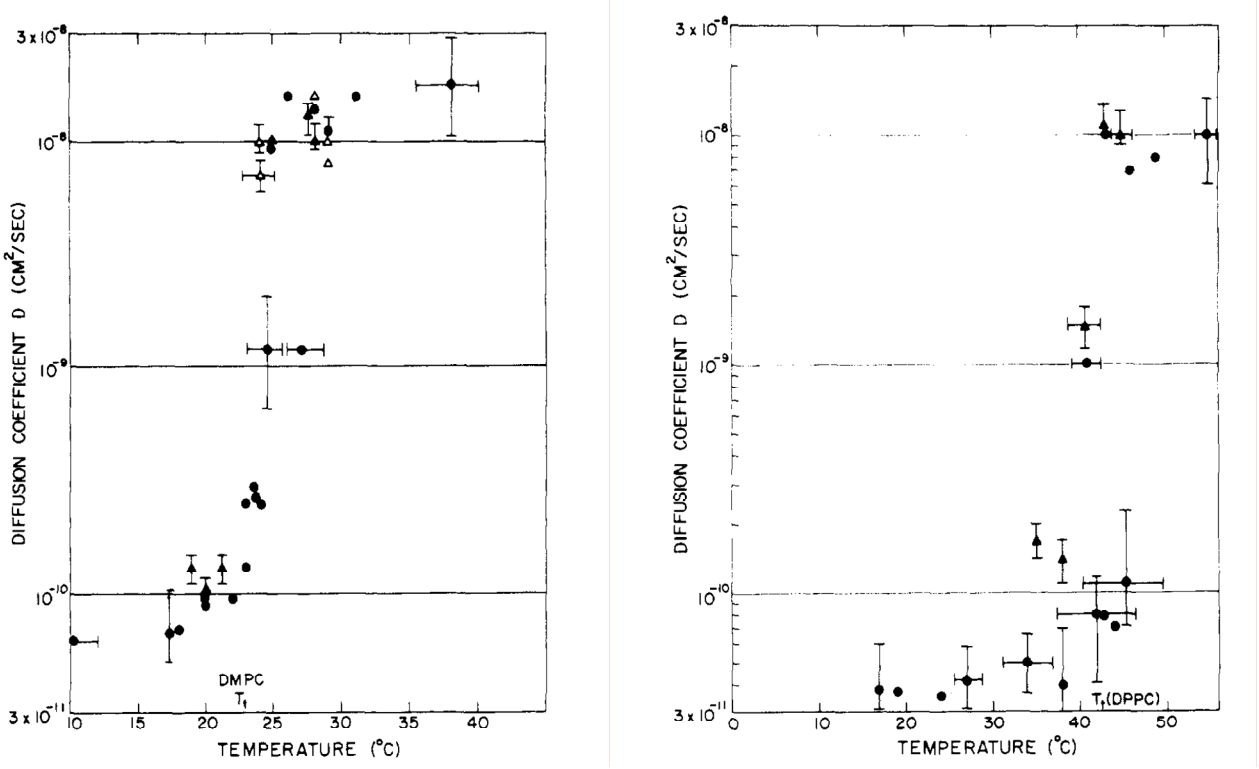


Figure 1.8 : Dépendance du coefficient de diffusion en fonction de la température du marqueur diI dans des MLV et des LUV de DMPC (figure de gauche) et de DPPC (figure de droite). D'après [67].

1.4.4 Effet de la proximité du substrat : couplage entre les deux feuillets

Bien qu'il ait été montré que les bicouches supportées constituaient des systèmes aux propriétés physiques très similaires à celles des bicouches libres, il subsiste néanmoins quelques différences dues à la présence d'un support solide. La tension latérale peut être beaucoup plus élevée dans les bicouches planes avec une diminution de l'ordre moléculaire

qui empêchera par exemple la formation de certaines phases lipidiques présentes dans les bicouches libres (exemple : phase *ripple*) [63]. D'autre part, la plupart des supports utilisés étant chargés (silice, silicium, mica), on observe une forte augmentation des interactions coulombiennes entre le support et la bicouche.
Des mesures par RMN sur des billes de verre ont révélé un coefficient de diffusion latérale deux fois plus lent dans le feuillet en contact avec le support [56] pour une bicouche en phase fluide, indiquant clairement un couplage plus important entre le feuillet face au support et le support lui-même qu'entre les deux feuillets de la bicouche, et ce, malgré la présence d'un film d'eau de l'ordre du nanomètre.
Une autre étude à également montré que la mobilité des lipides dans une bicouche supportée sur verre était ralentie d'un facteur 4.5 par rapport à une membrane libre [65].

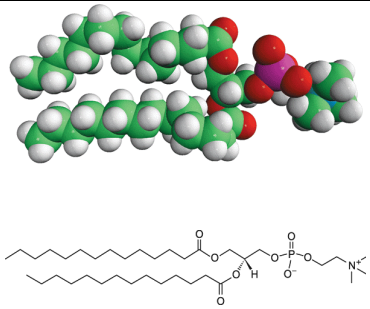
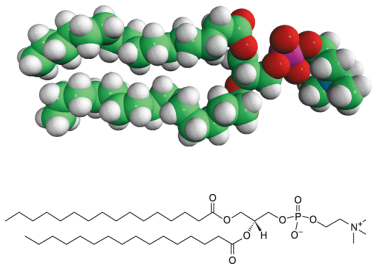
Conclusion

Les bicouches lipidiques constituent des systèmes biomimétiques utiles à la compréhension de la dynamique des cellules vivantes et/ou en vue d'applications dans les biotechnologies. Elles peuvent être utilisées sous forme de bicouche libre dans les vésicules ou sous forme de film supporté, cette dernière configuration permettant d'effectuer plus facilement des mesures quantitatives. Si cette localisation est intéressante dans la perspective de mesures, la présence du substrat induit des effets, qui peuvent être intéressants du point de vue de la compréhension de ces systèmes et de leurs applications et qu'il faut prendre en compte dans l'analyse du comportement de la bicouche. En effet ils peuvent varier en fonction des différents paramètres physico-chimiques des constituants du système. L'ampleur des différences de comportement a été illustrée dans ce chapitre.

2 Matériels et méthodes

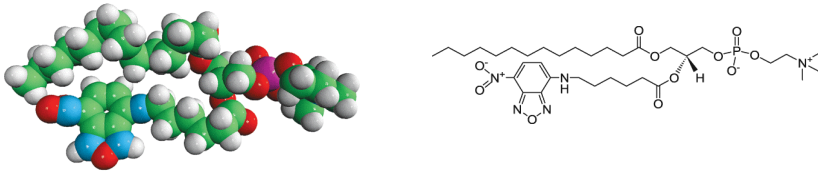
2.1 Structure des phospholipides utilisés

Les deux phospholipides zwitterioniques (tête polaire phosphatidylcholine : un groupe phosphate et une amine quaternaire) utilisés sont des phospholipides synthétiques qui ont une structure identique avec deux chaînes carbonées symétriques, mais de longueur différente. Ils sont donnés dans le tableau qui suit, avec leur température de transition gel-fluide :

structure	nom	notation	nombre de carbones	Tm
	1,2-Dimyristoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphocholine	DMPC	14	24 °C
	1,2-Dipalmitoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphocholine	DPPC	16	41,5 °C

Structures d'après [79].

Pour toutes les expériences menées dans cette étude, nous avons utilisé comme fluorophore le groupement fluorescent NBD (7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl) greffé en substitution de la partie terminale d'une des chaînes carbonées. Le groupement n'étant pas chargé, le phospholipide reste zwitterionique.



En fonction du phospholipide utilisé, nous avons choisi le phospholipide marqué ayant une structure similaire à celle de son homologue non marqué de façon à perturber le moins possible les propriétés des bicouches :

- marqueur fluorescent du DMPC : 14:0-06:0 PC-NBD
- marqueur fluorescent du DPPC : 16:0-12:0 PC-NBD

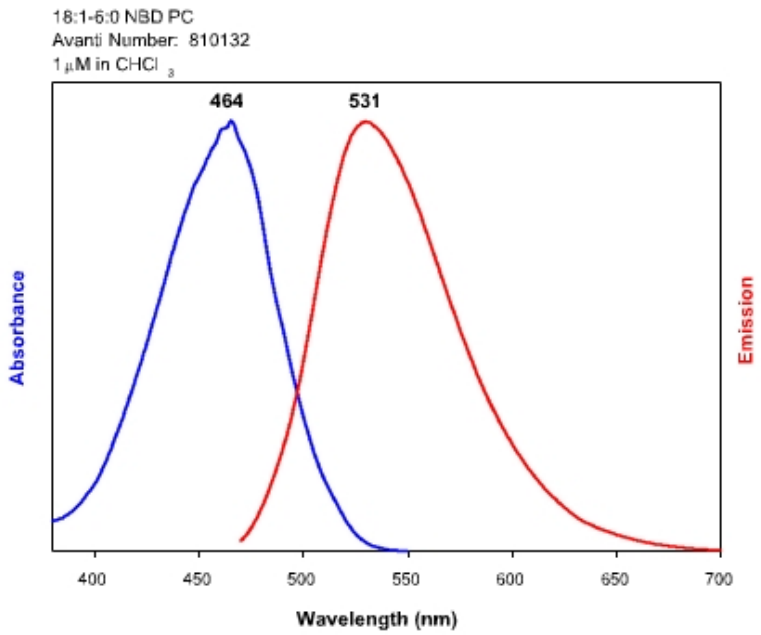


Figure 2.1 : Spectre d'absorbance et d'émission du NBD.

Le phospholipide fluorescent sera dénommé PC-NBD dans le reste du manuscrit.

Les lipides (Avanti polar lipid, USA) sont reçus sous forme de poudre ou de solution dans le chloroforme. Ils sont solubilisés ou dilués voire aliquotés, sans autre purification, en utilisant du chloroforme stabilisé à l'éthanol. Les récipients sont des tubes en verre dont le joint du bouchon est en téflon™. Ces précautions sont nécessaires : nous avons effectué des spectres RMN (^{1}H et ^{13}C). Ils ont montré la persistance de la présence du stabilisant du chloroforme quand ce n'était pas l'alcool ainsi que celle de substances dissoutes quand la solution avait été stockée dans des tubes pourtant réputés pour leur tenue au solvant. Nous voulions ainsi absolument éviter toute pollution de la solution de phospholipides, la présence de seulement quelques molécules non-désirées pouvant dramatiquement affecter la tension de surface de la monocouche et les interactions avec le substrat, affectant par la suite les propriétés

dynamiques de la bicouche. L'éthanol et le chloroforme sont éliminés par évaporation (à la surface de la cuve ou par tirage sous vide) pendant un temps suffisant.

2.2 Préparation des bicouches lipidiques supportées

2.2.1 Balance à film de Langmuir

2.2.1.1 Principe

Un film de Langmuir est une monocouche de molécules tensioactives à la surface de l'eau. C'est un système bidimensionnel.

L'adsorption de molécules amphiphiles à la surface de l'eau donne naissance à un film monomoléculaire qui abaisse la tension de surface et a un effet stabilisateur de l'interface. On définit la pression de surface par la diminution de la tension de surface de la sous-phase pure γ_0 par le film adsorbé, soit :

$$\Pi = \gamma_0 - \gamma \qquad (N/m)$$

où γ est la tension de surface en présence des molécules tensioactives.
La pression de surface Π est mesurée en permanence, dans notre cas grâce à un dispositif de type « lame de Wilhemy ». Une des extrémités de la lame est plongée dans le liquide, l'autre est reliée à un capteur de force. Il s'exerce sur la lame une force verticale dirigée vers le bas. Cette force est la résultante du poids de la lame, de la poussée d'Archimède et de la force due à la tension superficielle. La résolution de nos mesures est de 0,1 mN/m.

L'indicateur le plus important des propriétés des monocouches de molécules amphiphiles est donné par la mesure de la pression de surface en fonction de l'aire A qu'elles occupent à l'interface eau-air. Ces mesures sont effectuées à température constante et permettent de tracer des isothermes de compression $\Pi = f(A)$. Elles sont obtenues en comprimant le film à l'aide de barrières mobiles (se déplaçant à vitesse constante) tout en mesurant la pression de surface. L'aire moléculaire est la surface moyenne disponible pour chaque molécule amphiphile constituant le film. Elle dépend de la taille de la tête polaire mais aussi de l'encombrement des chaînes. Les barrières mobiles et la cuve sont en téflon™ afin d'empêcher l'adsorption des molécules. Nous utilisons des barrières en téflon DELRIN ™ :

elles ont été recouvertes d'un film de polymère plus hydrophile que le téflon™ mais n'entraînant pas l'adsorption des lipides. Du fait de leur caractère légèrement hydrophile, l'eau forme un ménisque positif (mouillant) et non pas négatif. On peut ainsi atteindre des pressions de surface plus élevées sans que le film de Langmuir ait tendance à « plonger » sous les barrières.

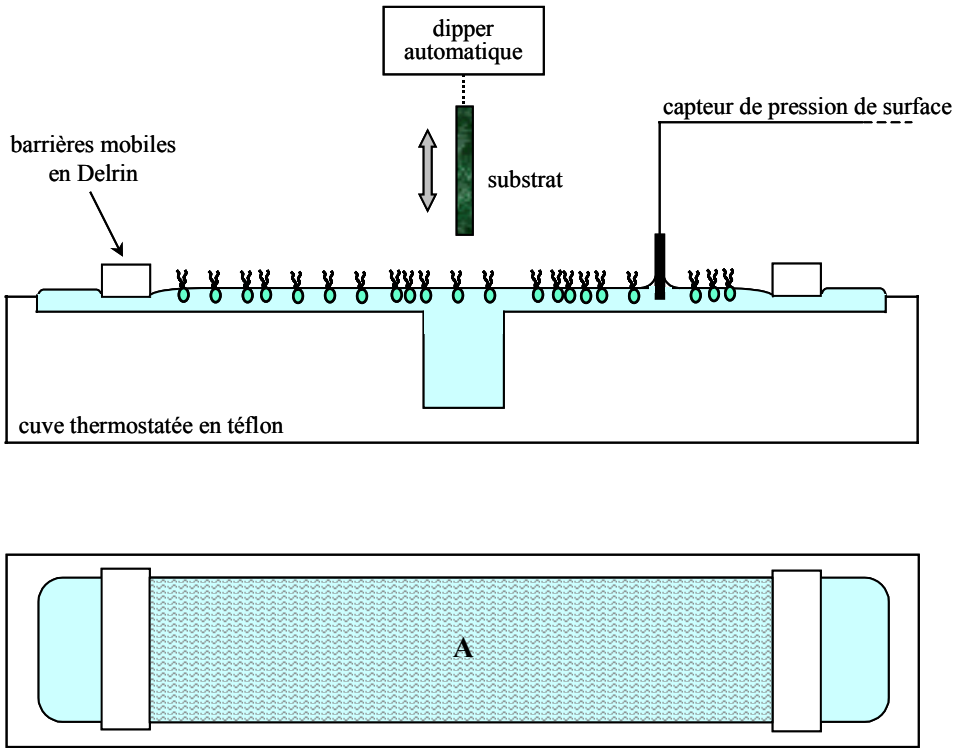


Figure 2.2 : Illustration de la balance à film de Langmuir (KSV Minitrough). Les molécules tensio-actives occupent une aire A délimitée par les barrières mobiles.

Avant tout dépôt, l'enregistrement d'une isotherme de compression est une étape fondamentale préliminaire qui révèle l'existence de plusieurs phases, avec des transitions entre celles-ci, qui apparaissent sur les isothermes au travers de paliers et de ruptures de pente (figure 2.3). Si l'on continue la compression après un certain seuil, le film s'effondre (collapse) : les interactions entre molécules sont si importantes qu'afin de minimiser leur énergie, elles forment des multicouches et/ou des micelles.

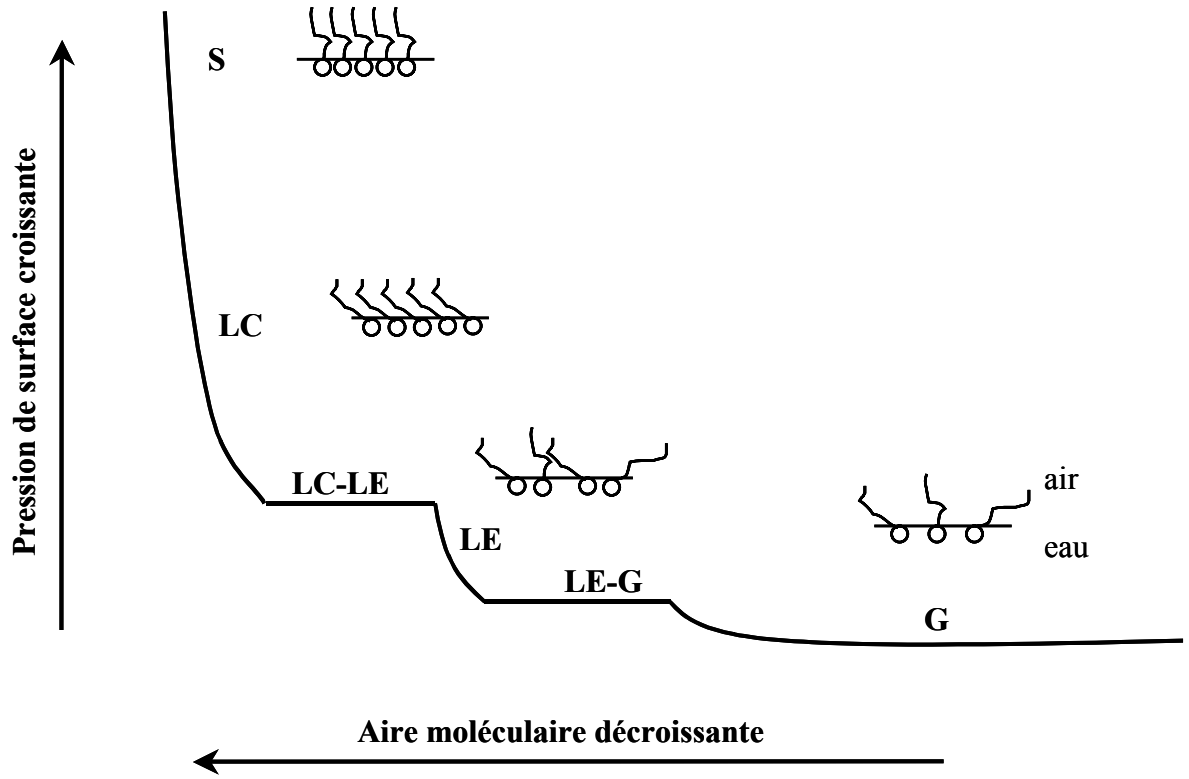


Figure 2.3 : Isotherme de compression typique d'un acide gras.
En comprimant la monocouche, les molécules passent successivement d'un état gazeux (G) à une phase liquide expansé (LE) puis liquide condensé (LC). A plus haute densité, on atteint l'état solide (S) et si on continue la compression, la monocouche s'effondre (pression de « collapse ») et forme des structures 3D.

Nous montrons ci-dessous les isothermes de compression des deux phospholipides utilisés dans ce travail. La figure 2.4.a concerne la compression d'une monocouche de DMPC sur une sous-phase constituée d'eau déionisée (résistance > 18 MΩ) à différentes températures. Quand la pression augmente on observe clairement la zone liquide expansé (LE) puis le plateau correspondant à la coexistence liquide expansé + liquide condensé (LE + LC) et enfin une montée abrupte qui traduit le passage à une phase 100% LC puis solide (S). La position du plateau dépend de la température.

A 15 °C, 30 mN/m correspond à la fin de la phase LE, 35 mN/M à la fin de la phase LE + LC. A 40 mN/m, la monocouche est en phase LC, pas très éloignée de sa pression d'effondrement (≈ 42 mN/m).

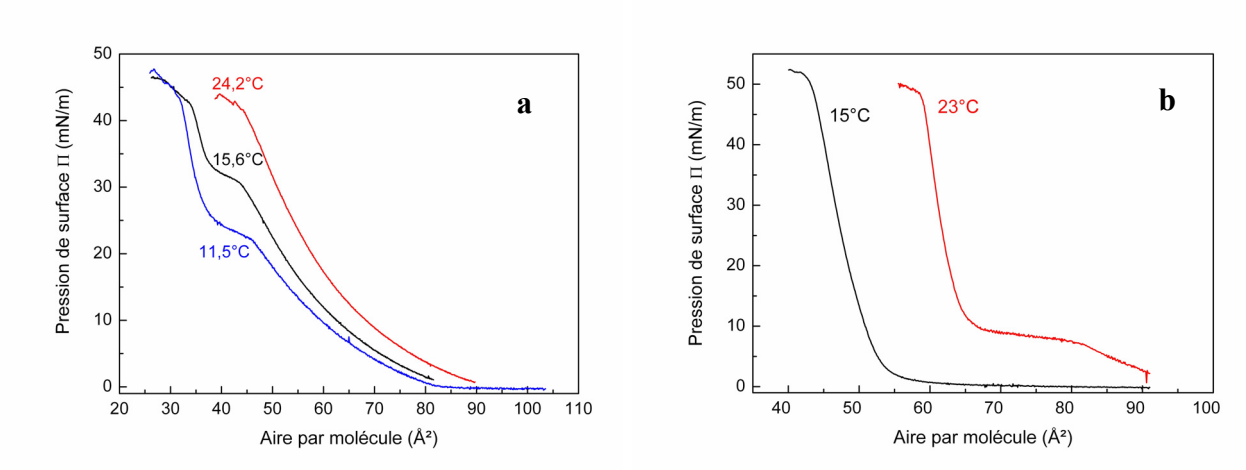


Figure 2.4 : Isothermes de compression du DMPC avec 0.1 % de PC-NBD (a) et du DPPC avec 0.1 % de PC-NBD (b) sur une sous-phase d'eau déionisée à différentes températures.

La figure 2.4.b montre les isothermes de compression du DPPC sur sous-phase aqueuse à deux températures. On note qu'à 15 °C la monocouche de DPPC est dans le régime LC 100% dès 10 mN/m. Sa pression d'effondrement est de l'ordre de 52 mN/m.

2.2.1.2 Transfert de Langmuir-Blodgett (LB)

Le principe général du dépôt de Langmuir-Blodgett (LB) est représenté sur la figure 2.2. Les phospholipides sont dissous dans un solvant très volatil, dans notre cas nous avons utilisé du chloroforme, de façon à obtenir une solution de concentration 1 mg/mL. Les molécules (environ 40 µL), répandues à la surface de la cuve contenant une solution aqueuse, se placent naturellement à l'interface eau-air avec la tête hydrophile plongeant dans la sous-phase aqueuse et la partie hydrophobe émergeant. Après évaporation du solvant, au bout d'une quinzaine de minutes, la monocouche est comprimée lentement (5 mm/min) jusqu'à une pression de surface préalablement choisie par l'utilisateur. Lors des dépôts, cette pression est maintenue constante grâce à l'asservissement des barrières.

Après stabilisation de la monocouche (10 minutes), le transfert a lieu en sortant lentement le substrat de la cuve (5 mm/min). Les phospholipides sont entraînés à la surface du support hydrophile. Théoriquement, une deuxième monocouche, d'orientation inversée, peut être déposée sur la première en redescendant le substrat dans la cuve (figure 2.5).

A tout instant, la technique permet de suivre le taux de transfert instantané des molécules sur toute la longueur du substrat. Le taux de transfert global est calculé en fin de dépôt et donne une indication sur la qualité des monocouches. Il est défini par :

$$Tr = \frac{\text{aire balayée par les barrières}}{\text{aire du substrat recouverte par la monocouche}}$$

Idéalement, le taux de transfert est de 1. Un taux inférieur signifie que la monocouche déposée est incomplète et un taux supérieur indique que la monocouche est plus dense sur le support solide qu'à l'interface eau/air. Cette forte affinité entre les lipides et le substrat induit une organisation plus compacte des molécules à la surface du substrat. Il n'est pas rare d'observer un passage de la phase LE sur la sous-phase à une phase gel sur le support. Il est communément admis que les transferts type Langmuir-Blodgett sont difficiles à réaliser lorsque les monocouches ne se trouvent pas en phase LC, les films devant présenter une certaine rigidité pour passer avec succès d'une surface à l'autre. C'est une des raisons qui ont amené les expérimentateurs à développer la technique de fabrication de bicouches par éclatement de vésicules dans le cas du EggPC. Le EggPC est constitué d'un mélange de phosphatidylcholines saturées de longueurs de chaîne différentes [100]. Ce mélange est fluide à toutes températures et réputé impossible à transférer par Langmuir-Blodgett. Nous verrons plus tard que les phénomènes sont plus subtils.

Grâce à cette méthode, il est possible de déposer une troisième couche de lipides. C'est un maximum. Si l'on tente de transférer une quatrième couche verticalement, la troisième couche est pelée et repart à l'interface eau-air. Les interactions lipides/substrat-déjà-recouvert deviennent probablement trop faibles pour permettre le dépôt.

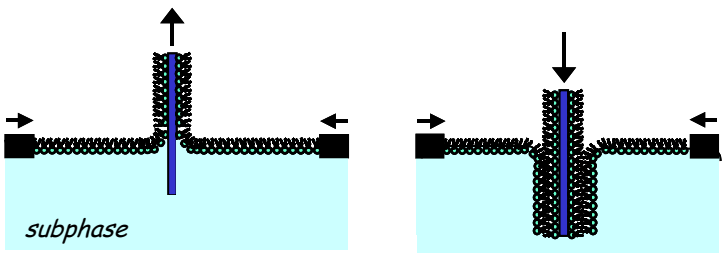


Figure 2.5 : Principe de formation d'une bicouche par Langmuir-blodgett.

Nous développerons ces aspects dans une étude plus poussée de l'influence du substrat, du phospholipide et de la pression de dépôt sur le taux de transfert des monocouches. Nous verrons notamment qu'il n'est possible de former la tricouche par dépôt de Langmuir-Blodgett que dans certaines conditions.

2.2.1.3 Transfert de Langmuir-Schaeffer (LS)

Pour former une quadricouche, et également une bicouche dans beaucoup de nos expériences, nous avons utilisé la méthode dite de Langmuir-Schaeffer (LS).
Contrairement au transfert de Langmuir-Blodgett, le substrat est amené horizontalement, parallèlement à la surface, au contact de la monocouche [49] (figure 2.6). Il peut s'agir d'un substrat hydrophobe (remonté du côté air) ou hydrophile comme dans notre cas (descendu du côté eau).
Tous nos dépôts se font à la même pression que la ou les monocouches précédemment transférées.
L'évaluation du taux de transfert se fait grâce à la variation de l'aire entre les barrières.
A l'inverse de la méthode de Langmuir-Blodgett, cette méthode est hors-équilibre donc irréversible et le taux de transfert est quasiment indépendant de la pression de dépôt.

Le substrat qui porte la bicouche est ensuite placé, sans jamais voir l'air, dans une cellule liquide adaptée pour les mesures de FRAPP.

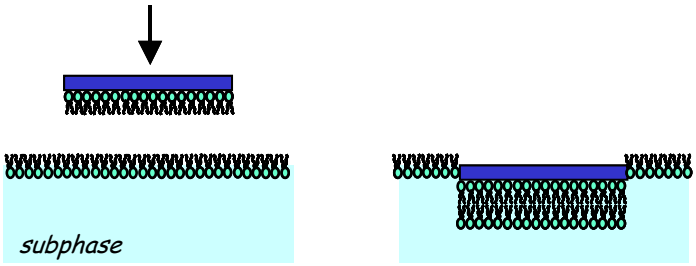


Figure 2.6 : Principe de formation d'une bicouche ou d'une quadricouche par Langmuir-Schaeffer.

2.2.2 Fusion de vésicules

2.2.2.1 Principe

La formation de bicouches phospholipidiques supportées par éclatement de vésicules suit le principe suivant : après formation de petites vésicules unilamellaires, celles-ci sont mises en contact avec le substrat à une température de 33°C supérieure à leur température de transition de phase (24 °C pour le DMPC). Les vésicules diffusent, se rompent et fusionnent entre elles. Il en résulte la formation de disques de bicouche qui coalescent ensuite pour former une bicouche lipidique continue, quasi-exempte de défauts.
Pour ce type de phospholipides, des études AFM [70] ont montré que les bicouches formées étaient auto-limitées, c'est-à-dire qu'il n'y a pas formation d'une seconde bicouche sur la première malgré l'excès de vésicules présentes.

2.2.2.2 Protocole expérimental

Les lipides sous forme de poudre sont dissous puis aliquotés dans du chloroforme à une concentration de 1 mg/mL. La concentration en marqueur fluorescent est de 0,1% en poids pour tous les *aliquots* marqués.
Après avoir tiré sous vide la solution pendant au moins 3 heures pour éliminer toute trace de solvant, le film de lipide qui s'est déposé sur les parois du tube est resuspendu pendant 30 minutes dans une solution aqueuse à une concentration de 1 mg/mL. Transférée dans un tube conique (volume 1.5 ml), la dispersion de vésicules multilamellaires obtenue est placée dans un bain à ultrasons durant 10 minutes (90 Watts) de façon à former des petites vésicules unilamellaires (SUV) (la solution se clarifie). Une centrifugation à 1900 *g* pendant 10 minutes permet d'éliminer les particules et agrégats qui se retrouve dans le culot. La solution est mise au contact du substrat hydrophile pendant une trentaine de minutes. Tous les dépôts se font à environ 30°C en chauffant préalablement le substrat (au-dessus de la température de transition du DMPC. Nous n'avons fait aucune expérience d'éclatement de vésicules avec du DPPC). La surface est finalement abondamment rincée et fermée comme décrit pour les dépôts de Langmuir.
Les resuspensions et dépôts ont été effectués soit dans de l'eau déionisée soit dans une solution tampon de composition suivante : 1 mM de tampon phosphate, 100 mM de NaCl, le tout tamponné à pH 7.2 par ajout de soude concentrée.

Nous avons effectué des mesures de taille de vésicules par diffusion de la lumière (DLS). Le diamètre moyen des vésicules mises au contact du substrat est de 200 nm avec une polydispersité de 28.6 %, dans nos conditions de préparation.

2.2.3 Comparaison des deux méthodes

Le principal intérêt de la méthode de fusion de vésicules réside dans sa simplicité de mise en œuvre. Les substrats utilisés peuvent avoir des dimensions géométriques quelconques si l'on utilise, comme c'est notre cas, une cellule étanche. Elle permet cependant de ne former que des bicouches ayant des feuillets de composition identique.
Notons que les liposomes ne se formant qu'à une température supérieure à celle de leur transition de phase, cela réduit l'utilisation de cette méthode à certains phospholipides.

La technique de Langmuir-Blodgett comporte de nombreux avantages puisqu'elle permet le contrôle de nombreux paramètres lors des dépôts comme la température, la pression, la vitesse du substrat… Elle donne accès à des informations quantitatives sur la qualité des monocouches et permet de faire des structures multicouches en variant la composition de chaque feuillet sur de grandes surfaces.

Vu les difficultés rencontrées, dans certaines conditions, pour le transfert de la seconde monocouche, nous avons (sauf mention différente) fabriqué toutes nos bicouches de DMPC par un transfert (LB + LS) à 30 mN/m et 15 °C. Ces conditions constituent un bon compromis pour permettre aux phospholipides de se déposer au mieux sur le substrat solide à partir d'une monocouche (en phase LE), ayant néanmoins une certaine rigidité, et à une pression très inférieure à la pression d'effondrement. Pour le DPPC, en phase LC dès 10 mN/m, le choix était plus réduit. Les transferts ont eu lieu à 40 mN/m à 15°C, soit par (LB+ LS) soit par double LB.

2.2.4 Substrats utilisés

Pour l'élaboration des bicouches, nous avons utilisé du mica muscovite (Metafix, Montdidier, France) et des lames de microscope en verre (Menzel-Gläser, Manheim, Allemagne).

Les échantillons de mica sont ajustés à la taille de la cellule liquide utilisée pour les mesures de FRAP, puis fraîchement clivés avant tout dépôt (clivage des deux côtés pour les transferts de Langmuir). Les substrats de mica présentent l'avantage de constituer des systèmes « bon marché » et qui permettent d'obtenir aisément des surfaces propres puisqu'il suffit de les cliver pour obtenir une surface neuve, plane à l'échelle moléculaire.

Le protocole de nettoyage adopté pour les lames de verre est le suivant :

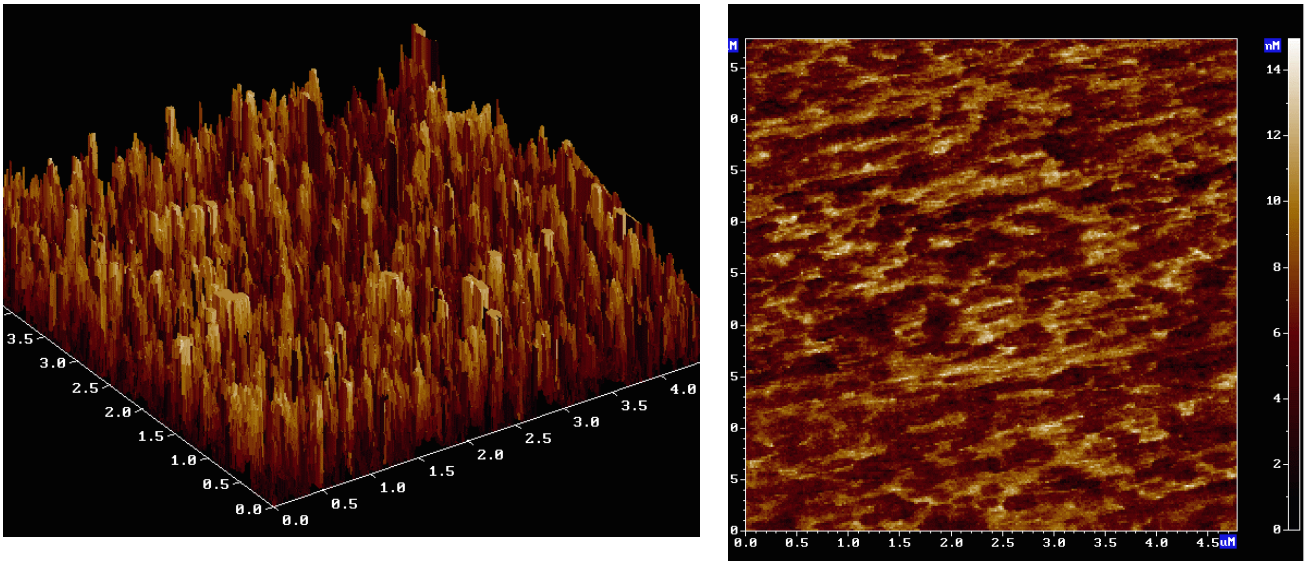
- rinçage abondant à l'eau du robinet et rinçage à l'aide d'un pinceau en soie puis avec de l'eau déionisée (18 MΩ)
- immersion dans une solution de soude alcoolique (environ 50% solution NaOH saturée et 50% éthanol) sous agitation pendant 10 minutes et sonication dans la même solution de soude alcoolique pendant 10 minutes *OU* immersion dans le Piranha (1/3 H_2O_2 + 2/3 H_2SO_4) pendant 20 minutes
- rinçage abondant puis 3 x (sonication dans de l'eau déionisée pendant 10 minutes)
- rinçage puis conservation dans de l'eau déionisée à 4°C.

Par cette méthode le verre est rendu propre et très hydrophile .Les lames ne sont jamais utilisées plus de deux jours après leur nettoyage.

<u>Effet du nettoyage du support en verre</u>

La diversité des préparations de surface relatées dans la littérature nous a amené à faire un certain nombre d'essais afin de déterminer la méthode de nettoyage que nous allions utiliser. Nous avons testé deux méthodes de nettoyage : une en milieu acide, l'autre en milieu basique. L'effet du lavage en milieu basique est de solubiliser une mince couche de verre. La lame de verre est facilement rincée et a un potentiel zéta immédiatement constant. En milieu acide le potentiel zéta de la surface peut varier au cours du temps et du chauffage pendant une quinzaine de jours [84].

De plus les images AFM (figure 2.7), que nous avons effectué en milieu liquide, révèlent des topographies très différentes. La lame nettoyée 20 minutes à la soude alcoolique présente une surface ayant de nombreuses aspérités. Il apparaît à l'opposé une structure nanoporeuse lorsqu'on utilise le nettoyage au Piranha, qui pourrait expliquer l'instabilité au cours du temps du potentiel zéta, les nanopores « relarguant » petit à petit le mélange décapant. On peut aussi s'interroger sur l'effet que pourrait avoir ce relargage sur la bicouche supportée (possible surconcentration locale d'acide).



Lame de verre nettoyée 20 minutes dans une solution de soude alcoolique (50 % NaOH + 50 % éthanol)

Lame de verre nettoyée 20 minutes dans une solution de Piranha (1/3 H_2O_2, 2/3 H_2SO_4)

Figure 2.7 : Images AFM de deux différents nettoyages des lames de verre (échelles XY identiques-5 µm x 5 µm, échelle Z 0-15 nm).

Nous ne savons pas si cela est dû à la qualité de nos rinçages dans l'eau déionisée sous ultrasons mais les différents traitements appliqués aux lames de verre semblent n'avoir engendré, dans notre cas, aucun effet sur la courbe de transition en température (résultats non représentés). Cependant, pour éviter tout risque, nous avons choisi la méthode de nettoyage à la soude alcoolique.

2.3 La technique de FRAPP

2.3.1 Principe

Le temps de retour de la fluorescence après photoblanchiment peut être mesuré dans tout système optiquement transparent. Nous avons optimisé notre montage pour pouvoir effectuer des mesures dans des systèmes à 2D dont la dimension qui correspond au trajet optique est de quelques nanomètres.

On entend par photoblanchiment l'ensemble des processus par lesquels une molécule perd sa faculté d'émettre de la fluorescence à la suite d'une (forte) excitation lumineuse..
Lors du processus de fluorescence, la molécule absorbe un photon, passant d'un état électronique fondamental (énergie la plus basse) à un état électronique excité (d'une énergie plus haute que celle de l'état initial d'un quantum $h\nu$). Elle peut alors se désexciter spontanément et retourner à son état fondamental en émettant un autre photon d'une énergie plus faible. Cependant, elle peut suivre d'autres voies de désexcitation, radiatives ou non, dont certaines peuvent conduire vers des états où la molécule quitte le cycle excitation-émission de fluorescence. C'est le processus de photoblanchiment, ou photodestruction (*photobleaching* en anglais). La variété des évènements possibles au sein de la structure électronique d'une molécule explique que, de façon générale, on ne connaisse pas les processus conduisant au photoblanchiment. Dans le cas du NBD, le photoblanchiment est irréversible dans l'échelle de temps de nos mesures.
Ce phénomène photochimique intervient lorsque les molécules sont soumises à une forte intensité d'éclairage et augmente avec la durée de l'exposition. Le photoblanchiment produit une zone dont la fluorescence est quasiment nulle. C'est cette propriété qui est mise à profit dans la technique de FRAP.

2.3.2 Dispositif expérimental

La technique de FRAP est utilisée depuis 1976 [74] pour la mesure de la mobilité de molécules fluorescentes à l'échelle microscopique. Sa version basique (FRAP « en spot ») utilise un simple faisceau laser [73]. Elle consiste à illuminer fortement une région de l'échantillon de façon à photoblanchir les molécules fluorescentes situées dans cette région puis à observer, avec une puissance d'excitation beaucoup plus faible, l'évolution de la fluorescence en fonction du temps. Si les molécules sont mobiles, celles qui sont restées hors

de la zone d'exposition vont diffuser dans la zone blanchie et *vice-versa*, ce qui va conduire à un recouvrement de la fluorescence dans la région observée. La cinétique et la forme de la courbe de retour de fluorescence permettent alors de déterminer, avec un modèle théorique adéquat, le coefficient de diffusion des marqueurs dans l'échantillon.

Le système que nous utilisons est un système de FRAPP en franges (Fluorescence Recovery After Patterned Photobleaching), plus optimisé que les classiques FRAP. Il permet d'utiliser des densités de marqueurs fluorescents beaucoup plus faibles et de quantifier plus facilement les fractions mobiles et immobiles à l'aide d'un système de modulation en fréquence. Grâce à ces franges et à la modulation on détecte un seul mode, ce qui permet d'étudier la dépendance du temps de recouvrement avec le vecteur d'onde.

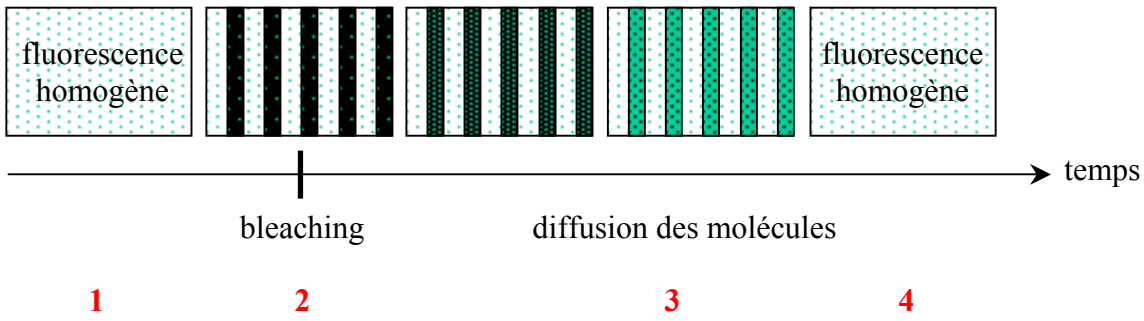


Figure 2.8 : Principe du retour de fluorescence après photoblanchiment.

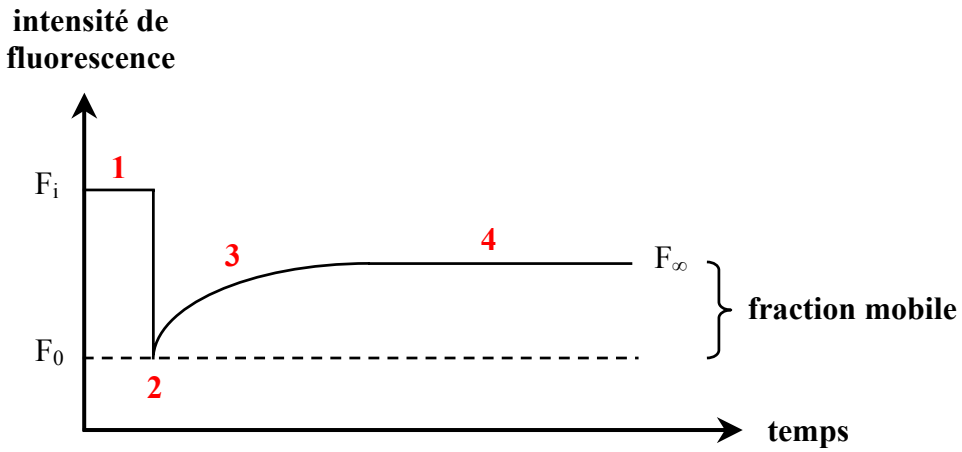


Figure 2.9 : Courbe de remontée de fluorescence.

On définit la fraction mobile de molécules par (figure 2.9) :

$$\text{fraction mobile} = \frac{F_\infty - F_0}{F_i - F_0}$$

où F_i est l'intensité initiale de fluorescence

F_∞ est la valeur asymptotique de la courbe

F_0 est la valeur juste après le photoblanchiment

En l'absence de fraction immobile, l'asymptote de la courbe de retour de fluorescence doit revenir à son état initial.

Description des différents éléments du dispositif :

- la source lumineuse est un laser Argon monomode ajustée à 488 nm (raie bleue)

- la variation d'intensité du faisceau laser qui induit le blanchiment des molécules est assuré par un dispositif comprenant une cellule de Pockels, située entre un polariseur et un analyseur croisé. Il va produire un éclair d'intensité très élevée (0,9 Watt) pendant un temps court, typiquement 1 seconde. La cellule de Pockels est composée d'un matériau électro-optique dont les caractéristiques dépendent du champ électrique appliqué. Cette propriété permet de moduler les caractéristiques d'un faisceau laser (polarisation, intensité, phase) traversant la cellule.

- la lame semi-réfléchissante sépare le faisceau en deux et envoie un des faisceaux sur un miroir monté sur un pousseur piézo-électrique. Les deux faisceaux sont recombinés dans l'échantillon créant un réseau de franges d'interférence. Les franges oscilleront à la surface de l'échantillon à la fréquence de vibration du piézo-électrique.

- la fluorescence est collectée par une fibre optique multibrins, connectée à un photomultiplicateur performant (gain 10^8). Le signal est ensuite analysé via une détection synchrone qui va filtrer le signal en se basant sur la fréquence du miroir piézo-électrique (1 kHz).

Typiquement, une expérience se déroule de la façon suivante (figure 2.8) :
Les molécules fluorescentes sont initialement réparties de façon homogène dans l'échantillon. Le photoblanchiment consiste à augmenter pendant un court instant l'intensité lumineuse grâce à la cellule de Pockels. Les faisceaux arrivent sur l'échantillon avec une intensité maximale et les molécules fluorescentes éclairées vont être photoblanchies (désactivation du

fluorophore). Des franges sont ainsi « gravées » dans l'échantillon. Après le blanchiment, l'intensité des faisceaux est réduite de façon à seulement exciter la fluorescence de l'échantillon. On forme toujours des franges d'interférence dans l'échantillon, mais celles-ci ne s'impriment plus. Elles permettent uniquement la lecture du retour de fluorescence par excitation des fluorophores. A l'aide du mouvement oscillant du miroir piézo-électrique, les franges du faisceau de lecture passeront par des positions où elles sont en phases avec celles qui sont gravées (l'intensité de fluorescence collectée sera alors maximum) à des positions où elles sont en opposition de phase (l'intensité sera minimum). Cette différence d'intensité donne le contraste. La détection synchrone permet de filtrer le signal reçu en se basant sur la fréquence de vibration du miroir piézo-électrique. Après le blanchiment, les molécules, soumises au mouvement brownien, diffusent dans l'échantillon en passant d'une frange à l'autre. Le contraste enregistré va donc diminuer avec un temps caractéristique dépendant de la largeur des franges, à partir duquel on déterminera le coefficient de diffusion des molécules. L'utilisation de la même interfrange pour le blanchiment et la lecture du signal garantissent qu'ils sont caractérisés tous les deux par la même longueur d'onde spatiale.

L'interfrange est donné par : $$i = \frac{\lambda}{2\sin\frac{\theta}{2}}$$

où θ est l'angle entre les deux faisceaux incidents (voir figure 2.10).
Les caractéristiques du vecteur d'onde q dans l'espace réciproque sont :

$$q = \frac{2\pi}{i} \quad \text{ou} \quad q = \frac{4\pi}{\lambda}\sin\frac{\theta}{2}$$

<u>Rappels sur la diffusion brownienne</u> :

La première loi de Fick relie le flux de diffusion d'une espèce au gradient de sa concentration :

$$J = -D\frac{dC}{dx} \tag{1}$$

La seconde loi de Fick exprime le bilan des entrées-sorties dans un petit volume :

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D\frac{\partial^2 C}{\partial x^2} \tag{2}$$

Pour une diffusion brownienne, l'équation de diffusion des molécules dans un milieu à trois dimensions est donné par :

$$\frac{\partial c(\vec{r},t)}{\partial t} = D\,\nabla^2 c(\vec{r},t) \tag{3}$$

où $c(\vec{r},t)$ est défini comme la concentration en fluorophores au temps t dans petit volume de coordonnées $\vec{r}$, et D le coefficient de diffusion. Dans un milieu infini, la transformée de Fourier de l'équation (3) donne :

$$\frac{\partial C(\vec{q},t)}{\partial t} = -D\,q^2\,C(\vec{q},t) \tag{4}$$

avec $C(\vec{q},t) = (2\pi)^{-3/2} \int c(\vec{r},t) \exp^{(i\vec{q},\vec{r})} d^3r$

La solution de l'équation (4) est :

$$C(\vec{q},t) = C(\vec{q},0)\ \exp^{(-Dq^2t)} \tag{5}$$

où $C(\vec{q},0)$ est la concentration initiale en molécules fluorescentes dans l'espace de Fourier juste après le photoblanchiment.

Les courbes de retour de fluorescence sont données par :

$$C(t) = C_\infty + (C_0 - C_\infty) \exp^{-t/\tau} \tag{6}$$

où C_0 et C_∞ correspondent aux contrastes juste après et infiniment longtemps après le photoblanchiment. Le temps caractéristique de retour de fluorescence par diffusion brownienne est donc :

$$\tau = \frac{1}{Dq^2}$$

En effectuant les mesures à différentes interfranges, on peut tracer le temps de relaxation en fonction de l'interfrange au carré. Une régression linéaire, que nous appelons *loi de diffusion*, passant par l'origine est caractéristique de la diffusion brownienne d'une seule espèce et permet d'avoir directement accès au coefficient de diffusion avec une pente de $\frac{1}{4\pi D^2}$. La vérification de la proportionnalité entre τ et i^2 fournit un moyen direct de discrimination entre une relaxation par un mouvement purement brownien et un autre type de relaxation (convection, photoblanchiment irréversible…) [73]. Nous avons particulièrement étudié les lois de diffusion car il existe très peu de références sur ce point dans la littérature.

Pour notre étude, nous avons utilisé une gamme de franges allant de 1 à 80 µm. Au delà de ces valeurs, les mesures deviennent difficiles soit parce que les temps d'acquisition

deviennent trop longs et que la dérive du dispositif risque de fausser les mesures, soit parce que le phénomène de relaxation devient trop rapide pour être détecté par le dispositif.

Remarques sur les limitations de la technique :

- il faut éviter le photoblanchiment des molécules pendant la mesure qui risquerait de modifier la courbe de retour de fluorescence et de masquer certains phénomènes. Si au cours de la lecture les fluorophores sont dégradés, on obtiendra des temps de diffusion plus courts.

- le temps de photoblanchiment doit être court par rapport au temps caractéristique de diffusion des fluorophores.

- la région photoblanchie doit être petite par rapport à la taille de l'échantillon si l'on veut éviter les « effets de bords ».

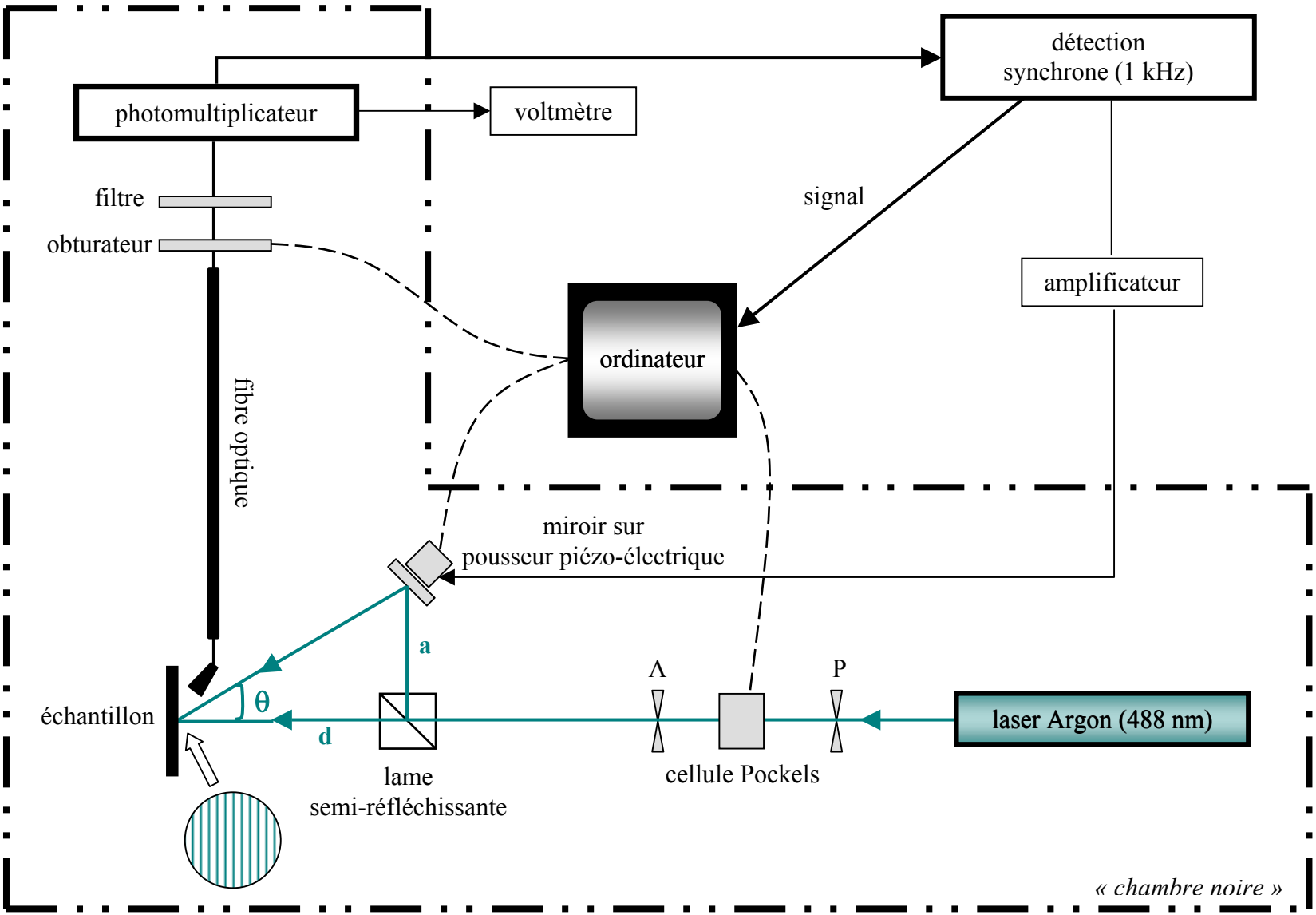
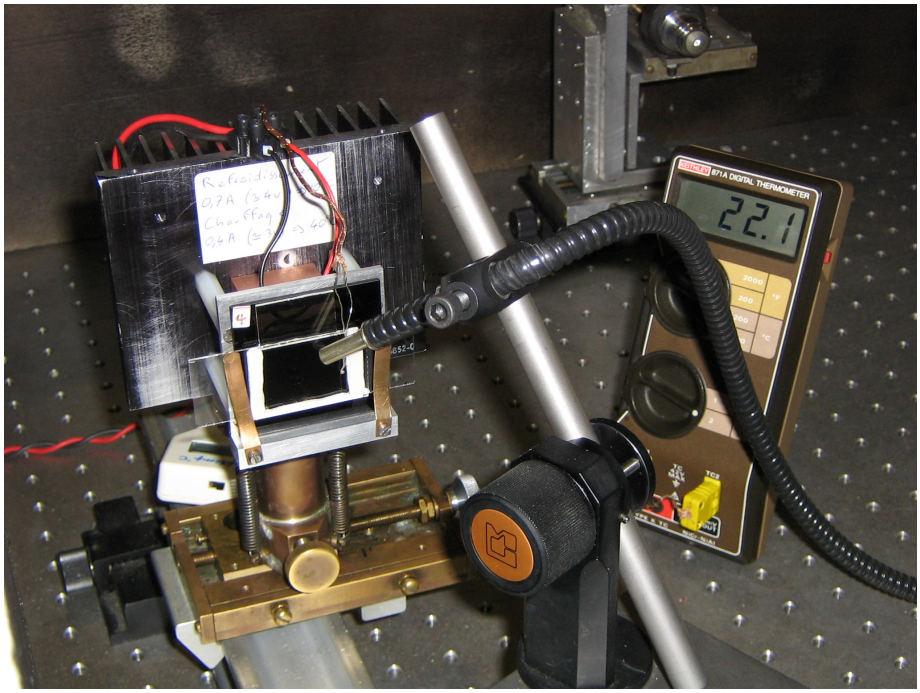


Figure 2.10 : schéma du dispositif de FRAP.

2.3.3 Mesures en température

Le chauffage et le refroidissement des échantillons sont assurés par un élément Peltier sur lequel on fixe la cuve contenant la bicouche.
La température est mesurée à l'aide d'un thermocouple placé directement dans la cuve (sensibilité : 0.1 °C). Pour les mesures de FRAP, la stabilité thermique est atteinte après environ 10 minutes après la fixation de la consigne.



Sur le cliché on distingue la lame de verre portant la bicouche. Celle-ci est immergée dans une cuve remplie d'eau (1 ml). L'ensemble est adossé à un élément Peltier monté sur un bloc de cuivre et un radiateur, permettant la thermostatation de l'échantillon. On aperçoit également le thermocouple plongeant dans la cuve, ainsi que la fibre optique qui permet la collecte du signal. Ce dispositif, rapporté aux dimensions de la bicouche (2.5 cm × 2 cm × 4 nm), assure une bonne inertie thermique au système. La température reste stable pendant toute la durée de l'acquisition à ± 0.2 °C.

2.3.4 Qualité des mesures effectuées

Nous avons effectué des mesures de coefficients de diffusion sur des bicouches lipidiques supportées contenant de 0.1 % à 1 % en poids de PC-NBD. Nous n'avons constaté aucune différence significative. Dans la littérature certaines expériences utilisent des teneurs jusqu'à 4 %. Il a été montré que, dès une concentration de 1 %, une compression sur cuve de Langmuir pouvait induire la formation par séparation de phase de nano-domaines [83], ce qui ne manquerait pas d'affecter la dynamique de la bicouche. De ce fait, pour toutes nos préparations, nous avons utilisé un taux de marquage en fluorophore de 0.1% en poids. Ce faible taux de marquage évite ainsi ce type d'artefact.
La fraction immobile mesurée sur les courbes de retour de fluorescence reste dans la majorité des cas quasiment inexistante (≈ 4 %). Les seuls cas où une valeur plus grande a été atteinte (maximum 15%) correspondaient soit à un vecteur d'onde q inapproprié (ex : bicouche sur verre) soit à l'existence d'une seconde composante qui apparaissait comme une fraction immobile à cette valeur de q (ex : bicouche sur mica). Le choix de la bonne valeur de q a alors permis la détermination correcte du(des) temps. Cet aspect sera développé en détail dans le chapitre suivant.

2.4 Signaux et analyse

La transition complète pour une condition donnée (température, interfrange) est effectuée sur le même échantillon dans la même journée. Chaque point correspond à la moyenne d'un minimum de cinq mesures.
Typiquement, les premières mesures sont effectuées sur l'échantillon en phase gel, à la température la plus basse. Il est ensuite progressivement chauffé (l'équilibre thermique est plus rapidement atteint).

La figure 2.11 montre des signaux typiques de recouvrement de fluorescence. Le mouvement diffusif purement brownien d'une seule espèce se traduit par un signal de relaxation de fluorescence (diminution du contraste en fonction du temps) monoexponentiel (graphe A).

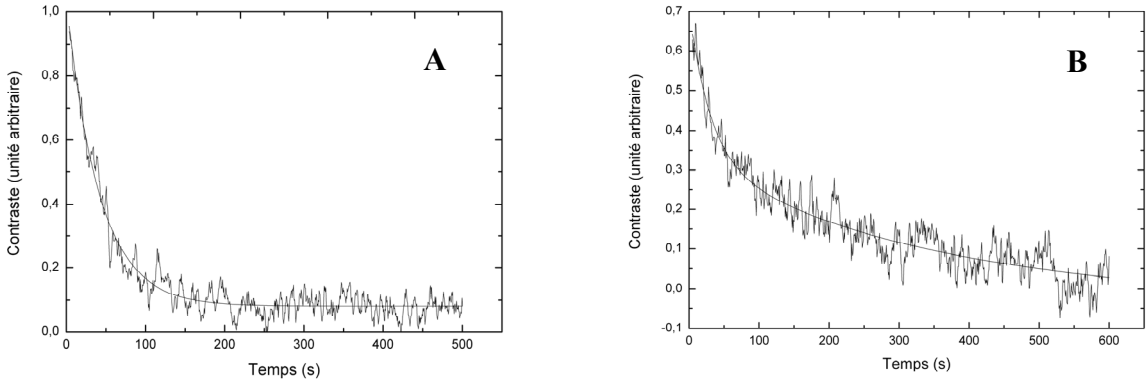


Figure 2.11 : Allure typique d'un signal de recouvrement monoexponentiel (figure A) et biexponentiel (figure B) et meilleur fit.
Figure A : temps caractéristique de recouvrement $\tau \sim 41.4$ s ($q = 1013.8$ cm^{-1})
Figure B : temps caractéristiques de recouvrement $\tau_1 \sim 30.4$ s et $\tau_2 \sim 323.5$ s ($q = 2677.1$ cm^{-1})

Conclusion

Des substrats propres (nettoyage en milieu basique), des phospholipides purs (pas de pollution par des substances dissoutes), des bicouches de bonne qualité (balance de Langmuir-Blodgett) et un montage de FRAPP optimisé constituent un préalable à la réalisation de mesures fiables et reproductibles

Trois points concernant le montage de FRAPP méritent d'être soulignés :

- le choix d'un photomultiplicateur performant permet de détecter correctement un signal malgré une faible teneur en lipide marqué (1/1000) et le faible trajet optique de l'échantillon (épaisseur de la bicouche : 4 nm).

- l'utilisation d'un réseau périodique sinusoïdal pour le blanchiment et la lecture modulée permettent de sélectionner un seul mode dans l'équation de diffusion. Ce n'est pas le cas pour la FRAP « en spot » (en supposant un faisceau plus ou moins gaussien) où un réseau plus complexe (multimode) est gravé. Dans notre cas, l'analyse est plus simple et donc plus précise. Ceci permet de détecter de petites variations du coefficient de diffusion et de discriminer différentes populations.

- notre montage permet de faire varier la largeur des franges et de nous assurer directement de la validité de la loi de diffusion dans l'espace réciproque.

3 Résultats et discussion

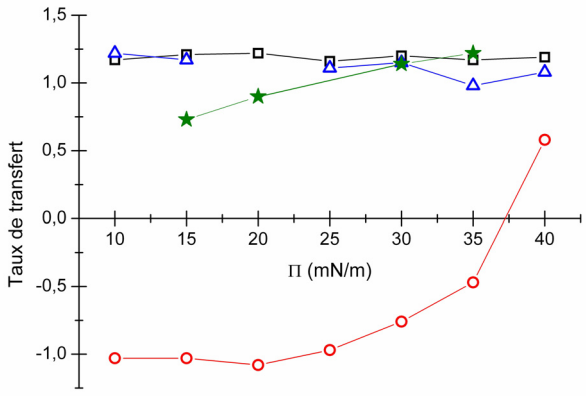
Nous présentons dans cette partie une étude systématique et détaillée du taux de transferts des monocouches en fonction du substrat et de la pression initiale puis les mesures de coefficients de diffusion sur les différents systèmes étudiés.

3.1 Taux de transfert des couches de Langmuir

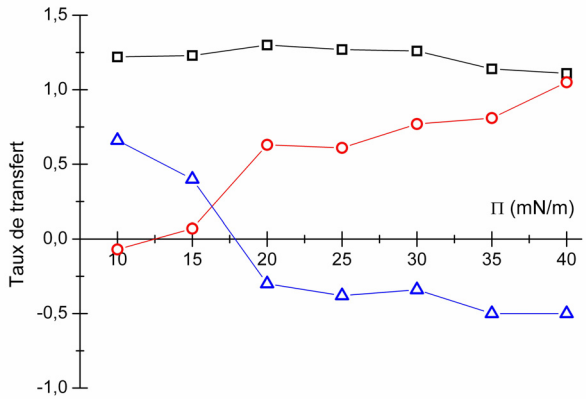
Le taux de transfert est défini comme étant le rapport entre la diminution d'aire de la monocouche pendant le dépôt et l'aire du substrat. La mesure des taux de transfert donne un indication précise de la quantité de phospholipides transférés de la surface de la sous-phase vers la surface du substrat. Sa valeur est une mesure de la qualité du dépôt et donc de celle de la bicouche finale. Il est le reflet des interactions moléculaires complexes entre la surface du substrat et la monocouche. Il est difficile d'avoir une parfaite connaissance des paramètres qui caractérisent la géométrie de la cuve essentiellement à cause des effets de ménisque. Aussi, au cours de ce travail, ne discutons nous pas les valeurs absolues du taux de transfert global mais plutôt ses variations. La figure 3.1 montre les taux de transfert mesurés pour des dépôts LB (Tr_i, i= 1, 2, 3 : taux de transfert globaux respectivement lors du dépôt de la première, seconde et troisième monocouche) et LS_2 (taux de transfert lors du dépôt par Langmuir-Schaeffer de la seconde monocouche) du DMPC et du DPPC, sur du verre et du mica, en fonction de différentes pressions (Π varie entre 10 et 40 mN/m).

Le protocole suivi est resté le même pour toutes les expériences :

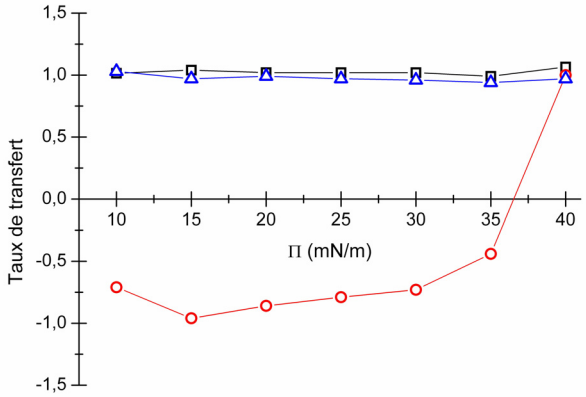
- sous-phase aqueuse : eau déionisée à 15°C
- monocouches marquées avec 0.1% de PC-NBD
- transfert des trois monocouches à la même pression de surface (de 10 à 40 mN/m)



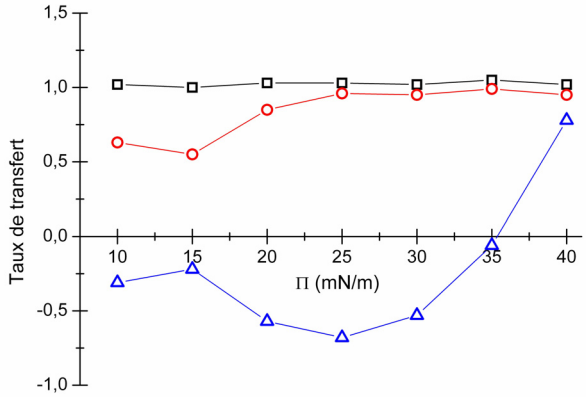
DMPC / verre



DMPC / mica



DPPC / verre



DPPC / mica

Figure 3.1 : Taux de transfert globaux en fonction de la pression de transfert initiale Π(mN/m) obtenus pour le dépôt successif de trois monocouches de DMPC et DPPC sur du verre et du mica.
Légende : □ Tr_1 ○ Tr_2 △ Tr_3 ★ LS_2

3.1.1 Dépôt de la première monocouche

Lors des transferts de Langmuir-Blodgett, la qualité de la première monocouche dépend de la surface du substrat. Plus il est hydrophile, plus il est énergiquement favorable pour les molécules de quitter l'interface eau-air où elles sont comprimées. Les valeurs obtenues (Tr_1) indiquent une quasi-parfaite couverture du substrat dans tous les cas étudiés : DMPC et DPPC sur verre ou mica. C'est le signe d'une forte affinité des phospholipides pour le substrat. Il arrive parfois qu'ils soient supérieurs à 1, signifiant que la monocouche est plus dense sur le

support solide qu'à l'interface eau-air. Il faut cependant noter que des taux de transfert (Tr) semblables pour la première monocouche pour les deux phospholipides ne correspondent pas à une densité à la surface du substrat identique puisque, pour une pression donnée, ils n'ont pas la même aire moléculaire. Ceci se manifeste expérimentalement par le fait que le DMPC qui a une aire moléculaire plus petite que celle du DPPC atteint des Tr_1 de l'ordre de 1.2 contre seulement 1 pour ce dernier.

3.1.2 Dépôt de la seconde monocouche

Le dépôt de la seconde monocouche peut être fait de deux façons différentes : un transfert par Langmuir-Blodgett (Tr_2) ou par Langmuir-Schaeffer (LS_2). Nous avons porté sur la figure 3.1 le taux de transfert estimé pour une déposition par LS à différentes pressions. Les valeurs montrent une augmentation régulière de LS_2, dont la valeur est voisine de celle observée pour la première monocouche à partir d'une pression de surface de 30 mN/m. Ceci montre que la combinaison LB + LS permet de préparer des bicouches presque parfaites.

Le second transfert par LB est plus subtil. Le taux de transfert dépend fortement de paramètres physico-chimiques tels que le substrat (physico-chimie, rugosité) , la longueur des chaînes de lipides, et la pression de surface. La différence de comportement la plus importante est celle observée entre le verre et le mica.

Sur le verre, en dessous de 30 mN/m, il n'est jamais possible d'ajouter une seconde monocouche. Nous obtenons systématiquement des Tr_2 égaux à - 1. Ceci indique clairement que la première monocouche est complètement désorbée durant le second passage, laissant une surface à nouveau vierge de tout phospholipide. Un taux de transfert négatif signifie que la première monocouche est désorbée ou « pelée », partiellement ou complètement selon sa valeur. Lors de l'expérience, la réouverture simultanée des barrières pendant le dépôt montre que les phospholipides se redéposent à la surface de la cuve.

Pour une plus grande pression ($\Pi \approx 40$ mN/m), Tr_2 atteint des valeurs positives ($\approx$ 0.6- 0.8), ce qui signifie qu'une seconde monocouche commence effectivement à se déposer pour former une bicouche ; cette valeur est significativement plus faible que pour la première monocouche et en particulier plus faible que la valeur obtenue par LS.

Sur le mica le comportement est différent. On voit qu'il est possible de déposer une seconde monocouche même à des pressions inférieures à 40 mN/m. Nous observons également un

effet de la longueur de chaînes, les Tr augmentant avec celle-ci. Cet effet est également présent sur le verre mais de façon moins marqué.

Des études menées par Graf et al. [48] ont par ailleurs montré l'impact de la préparation de surface du substrat sur l'adhésion de la monocouche en mesurant l'angle de contact entre la monocouche et le support. En effectuant deux traitements chimiques différents sur une surface de SiO_2, ils ont mesuré des angles de contact deux fois plus faibles (donc une énergie d'interaction plus faible) sur une surface deux fois plus rugueuse. On peut donc penser que le phénomène est encore plus accentué dans notre cas entre le verre et le mica.

3.1.3 Dépôt d'une troisième monocouche

La formation de la tricouche n'est bien entendu possible que si une bicouche est déjà formée. Si on observe un taux de transfert du même ordre que celui de la première monocouche, alors que l'on a complètement désorbé celle-ci lors du deuxième passage à travers la surface eau/air, cela montre clairement qu'il ne s'agit pas de la formation d'une tricouche, mais du dépôt d'une nouvelle première monocouche à la surface du substrat. La seule pression autorisant un réel triple transfert est de 40mN/m pour du DPPC et du DMPC sur verre.

La figure 3.2 représente la valeur du transfert instantané dans deux essais typiques de préparation d'une tricouche. Dans l'expérience A, les taux de transfert pour les trois monocouches successives sont respectivement de 1.02, 0.95 et 0.78. Le suivi du transfert instantané montre que les monocouches déposées sont de bonne qualité sur toute la surface de la lame. Les variations, locales et brutales (pics), sont dues aux effets de bords au moment où les extrémités des monocouches successives se rencontrent. On peut également suivre la qualité des dépôts comme sur la figure 3.3 où l'aire de la cuve diminue au cours des trois transferts. L'expérience B est caractéristique de la désorption de la première monocouche avec un transfert instantané négatif sur toute la surface. Le taux de transfert entièrement négatif de la seconde monocouche indique la désorption totale de la première monocouche. Le troisième passage correspond donc au dépôt régulier d'une nouvelle première monocouche.

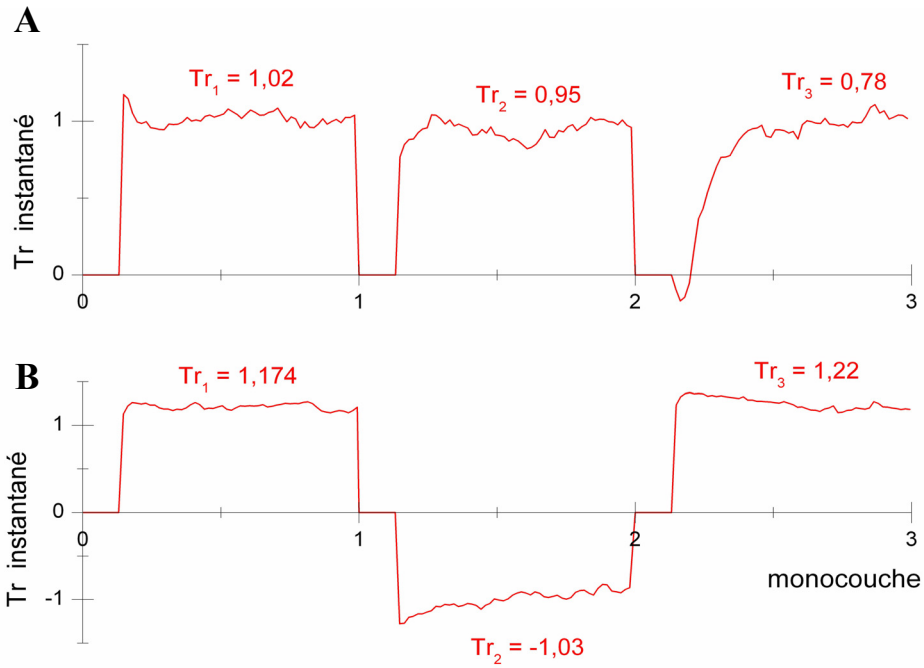


Figure 3.2 : Taux de transfert instantané et global lors de la formation de trois passages successifs à travers l'interface eau/air : A : DPPC sur mica à 40 mN/m, dépôt réussi des trois monocouches, B : DMPC sur verre à 15 mN/m : désorption de la première monocouche et donc dépôt d'une nouvelle première monocouche lors du troisième passage

De nouveau, le comportement sur le mica est significativement différent. Pour le DMPC nous n'arrivons jamais à déposer une troisième monocouche. Les valeurs obtenues à basse pression indiquent seulement que le substrat n'est pas recouvert d'une bicouche. La valeur négative de Tr_3 montre que la seconde monocouche est arrachée du substrat. Le comportement est similaire pour le DPPC à l'exception notable qu'il est possible de former une tricouche à 40 mN/m. On observe également une dépendance avec la longueur des chaînes.

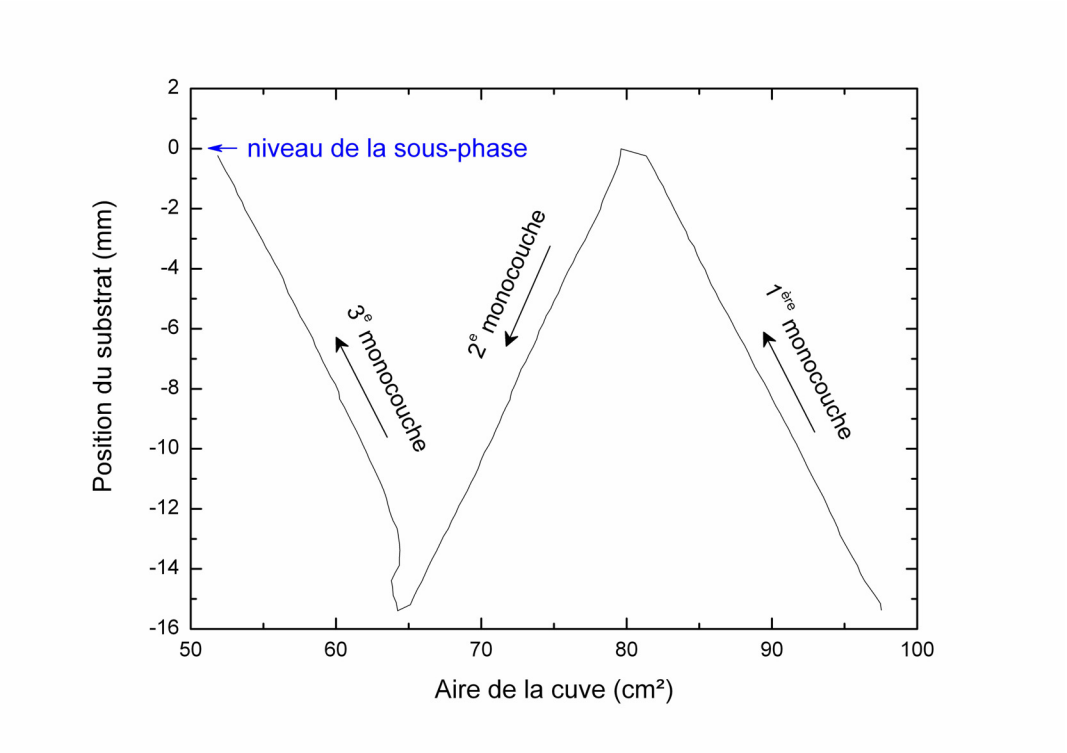


Figure 3.3 : Formation d'une tricouche. L'aire de la cuve diminuant pendant le transfert indique la formation des trois monocouches.

3.1.4 Qualité des bicouches sur mica

Bassereau et al. [81] ont étudié quantitativement la présence de trous lors de la formation d'une bicouche par transfert de Langmuir-Blodgett en relevant les taux de transfert et en effectuant des mesures par AFM. Sur des systèmes asymétriques (première monocouche sur mica : DMPE, deuxième monocouche : DOPC), ils ont observé que la présence de trous dans la bicouche était causée par la désorption de molécules de la première monocouche pendant le second transfert. Tout comme leurs observations, nous avons pu constater que les taux de transfert augmentaient avec la pression de dépôt. Pour calculer la proportion x de trous formés, nous considérons l'écart relatif entre les deux premiers taux de transfert, nos monocouches étant composées du même phospholipide (tableau 3.1).

pression de dépôt (mN/m)	*x* (%) DMPC-mica	*x* (%) DPPC-mica
10	désorption totale	38.2
15	94.3	45
20	51.5	17.5
25	52	6.8
30	38.9	6.8
35	28.9	5.7
40	5.4	6.8

Tableau 3.1 : Pourcentage de trous dans une bicouche de DMPC ou DPPC en fonction de la pression de transfert.

Il apparaît nettement une proportion de trous beaucoup plus faible en formant une bicouche avec du DPPC. On obtient des bicouches de qualité dès 25 mN/m alors qu'il faut monter à une pression de 40 mN/m pour obtenir l'équivalent avec du DMPC.

3.1.5 Conclusion

Le transfert complet de trois monocouches n'est possible que dans une étroite fenêtre de pression de surface.

Nos mesures sont en accord avec les résultats de la littérature à savoir que l'énergie de cohésion entre les deux feuillets est plus forte lorsque la longueur de chaîne augmente (d'où une température de transition principale plus élevée pour le DPPC). Dans la suite de notre étude, nous avons donc formé des bicouches de DMPC sur le verre en utilisant la combinaison Langmuir-Blodgett/Langmuir-Schaeffer (LB + LS).

Ce travail préliminaire nous a permis d'acquérir une connaissance plus approfondie de la méthode d'élaboration des bicouches lipidiques supportées. Les différentes observations nous fourniront des indications utiles pour la compréhension du comportement diffusif de ces systèmes.

3.2 Diffusion de lipides dans les bicouches supportées et étude de la transition gel-fluide

Nous avons mené une étude des propriétés dynamiques de la transition de phase sur des bicouches phospholipidiques supportées pour tenter de comprendre comment elles étaient affectées par les différents paramètres. Après les propriétés générales de diffusion dans les bicouches, nous présenterons en détail les effets du substrat et de la méthode de déposition.

3.2.1 Loi de diffusion

Nous avons effectué des mesures du coefficient de diffusion D pour différentes valeurs de q afin de tester le caractère brownien ou non de la diffusion. Une variation linéaire de τ en fonction de $1/q^2$ constitue la signature d'un processus diffusif. Dans nos expériences nous avons fait varier l'interfrange de 1 à 80 µm. La figure 3.4 présente les lois de diffusion $\tau = f(1/q^2)$ respectivement à 15.3 °C et 34.3 °C pour une bicouche de DMPC sur du verre.

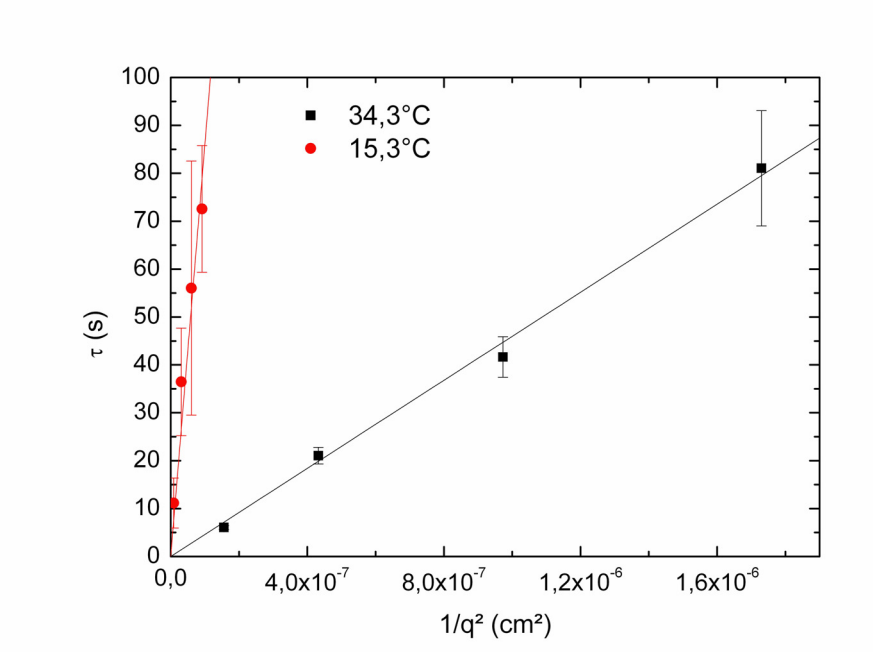


Figure 3.4 : Loi de diffusion dans une bicouche de DMPC (0.1% de PC-NBD) supportée sur verre, dans du tampon phosphate de Na 1 mM, NaCl 100 mM à pH 7.2, pour deux températures différentes, coefficients de diffusion associés :
(■) 34.3°C : $D = 2.17 \pm 0.05 \times 10^{-8}$ cm²/s ($r^2 = 0.9954$)
(●) 15.3°C : $D = 1.16 \pm 0.09 \times 10^{-9}$ cm²/s ($r^2 = 0.9185$)

Aux deux températures (dont nous verrons plus loin qu'elles correspondent respectivement à la phase gel et à la phase fluide) la régression est linéaire et passe par l'origine, caractéristique d'un mouvement purement brownien. Les coefficients de diffusion obtenus par la pente des droites sont en accord avec les valeurs de la figure 3.5 (les lois de diffusion ont été faites sur des échantillons différents).

Remarque : pour les lois de diffusion, nous avons forcé les régressions linéaires par l'origine pour déterminer le coefficient de diffusion.

3.2.2 Transition principale gel-fluide des bicouches de DMPC et DPPC

Nous avons étudié l'effet de la température sur le coefficient de diffusion des phospholipides en passant de la phase gel à la phase fluide dans des bicouches supportées de DMPC et de DPPC. La figure 3.5 montre clairement une transition entre un régime de diffusion lent et un régime de diffusion rapide, de part et d'autre d'une température de transition Tm. Dans la zone de basse température (phase gel) le coefficient de diffusion est de l'ordre de 10^{-9}- 10^{-10} cm^2/s. Pour des températures au-dessus de Tm (phase fluide), le coefficient de diffusion est deux ordres de grandeur plus élevé que précédemment. Les températures de transition de phase obtenues en traçant D = f(T) sont qualitativement en bon accord avec les valeurs obtenues en utilisant des techniques thermodynamiques en volume comme la calorimétrie différentielle [86, 87].

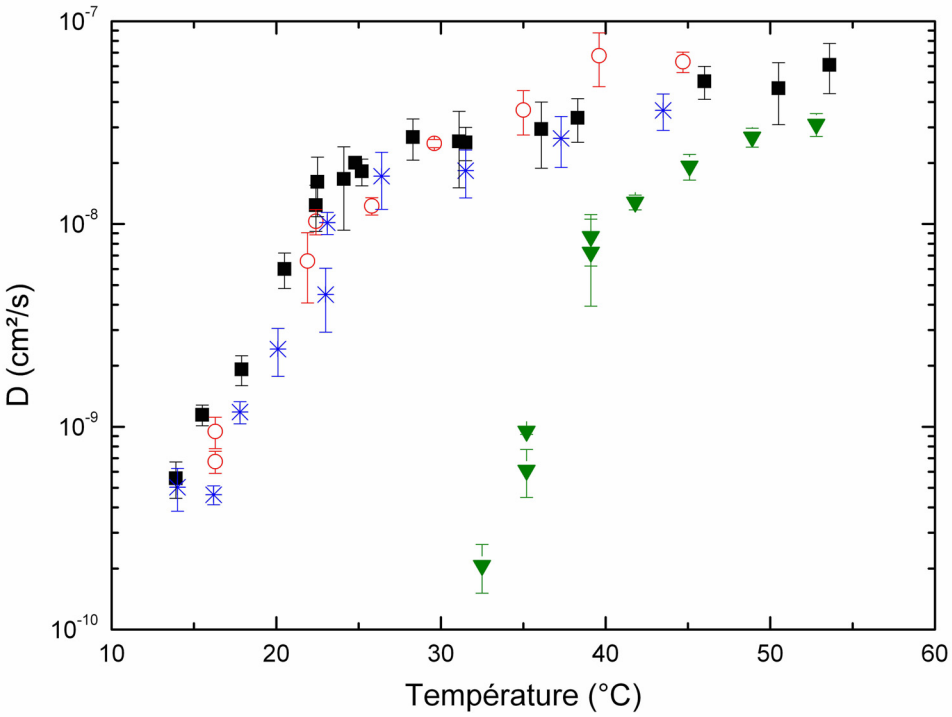


Figure 3.5 : Dépendance en température du coefficient de diffusion dans une bicouche de DMPC supportée sur verre dans deux milieux différents : (■) eau déionisée, (○) et (✳) tampon phosphate de Na 1 mM, NaCl 100 mM pH 7.2, et dans une bicouche de DPPC dans de l'eau déionisée (▼).

Pour pouvoir comparer quantitativement les températures de transition de différents systèmes nous avons modélisé nos données au voisinage de la transition : il est possible d'ajuster les données expérimentales en utilisant une loi de puissance dans la zone de transition

$$D \sim (T - T_x)^{\gamma} \qquad (7)$$

avec $\gamma = 2$

T_x est la température de transition obtenue via cette approche. Cette méthode sous-estime clairement Tm. Nous trouvons T_x = 38 °C pour le DPPC et T_x = 18 °C pour le DMPC, à comparer avec les valeurs thermodynamiques qui sont respectivement Tm = 41.5 °C et Tm = 23 °C. Néanmoins cela nous fournit un outil pour comparer objectivement les températures de transition de différents systèmes. Enfin, nous notons que des lois de puissance pour les coefficients de transport, comparable à l'équation 7, sont couramment utilisées pour des

transitions de phase à l'équilibre thermique dans les théories des phénomènes critiques [88] et aussi pour des systèmes vitreux [89].

Nous avons également vérifié au cours d'un cycle de chauffage-refroidissement au-delà de la température de transition qu'il n'y avait pas d'hystérésis sur les valeurs de D dans les deux phases. Ceci indique qu'il n'y a pas de départ de matière au sein de la bicouche au cours du chauffage dû aux fluctuations thermiques, ce qui pourrait avoir pour effet un ralentissement de la dynamique, du fait de la présence de trous (Charitat et al. [85] ont observé ce phénomène sur des bicouches de DPPC et DSPC avec désorption réversible de matière sous forme de vésicules, seulement quelques degrés au-dessus de la température de transition principale).

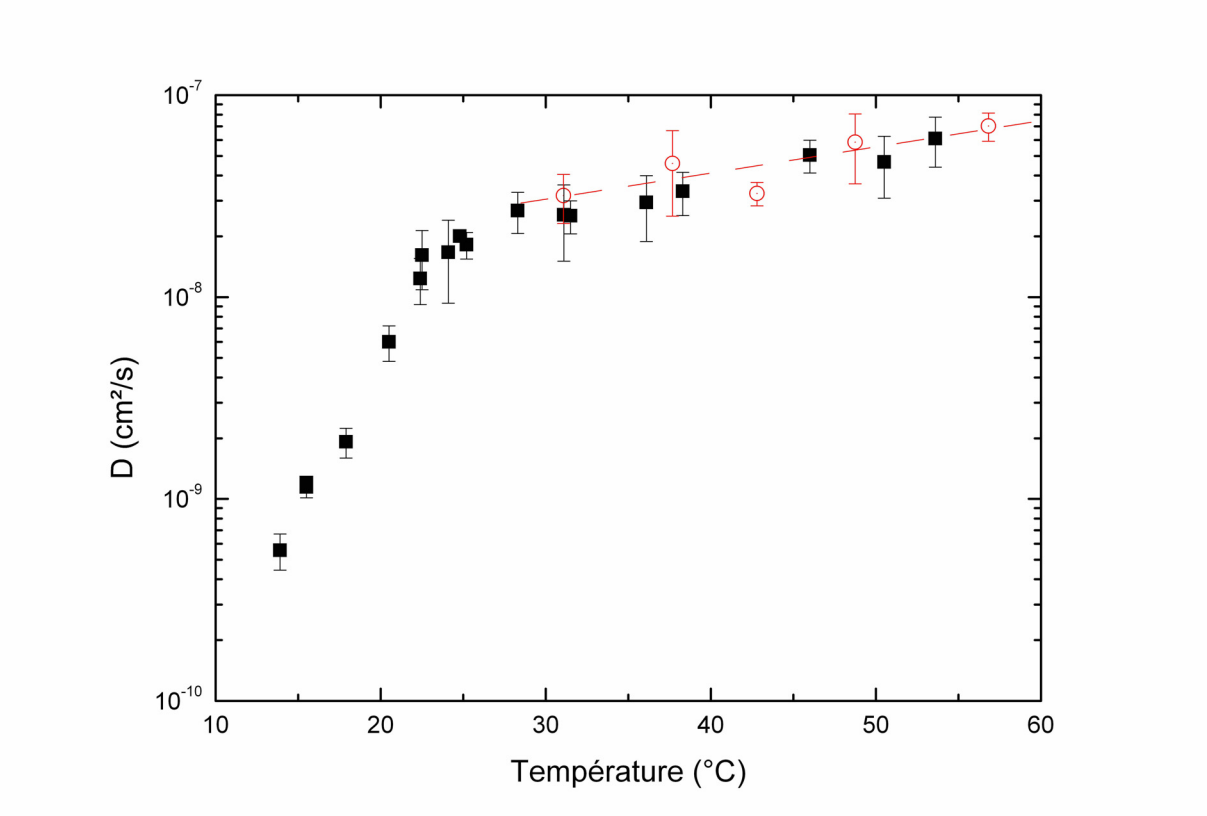


Figure 3.6 : Dépendance en température du coefficient de diffusion dans deux bicouches de DMPC supportées sur verre, dans de l'eau déionisée : (■) et (○).

Sur ce système DMPC/verre, nous avons voulu vérifier s'il existait ou non une seconde transition au-delà de la première, en chauffant jusqu'aux environs de 55 °C. Ce phénomène a déjà été observé par AFM pour une bicouche de ce lipide déposé sur du mica et a été associé à

la transition du feuillet proximal (le plus près du substrat), le feuillet distal (côté solution), supposé plus libre, transitant à une température voisine de celle de la bicouche libre.
Sur la figure 3.6, nous avons superposé une courbe représentant la transition entière à une autre série de mesures en phase fluide en augmentant la statistique de chaque point (environ 10 mesures par température). Il en résulte une variation linéaire de log(D) avec la température du même ordre de grandeur que la courbe de référence. Cette variation graduelle correspond à la variation de viscosité du liquide. Nous en concluons qu'il n'existe pour ce système aucune autre transition.

Le fait que tous nos signaux soient monoexponentiels et que la fraction immobile soit négligeable nous permet de dire que l'interaction des bicouches de DMPC et de DPPC avec le verre est faible et que les deux feuillets ont la même dynamique. En se référant aux valeurs publiées [67], on peut considérer que la transition en température des bicouches de DMPC sur ce support se comporte comme celle d'une membrane libre.
Quand cela sera possible, nous utiliserons nos courbes D = f(T) pour déterminer les énergies d'activation dans les phases gel et fluide ainsi que les enthalpies de transition des différents systèmes. Les valeurs seront présentées et analysées dans la sous-section 3.2.5

3.2.3 Effet de la pression initiale de dépôt et de la force ionique

Comme cela a été montré au début de ce chapitre, la pression de dépôt influence fortement la qualité finale des bicouches supportées. Nous avons tenté de quantifier l'effet de ce paramètre sur la dynamique interne de la bicouche lipidique. La figure 3.7 montre le coefficient de diffusion, mesuré sur des bicouches lipidiques déposées par (LB +LS) sur le verre, en fonction de la pression initiale à 31.7 °C.
Nous n'observons pas de variation significative du coefficient de diffusion, ce qui tend à montrer que, quelle que soit la pression de dépôt, nos bicouches ne présentent pas (ou peu) de défauts. Les lipides s'organisent sur le substrat en bicouches qui ont des tensions superficielles à l'équilibre équivalentes. Tout se passe comme si la pression initiale des phospholipides sur la cuve de Langmuir évoluait vers une tension de surface finale de la bicouche qui serait majoritairement déterminée par l'affinité lipide/substrat. Une fois la première monocouche déposée avec les excellents taux de transfert vus précédemment, la

seconde monocouche permet, via Langmuir-Schaffer, de refermer cette « fermeture éclair » à 2 dimensions (modèle VELCRO™).

Cette interprétation recoupe l'observation faite au paragraphe 3.1.1 où l'on constatait que le DPPC et le DMPC, n'ayant pas la même aire moléculaire, présentaient des Tr_1 respectivement égaux à 1 et à 1.2. Ceci pourrait relever du même mécanisme, résultant en une tension de surface du même ordre de grandeur dans les deux bicouches.

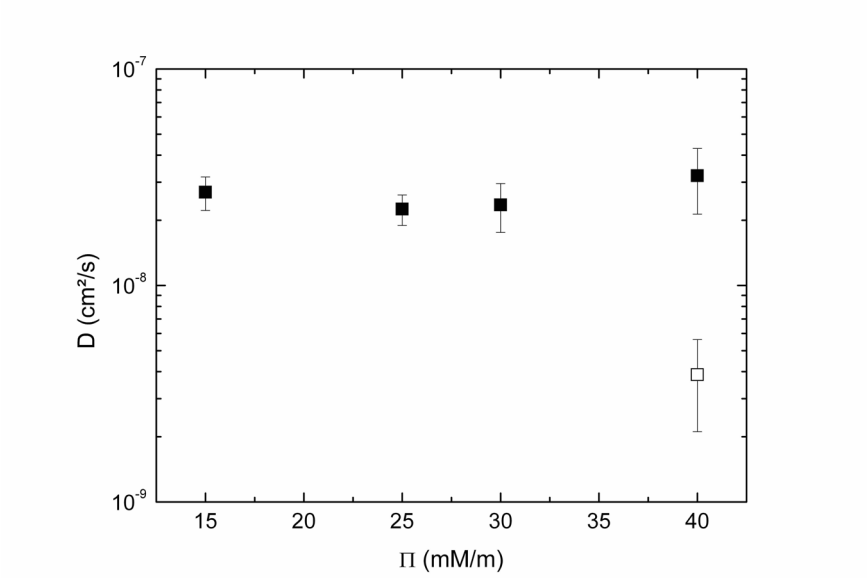


Figure 3.7 : Coefficients de diffusion mesurés pour des bicouches de DMPC réalisées à différentes pressions de transfert.

Remarque : il s'est avéré qu'un échantillon préparé par (LB + LS) conduit parfois à un signal de recouvrement de fluorescence à deux composantes (figure 3.7).

Suite aux observations faites sur les taux de transfert des doubles dépôts par Langmuir-Blodgett (partie 3.1), il s'est avéré intéressant de vérifier dans quelle mesure la présence de trous affectait la dynamique des phospholipides. Ayant observé qu'il était possible d'obtenir une bicouche avec des taux de transfert élevés en comprimant la monocouche initiale à 40 mN/m, nous avons testé ces conditions avec le système DMPC/verre.

Nous avons préparé un échantillon par deux LB dont les taux de transfert sont de 1.22 pour la première monocouche, et de 0.44 pour la seconde, soit un pourcentage approximatif de trous de 64 %. On observe deux composantes en phase gel qui disparaissent en phase fluide (figure 3.8). S'agit-il d'une cicatrisation au cours du chauffage ?

Nous avons remarqué que la valeur 40 mN/m était proche de la valeur d'effondrement pour le DMPC. Compte-tenu du fait qu'avec le DPPC des transferts à 40 mN/m (loin de sa pression de collapse) ont toujours donné une seule exponentielle sur le verre, nous en avons déduit que ce comportement à deux composantes était peut être le résultat d'une instabilité due au voisinage de cette pression critique. Par précaution les bicouches de DMPC ont donc toujours été faites à 30 mN/m par (LB+ LS).

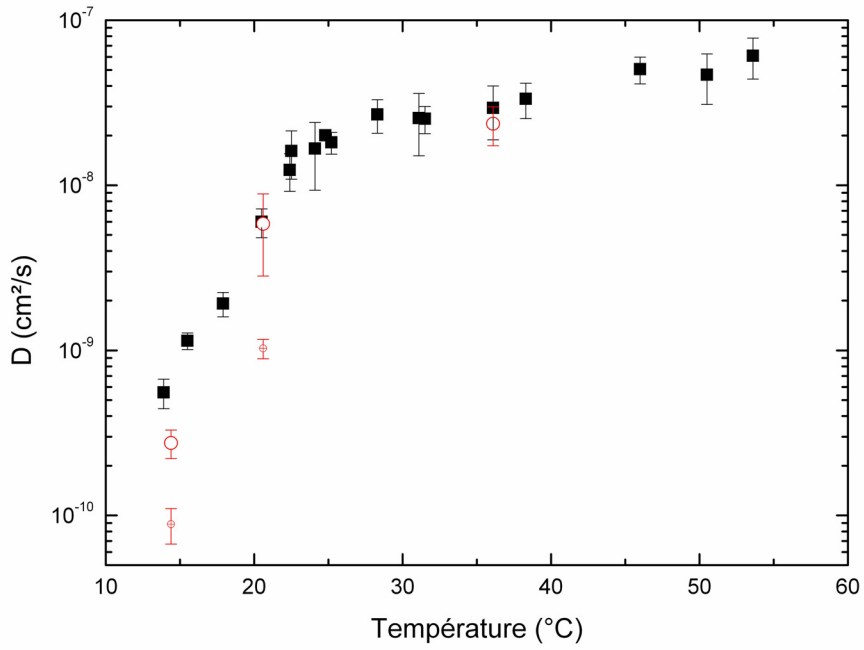


Figure 3.8 : Dépendance en température du coefficient de diffusion en fonction de la température pour des bicouches de DMPC fabriquées de deux manières différentes : (■) LB + LS à 30 mN/m, (○) LB + LB à 40 mN/m, $Tr_1 = 1{,}22$ et $Tr_2 = 0{,}44$.

La force ionique de la solution environnante n'a pas d'influence sur la diffusion dans la bicouche comme on peut le voir sur la figure 3.5 (1 courbe dans l'eau et 2 courbes en tampon phosphate de Na 1 mM + 100 mM NaCl, pH 7.2). On remarque une presque parfaite superposition des courbes correspondant à la transition dans les différents milieux. Ceci

souligne la très bonne reproductibilité, d'une expérience à l'autre, de la préparation des échantillons, entraînant également celle des mesures.

3.2.4 Influence de la nature du substrat sur le coefficient de diffusion

3.2.4.1 Dynamique de la bicouche

Dans cette partie nous nous intéressons à l'effet du substrat sur la dynamique interne de la bicouche. Nous examinons d'abord le cas de bicouches supportées déposées sur mica.
Nous avons utilisé la même méthode de préparation des échantillons que précédemment, soit un dépôt (LB + LS) avec notre balance de Langmuir. En utilisant un programme d'ajustement type moindre carré, nous avons observé que la décroissance de la fluorescence présentait systématiquement deux composantes. Nous avons également analysé la distribution des temps de relaxation en utilisant la transformée inverse de Laplace (CONTIN [90]) (voir également Annexe 1).
La figure 3.9 révèle une dynamique complexe comportant deux temps de relaxation distincts, associés à des amplitudes équivalentes.

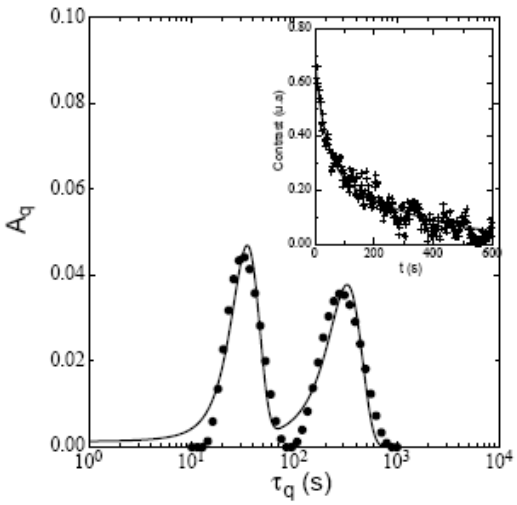


Figure 3.9 : Analyse du contraste de fluorescence en fonction du temps pour une bicouche de DMPC sur mica : distribution des temps de relaxation à partir du programme CONTIN et meilleurs fits associés avec des distributions gaussiennes. En insert : données expérimentales ajustées avec deux fonctions exponentielles.

Après cette observation nous avons, par la suite, forcé l'égalité des amplitudes et fixé la valeur de la ligne de base à zéro lors de nos analyses de signaux. En réduisant ainsi le nombre de paramètres d'ajustement de 5 (2 pour les amplitudes, 2 pour les temps, 1 pour la ligne de base) à 3, nous avons observé un resserrement de la distribution des temps et donc une réduction des barres d'erreur. Cette évolution favorable constitue un argument supplémentaire en faveur de l'égalité des amplitudes.

Pour vérifier que ces temps correspondaient effectivement à un processus de diffusion brownienne, nous avons effectué des mesures à différents vecteurs q pour différentes températures (dans la phase gel, pendant la transition et dans la phase fluide). On voit sur la figure 3.10 que les deux composantes varient en q^2.
Si ceci confirme l'existence d'une diffusion brownienne, cela révèle également la dynamique complexe d'une bicouche sur le mica. Ce phénomène n'était pas observé sur le verre alors que toutes les autres conditions étaient identiques (voir 3.2.1 et 3.2.2).

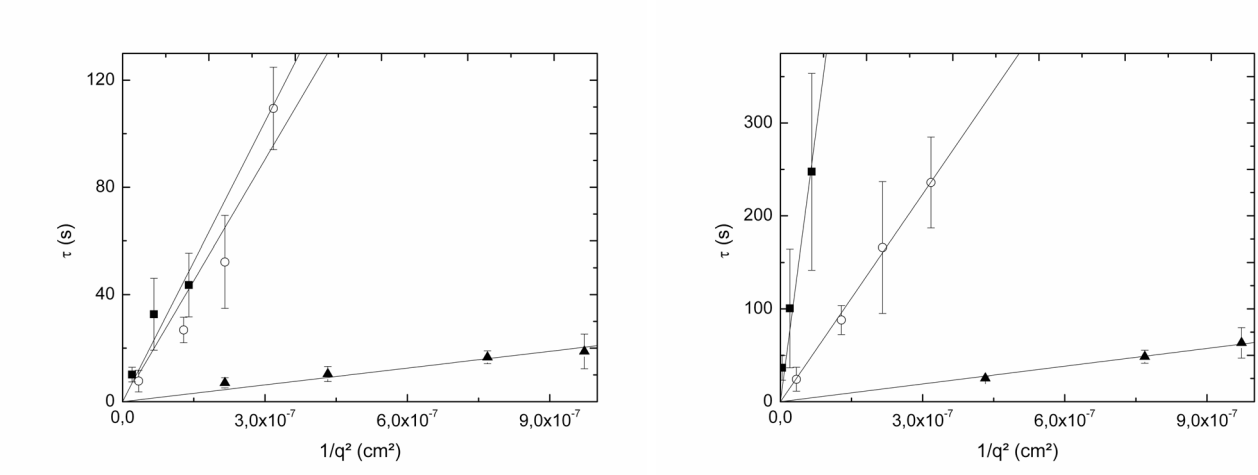


Figure 3.10 : Lois de diffusion des composantes rapide (gauche) et lente (droite) dans une bicouche de DMPC supportée sur mica pour trois températures différentes.
(■) 15.1 °C, (○) 21.9 °C et (▲) 33 °C.

La figure 3.11 montre la variation du coefficient de diffusion avec la température pour les composantes lentes et rapides. Les deux composantes sont qualitativement comparables aux mesures effectuées sur le verre.

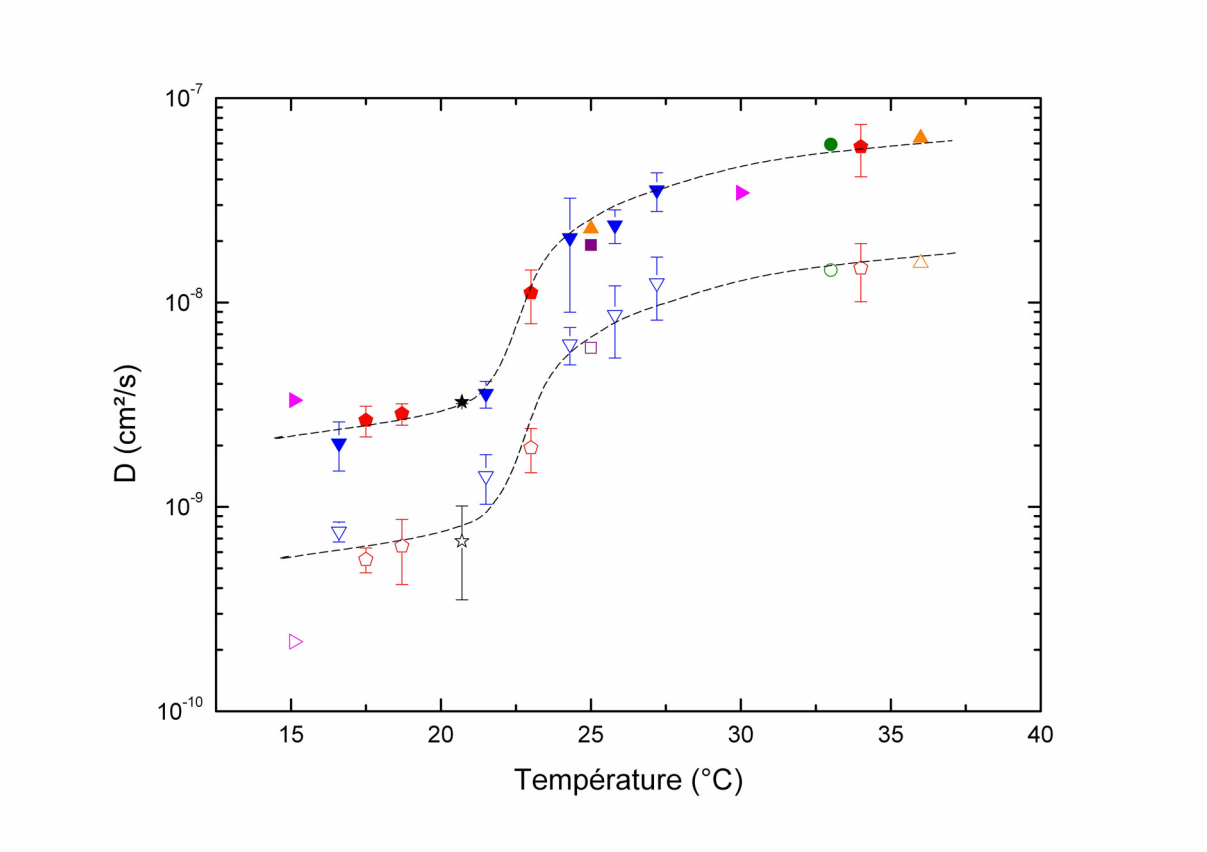


Figure 3.11 : Dépendance en température du coefficient de diffusion dans une bicouche de DMPC marquée avec 0.1% de PC-NBD supportée sur mica dans une solution tampon de phosphate de Na 1 mM, NaCl 100 mM, pH = 7.2.
Symboles pleins : composante rapide D_{rapide}
Symboles creux : composante lente D_{lente}
(les symboles de formes différentes correspondent à des échantillons différents)

Ces considérations, associées au fait que les deux temps de relaxation ont la même amplitude, nous ont amené à penser que ces deux dynamiques pouvaient être attribuées aux deux feuillets de la bicouche, même si nous n'avons pas de preuve directe de cette hypothèse. Remarquant que la variation du coefficient le plus rapide était semblable à la variation de l'unique coefficient mesuré sur le verre (valeurs absolues, comportement qualitatif, température de transition Tm) nous pouvons inférer que, sur le mica, le coefficient de diffusion est plus lent dans le feuillet proximal (proche du substrat) que dans le feuillet distal. Ceci provient probablement d'une plus forte interaction avec le substrat. Cette interaction n'est probablement pas électrostatique car, outre le fait que la tête PC du lipide est globalement neutre, nous avons observé, comme sur le verre, qu'un changement de la force ionique (de l'eau déionisée à 500 mM NaCl) n'affectait pas les dynamiques respectives des feuillets.

Ainsi la composante la plus lente correspondrait au feuillet proximal et la composante la plus rapide au feuillet distal, le couplage proprement dit entre les feuillets semblant plutôt faible, en tout cas devant l'interaction feuillet proximal substrat. Le coefficient de diffusion de la composante la plus lente est environ 5 fois plus petit que celui du feuillet distal sur l'ensemble de la transition. Dans la limite de notre résolution expérimentale, Tm semble être la même pour les deux feuillets.

Le tableau 3.4 résume les valeurs des coefficients de diffusion obtenus par régression linéaire passant par l'origine des lois de diffusion pour chacune des deux composantes.

température (°C)	**composante rapide feuillet distal**	**composante lente feuillet proximal**
15.1	$2.87 \pm 0.42 \times 10^{-9}$	$2.58 \pm 0.22 \times 10^{-10}$
21.9	$3.32 \pm 0.35 \times 10^{-9}$	$1.34 \pm 0.02 \times 10^{-9}$
33	$4.78 \pm 0.33 \times 10^{-8}$	$1.57 \pm 0.04 \times 10^{-8}$

Tableau 3.4 : Coefficients de diffusion (cm^2/s) obtenus par régression linéaire de la figure 3.10.

Un comportement tout à fait similaire a été observé avec le DPPC (figure 3.12), qui présentait lui aussi une seule composante sur le verre. La courbe obtenue sur le verre est rappelée pour permettre la comparaison. Nous n'avons pas pu effectuer de mesures entre 40 et 44 °C car dans cette fourchette de température D augmente tellement qu'il devient difficile de trouver l'interfrange où l'on puisse déterminer les deux temps de relaxation.
Sur le mica, l'amplitude de la transition entre la phase gel et la phase fluide est beaucoup plus marquée puisque D varie de $\approx 10^{-12}$ -10^{-11} à $\approx 10^{-8}$ -10^{-7} cm^2/s, soit 4 ordres de grandeur au lieu de 2. Ceci peut s'expliquer par une interaction plus forte avec le substrat et entre les feuillets du fait de la plus grande longueur des chaînes carbonées du lipide. Cette plus grande affinité du DPPC pour le substrat était déjà observée lors de l'étude des taux de transfert.

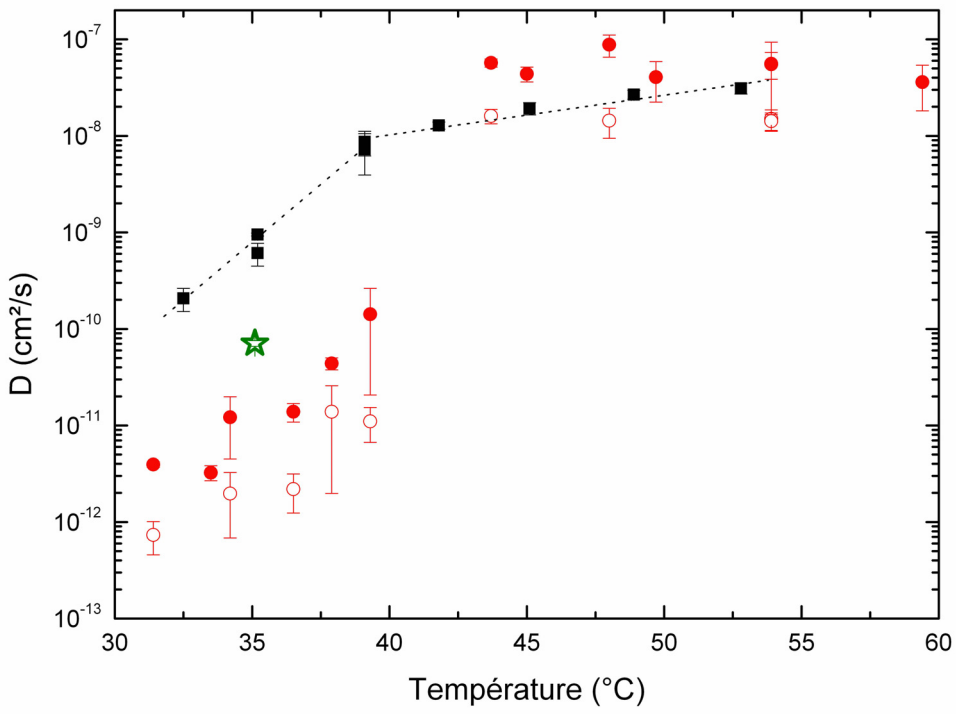


Figure 3.12 : Evolution du coefficient de diffusion en fonction de la température dans une bicouche de DPPC suivant la nature du substrat :
(●) mica (symboles pleins : feuillet distal, symboles creux : feuillet proximal), (■) verre, (☆) : double bicouche de DPPC sur du mica, seulement la quatrième monocouche est marquée avec 0.1% de PC-NBD.

Le comportement d'une bicouche supportée, préparée par (LB + LS), est donc drastiquement différent selon qu'elle est déposée sur verre ou sur mica. Ces surfaces, toutes deux chargées négativement, ne sont pas chimiquement équivalentes mais présentent aussi des topologies de surface très différentes. La surface du mica clivé est atomiquement plane, permettant à la bicouche de venir très près, pour s'adsorber avec un nombre de sites d'interaction très important. Ceci conduit à une réduction de l'épaisseur du film d'eau compris entre le feuillet proximal et le substrat qui jouait le rôle de lubrifiant. Dès lors une friction plus importante pourrait être à l'origine du ralentissement du feuillet. Au contraire sur les substrats en verre « flotté » (appellation industrielle des fabricants), une rugosité à courte longueur d'onde (< 10 nm) est toujours présente à cause des ondes capillaires (amplitude ≈ 1 à 10 nm) [91], qui s'ajoute éventuellement à celle générée par le traitement de nettoyage (voir image AFM, chapitre II). Celle-ci peut significativement réduire le potentiel local d'adhésion de la bicouche comme montré par Swain et Andelman [92, 93]. Cette différence de valeur du potentiel d'interaction peut être une explication des différents comportements observés.

Afin de permettre de visualiser les différences et les points communs nous avons jugé utile de représenter les coefficients de diffusion sur une échelle de températures réduites *Tr* dans les figures 3.13 et 3.14.

Elle est définie comme suit :

$$Tr = \frac{T - Tm}{Tm}$$

avec *Tm* (température de transition principale) respectivement de 24 et 41 °C pour le DMPC et le DPPC.

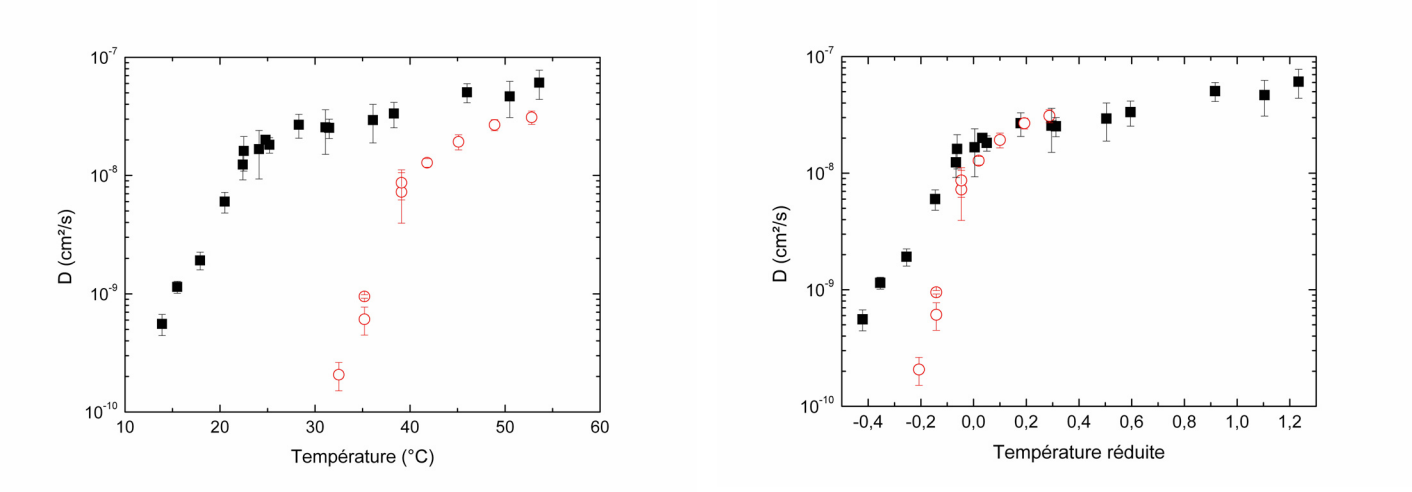


Figure 3.13 : Transition en température sur verre.
(■) bicouche de DMPC (LB + LS) à 30 mN/m
(○) bicouche de DPPC (LB + LB) à 40 mN/m

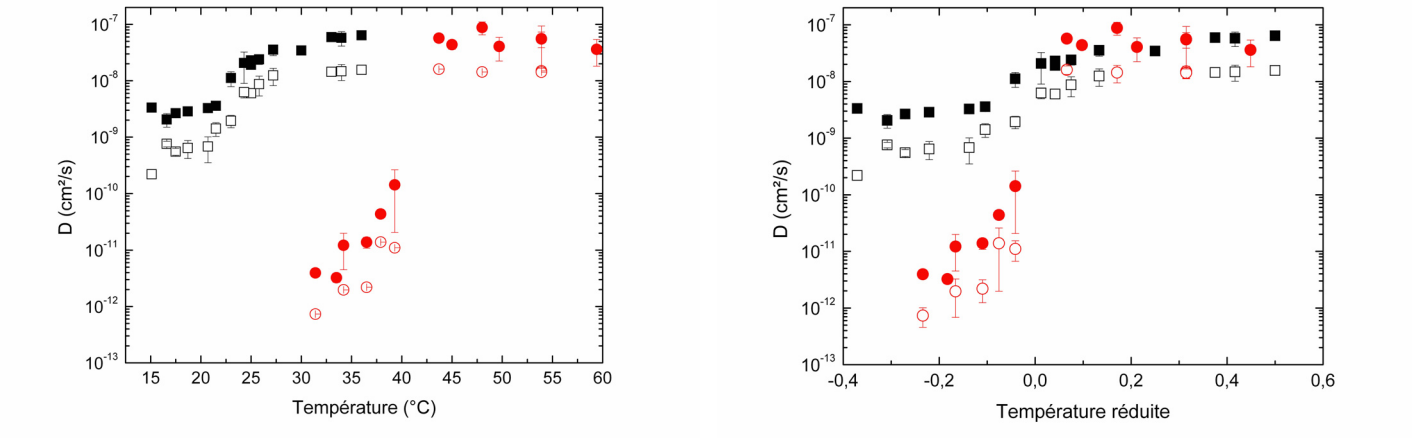


Figure 3.14 : Transition en température sur mica.
(■) bicouche de DMPC (LB +LS) à 30 mN/m
(●) bicouche de DPPC (LB + LS) à 40 mN/m

3.2.4.2 Marquage alternatif des feuillets sur mica

Nous avons recherché une preuve plus directe du mouvement différencié des feuillets de DMPC sur le mica. Pour cela nous avons réalisé deux tentatives : dans la première nous avons marqué seulement la monocouche distale, dans la seconde seulement la monocouche proximale. En mettant l'échantillon sur le banc de FRAPP dès la fin de la préparation, spécialement dans le cas du marquage du feuillet supérieur, en débutant les mesures en phase gel (où les temps de flip-flop sont plus longs), nous espérions obtenir des signaux redevenus monoexponentiels donnant soit la composante rapide soit la composante lente. Grâce à nos précédentes mesures, nous savions quelle interfrange utiliser. Les résultats de FRAPP ont donné systématiquement deux composantes, de la même manière que lorsque les deux monocouches étaient toutes les deux marquées. Nous en avons conclu que le passage d'un lipide marqué (ou non) dans l'autre feuillet était encore trop rapide. De cette expérience, nous en avons déduit un temps de flip-flop inférieur à 15 minutes, et ce dès 15°C, à rapprocher des valeurs de Liu et al (8.4 à 1.3 minutes entre 12.1 et 20.4 °C) [61].

3.2.4.3 Dynamique d'une quadricouche sur mica

Avec la même question que dans le paragraphe précédent, nous avons voulu faire l'expérience avec une quadricouche en ne marquant que l'ultime feuillet. L'idée était que même si le flip-flop conduisait au marquage du second feuillet de la même bicouche, le film d'eau qui sépare les deux bicouches (environ 5 nm) serait suffisant pour interdire tout transfert de lipide marqué vers la bicouche située au voisinage du substrat.. Ainsi, mesurant la dynamique de la bicouche éloignée du substrat et donc *a priori* libre de toute interaction avec celui-ci nous devrions n'observer qu'une seule exponentielle. Nous avons donc préparé une tricouche non-marquée sur mica et en utilisant la technique de Langmuir-Schaeffer déposé la quatrième monocouche pour former la quadricouche, seul feuillet marqué avec PC-NBD 0.1 %. Toutes les monocouches ont été déposées à 40 mN/m sur une sous-phase d'eau déionisée à 15 °C,
La loi de diffusion à 35.1 °C sur cette quatrième monocouche (figure 3.15) pour trois interfranges donne un coefficient de diffusion unique de $7.08 \pm 0.48 \times 10^{-11}$ cm²/s. Cette

valeur est reportée sur les courbes de transition en température des bicouches sur verre et mica de la figure 3.12.

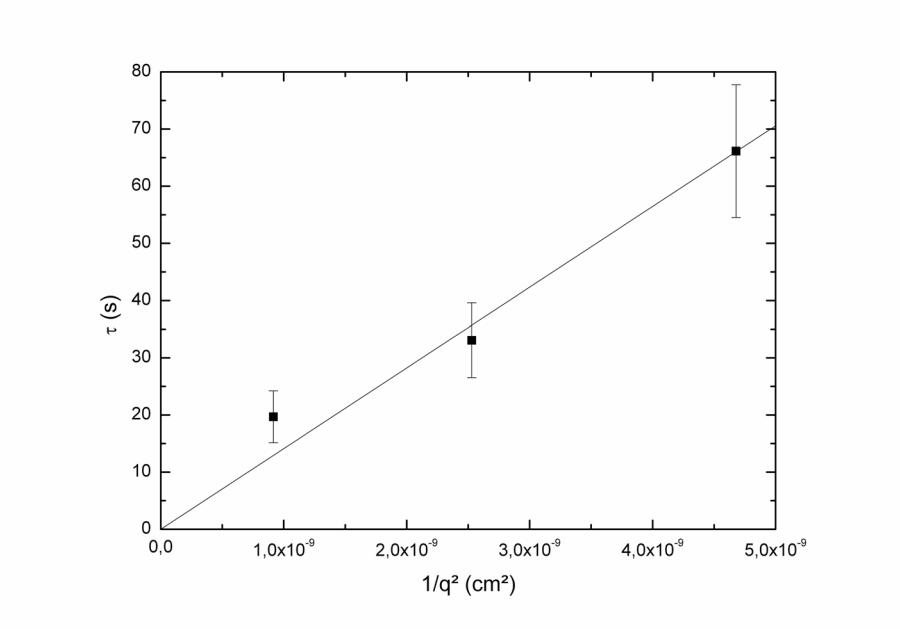


Figure 3.15 : Loi de diffusion à 35.1°C dans une quadricouche de DPPC marquée avec 0.1% de PC-NBD.

Plusieurs remarques découlent de ces résultats :

- nous avons observé la présence d'une seule composante dans les signaux de relaxation. Ainsi, soit les marqueurs sont restés confinés dans la quatrième monocouche, soit, via un mouvement de flip-flop (analogue à celui suspecté pour une bicouche sur mica), ils sont passés dans la troisième monocouche, ce qui signifierait que les deux feuillets de la seconde bicouche diffusent à la même vitesse. Cette hypothèse est vraisemblable si on considère que le même phénomène s'est produit avec le DMPC sur le mica, alors qu'énergétiquement, le flip-flop était moins favorable quand le feuillet proximal était marqué du fait de l'interaction avec le mica. Dans les deux cas, le marqueur est resté confiné dans la seconde bicouche, la plus éloignée du substrat.

- la valeur intermédiaire de D (entre le mica et le verre) indique qu'il subsiste un effet, bien qu'éloigné du support. La seconde bicouche n'a donc pas les propriétés d'une membrane libre, malgré la distance avec le substrat (épaisseur de la première bicouche (4 nm) + couche d'eau (5nm) entre bicouches = 9 nm). Nous aurions pu retrouver la valeur obtenue sur le verre ($\approx 8 \times 10^{-9}$ cm²/s).

3.2.5. Détermination des énergies d'activation et des enthalpies de transition. Données thermodynamiques.

Dans la littérature, on recense peu de données relatives à ces énergies pour des bicouches supportées. La majorité des études sont faites sur des liposomes par calorimétrie différentielle.

La diffusion est un processus thermiquement activé qui suit la relation suivante :

$$D = D_0 \exp^{(-E_a/RT)}$$

avec D : coefficient de diffusion

D_0 : préfacteur

E_a : énergie d'activation

R : constante universelle des gaz

T : température absolue

La représentation des courbes de diffusion en fonction de la température en échelle logarithmique permet de déterminer les énergies d'activation E_a des phases gel et fluide ainsi que l'enthalpie de la transition ΔH_{tr}. Cette enthalpie de transition traduit la barrière énergétique à fournir pour passer d'une phase à l'autre.

La figure 3.16 illustre les transitions en température à partir desquelles sont calculées les données thermodynamiques. Elles sont récapitulées dans le tableau 3.6.

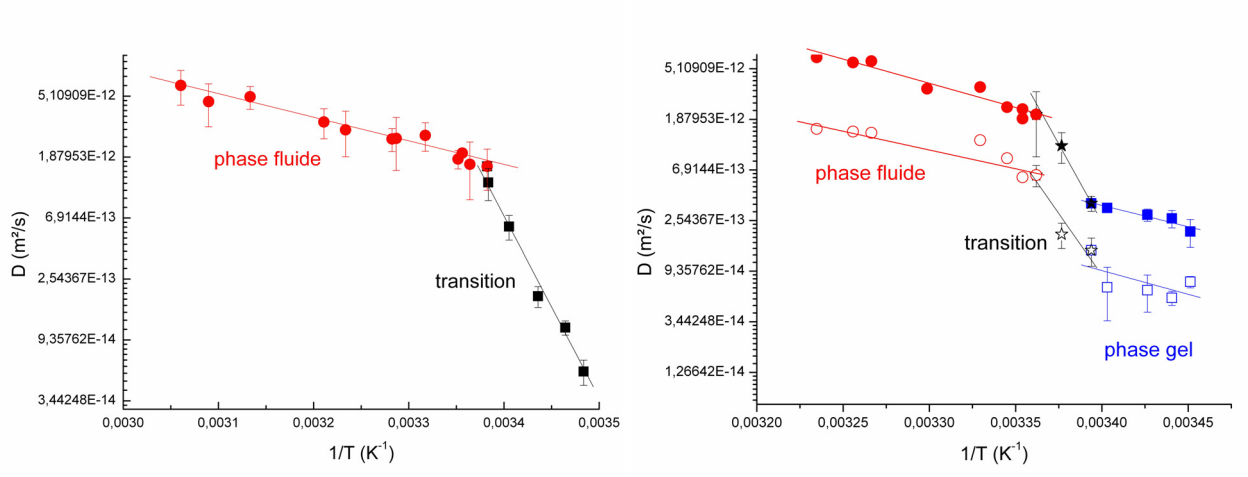


Figure 3.16 : Dépendance du coefficient de diffusion en fonction de l'inverse de la température dans une bicouche de DMPC marquée avec 0.1% de PC-NBD sur verre (gauche) ou mica (droite).

phospholipide	substrat/composante	E_a gel	ΔH_{tr}	E_a fluide
DMPC + 0.1 % PC-NBD	verre/bicouche		290 ± 10	45 ± 10
	mica/feuillet distal	70	512	80
	mica/feuillet proximal	78	405	58
DPPC + 0.1 % PC-NBD	verre/bicouche		448	88
	mica/feuillet distal	266	1121	~ 0
	mica/feuillet proximal	261	1363	~ 0

Tableau 3.6 : Tableau récapitulatif des énergies d'activation et des enthalpies de transition mesurées dans des bicouches de DMPC et DPPC.
Les valeurs sont données en kJ/mol.

Blume [82] a mesuré les enthalpies de la transition principale pour des liposomes multilamellaires (ΔH_{tr} (DMPC) = 27.2 kJ/mol, ΔH_{tr} (DPPC) = 36.4 kJ/mol) et en a déduit que l'enthalpie de la transition augmentait, mais de façon non-linéaire, avec la longueur des chaînes.

Dans leur étude sur la transition de phase découplée sur des bicouches mixtes de DPPC/SOPC, Keller et al. [69] ont déterminé les enthalpies de transition de chaque feuillet, respectivement de 372 ± 29 kJ/mol et 1030 ± 26 kJ/mol pour les monocouches distale et proximale. L'enthalpie de transition pour des SUV de même composition étant de 400 ± 5 kJ/mol, ils en ont déduit que le support en mica n'affectait pas le feuillet distal alors qu'il induisait un décalage vers les plus hautes températures de la transition principale ainsi qu'une diminution de la largeur de cette dernière.

L'énergie d'activation en phase fluide du feuillet distal d'une bicouche de DMPC (transférée à 29.7 mN/m) supportée sur verre à été déterminée comme étant égale à 54 ± 10 kJ/mol [64]. Elle est comprise entre 16.7 et 33.5 kJ/mol pour des multicouches de phosphatidylcholines [75] qui peuvent être considérées comme libre.

Nous fournissons ici un jeu de données originales que nous pouvons comparer avec les quelques valeurs de la littérature

Notre valeur pour le DMPC (45 ± 10 kJ/mol) est en bon accord avec les 54 kJ/mol d'un système voisin. La valeur plus élevée du DPPC (88 kJ/mol) s'explique par la plus grande longueur de ses chaînes carbonées.

Si l'on examine les valeurs obtenues pour le DMPC, on remarque que sur le mica, les deux feuillets sont caractérisés par les mêmes valeurs, de la phase gel à la phase fluide, en passant par l'enthalpie de transition. On peut donc considérer qu'ils sont « thermodynamiquement » équivalents (seule la dynamique est ralentie d'un facteur 5 pour le feuillet proximal). Par rapport aux résultats de Keller [69], on voit très distinctement que dans le cas de notre méthode de préparation (LB + LS), la présence du mica n'induit ni décalage de Tm ni d'augmentation de l'enthalpie de transition sur le feuillet proximal. On observe également l'équivalence des deux feuillets avec le DPPC.
Ainsi nos mesures montrent que ce n'est pas la présence du mica qui induit un décalage de la température de transition Tm, mais la méthode de préparation.

Nous avons estimé, et ce pour la première fois, l'enthalpie de transition du DPPC sur le mica à environ 1200 kJ/mol. Pour faire cette estimation, nous avons pris les valeurs extrêmes des coefficients de diffusion pour la phase gel et les premières valeurs pour la phase fluide. Bien que n'ayant pas de points intermédiaires (difficiles à obtenir expérimentalement), nous estimons l'erreur à ± 20 % .

Les coefficients de diffusion en phase fluide pour le DPPC sur le mica n'augmentent pas de façon suffisamment significative pour calculer une énergie d'activation.

On remarque que l'augmentation de la longueur des chaînes carbonées se traduit par une augmentation des énergies d'activation et des enthalpies de transition (excepté dans le cas de l'énergie d'activation en phase fluide pour le système DPPC/mica) en accord avec ce que l'on pouvait attendre.
D'autre part ces mêmes grandeurs sont systématiquement plus élevées sur le mica que sur le verre, confirmant encore une interaction plus forte avec ce support.

3.2.6 Influence de la méthode de préparation : comparaison fusion de vésicules/dépôts de Langmuir

Comme cela a été mentionné précédemment, dans nos conditions, nous observons sur des substrats en verre une décroissance de la fluorescence avec une seule composante, quand la

bicouche n'a pratiquement aucun défaut, parce qu'elles ont été élaborées en utilisant les transferts (LB + LS).

A partir de cette situation, nous avons préparé sur ce support des bicouches de DMPC par fusion de vésicules, à une température (33 °C) supérieure à Tm (≈ 24 °C). De cette manière la fusion des vésicules sur le substrat s'opère facilement et conduit à des bicouches formées de larges domaines homogènes, *a priori* plus grands que l'interfrange. Ces bicouches approchent (au microscope) la qualité des bicouches préparées par LB mais ont des propriétés dynamiques différentes. De nombreux échantillons ont été testés et nous avons choisi d'en présenter trois, dont deux ont été élaborés dans une solution tampon et un dans de l'eau déionisée (figure 3.17). Les figures 3.17 et 3.18 montrent l'existence systématique de deux composantes, avec une transition en fonction de la température qui peut être plus large, moins abrupte, et comportant des décalages de température de transition.

D'une manière générale, bien que le protocole de préparation des bicouches soit rigoureusement suivi, on voit une assez grande disparité des mesures, notamment autour de la transition. Les valeurs D de la composante rapide sont relativement voisines les unes des autres sur toute la transition. Il n'en est pas de même pour la composante lente dont les valeurs sont très dispersées.

Pour résumer, deux composantes apparaissent systématiquement dans les systèmes réalisés par éclatement de vésicules. Il n'existe pas d'effet de la force ionique sur la composante rapide, tout comme dans les bicouches (LB + LS).

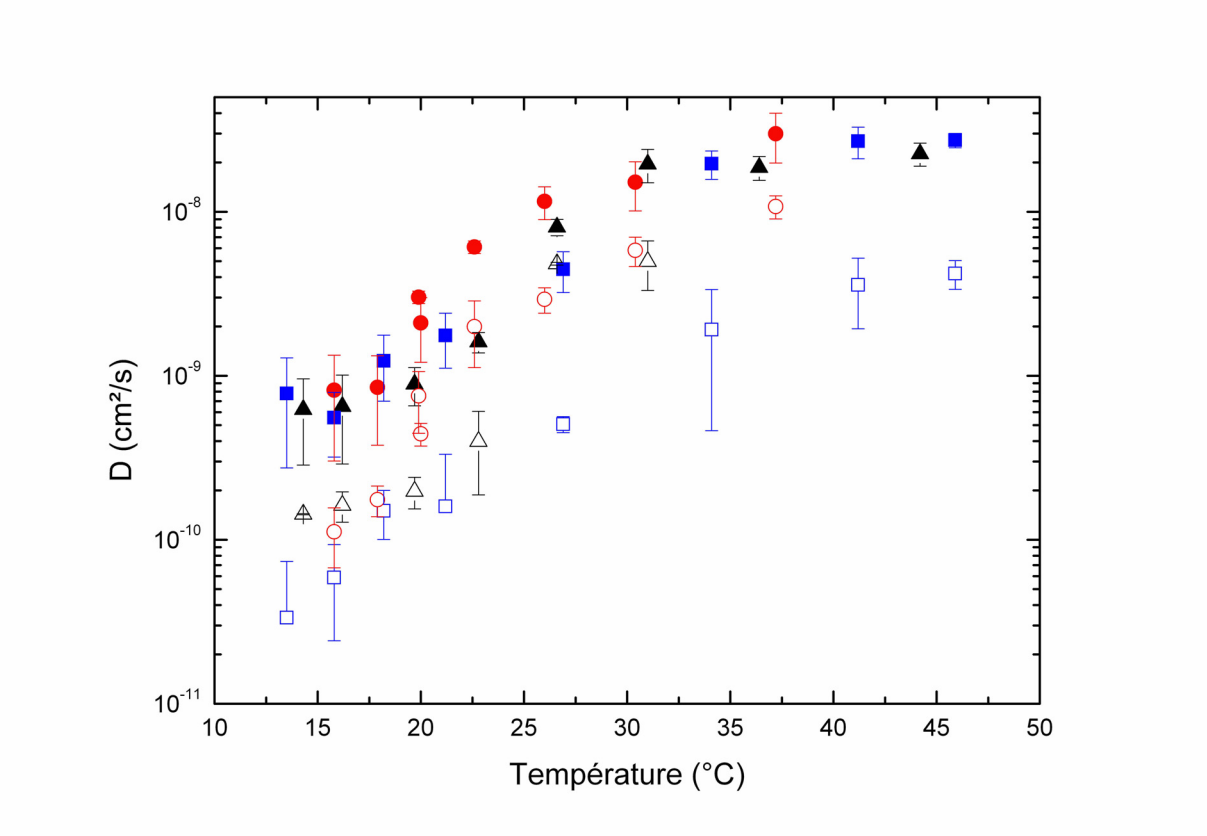


Figure 3.17 : Courbes de transition en température de trois bicouches de DMPC réalisées par fusion de vésicules dans deux environnement aqueux différents : (■) eau déionisée,(●) et (▲) tampon phosphate de Na 1 mM, NaCl 100 mM, pH 7.2.
symboles pleins : composante rapide
symboles creux : composante lente

La figure 3.18 présente les courbes de transition en température d'une bicouche de DMPC fabriquée par fusion de vésicules et (LB + LS). En plus de la présence d'une deuxième composante, on voit clairement un décalage de la température de transition vers les plus hautes températures pour la bicouche formée à partir de vésicules. Les domaines formés par les vésicules ne fusionnent pas car malgré le chauffage, on est toujours en présence de la seconde composante, et la dynamique reste inférieure à celle d'une membrane libre [69].

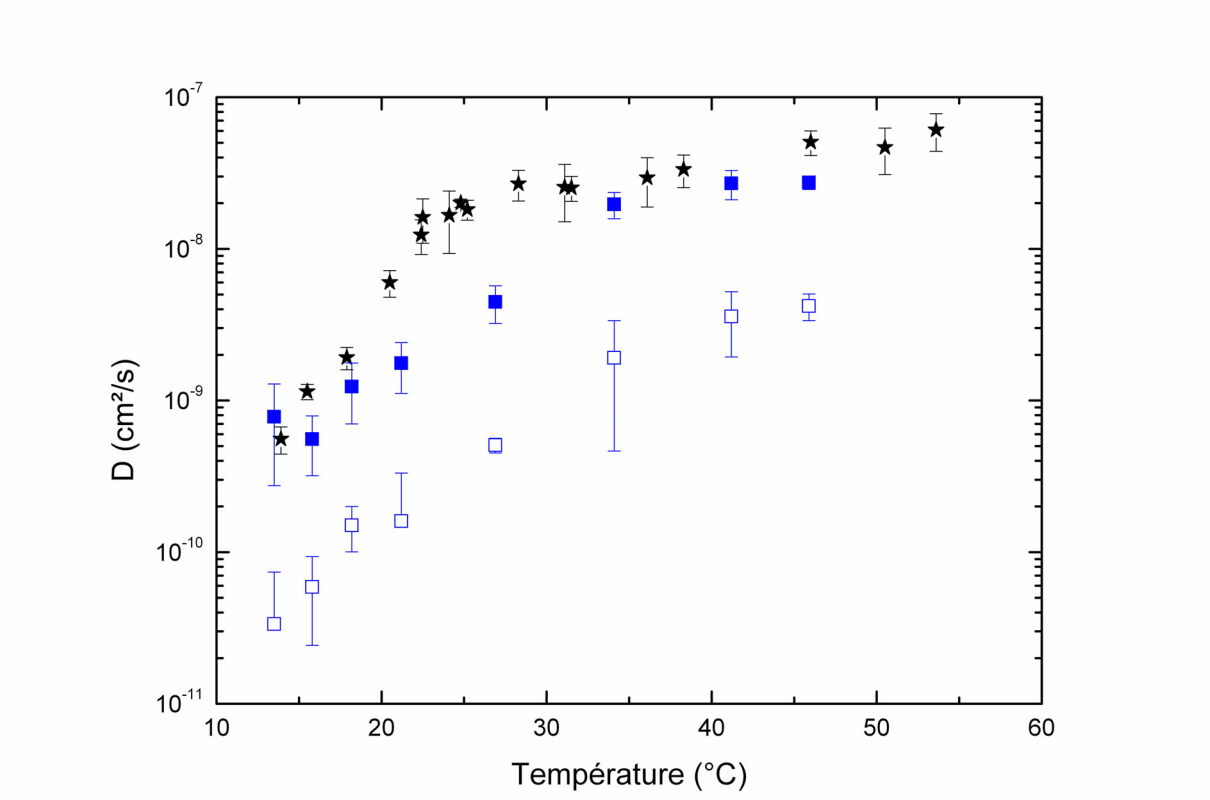


Figure 3.18 : Courbes de transition en température du DMPC en fonction de la méthode de préparation : (■) fusion de vésicules, (★) LB + LS.

Plusieurs études de la transition de phase sur les bicouches de lipides purs (DMPC) ou en mélange (DPPC +SOPC) et utilisant l'AFM comme méthode de caractérisation existent dans la littérature [69, 70]. Les observations principales de ces travaux sont une largeur de transition plus importante qu'avec les SUV et une différence de 10-15 °C entre les températures de transition des différents feuillets. Comme mentionné dans le chapitre I pour Charrier et al. [70], ces observations résultaient d'une transition effectuée à surface constante, contrairement à la transition dans les SUV effectuée à tension de surface constante. Mouristen a observé un comportement similaire tout en remarquant que la structure de départ de la bicouche était granulaire (existence de domaines submicroniques) et le restait malgré les cycles chauffage/refroidissement.

Nous avons remarqué que dans les deux études, les bicouches avaient été préparées par fusion de vésicules à une température inférieure à Tm, donc avec une membrane en phase gel ce qui défavorise la rupture des vésicules et favorise la formation de domaines. Nous avons effectué des mesures de diffusion sur des bicouches de DMPC préparées en appliquant leur protocole. Sur les bicouches ainsi formées, nous n'avons jamais pu mesurer de coefficients de diffusion

ce qui signifient qu'ils étaient inférieurs à 10^{-13} cm^2/s, bien plus petits que ceux obtenus sur nos bicouches fabriquées par éclatement de vésicules au-dessus de Tm et *a fortiori* comparés aux mesures sur des bicouches LB. Ceci veut dire que l'éclatement de vésicules en-dessous de Tm conduit à la formation de domaines plus petits que l'interfrange du réseau de la FRAPP (variée de 1 à 80 μm). Cette estimation (taille de domaines < 1μm) est tout a fait comparable à la taille des grains visible dans les études mentionnées. Le chauffage de ces échantillons jusqu'à 45 °C n'a induit aucune augmentation de D, indiquant que les domaines ne fusionnent pas entre eux, en accord avec les observations de Mouristen [69].

3.2.7 Conclusion

Tous nos résultats concernant des bicouches LB sur verre montrent l'existence d'une seule composante de diffusion, quel que soit le lipide. Cette observation est compatible avec le non-découplage des feuillets et le signe d'une faible interaction avec le substrat.

Sur le mica, avec les deux lipides, nous observons une dynamique différente pour les deux feuillets : la monocouche distale garde une dynamique du même ordre de grandeur que la diffusion mesurée sur le verre, la monocouche proximale est ralentie du fait de l'interaction avec le substrat.

Il apparaît que le procédé de préparation par fusion de vésicules conduit à un système final dont la dynamique est plus aléatoire qu'un système obtenu via (LB + LS). Opérer la fusion de vésicules dans une gamme de température qui s'étend de part et d'autre de Tm conduit à un comportement dynamique qui peut varier de proche de celui d'une bicouche LB de bonne qualité (avec néanmoins deux composantes et un certain décalage de Tm) à zéro diffusion du fait de la formation d'une bicouche composée d'une multitude de nano-domaines.

Prenant en compte l'invariabilité de Tm pour une bicouche LB sur mica et les estimations des énergies d'activation et des enthalpies de transition, nous avons démontré que le décalage de Tm, observé sur la courbe D = f(T) de bicouches issues de vésicules, est uniquement dû à la méthode de préparation.

De ces observations nous concluons que deux raisons majeures sont la cause d'une dynamique pour chaque feuillet :

- l'interaction d'un lipide donné avec le substrat dépendant principalement de la rugosité et de la nature chimique du substrat
- la méthode de préparation des bicouches

Conclusion générale et perspectives

Au cours de ce travail de thèse, nous avons étudié la diffusion des phospholipides constitutifs des bicouches lipidiques supportées et observé comment elles différaient des bicouches libres à cause de la proximité du substrat ou d'autres paramètres comme leur méthode de fabrication. L'utilisation d'un système très contrôlé pour la fabrication des bicouches (cuve de Langmuir) a permis la détermination des taux de transfert lors de la déposition des différents feuillets sur le substrat. Nous avons pu ainsi déterminer les conditions de pression ou faire le choix du transfert Langmuir-Blodgett + Langmuir-Schaeffer afin d'obtenir des bicouches de qualité. L'optimisation de notre montage de FRAPP a permis d'effectuer des mesures précises et reproductibles du coefficient de diffusion D en utilisant un faible taux de marquage, une thermostatation de l'échantillon et des franges de largeur variable. La variation linéaire du temps de relaxation en q^2 nous a permis d'établir que, pour des échelles spatiales supérieures à 1 μm, le mouvement des lipides dans une bicouche supportée était purement brownien et ce dans tous les domaines de la transition gel-fluide et sur tous les substrats étudiés, quel que soit le nombre de composantes.

La variation d'au moins deux ordres de grandeur de D avec la température révèle la transition gel-fluide et permet la détermination de Tm et des différentes énergies d'activation et enthalpies de transition des systèmes étudiés. La transition constitue également la signature de l'interaction entre les différents feuillets et le substrat via l'existence ou non de deux temps de relaxation. Ainsi à partir de bicouches préparées par (LB + LS) ou double LB, nous avons clairement mis en évidence l'existence d'un seul coefficient de diffusion sur le verre, au cours de la transition en température, signe d'une faible interaction avec le substrat. En revanche sur le mica l'interaction est plus forte, ce qui conduit à l'observation de deux coefficients de diffusion au cours du chauffage, le plus lent étant probablement le feuillet proximal. Ces effets existent avec les deux phospholipides utilisés, le plus long lipide diffusant le plus lentement.

Nous avons montré que la force ionique et la pression initiale de la monocouche ne jouaient pas de rôle dans la dynamique de ces systèmes.

Nous avons ainsi montré que la fabrication par fusion de vésicules pouvait mener à une dynamique différente et plus aléatoire. Ainsi l'éclatement à une température inférieure à la température de la transition gel-fluide conduit à une bicouche ayant une dynamique très lente

($D < 10^{-13}$ cm²/s) quelle que soit la température, ce qui traduit l'existence de domaines plus petits que la largeur minimale des franges utilisées (1 µm). L'éclatement des vésicules à une température supérieure à la température de la transition gel-fluide conduit à une bicouche dont la dynamique redevient du même ordre de grandeur que pour des échantillons préparés par Langmuir-Blodgett avec cependant trois différences majeures : observation de deux composantes, d'une transition plus molle et d'une Tm décalée. Nous avons montré que le décalage de Tm était induit par la méthode de préparation des bicouches supportées et non par le substrat.

Au terme de ce travail nous disposons d'un corpus de connaissance qui nous permet de préparer des systèmes ayant des dynamiques variées :

1 composante, 1 température de transition, transition étroite (2-3 °C)

2 composantes, 1 température de transition

2 composantes, 2 températures de transition, transition large (10-15 °C)

L'étude des propriétés dynamiques de ces systèmes constitue un travail préliminaire pour le développement de nouvelles techniques biomimétiques à l'interface entre les substrats solides et les cellules. Nous souhaiterions approfondir l'effet « *1 ou 2 composantes »* en fonction du substrat pour établir la raison fondamentale de cette différence de comportement.

Les connaissances acquises sur ces systèmes modèles simples (1 lipide, 1 substrat) ouvrent la voie à l'étude et à la compréhension de systèmes plus complexes (mélange de lipides, ajout de cholestérol…). En particulier nous envisageons l'insertion de protéines membranaires pour commencer à mimer la membrane cellulaire.

ANNEXE 1

Analyse des signaux biexponentiels

Lors de l'analyse des signaux de recouvrement de fluorescence non monoexponentiels, nous avons testé plusieurs hypothèses d'ajustement pour déterminer les temps de relaxation. La quantité de marqueur fluorescent dans chaque feuillet étant identique, nous avons ajusté les signaux par des biexponentielles d'amplitudes égales. Aucune fraction immobile n'a été observée. En modifiant les amplitudes des deux temps de décroissance dans des proportions non égales (80%-20% ou encore 60%-40%), les écarts entre les mesures deviennent plus importants, voire dans certaines conditions, la composante la plus lente n'apparaît pas (tableau 3.7). En forçant l'égalité des amplitudes, nous avons donc réduit le nombre de paramètres ajustables en passant de 5 (2 pour le temps, 2 pour les amplitudes, 1 pour la ligne de base) à 3, ce qui a eu pour conséquence de réduire notablement les barres d'erreur sur les temps de relaxation.

Par la suite nous avons donc systématiquement forcé l'égalité des amplitudes et ajusté nos courbes avec seulement trois paramètres pour tous les signaux comportant deux composantes.

	composante rapide écart (%)	composante lente écart (%)
échantillon 1		
ajustement libre	20,03	n'apparaît pas
50-50	26,57	11,8
80-20	20,41	35
échantillon 2		
ajustement libre	28,74	n'apparaît pas
50-50	34,48	25,86
80-20	28,5	113

Tableau 3.7 : Ecart (%) par rapport à la valeur moyenne sur le temps de relaxation en fonction de l'amplitude (en %) donnée à chaque composante, pour deux échantillons.

Références

[1] S.J. Singer, G.L. Nicolson. The fluid mosaic modelof the structure of cell membranes. *Science* 1972, 175:720-31.

[2] R. Lipowsky, E. Sackmann. Handbook of biological physics. 1995.

[3] M.B. Forstner, D.S. Martin, A.M. Navar, J.A. Kas. Simultaneous single-particle tracking and visualization of domain structure on lipid monolayers. *Langmuir* 2003, 19, 4876-4879.

[4] G. Vereb, J. Szollosi, J. Matko, P. Nagy, T. Farkas, L. Vigh, L. Mtyus, T.A. Waldmann, S. Damjanovich. Dynamic, yet structured: The cell membrane three decades after the Singer-Nicolson model. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2003, 100, 8053-8058.

[5] G. Decher, J.D. Hong. Buildup of ultrathin multilayer films by a self-assembly process: I. consecutive adsorption of anionic and cationic bipolar amphiphiles. *Makromol. Chem., Macromol. Symp* 1991*, 46*, 321.

[6] G. Decher, J.D. Hong, J. Schmitt. Buildup of ultrathin multilayer films by a selfassembly process: III. Consecutively alternating adsorption of anionic and cationic polyelectrolytes on charged surfaces. *Thin Solid Films* 1992, 831-835.

[7] A. Lorin, C. Flore, A. Thomas, R. Brasseur. Les liposomes : description, fabrication et applications. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment* 2004, 8 (3), 163-176.

[8] Z.V. Feng, S. Granick, A.A. Gewirth. Modification of a supported lipid bilayer by polyelectrolyte adsorption. *Langmuir* 2004, 20, 8796-8804.

[9] A.S. Muresan, K.Y.C. Lee. Shape evolution of lipid bilayer patches adsorbed on mica: An atomic force microscopy study. *Journal of Physical Chemistry B* 2001, 105, 852-855.

[10] J. Kim, G. Kim, P.S. Cremer. Investigations of water structure at the solid/liquid interface in the presence of supported lipid bilayers by vibrational sum frequency spectroscopy. *Langmuir* 2001, 17, 7255-7260.

[11] H.M. McConnel et al. Biochem.Biophys.Acta. 1986, 864,95

[12] A. Grakoui, S.K. Bromley, C. Sumen, M.M. Davis, A.S. Shaw, P.M. Allen, M.L. Dustin. The immunological synapse: A molecular machine controlling T cell activation. *Science* 1999, 285, 221-227.

[13] E. Sackmann. Supported membranes: Scientific and practical applications. *Science* 1996, 271, 43-48.

[14] A.A. Brian, H.M. McConnel. Allogenic simulation of cyto-toxic T-cells by supported planar membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences* 1984, 81, 6159-6163.

[15] J. Radler, H. Strey, E. Sackmann. Phenomenology and kinetics of lipid bilayer spreading on hydrophilic surfaces. *Langmuir* 1995, 11, 4539-4548.

[16] J. Schneider, Y.F. Dufrene, W.R. Barger, G.U. Lee. Atomic force microscope image contrast mechanisms on supported lipid bilayers. *Biophysical Journal* 2000, 79, 1107-1118.

[17] A.F. Xie, S. Granick. Phospholipid membranes as substrates for polymer adsorption. *Nature Materials* 2002, 1, 129-133.

[18] M. Tanaka, E. Sackmann. Polymer-supported membranes as models of the cell surface. *Nature* 2005, 437, 656-663.

[19] D. Marsh. Lateral pressure in membranes. *Biochimica et Biophysica Acta* 1996, 1286, 183-223.

[20] Z.I. Lalchev, A.R. Mackie. Molecular lateral diffusion in model membrane systems. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 1999, 15, 147-160.

[21] O. Albrecht, H. Gruler, E. Sackmann. Ploymorphism of phospholipid monolayers. *Journal de Physique* 1978, 39, 301-313.

[22] A. Blume. Comparative-study of the phase-transitions oh phospholipid bilayers and monolayers. *Biochimica et Biophysica Acta* 1979, 557, 32-44.

[23] J.F. Nagle. Theory of the main lipid bilayer phase-transition. *Annual Review of Physical Chemistry* 1980, 31, 157-195.

[24] R. Koynova, M. Caffrey. Phases and phase transitions of the phosphatidylcholines. *Biochimica et Biophysica Acta* 1998, 1376, 91-145.

[25] O.G. Mouritsen. Theoretical-models of phospholipid phase transitions. *Chemistry and Physics of Lipids* 1991, 57, 179-194.

[26] P. Garidel, A. Blume. Miscibility of phospholipids with identical headgroups and acyl chain lengths differing by two methylene units: Effects of headgroup structure and headgroup charge. *Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes* 1998, 1371, 83-95.

[27] T. Heimburg. A model for the lipid pretransition : coupling of ripple formation with the chain-melting transition. *Biophysical Journal* 2000, 78, 1154-1165.

[28] M. Rappolt, G. Pabst, G. Rapp, M. Kriechbaum, H. Amenitsch, C. Krenn, S. Bernstorff, P. Laggner. New evidence for gel-liquid crystalline phase coexistence in the ripple phase of phosphatidylcholines. *European Biophysics Journal with Biophysics Letters* 2000, 29, 125-133.

[29] D. Stroumpouli, A. Parra, J. Gliem, M. Tirrel. A kinetic study of vesicle fusion on silicon dioxide surfaces by ellipsometry. *Aiche Journal* 2006, 52 (8): 2931-2937.

[30] R.P. Richter, A.R. Brisson. Following the formation of supported lipid bilayers on mica : a study combining AFM, QCM-D, and ellipsometry. Biophysical Journal 2005, 88, 3422-3433.

[31] R.P. Richter, N. Maury, A.R. Brisson. On the effect of the solid support onthe interleaflet distribution of lipids in supported lipid bilayers. *Langmuir* 2005, 21, 299-304.

[32] R.P. Richter, A. Mukhopadhyay, A.R. Brisson. Pathways of lipid vesicle deposition on solid surfaces : a combined QCM-D and AFM study. *Biophysical Journal* 2003, 85, 3035-3047.

[33] I. Reviakine, A. Brisson. Formation of supported phospholipid bilayers from unilamellar vesicles investigated by atomic force microscopy. *Langmuir* 2000, 16, 1806-1815.

[34] H. Egawa, K. Furusawa. Liposome adhesion on mica surface studied by atomic force microscopy. *Langmuir* 1999, 15, 1660-1666.

[35] U. Seifert. Configurations of fluid membranes and vesicles. *Advances in Physics* 1997, 46, 13-137.

[36] C.A. Keller, K. Glasmastar, V.P.Zhdanov, B. Kasemo. Formation of supported membranes from vesicles. *Physical Review Letters* 2000, 84, 5443-5446.

[37] C.A. Keller, B. Kasemo. Surface specific kinetics of lipid vesicle adsorption measured with a quartz crystal microbalance. *Biophysical Journal* 1998, 75, 1397-1402.

[38] L.M. Williams, S.D. Evans, T.M. Flynn, A. Marsh, P.F. Knowles, R.J. Bushby, N. Boden. Kinetics of formation of single phospholipid bilayers on self-assembled monolayer supports, as monitored by surface plasmon resonance. *Supramolecular Science* 1997, 4, 513-517.

[39] B.W. Koenig, S. Kruger, W.J. Orts, C.F. Majkrzak, N.F. Berk, J.V. Silverton, K. Gawrisch. Neutron reflectivity and atomic force microscopy studies of a lipid bilayer in water adsorbed to the surface of a silicon single crystal. *Langmuir* 1996, 12, 1343-1350.

[40] M. Benes, D. Billy, W.T. Hermens, M. Hof. Muscovite (mica) allows for the characterisation of supported bilayers by ellipsometry and confocal fluorescence correlation spectroscopy. *Biological Chemistry* 2002, 383, 337-341.

[41] R. Lipowsky, U. Seifert. Adhesion of vesicles and membranes. *Molecular Crystals and Liquid Crystals* 1991, 202, 17-25.

[42] D.K. Schwartz. Langmuir-Blodgett film structure. *Surface Science Reports* 1997, 27, 241-334.

[43] J.B. Peng, G.T. Barnes, I.R. Gentle. The structures of Langmuir-Blodgett films of fatty acids and their salts. *Advances in Colloid and Interface Science* 2001, 91, 163-219.

[44] T.D. Osborn, P. Yager. Modeling success and failure of Langmuir-Blodgett transfer of phospholipid bilayers to silicon dioxide. *Biophysical Journal* 1995, 68, 1364-1373.

[45] B.A. Pethica. Experimental criteria for monolayer studies in relation tothe formation of Langmuir-Blodgett multilayers. *Thin Solid Films* 1987, 152, 3-8.

[46] J.M. Mikrut, P. Dutta, J.B. Ketterson, R.C. MacDonald. Atomic-force and fluorescence microscopy of Langmuir-Blodgett monolayers of alpha-dimyristoylphosphatidic acid. *Physical Review B* 1993, 48, 14479-14487.

[47] H.D. Sikes, J.T. Woodward, I.V and D.K. Schwartz. Pattern formation in a substrate-induced phase transition during Langmuir-Blodgett transfer. *Journal of Chemical Chemistry* 1996, 100, 9093-9097.

[48] K. Graf, H. Riegler. Molecular adhesion interactions between Langmuir monolayers and solid substrates. *Colloids and Surfaces* 1998, 131, 215-224.

[49] T.Charitat, E. Bellet-Amalric, G. Fragneto, F. Graner. Adsorbed and free lipid bilayers at the solid-liquid interface. *European Physical Journal B* 1999, 8, 583-593.

[50] L. Zhang, S. Granick. Lipid diffusion compared in outer and inner leaflets of planar supported bilayers. *The Journal of Chemical Physics* 2005, 123, 211104.

[51] L.K. Tamm, H.M. McConnel.Supported phospholipid bilayers. *Biophysical Journal* 1985, 47, 105-113.

[52] T.V. Ratto, M.L. Longo.Obstructed diffusion in phase-separated supported lipid bilayers : a combined atomic forc microscopy and fluorescence recovery after photobleaching approach. *Biophysical Journal* 2002, 83, 3380-3392.

[53] T.V. Ratto, M.L. Longo. Anomalous subdiffusion in heterogeneous lipid bilayers. *Langmuir* 2003, 19, 1788-1793.

[54] M. Przybylo, J. Sykora, J. Humpolickova, A. Benda, A. Zan, M. Hof. Lipid diffusion in giant unilamellar vesicles is more than 2 times faster than in supported phospholipid bilayers under identical conditions. *Langmuir* 2006, 22, 9096-9099.

[55] W.L.C. Vaz, R.M. Clegg, D. Hallmann. Translational diffusion of lipids in liquid crystalline phosphatidylcholine multibilayers. A comparison of experiment with theory. *Biochemistry* 1985, 24, 781-786.

[56] M. Hetzer, S. Heinz, S. Grage, T.M. Bayerl. Asymetric molecular friction in supported phospholipid bilayers revealed by NMR measurements of lipid diffusion. *Langmuir* 1998, 14, 982-984.

[57] J. Yang, J. Appleyard. The main phase transition of mica-supported phosphatidylcholine membranes. *Journal of Physical Chemistry B* 2000, 104, 8097-8100.

[58] A. Zachowski. Phospholipids in animal eukaryotic membranes – Transverse asymmetry and movement. *Biochemical Journal* 1993, 294, 1-14.

[59] P.F. Devaux. Static and dynamic lipid asymmetry in cell-membranes. *Biochemistry* 1991, 30, 1163-1173.

[60] M.B. Forstner, L. Käs, D. Martin. Single lipid diffusion in Langmuir monolayers. *Langmuir* 2001, 17, 567-570.

[61] J.Liu, J.C. Conboy. 1,2-Diacyl-Phosphatidylcholine flip-flop measured directly by sum-frequency vibrational spectroscopy. *Biophysical journal* 2005, 89, 2522-2532.

[62] K. John, S. Schreiber, J. Kubelt, A. Herrmann, P. Müller. Transbilayer movement of phospholipids at the main phase transition of lipid membranes : implications for rapid flip-flop in biological membranes. *BiophysicalJournal* 2002, 83, 3315-3323.

[63] S.J. Johnson, T.M. Bayerl, D.C. McDermott, G.W. Adam, A.R. Rennie, R.K. Thomas, E. Sackmann. Structure of an adsorbed dimyristoylphosphatidylcholine bilayer measured with specular reflection of neutrons. *Biophysical Journal* 1991, 59, 289-294.

[64] R. Merkel, E. Sackmann, E. Evans. Molecular friction and epitatic coupling between monolayers in supported bilayers. *Journal de Physique* 1989, 50, 1535-1555.

[65] A. Sonnleitner, G.J. Schütz, T. Schmidt. Free brownian motion of individual lipid molecules in biomembranes. *Biophysical Journal* 1999, 77, 2638-2642.

[66] E.S. Wu, K. Jacobson, D. Papahadjopoulos. Lateral diffusion in phospholipid multibilayers measured by fluorescence recovery after photobleaching. *Biochemistry* 1977, 16, n°17.

[67] P.F. Fahey, W.W. Webb. Lateral diffusion in phospholipid bilayer membranes and multilamellar liquid cristas. *Biochemistry* 1978, 3046.

[68] L.K. Tamm. Lateral diffusion and fluorescence microscope studies on a monoclonal antibody specifically bound to supported phospholipid bilayers. *Biochemistry* 1988, 27, 1450-1457.

[69] D. Keller, N.B. Larsen, I.M. Møller, O.G. Mouritsen. Decoupled phase transitions and grain-boundary melting in supported phospholipid bilayers. *Physical Review Letters* 2005, 94, 025701.

[70] A. Charrier, F. Thibaudau. Main phase transitions in supported lipid single-bilayer. *Biophysical Journal* 2005, 89, 1094-1101.

[71] A.F. Xie, R. Yamada, A.A. Gewirth, S. Granick. Materials science of the gel to fluid phase transition in a supported phospholipid bilayer. *Physical Review Letters* 2002, 89, 246103.

[72] Z.V. Feng, T.A. Spurlin, A.A. Gewirth. Direct visualization of asymmetric behavior in supported lipid bilayers at the gel-fluide phase transition. *Biophysical Journal* 2002, 88, 2154-2164.

[73] J. Davoust, P.F. Devaux, L. Leger. Fringe pattern photobleaching, a new method for the measurement of transport coefficients of biological macromolecules. *The EMBO Journal* 1982, 1, 1233-1238.

[74] D. Axelrod, D.E. Koppel, J. Schlessinger, E. Elson, W.W. Webb. Mobility measurement by analysis of fluorescence photobleaching recovery kinetics. *Biophysical Journal* 1976, 16, 1055-1069.

[75] Z. Derzko, K. Jacobson. Comparative lateral diffusion of fluorescent lipid analogues in phospholipid multibilayers. *Biochemistry* 1980, 19, 6050-6057.

[76] H.G. Kapitza, D.A. Rüppel, H.J. Galla, E. Sackmann. Lateral diffusion of lipids and glycophorin in solid phosphatidylcholine bilayers. The role of structural deffects. *Biophysical Journal* 1984, 45, 577-587.

[77] E. Reimhult, F. Hook, B. Kasemo. Intact vesicle adsorption and supported biomembrane formation from vesicles in solution: Influence of surface chemistry, vesicle size, temperature, and osmotic pressure. *Langmuir* 2003, 19, 1681-1691.

[78] A.G. Lee, N.J.M. Birdsall, J.C. Metcalfe. Measurement of fast lateral diffusion of lipids in vesicles and in biological membranes by nuclear magnetic resonance. *Biochemistry* 1973, 12, 1650-1659.

[79] avantilipids.com

[80] P.G. Saffman, M;Delbrück. Brownian motion in biological membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences* 1975, 72, 3111-3113.

[81] P. Bassereau, F. Pincet. Quantitative analysis of holes in supported bilayers providing the adsorption energy of surfactants on solid substrate. *Langmuir* 1997, 13, 7003-7007.

[82] A. Blume. Apparent molar heat capacities of hospholipids in aqueous dispersion. Effects of chain length and head group structure. *Biochemistry* 1983, 22, 5436-5442.

[83] V. Tsukanova, D.W. Grainger, C. Salesse. Monolayer behavior of NBD-labeled phospholipids at the air/water interface. *Langmuir* 2002, 18, 5539-5550.

[84] C.J. Evenhuis, R.M. Guijt, M. Macka, P.J. Marriott, P.R. Haddad. Variation of zeta-potential with temperature in fused-silica capillaries used for capillary electrophoresis. *Electrophoresis* 2006, 27, 672-676.

[85] S. Lecuyer, T. Charitat. From supported membranes to tethered vesicles : lipid bilayer destabilisation at the main transition. *Europhysics Letters* 2006, 75, 652-658.

[86] K. Ohki. Effect of substitution of hydrogen oxide by deuterium oxide on thermotropic transition betwee the interdigitated gel phase and the ripple phase of dihexadecylphosphatidylcholine. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1991, 174, 102-106.

[87] T. Heimburg. Mechanical aspects of membrane thermodynamics. Estimation of the mechanical properties of lipid membranes close to the chain melting transition from calorimetry. *Biochimica and Biophysica Acta* 1998, 1415, 147-162.

[88] B.I. Halperin, P.C. Hohenberg. Scaling laws for dynamic critical phenomena. *Physical Review* 1969, 177, 952-971.

[89] J.L. Barrat, W. Götze, A. Latz. The liquid-glass transition of the hard-sphere system. *Journal of Physics : condensed matter* 1989, 1, 7163-7170.

[90] S.W. Provencher. CONTIN : A general purpose constrained regularization program for inverting noisy linear algebraic and integral equations. *Computer Physics Communications* 1982, 27, 229-242.

[91] J. Jackle, K. Kawasaki. Intrinsic roughness of glass surfaces. *Journal of Physics : condensed matter* 1995, 7, 4351-4358.

[92] P.S. Swain, D. Andelman. The influence of substrate structure on membrane adhesion. *Langmuir* 1999, 15, 8902-8914.

[93] P.S. Swain, D. Andelman. Supported membranes on chemically structured and rough surfaces. *Physical Review E* 2001, 63, 51911.

[94] K. Ritchie, X.Y. Shan, J. Kondo, K. Iwasawa, T. Fujiwara, A. Kusumi. Detection of non-brownian diffusion in the cell membrane in single molecule tracking. *Biophysical Journal* 2005, 88, 2266-2277.

[95] V. Kiessling, J.M. Crane, L.K. Tamm. Transbilayer effects of raft-like lipid domains in asymmetric planar bilayers measured by single molecule tracking. *Biophysical Journal* 2006, 91, 3313-3326.

[96] L. Wawrezinieck, H. Rigneault, D. Marguet, P.F. Lenne. Fluorescence correlation spectroscopy diffusion laws to probe the submicron cell membrane organisation. *Biopysical Journal* 2005, 89, 4029-4042.

[97] J. Tabony, B. Perly. Quasi-elastic neutron-scattering measurements of fast local translational diffusion of lipid molecules in phospholipid-bilayers. *Biochimica et Biophysica Acta* 1991, 1063, 67-72.

[98] S. Konig, W. Pfeiffer, T. Bayerl, D. Richter, E. Sackmann. Molecular-dynamics of lipid bilayers studied by incoherent quasi-elastic neutron scattering. *Journal de Physique II* 1992, 2, 1589-1615.

[99] A. Kusumi, Y. Sako, M. Yamamoto. Confined lateral diffusion of membranes receptors as studied by single particle tracking (nanovid microscopy). Effetcs of calcium-induced differentiation in cultured epithelial cells. *Biophysical Journal* 1993, 65, 2021-2040.

[100] composition en phosphatidylcholines du mélange EggPC : 58% 18:0
34% 16:0
5% 20:0
3% 22:0

Résumé en français

Au cours de ce travail, nous avons étudié la dynamique des phospholipides constitutifs des bicouches lipidiques supportées sur des substrats solides. A l'aide d'un dispositif de retour de fluorescence après photoblanchiment (FRAPP : Fluorescence Recovery After Patterned Photobleaching), nous avons mis en évidence différents comportements diffusifs suivant la nature du substrat (rugosité et chimie), le phospholipide et la méthode de préparation de la bicouche. La mesure du coefficient de diffusion en fonction de la température nous a permis d'établir un ensemble de données fiables et reproductibles sur la transition de phase gel-fluide de ces systèmes. Il est apparu que leur diffusion dépendait de la nature du substrat. En effet, sur le verre, où les deux feuillets ont la même dynamique, on observe une transition couplée. Au contraire, sur le mica, le feuillet proximal a une dynamique plus lente que le feuillet distal qui est quasiment libre de toute interaction avec le support. La méthode de préparation s'est également révélée être un paramètre crucial puisque nous avons obtenu une plus grande dispersion des mesures en préparant les bicouches par éclatement de vésicules par rapport à la technique de Langmuir-Blodgett / Langmuir-Schaeffer qui donnent des échantillons sans microdomaines. Nous avons également déterminé les énergies d'activation des différentes phases ainsi que les enthalpies de transition pour les deux phospholipides étudiés. Ce travail constitue une étape primordiale dans la compréhension des mécanismes diffusifs de systèmes plus complexes.

Dynamic of supported lipid bilayers

During this thesis, we have investigated the lateral mobility of pospholipids in supported lipid bilayers on solid substrates. Using the technique of Fluorescence Recovery After Patterned Photobleaching (FRAPP), we display different diffusive behaviors depending on the substrate nature (roughness, chemistry), the phospholipid type and the preparation method of the bilayer. Measuring the diffusion coefficient versus temperature allows us to establish a solid and repeteable set of data concerning the phase transition of such systems and understand the involved mecanisms. Depending of the nature of the substrate, we observe two different behaviors : on glass, both leaflets of the bilayer have the same dynamics indicating that the transition is coupled ; on mica, the proximal leaflet diffuses slowly than the distal one, the latter having almost no interaction with the substrate. The way of preparation is a crucial parameter which shows a greater dispersion of the diffusion measurements using bilayers from vesicles fusion with respect to Langmuir-Blodgett / Langmuir-Schaeffer techniques that engender more homogeneous samples. We also determine activation energies of the different phases and the transition enthalpies of both used phospholipids. This work represents a fundamental stage for the comprehension of diffusive mecanisms of more complex systems such as lipid mixture containing membrane proteins.