

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE MENTOURI CONSTANTINE
FACULTE DES SCIENCES EXACTES
DEPARTEMENT DE CHIMIE

N° d'orde :
Série : ...

THESE

Présentée pour l'obtention du diplôme de

DOCTORAT en SCIENCES

Spécialité : Chimie Physique et Analytique

Option : Physico-Chimie des Surfaces

par

FAIROUZ DEKKICHE

THEME

**Etude de l'adsorption des protéines à l'interface solide/liquide et
des propriétés des membranes phospholipidiques supportées**

Soutenue le : 30 /06 / 2011

Devant le jury :

N. KEGHOUCHE	Prof.	Université Mentouri Constantine	Président
W. KAABAR	Prof.	Université Mentouri Constantine	Directrice de thèse
J- P. RIEU	Prof.	Université Claude Bernard Lyon	Co-Directeur
Z. CHOUAHDA	M.C	Université Badji-Mokhtar Annaba	Examineur
M. GHERS	Prof.	Université Badji-Mokhtar Annaba	Examineur
L. CHEKOUR	Prof.	Université Mentouri Constantine	Examineur

Remerciements

Ce travail a été réalisé au Laboratoire de Physique de la Matière Condensée et Nanostructures « LPMCN », à l'université Claude Bernard, Lyon1, je tiens à remercier son directeur, le Professeur Jean-Louis Barrat, de m'y avoir accueillie.

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance envers Mr Jean-Paul RIEU, professeur à l'université Claude Bernard, Lyon1, pour avoir dirigé cette thèse.

En premier lieu, je voudrais le remercier de m'avoir accueillie dans son équipe et de m'avoir donné tous les moyens pour effectuer ce travail dans d'excellentes conditions.

Je le remercie pour sa grande disponibilité et sa patience ainsi que pour son aide et ses conseils qu'il m'a sans cesse prodigués autant sur les aspects techniques que sur l'interprétation des résultats et la rédaction de cette thèse.

Grâce à lui j'ai découvert le domaine de la biophysique où j'ai beaucoup appris. Je le remercie de m'avoir initiée à l'AFM et m'a fait découvrir la nanophysique.

Je le remercie aussi pour m'avoir offert l'opportunité de participer à de nombreux évènements scientifiques.

La confiance qu'il m'a toujours témoignée m'a stimulé pour mener à bien mes investigations.

Je tiens à remercier respectueusement Mme Wahiba KAABAR, Professeur à l'université Mentouri Constantine, pour son aide précieuse, ses orientations ainsi que pour ses nombreux conseils et encouragements.

Je tiens aussi à remercier Mme N. KEGHOUCHE, Professeur à l'université Mentouri Constantine, de m'avoir fait l'honneur de présider le jury de cette thèse.

Remerciements

Je suis très sensible à l'honneur que me fait Mme Z. CHOUAHDA, Maître de conférences à l'université Badji-Mokhtar Annaba, en acceptant d'examiner ce travail.

J'exprime toute ma gratitude à Mr M. GHERS, Professeur à l'université Badji-Mokhtar Annaba, d'avoir accepté de faire partie du jury de cette thèse.

Je tiens à adresser mes plus vifs remerciements à Mr L. CHEKOUR, Professeur à l'université Mentouri Constantine, d'avoir accepté de juger ce travail.

Je dis un grand merci à Ana-Maria Trunfio Sfarghiu, pour ses conseils et son soutien à la fois scientifique et amical. Je la remercie pour sa disponibilité, son expérience et son dynamisme. Je la remercie pour les discussions scientifiques "et autres" sans oublier les beaux moments qu'on a passés ensemble.

Je tiens à remercier amicalement Thierry Ganjon de l'Institut de Chimie et Biochimie Moléculaires et Supramoléculaires (UCBL) pour son aide dans la préparation des vésicules. Je le remercie de m'avoir accueillie dans son équipe pendant la préparation des vésicules ainsi que pour ses conseils et discussions précieuses.

Je remercie particulièrement Agnès Piednoir pour son aide et sa disponibilité. Merci pour la calibration des pointes AFM, et de nous avoir permis de puiser dans ton "stock" ainsi que pour ta bonne humeur quotidienne.

Je remercie Michel Monchanin, pour son soutien technique et sa disponibilité en tout moment.

J'exprime toute ma gratitude à Geneviève Carasco, et à Christelle Macheboeuf ainsi qu'à nos informaticiens Ruben Mascart et Jacques Chanel.

Enfin, j'aimerais remercier chaleureusement toute l'équipe « liquides et interfaces » du LPMCN : Hélène Delanoë-Ayari, Charlotte Rivière, Cécile Cottin-Bizonne, Catherine Barentin, Elisabeth Charlaix, Christophe Ybert, Stella Ramos-Canut, Lydéric Bocquet et tous

Remerciements

ceux que je n'ai pas cité, pour l'esprit d'accueil, l'ambiance sympathique et agréable tout au long de mon séjours.

Je ne saurai terminer sans remercier amicalement Magdalena-Carla Corneci, pour son aide précieuse et sa disponibilité en tout moment.

Merci "Magda" : tu as toujours répondu présente quand je sollicitais ton aide dans n'importe quel domaine et à n'importe quel moment. Je n'oublierai jamais les moments agréables qu'on a passés ensemble. J'espère que ta soutenance sera pour très bientôt et je te souhaite bonne chance pour la suite...

Enfin, je remercie tous ceux qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Table de matières

Introduction générale 6

CHAPITRE I

Membranes phospholipidiques et adsorption des protéines

I-1 Membranes biologiques 9

I-1-1 Composition et structure des membranes biologiques..... 10

I-1-1-1 Les Glycérophospholipides (Phospholipides)..... 12

I-1-1-2 Les Sphingolipides 16

I-1-1-3 Le Cholestérol 16

I-1-1-4 Les protéines 19

Structure des protéines 20

I-1-2 Les interactions lipide-protéine 21

I-1-3 Dynamique des lipides dans les membranes et fluidité 22

I-1-3-1 Le modèle de « mosaïque fluide » 22

I.1.3.2 Les radeaux lipidiques 23

I-1-4 Les différents états de phase des membranes lipidiques 24

I-1-5 Transitions de phase dans les membranes 25

I-2 Membranes modèles 26

I-2-1 Les vésicules lipidiques 26

I-2-1-1 Adsorption de liposomes à une interface solide-liquide 28

I-2-2 Les bicouches planes..... 28

I-2-3 Dynamique dans les vésicules libres et les bicouches lipidiques supportées 29

I-2-3-1 Diffusion transversale 30

I-3 Adsorption des protéines sur des surfaces solides..... 30

CHAPITRE II

Microscopie à Force Atomique et Microscopie de Fluorescence

II-1 La microscopie à force atomique	32
II-1-1 Dispositif	32
II-1-2 Principe de fonctionnement de l'AFM	34
II-1-3-Le principe d'imagerie AFM	35
II-1-4 Les forces en microscopie à force atomique	35
II-1-4-1- Forces de Van der Waals	36
II-1-4-2 Forces répulsives	37
II-1-5 Les mode d'imagerie de l'AFM	37
II-1-5-1 Mode contact.....	38
II-1-5-2 Mode tapping (ou mode contact intermittent)	38
II-1-5-3 Mode non-contact	39
II-1-6 Courbes force-distance	40
II-1-6-1 principe	40
II-1-6-2 Interprétation de la courbe force-distance	40
II-1-6-3 Hystérésis d'adhésion	42
II-1-7 Appareillage utilisé	43
II-1-7-1 Calibration du microlevier	44
II-1-7-2 Caractérisation des pointes AFM (Mesure du rayon de courbure)	44
II-2 Microscopie de Fluorescence	46
II-2-1 Principe	46
II-2-2 Marquage des lipides	48
II-2--3 Exemples d'images	49
II-2-4 Utilisation des billes fluorescentes activées par EDC	50

CHAPITRE III

Fabrication des membranes phospholipidiques modèles et leur caractérisation par AFM et microscopie de fluorescence

III-1 Préparation des surfaces	51
III-2 Lipides utilisés	54
III-3 Préparation des membranes supportées	54

III-3-1 Méthode de Langmuir-Blodgett	55
III-3-1-1 Molécules tensioactives	56
III-3-1-2 Cuve de Langmuir et balance de Wilhelmy	57
III-3-1-3 Dépôt de Langmuir-Blodgett	59
A- Préparation de la cuve de Langmuir	59
B- Ependage du phospholipide à la surface de l'eau	59
C- Isotherme Pression de surface-Aire	59
D- Dépôt de Langmuir-Blodgett	61
III-3-1-4 Caractérisation par AFM de bicouches de DPPC déposées par la technique LB	63
III-3-2 Méthode de coadsorption de micelles mixtes	64
III-3-2-1 Préparation de micelles mixtes	64
III-3-2-2 Préparation de bicouches dans l'eau	65
III-3-2-3 Bicouches de DOPC dans le TRIS pH 7.2	67
III-3-2-4 Caractérisation de la bicouche de DOPC sur le verre	67
III-3-2-4-1 par microscopie à force atomique	67
III-3-2-5 Effet de la vitesse de dilution et du vieillissement de la bicouche	69
III-3-3 Méthode de fusion des vésicules	72
III-3-3-1 Préparation de vésicules unilamellaires	72
III-3-3-2 Préparation de bicouches	72
III-3-3-3 Caractérisation des bicouches	74
a- par microscopie de Fluorescence	74
b- par AFM	74
III-4 BILAN	75

CHAPITRE IV

Etude des propriétés nanomécaniques des membranes phospholipidiques par AFM

IV-1 Mesures de nano-indentations	77
IV-2 Bicouches de DOPC-NBDPC préparées par co-adsorption de micelles sur le verre	78
IV-2-1 Bicouches de DOPC-NBDPC dans l'eau ultrapure, pH 5.5	79
IV-2-1-1 Bicouches de DOPC préparées par une seule incubation	79
IV-2-1-2 Bicouches de DOPC préparées par deux incubations	79
IV-2-1-3 Bilan	79
IV-2-1-4 Discussion et interprétation	81
IV-2-2 Bicouches DOPC-NBDPC dans le Tris 15mM (pH7.2)	81

IV-2-3 Bicouches DOPC-NBDPC dans le NaCl 150mM, Tris 15mM (pH 7.2)	82
IV-2-4 Bicouches DOPC-NBDPC dans le NaCl 150mM (pH 5.8)	84
IV-3 Bicouches de DOPC-NBDPC préparées par éclatement de vésicules sur le verre	84
IV-3-1 DOPC-NBDPC dans l'eau ultrapure, pH 5.5	85
IV-3-2 Bicouche DOPC-NBDPC dans le Tris 15mM (pH 7.2)	85
IV-3-3 Bicouche DOPC-NBDPC dans NaCl 150mM, Tris 15mM (pH 7.2)	85
IV-4 Bicouches de DOPC-NBDPC préparées par éclatement de vésicules sur le mica	87
IV-4-1 DOPC-NBDPC dans l'eau	87
IV-4-2 DOPC-NBDPC dans le Tris 15mM, pH 7.2	88
IV-4-3 DOPC-NBDPC dans NaCl 150mM, pH 7.2	90
IV-5 Bicouches mixtes de DOPC/DPPC préparées par éclatement de vésicules sur le mica	91
IV-5-1 Topographie	91
IV-5-2 Mesure de force	92
IV-6 Bilan	92
IV-7 Discussion et conclusion	93

CHAPITRE V

Adsorption des protéines sur surfaces solides et leur insertion dans les membranes supportées

V-1 Introduction	95
V-2 Etude de l'adsorption de protéines sur surfaces solides.....	96
V-2-1 Silanisation de surfaces de verre	96
a-Protocole de silanisation	97

Table de matières

b- Silanisation avec l'octadécyltrichlorosilane (OTS)	98
c- Silanisation avec 3-aminopropyltriéthoxysilane (APTES)	99
V-2-2 Adsorption de la BSA sur le verre	101
V-2-2-1 L'albumine de sérum bovin (BSA)	101
V-2-2-2 Protocole d'adsorption sur pyrex	102
V-2-2-3 Résultats	103
V-2-2-4 Conclusion	104
V-2-3 Adsorption de la phosphatase alcaline sur le verre silanisé	104
V-2-3-1 Adsorption de l'APs sur le verre silanisé APTES	107
Microscopie de fluorescence	107
Microscopie à force atomique	107
V-2-3-2 Adsorption de l'APs sur le verre silanisé OTS	108
Microscopie de fluorescence	108
Imagerie par AFM	109
V-2-3-3 Conclusion	110
V-3- Insertion des protéines dans les membranes supportées	111
V-3-1 Insertion de la phosphatase alcaline soluble APs dans une bicouche de DPPC	111
Microscopie de fluorescence	111
V-3-2 Insertion de la phosphatase alcaline à ancre GPI dans une bicouche de DPPC	112
A- Résultats	112
Imagerie AFM	112
Microscopie de fluorescence	113
B- Conclusions	115
V-3-3 Insertion de la créatine Kinase (mtCK) dans une bicouche de PC-PE-CL	115
V-3-3-1 Préparation des vésicules PC-PE-CL	117
V-3-3-2 Réalisation des bicouches	118
V-3-3-3 Résultats AFM	118
a- Topographie en mode contact	118
b- Topographie en mode Tapping	120
c- Mesure de force	122
V-3-3-4 Discussion et Interprétation	122
V-3-3-5 Insertion de la Créatine Kinase dans la bicouche	123
V-3-3-6 Résultats AFM	123
V-3-3-7 Interprétation et conclusions	124
Conclusion générale et perspectives	126
Annexe	128
Références bibliographiques	131
Résumés	144

INTRODUCTION GENERALE

INTRODUCTION GENERALE

Les membranes modèles constituées d'une bicouche mixte (phospholipides et protéines) stabilisées au voisinage d'une surface solide sont des systèmes de plus en plus étudiés car elles permettent d'approcher certains comportements élémentaires de la membrane biologique tout en contrôlant bien les caractéristiques physico-chimiques de ces systèmes. C'est un domaine de recherche très pluridisciplinaire. Ces études rassemblent autant de laboratoires de biologie, pour l'aspect de modélisation des membranes cellulaires que de laboratoires de physique et de chimie qui interviennent dans l'étude des propriétés telles que les interactions protéine/lipide, l'activité de protéines insérées dans des membranes, et l'énergie d'ancrage d'une protéine dans une membrane [1–2].

Ces dernières années, une thématique importante des laboratoires de biochimie est l'étude des radeaux lipidiques [3,4]. Ces radeaux sont des petits îlots en phase liquide ordonnée (de diamètre proche de 50 nm) enrichis en protéines et lipides particuliers (cholestérol, protéines à ancres GPI...) dans le reste de la membrane fluide.

La fabrication de membranes phospholipidiques supportées comportant des radeaux modèles [5] couplée à une technique de caractérisation adaptée à cette échelle spatiale comme la microscopie à force atomique (AFM) va permettre d'étudier les propriétés et le fonctionnement particulier d'une protéine dans un environnement bien contrôlé (géométrie plane, composition en lipides connue).

Un autre domaine qui nous a intéressés durant cette thèse est l'étude des interfaces moléculaires articulaires modèles. Des bicouches lipidiques adsorbées sur les surfaces articulaires frottantes ainsi que dans le fluide synovial ont été mises en évidence. Cette mise en évidence a généré plusieurs études qui considèrent que les bicouches lipidiques jouent un rôle dans la lubrification des articulations et la réduction des forces de frottement entre les surfaces biologiques [6–10]. Lorsque celles-ci se dégradent, la friction augmente. Dans ce

contexte, nous avons étudié la stabilité des bicouches phospholipidiques à travers leur résistance à l'indentation de la pointe AFM.

Les membranes modèles permettent donc aussi d'étudier les propriétés nanomécaniques des membranes cellulaires [11] et la nanorhéologie dans et autour de la cellule [12].

La microscopie à force atomique (AFM) est devenue un outil majeur pour l'étude de la structure et la stabilité des bicouches. Elle a été utilisée pour mesurer les interactions entre la bicouche et la pointe [11] et pour observer la nature des défauts dans la bicouche [13].

Depuis le développement de la microscopie à force atomique (AFM), de nombreux modes ont été développés pour aller au-delà de la simple mesure de la topographie et permettre d'étudier localement les propriétés physico-chimiques des surfaces. Ainsi avec la création du microscope à force latérale (LFM) qui permet d'étudier et de mesurer la force de frottement entre la pointe et la surface, le champs d'application de l'AFM s'est étendu à l'étude des contacts, des frottements, de l'usure ou encore de l'adhésion entre surfaces à l'échelle nanométrique. Toutes ces nouvelles études de " nanomécanique " et " nanotribologie " sont indispensables pour comprendre les phénomènes physiques à l'interface entre deux surfaces dans de nombreux domaines scientifiques ou industriels (sciences des polymères, biologie cellulaire, microélectronique...).

La spectroscopie de force de l'AFM donne des informations expérimentales précieuses sur les forces d'interaction et le comportement mécanique des systèmes avec une résolution nanométrique et nanonewtonienne à travers les courbes forces-distance [14].

La mesure quantitative de cette force peut nous éclaircir sur des informations de base concernant la nanomécanique de la cellule de la membrane ainsi que sur sa stabilité [15].

La microscopie à force atomique est aussi très utilisée pour l'étude de l'insertion de protéines membranaires dans les membranes supportées. [5,16]

Dans ce travail de thèse, nous nous proposons d'étudier les propriétés nanomécaniques des membranes phospholipidiques et mettre en évidence leur rôle dans la biolubrification ; puis nous passons à l'étude de l'adsorption des protéines ainsi que leur insertion dans les membranes supportées en couplant la microscopie à force atomique à la microscopie de fluorescence.

Cette thèse est constituée de cinq parties essentielles :

Introduction générale

Le chapitre I est une introduction aux membranes lipidiques. Nous parlerons des membranes biologiques, leur composition, leur structure et leur dynamique, puis nous passons aux protéines, leur structure et à l'interaction lipide-protéine.

Nous parlerons ensuite des membranes modèles où nous aborderons les différents modèles de membranes artificielles ainsi que la dynamique dans les vésicules libres et les bicouches phospholipidiques supportées et de leur intérêt pour la compréhension des membranes biologiques.

Le chapitre II sera consacré aux techniques utilisées dans cette étude : la microscopie à force atomique, son principe, ses modes de fonctionnement, et son utilisation dans ce travail pour caractériser les différentes surfaces et étudier les propriétés nanomécaniques des membranes.

Nous parlerons aussi de la microscopie de fluorescence et son principe ainsi que du marquage des lipides.

La III^{ème} partie sera consacrée à la fabrication des membranes modèles et aux différentes méthodes utilisées : La méthode de Langmuir Blodgett, la coadsorption de micelles mixtes et la fusion de vésicules ainsi que la caractérisation de ces membranes par AFM et microscopie de fluorescence.

Le chapitre IV portera sur l'étude des propriétés nanomécaniques des membranes phospholipidiques supportés sur différentes surfaces et le rôle du pH et des ions dans la stabilité des bicouches. Pour conclure, nous discuterons du rôle des membranes dans la biolubrification en comparant nos résultats aux mesures tribologiques réalisées au laboratoire.

Le chapitre V sera consacré à l'adsorption des protéines sur surfaces solides et à leur insertion dans les membranes modèles : Nous parlerons de l'adsorption de la BSA et de l'APS sur le verre, puis nous étudierons l'insertion de la phosphatase alcaline dans une bicouche de DPPC ; ainsi que de l'insertion de la créatine kinase dans une bicouche mixte PC/PE/CL, afin de modéliser la membrane interne de la mitochondrie.

Nous terminerons par une conclusion générale et les perspectives et enfin les références bibliographiques.

CHAPITRE I

Membranes phospholipidiques et adsorption des protéines

CHAPITRE I

Membranes phospholipidiques et adsorption des protéines

L'étude des membranes phospholipidiques biomimétiques est devenue en quelques années une approche conceptuelle importante pour mieux comprendre, au niveau cellulaire, les processus du vivant. 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 extracellulaire. Elles interviennent aussi dans une variété de processus biologiques indispensables à la vie comme les phénomènes de transport, la transduction signalétique, les processus de conversion d'énergie, etc.

De nombreuses fonctions biologiques sont réalisées au niveau de la membrane plasmique, assurées dans leur grande majorité par les protéines qui y sont insérées (récepteurs membranaires).

Dans ce Chapitre, nous allons parler dans un premier temps des membranes biologiques et leur structure, puis nous développerons la dynamique des lipides dans ces membranes. Nous aborderons ensuite les différents modèles des membranes artificielles ainsi que la dynamique dans les vésicules libres et les bicouches lipidiques supportées. Nous terminerons par l'adsorption des protéines.

I-1 Membranes biologiques

Les membranes sont majoritairement constituées 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.

I-1-1 Composition et structure des membranes biologiques

Les membranes biologiques sont principalement constituées de deux couches de molécules amphiphiles (lipides) se faisant face de manière antiparallèle dans lesquelles sont insérées des protéines. Les lipides membranaires représentent 30 à 50 % de la masse membranaire selon le type d'organite. Ils appartiennent à une famille particulière de molécules amphiphiles qui possèdent une tête polaire, donc hydrophile, chargée ou non, et au moins une chaîne aliphatique, hydrophobe [1].

Les protéines sont quant à elles enchâssées dans la double couche lipidique et contribuent non seulement à sa solidité, mais surtout remplissent des fonctions essentielles (échanges et communications). La charpente des membranes cellulaires est donc une construction supramoléculaire de lipides associés à des protéines, dont les molécules sont régulièrement orientées, ce qui leur assure à la fois cohésion et souplesse (Figure I-1).

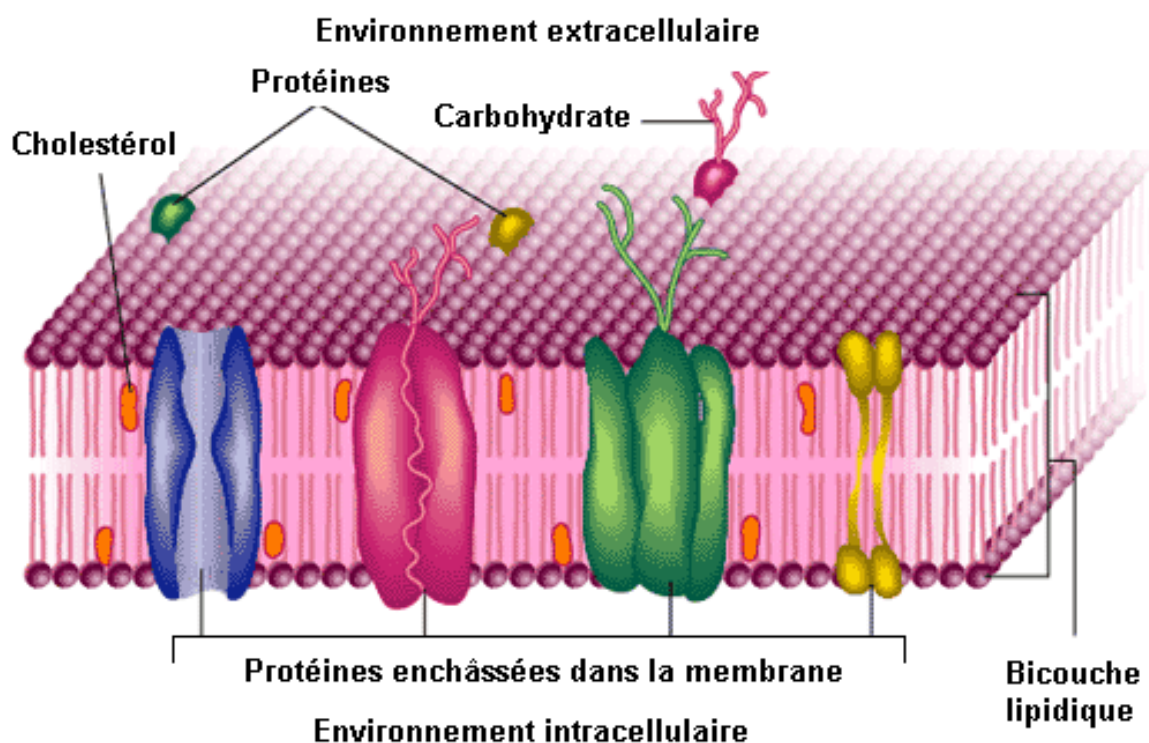


Figure I-1. Représentation schématique d'une membrane biologique. La membrane est constituée d'un double feuillet lipidique associé à des protéines.

Membranes phospholipidiques et adsorption des protéines

Les membranes vont se former grâce aux propriétés amphiphiles des lipides constitutifs. En effet, dans l'eau (principal composant des cellules et du milieu extracellulaire), les lipides s'orientent spontanément pour former une double couche dans laquelle les queues hydrophobes se font face en raison de leur affinité réciproque ; les têtes polaires sont dirigées vers l'eau (Figure I-1). L'organisation ainsi créée minimise l'énergie du système (énergie libre de Gibbs), et stabilise l'édifice. Les forces en jeu permettant de la maintenir sont de faible énergie, il s'agit d'interactions hydrophobes (liaisons hydrogènes de l'eau perturbées par les portions hydrophobes) et d'interactions de Van der Waals. Afin de minimiser l'énergie libre du système, un auto-assemblage des molécules individuelles a lieu. Cet auto-assemblage peut-être à l'origine de nombreuses phases de morphologie différentes [17, 18]. (Figure I-2). En ce sens, les membranes biologiques définissent les limites des compartiments intracellulaires ainsi que de la cellule elle-même.

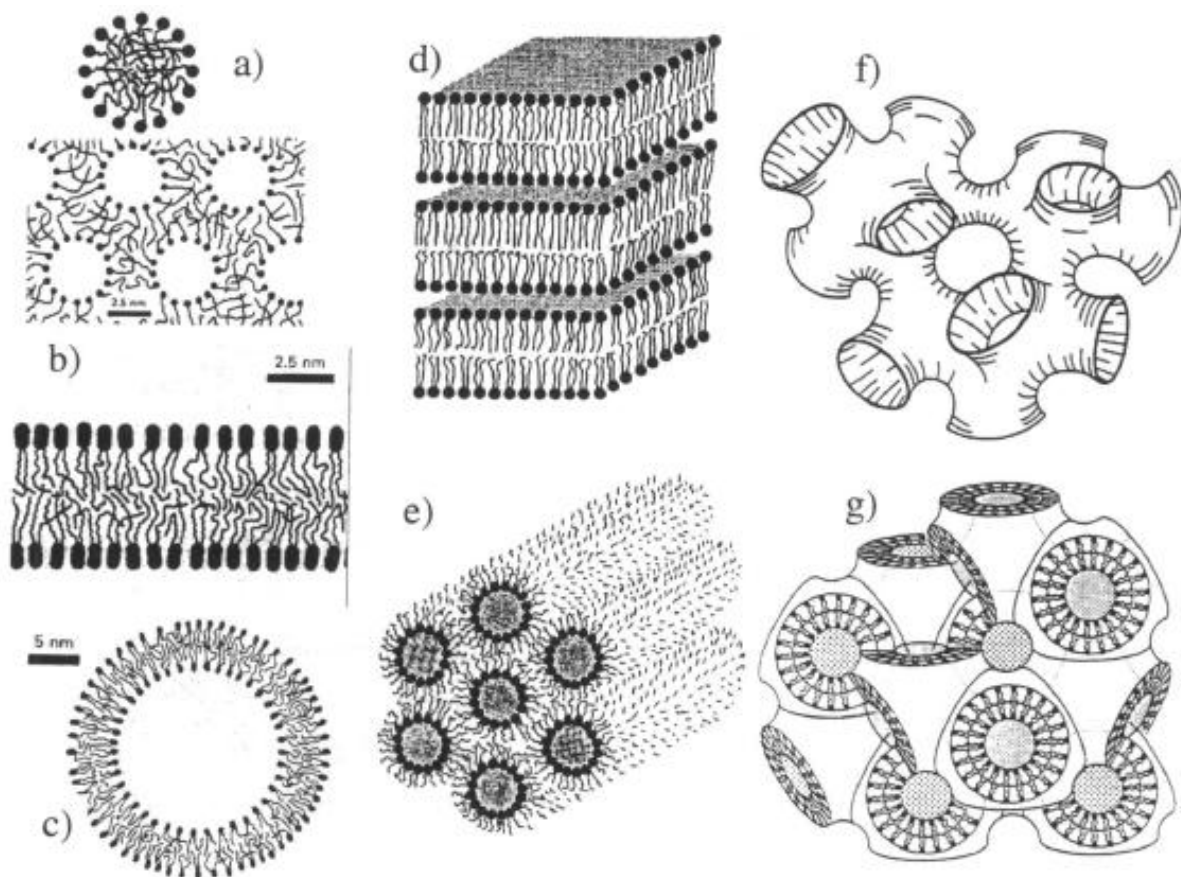


Figure I-2. Exemple de phases possibles pour les molécules amphiphiles dans un solvant aqueux : a) micelles et micelles inverses, b) bicouche, c) liposome, d) phase lamellaire, e) phase hexagonale inverse (micelles cylindriques inverses), f) phase éponge, g) phase cubique inverse bicontinue, d'après [17, 18].

Le volume moléculaire occupé par la tête polaire dépend de son inclinaison par rapport au plan de la membrane, de la vitesse de son mouvement rotatif et de son hydratation. Le volume moléculaire occupé par les chaînes acyles est en particulier fonction du nombre d'insaturations en *cis* présentes dans ces chaînes. Plus celles-ci sont nombreuses et proches du centre de la chaîne grasse, plus le désordre des chaînes acyles augmente (du fait des rotations autour des doubles liaisons C=C) et plus le volume moléculaire occupé par cette chaîne grasse est grand. De même, plus le nombre d'isomérisations *trans-gauches* augmente, plus le volume moléculaire des chaînes acyles augmente. Lorsque les parties hydrophobes et hydrophiles s'équilibrent, on peut schématiser les lipides sous forme de cylindres et le type de phase adopté est alors la phase lamellaire ($L\alpha$) qui correspond à un empilement de bicouches phospholipidiques espacées par des couches aqueuses. Par contre, si la partie hydrophobe du lipide est plus importante que la partie hydrophile, celui-ci est représenté par une forme conique avec la tête polaire au sommet du cône, et une phase dite hexagonale est préférentiellement adoptée. Les lipides en phase aqueuse hexagonale H_{II} , sont organisés sous forme de cylindres (de symétrie hexagonale) constitués de canaux aqueux vers lesquels les têtes polaires s'orientent.

On trouve dans les membranes biologiques une très grande variété de substances lipidiques. Les lipides qui entrent dans leur structure appartiennent aux trois catégories suivantes: les glycérophospholipides, les sphingolipides et les stérols. On retrouve également un certain nombre de composants moins abondants tels que des lysolipides les glycolipides et les cérébrosides.

I-1-1-1 Les Glycérophospholipides (ou Phospholipides)

Les glycérophospholipides, appelés couramment phospholipides, constituent la famille de lipides la plus répandue dans les membranes biologiques et les mieux représentés ; ils sont particulièrement abondants dans les membranes internes. Ce sont des molécules amphiphiles qui ont des propriétés tensioactives.

Les phospholipides sont composés d'une tête polaire hydrophile (surface moyenne de 50 \AA^2) et d'une queue apolaire hydrophobe, comportant deux chaînes d'acides gras de longueur différente, dont l'une peut porter une ou plusieurs doubles liaisons. La longueur moyenne de ces chaînes est de l'ordre de 2-3 nm.

Membranes phospholipidiques et adsorption des protéines

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...).

La structure de ces lipides consiste en un squelette de base glycérol (trialcool), sur lequel deux des fonctions alcool, dont la fonction secondaire, sont estérifiées par des acides gras, constituant les chaînes hydrocarbonées hydrophobes (principalement supérieures à 16 atomes de carbone), dont une est habituellement insaturée sur une ou plusieurs positions, parfois en *trans*, le plus souvent en *cis* (Figure I-3).

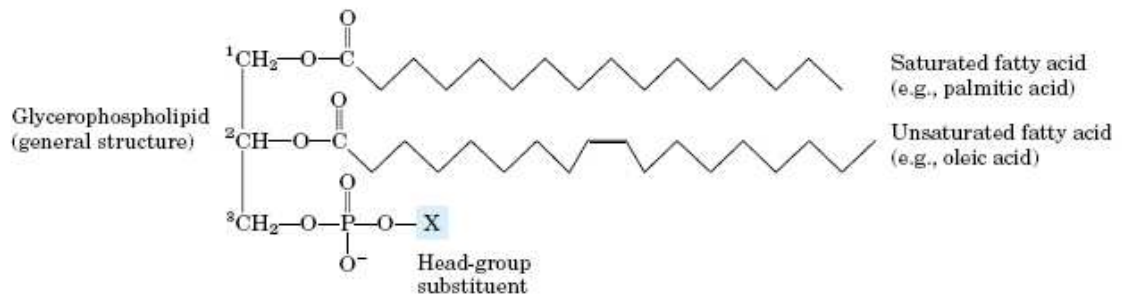
La tête polaire est constituée d'un groupement phosphate, substituant la troisième fonction alcool du squelette glycérol. Le phosphate est lui-même substitué par différents groupements qui définissent la nature du glycérophospholipide. Il s'agit classiquement de la phosphatidylcholines (PC), les phosphatidyléthanolamines (PE) et les phosphatidylsérines (PS ou l'inositol [18]).

L'exemple le plus classique de phospholipides, est la phosphatidylcholine (Figure I-4). Le groupement phosphatidyl 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.

Les phosphatidylcholines ont généralement deux chaînes acyles de longueur comparable de 16 ou 18 carbones, avec celle en position 1 souvent saturée tandis que l'autre peut comporter plusieurs doubles liaisons en configuration *cis*. C'est le cas du 1-Palmitoyl-2-Oléoyl-*sn*-Glycéro-3-PhosphatidylCholine (C16:0,18:1 PC ou POPC) qui est le phospholipide majoritaire de la membrane plasmique dans la plupart des types cellulaires.

De leur côté les glycérophospholipides à tête PE, PS ou PI présentent davantage d'insaturation sur une ou deux chaînes (majoritairement entre les carbones 9 et 10).

Membranes phospholipidiques et adsorption des protéines



Name of glycerophospholipid	Name of X	Formula of X	Net charge (at pH 7)
Phosphatidic acid	—	— H	-1
Phosphatidylethanolamine	Ethanolamine	— CH ₂ —CH ₂ —NH ₃ ⁺	0
Phosphatidylcholine	Choline	— CH ₂ —CH ₂ —N ⁺ (CH ₃) ₃	0
Phosphatidylserine	Serine	— CH ₂ —CH—NH ₃ ⁺ COO ⁻	-1
Phosphatidylglycerol	Glycerol	— CH ₂ —CH—CH ₂ —OH OH	-1
Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate	<i>myo</i> -Inositol 4,5-bisphosphate		-4
Cardiolipin	Phosphatidyl-glycerol	— CH ₂ CHOH CH ₂ —O—P(=O)(O ⁻)—O—CH ₂ CH—O—C(=O)—R ¹ CH ₂ —O—C(=O)—R ²	-2

Figure I-3. Structures des principaux lipides des membranes de mammifères : les glycérophospholipides, d'après [20].

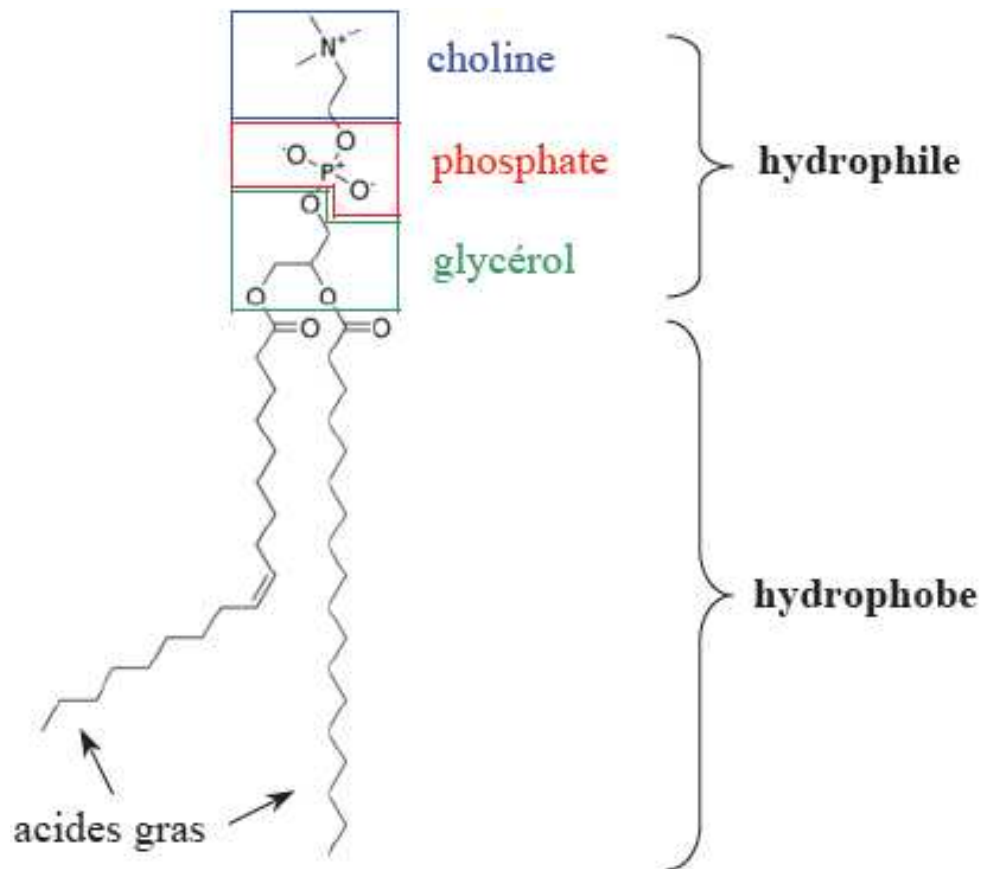


Figure I-4. Structure de la phosphatidylcholine.

Les glycérophosphoinositides (phospholipides à tête PI) sont tous estérifiés en position 2 par un acide arachidonique (C20:4) et en position 3 par un stéarate (C18).

Ainsi, de part les volumes respectifs occupés par la tête polaire et par les deux chaînes acyles (volume plus grand avec la présence de doubles liaisons *cis*), les glycéro-PC, glycéro-PI et glycéro-PS de la membrane plasmique forment spontanément des membranes planaires de bicouche en raison de leur forme cylindrique (c'est-à-dire, la tête polaire et la somme des deux chaînes ont approximativement la même section), alors que les glycéro-PE et les glycéro-PA ayant eux une géométrie conique.

Les aires sont plus petites lorsque la membrane est en état solide (gel) où toutes les chaînes sont bien ordonnées en lattice cristalline hexagonale et adoptent une conformation *trans*.

I-1-1-2 Les Sphingolipides

Les sphingolipides (Figure I-5) ont une base lipidique commune, appelée céramide, constituée d'une longue chaîne amino-alcool, appelée sphingosine, greffée par une liaison amide à un acide gras.

Les sphingolipides constituent une famille très nombreuse en raison de la diversité des groupements polaires. En fonction de ceux-ci, on distinguera les céramides, la sphingomyéline (SM) et les glycosphingolipides. Le groupement polaire correspond à une phosphocholine ou phosphoéthanolamine dans le cas de la SM, et un mono- ou un oligosaccharide dans le cas des glycosphingolipides, dont la dénomination est alors respectivement cérébrosides ou gangliosides.

Les gangliosides comprennent un ou plusieurs acides sialiques (ou acide N-acétylneuraminique) dans leur partie glucidique (exemple du GM1 ou ganglioside monosialide 1). La SM représente 10 à 20 % molaire des lipides membranaires, tandis que les glycosphingolipides sont présents habituellement à des niveaux faibles [21].

Bien que les dimensions effectives dans la bicouche lipidique soient comparables aux glycérophospholipides (l'aire de la tête polaire entre 45 et 57 Å²) [22], la longueur de l'acide gras peut être beaucoup plus longue (par exemple, les lignoceroylsphingosines ont 24 atomes de carbone). Les températures de fusion des chaînes de sphingolipides sont habituellement plus élevées que celles des glycérophospholipides et peuvent excéder 60°C [23].

I-1-1-3 Le Cholestérol

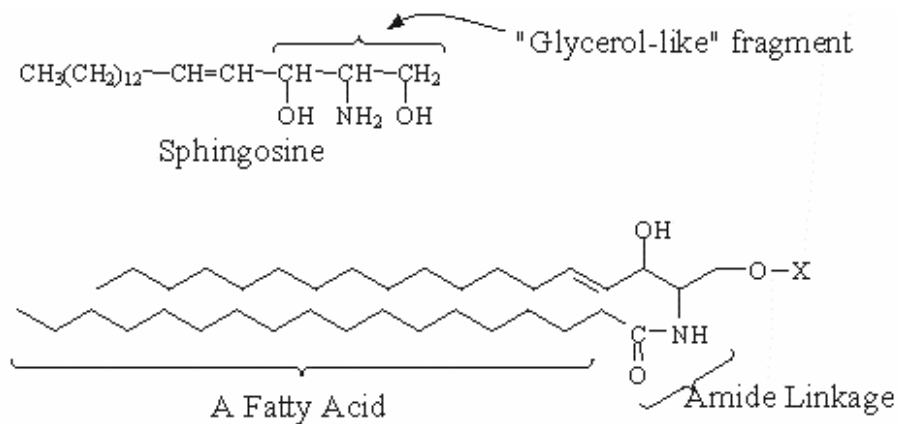
Le cholestérol et ses dérivés constituent une autre catégorie importante de lipides membranaires : les stérols. Le cholestérol est la forme la plus représentée chez les vertébrés. Cependant, il est l'unique stérol présent dans la membrane plasmique des cellules de mammifères, il est également présent chez nombre d'eucaryotes.

Le cholestérol ne présente pas une distribution homogène au sein des cellules des mammifères et se retrouve extrêmement concentré au sein de la membrane plasmique [24] alors qu'il est très peu présent dans les membranes internes [25].

La structure de base du cholestérol est un squelette hydrocarboné de quatre cycles rigides et plans, présentant un groupement hydroxyle en position 3 du premier cycle qui constitue la seule partie polaire de la molécule et lui confère un caractère amphiphile (Figure I-6). Le noyau stérol se poursuit par une chaîne ramifiée à 8 carbones.

Membranes phospholipidiques et adsorption des protéines

La tête polaire (l'hydroxyle) a une taille réduite par rapport au reste de la molécule, ce qui est néanmoins suffisant pour qu'il s'insère dans les membranes dans une direction perpendiculaire au plan moyen de la bicouche lipidique avec le groupe hydroxyle placé au niveau de la partie polaire des phospholipides et son corps hydrophobe plan au contact des chaînes d'acides gras [26,27].



Name of sphingolipid	Name of X	Formula of X
Ceramide	—	— H
Sphingomyelin	Phosphocholine	$ \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{— P — O — CH}_2\text{ — CH}_2\text{ — N}^+(\text{CH}_3)_3 \\ \text{O}^- \end{array} $
Neutral glycolipids Glucosylcerebroside	Glucose	
Lactosylceramide (a globoside)	Di-, tri-, or tetrasaccharide	
Ganglioside GM2	Complex oligosaccharide	

Figure I-5 Structures des principaux lipides des membranes de mammifères : les sphingolipides, d'après [20].

Membranes phospholipidiques et adsorption des protéines

La longueur de la chaîne du cholestérol, d'environ 17.5 Å, est plus courte que la longueur de chaîne des phospholipides qui est proche de 25 Å. La présence de cholestérol au sein de la membrane lipidique tend à la rigidifier tout en autorisant une certaine mobilité aux composants membranaires. Cette rigidification provient du fait que le cholestérol engendre un effet de condensation forte dans la membrane lipidique, faisant ainsi diminuer l'aire occupée par les molécules de lipides [20]. Grâce aux interactions ainsi mises en jeu avec les phospholipides avoisinants, le cholestérol modulera profondément les propriétés physiques, structurales et dynamiques des membranes qui le contiennent.

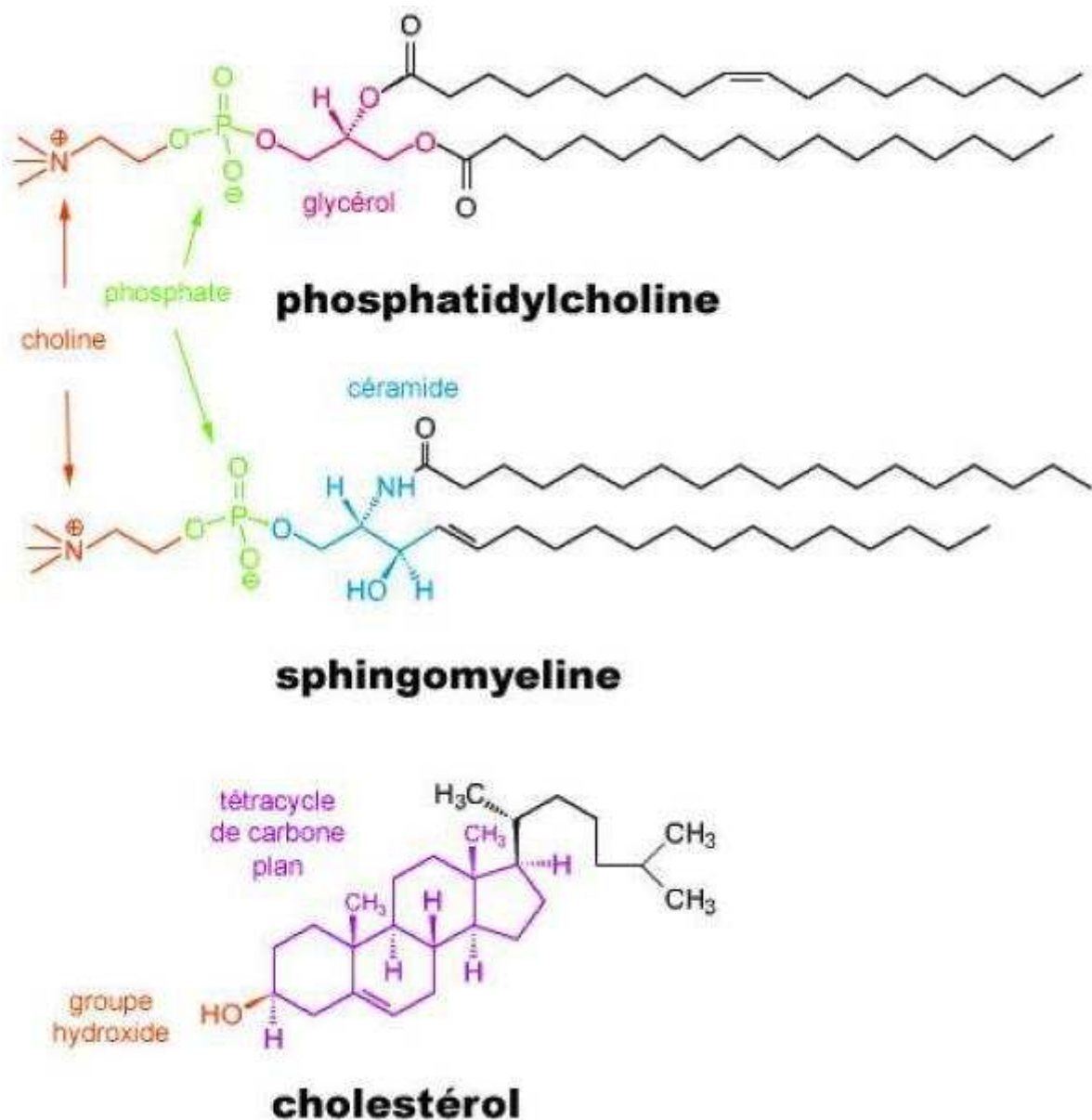


Figure I-6. Comparaison des structures chimiques des trois composants majeurs des membranes cellulaires. Un glycérophospholipide : la PC, un sphingolipide la SM et le Chol. Adapté de www.avantilipids.com.

I-1-1-4 Les protéines

Bien que les lipides aient principalement un rôle dans la structure de la membrane plasmique, cependant ce sont les protéines qui assurent la quasi-totalité des fonctions biologiques spécifiques de la membrane (structurelles et/ou fonctionnelles).

Suivant leur origine, les membranes renferment de 40 à 70 % de protéines réparties dans la bicouche lipidique.

La nature des protéines exprimées à la membrane dépend essentiellement du tissu auquel appartient la cellule et la présence d'une protéine donnée en grande quantité contribue à la spécialisation de la membrane. Le rôle des protéines membranaires est très large : elles vont transmettre vers l'intérieur de la cellule des informations sur le milieu extérieur (protéines réceptrices, canaux...) ; elles vont participer à la courbure ou à la stabilité de la membrane ; elles vont servir de point d'ancrage à des structures extracellulaires ou intracellulaires, tout cela contribuant à la dynamique fonctionnelle des membranes.

Les protéines membranaires peuvent être classées en deux catégories sur la base de la nature de leurs interactions avec la membrane: les protéines intrinsèques (intégrales) et les protéines extrinsèques (périphériques). La plupart des membranes renferment les deux types de protéines.

Les protéines membranaires extrinsèques ne pénètrent pas dans la membrane plasmique et peuvent être associées aux lipides de l'un des deux feuillet par des liaisons faibles (force électrostatique, liaison hydrogène). Elles sont extractibles par des solutions tamponnées acide ou basique si la force ionique est suffisamment élevée.

Les protéines membranaires intrinsèques, présentent au moins une partie incluse dans la membrane. Elles sont insolubles dans les solvants aqueux et ne peuvent être extraites que si la membrane est suffisamment déstabilisée avec des détergents.

Certaines protéines intrinsèques possèdent un ou plusieurs segments protéiques de nature hydrophobe localisés à l'intérieur de la bicouche phospholipidique. La plupart d'entre elles s'étendent sur toute l'épaisseur de la bicouche.

D'autres sont ancrées à l'un ou l'autre feuillet de la bicouche par des chaînes hydrocarbonées, auxquelles elles sont reliées de façon covalente. Dans ces protéines, la chaîne polypeptidique ne pénètre pas dans la membrane. Un exemple de ce type est les protéines à ancre GPI : ces protéines sont liées à leur extrémité C-terminale à un glycérophospholipide (ayant un PI

comme tête polaire) par un enchaînement de quatre sucres, d'un phosphate et de l'éthanolamine.

Les protéines membranaires peuvent être très abondantes au niveau de certaines membranes. On peut citer l'exemple de la membrane interne mitochondriale où on détecte 76% de protéines [28]. Ceci démontre l'importance de cette famille de protéines dans un grand nombre de fonctions biologiques telles que la signalisation, la bioénergétique, l'adhésion, la reconnaissance, le transport de soluté. Cependant, alors que plusieurs milliers de structures de protéines solubles ont été déterminées, seules les structures de quelques dizaines de protéines membranaires ont été résolues à l'heure actuelle. Ce manque de connaissance sur la structure des protéines membranaires s'explique par la grande difficulté à isoler et à cristalliser ce type de protéines.

Structure des protéines

Dans les protéines, les acides aminés sont reliés entre eux par une liaison amide entre le groupe carbonyle (C=O) de l'un et le groupe aminé (N-H) du suivant. Cette liaison est appelée "liaison peptidique". Le squelette polypeptidique peut ensuite s'organiser selon différentes structures secondaires (Figure I-3): hélice α , feuillet β , coude β , pelote statistique, qui influent directement sur les interactions avec la membrane [29,30].

- Dans la structure "hélice α " (conçue par Pauling et Corey en 1951 [31]), la chaîne peptidique est enroulée suivant une hélice droite, d'un pas de 0,54 nm, chaque tour d'hélice contenant en moyenne 3,6 résidus (Figure I-7). L'hélice est stabilisée par des liaisons hydrogène intramoléculaires s'établissant entre les groupements (CO) et (NH) de résidus espacés d'un tour d'hélice. Contrairement à la conformation en hélice α "droite", les hélices "gauche" ne sont que peu répandues.

- Dans la conformation en feuillet β , aussi désignée sous le terme de "feuillet plissé" [32], les liaisons peptidiques sont arrangées comme sur une feuille de papier pliée en accordéon (Figure I-7, à droite). Cette structure est également stabilisée par des liaisons hydrogène qui se forment entre chaînes voisines. On parle de feuillet plissé parallèle lorsque les chaînes adjacentes présentent des séquences peptidiques se parcourant dans le même sens, par exemple, de l'extrémité amine vers l'extrémité carbonyle, pour toutes les chaînes. Le terme feuillet plissé antiparallèle est utilisé, lorsque les liaisons peptidiques de chacune des chaînes se font en sens inverse: à l'extrémité amine d'une chaîne correspond alors l'extrémité carbonyle de ses voisines [33].

- Les coudes représentent les changements d'orientation de la chaîne peptidique. On parlera plus spécifiquement de coude β lorsque 4 résidus sont impliqués pour induire une rotation de 180° dans la structure des polypeptides. Cette configuration est stabilisée par une liaison hydrogène entre les résidus de tête et de fin de structure.

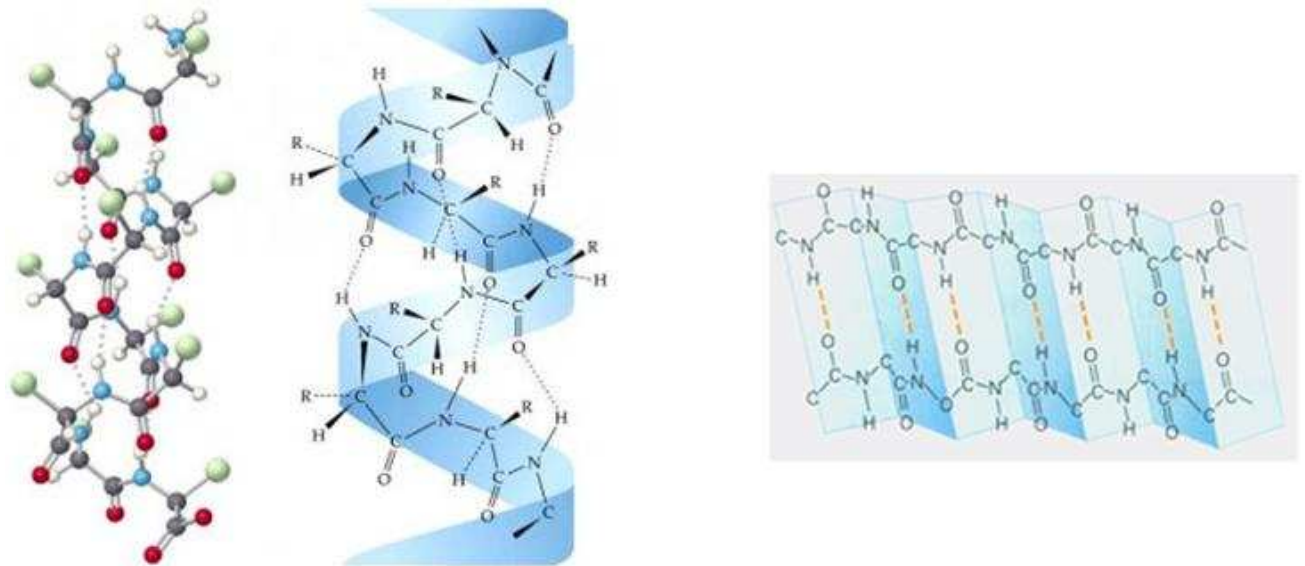


Figure I-7. Structure secondaires des protéines : hélice α et feuillet β plissé, à droite.

I-1-2 Les interactions lipide-protéine

Les interactions lipides-protéines de la membrane plasmique jouent un rôle clé dans la réalisation de ses fonctions. Les interactions des phospholipides avec les protéines se font à différents niveaux. Les données de modélisation moléculaire montrent que les chaînes acyles peuvent avoir des interactions de type Van der Waals avec certains acides aminés et que l'oxygène non estérifié du phosphate peut engager une liaison hydrogène avec le groupement amine-terminale [34]. D'autre part, la nature de la tête polaire des phospholipides a une influence sur son taux d'hydratation et donc son interaction avec la protéine.

Par exemple les PC sont davantage hydratées que les PE, et ces derniers procurent un environnement beaucoup plus favorable à l'activation de la rhodopsine [35]. Cette protéine serait également en interaction directe avec les molécules de cholestérol [36].

I-1-3 Dynamique des lipides dans les membranes et fluidité

I-1-3-1 Le modèle de «mosaïque fluide»

Le modèle de «mosaïque fluide» a été proposé par Singer et Nicolson en 1972 pour décrire l'assemblage et la dynamique des lipides dans membrane [35]. Ce modèle envisage la membrane lipidique comme un fluide bidimensionnel homogène dans lequel baignent des protéines mobiles et repose sur la dynamique de la membrane.

Les lipides sont perpétuellement en mouvement : ils peuvent se déplacer par diffusion latérale dans le feuillet dont ils font partie par mouvement brownien [38], par rotation libre autour de leur axe, et oscillation sur leur axe «wobble». Dans ces mouvements, les chaînes d'acides gras demeurent dans l'intérieur hydrophobe des membranes. Beaucoup plus rarement, les lipides se déplacent par diffusion transversale en changeant de feuillet (flip-flop) (Figure I-8); c'est un processus extrêmement défavorable énergétiquement au sein des bicouches pures de phospholipides car les têtes polaires des lipides doivent dans ce cas passer à travers l'intérieur de la zone hydrophobe de la membrane constituée par les queues des autres molécules de lipide. 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) [39]. 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 qui sont capables d'accélérer fortement ce mouvement [28,40].

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 ; elle est ralentie par la présence de chaînes saturées ainsi qu'une forte proportion de cholestérol. En effet la présence d'insaturation 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.

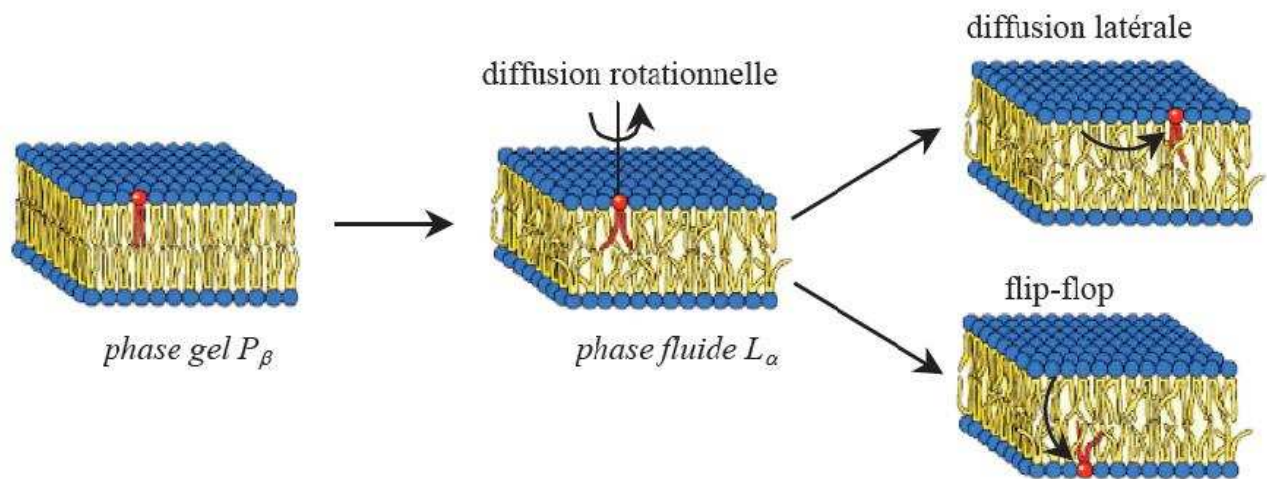


Figure I-8. Représentation schématique de la cinétique des lipides au sein des membranes. Les lipides dans la bicouche lipidique sont animés de mouvements : la diffusion latérale, rotationnelle et l'échange transversal (ou « flip-flop »). Adapté de Lipowsky and Sackmann [38].

I.1.3.2 Les radeaux lipidiques

A l'inverse du modèle considérant les membranes plasmiques comme une « mosaïque fluide », de nombreuses études réalisées ces dernières années ont amené les biologistes à introduire l'idée d'existence d'hétérogénéités latérales, de microdomaines lipidiques dans le modèle de structure et de dynamique de la membrane lipidique [41,42]. Ces études ont conduit à cette nouvelle vision actuellement admise de la structure des membranes cellulaires. Ils ont introduit ce qu'on appelle radeaux lipidiques ou « rafts » [3,4].

Ces assemblages latéraux sont des « domaines » enrichis en glycosphingolipides, cholestérol et sphingomyéline [43] et d'autres protéines de signal telles que la tyrosine-kinase et les protéines à ancrage GPI [43]. Ils forment une phase dense de plusieurs dizaines de nanomètres de diamètre flottant dans la membrane plutôt fluide [44].

Ils sont résistants à l'attaque de détergents non ioniques tels le Triton X-100 et les lipides à l'intérieur des radeaux sont supposés exister dans la phase liquide ordonnée L_0 intermédiaire entre les phases fluides et solides (gel). Comme dans la phase gel L_α , la compacité et

l'alignement des molécules sont grands, mais les molécules ont une mobilité latérale importante comme dans la phase fluide [45,46].

Selon cette hypothèse, ces radeaux membranaires sont impliqués dans de nombreux processus cellulaires, allant du trafic membranaire et morphogenèse cellulaire à la transduction de signaux.

La grande variété de lipides et de protéines au sein d'une même cellule en a fait un système complexe fortement inhomogène. Les membranes sont ainsi caractérisées par des hétérogénéités de distribution et d'état de phase.

I-1-4 Les différents états de phase des membranes lipidiques

En fonction de la température, on distingue plusieurs phases [47] (Figure I-9) :

- une phase lamellaire solide ordonnée ou 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 lamellaire désordonnée (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 [48].
- 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.

Certains lipides possèdent une phase liquide comprimée intermédiaire entre les phases gel et fluide, nommée phase *ripple* P_{β} [49,50]. Cette pré-transition est liée à la formation d'ondulations périodiques à la surface membranaire.

On peut distinguer aussi la phase liquide ordonnée L_o intermédiaire entre les phases fluides et solides dans le cas de radeaux lipidiques.

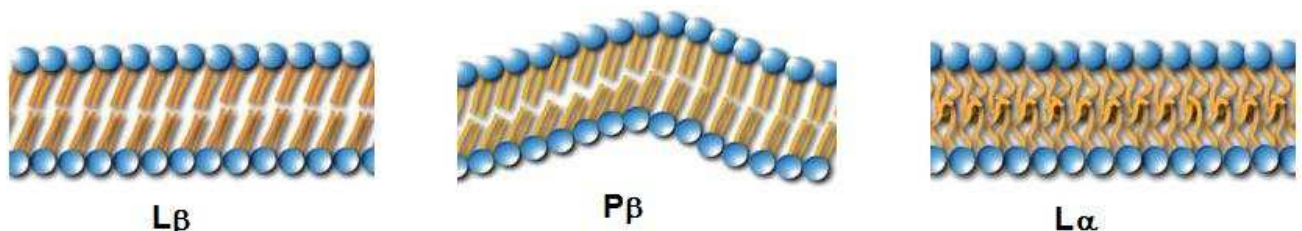


Figure I-9. Représentation des principaux changements de phase au sein des membranes lipidiques, d'après [51].

I-1-5 Transitions de phase dans les membranes

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 T_m 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 ($\Delta H = T_m \cdot \Delta S$). 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 température de transition de phase augmente avec le nombre d'interactions attractives entre lipides, notamment les interactions hydrophobes [52,53]. Plus la longueur des chaînes acyles des lipides est importante et plus le nombre d'interactions de type Van der Waals (correspondant à des forces de dispersion) sera important. Ainsi, la température de transition augmente proportionnellement à la longueur des chaînes acyles. Par exemple les membranes de DMPC (14:0) transitent autour de 23°C alors que celles composées de DPPC (16:0) transitent vers 41.5°C.

A chaîne carbonée identique, la température de transition peut être considérablement modifiée par la nature des têtes polaires et leur orientation par rapport au plan de la bicouche. Cependant, les insaturations *cis* défavorisent ces interactions entre chaînes, ce qui a pour effet de réduire la température de transition à nombre d'atomes de carbone donné dans les chaînes aliphatiques. Le DOPC (C18:1; C18:1), qui a une double liaison en configuration *cis* sur chacune des chaînes acyles entre les carbones 9 et 10, a une température de transition de -22°C (contre 55°C pour le DSPC en C18:0).

La température de transition dépend ainsi de la longueur et du degré d'insaturation des chaînes d'acides gras constituant les lipides de la membrane.

En ce qui concerne les mélanges de lipides, il a été montré que la température de transition de phase d'un système de deux lipides miscibles, ayant des températures de transition différentes, sera intermédiaire entre les températures de transition de phase des lipides individuels [54,55]. La variation de température de transition de phase du mélange sera une fonction affine de la fraction molaire de chaque lipide présent dans la membrane.

De plus, il a été montré qu'un changement de la température peut conduire à la séparation de phase de deux lipides dont les températures de transition de phase sont différentes [56].

La complexité des membranes biologiques et leurs interactions avec les composants intra et extracellulaires rendent les investigations directes difficiles d'où le développement de membranes modèles.

I-2 Membranes modèles

La réalisation de membranes modèles ou biomimétiques qui sont généralement des bicouches de phospholipides dans lesquelles sont insérés des récepteurs biologiques, des protéines, constituent un outil indispensable à l'étude des membranes biologiques et la compréhension de leurs caractéristiques chimiques et fonctionnelles.

Elles permettent d'étudier les interactions protéine /lipide, de mettre en évidence le rôle d'un constituant bien identifié dans un processus biologique et peuvent servir également à la réalisation de biocapteurs. Les membranes modèles constituent également des systèmes très intéressants pour étudier le comportement rhéologique dans et autour de la cellule. Les nombreux modèles de membranes artificielles développés ont joué un rôle important dans la compréhension de leurs caractéristiques chimiques et fonctionnelles. Ces modèles constituent les vésicules lipidiques et les bicouches planes.

I-2-1 Les vésicules lipidiques

La vésicule lipidique (également appelée liposome) représente une bicouche lipidique refermée sur elle-même formant ainsi une membrane qui sépare le milieu aqueux intérieur du milieu aqueux extérieur à la vésicule.

Les liposomes sont classés selon leur taille et le nombre de bicouches lipidiques concentriques.

On distingue (Figure I-10) :

- (i) les liposomes multilamellaires appelés **MLVs** pour "multilamellar large vesicles",
- (ii) les liposomes unilamellaires de petite taille, appelés **SUVs** pour "small unilamellar vesicles" (40 à 100 nm de diamètre),
- (iii) les liposomes unilamellaires de grande taille **LUVs**, pour "large unilamellar vesicles" (100 à 500 nm de diamètre),
- (iv) et enfin les liposomes géants, appelés **GUVs** pour "giant unilamellar vesicles" (500 nm à 100 µm de diamètre); visibles par microscopie optique.

Il existe plusieurs méthodes pour la formation des vésicules dont la plupart repose sur le fait que les lipides possèdent une propension naturelle d'auto-assemblage en vésicules. L'agitation physique, par exemple, provoquée par ultrasons ou par filtration à travers une membrane poreuse peut largement faciliter le processus. Ces techniques se sont avérées nécessaires pour la préparation reproductible de populations de vésicules unilamellaires homogènes en forme et en taille.

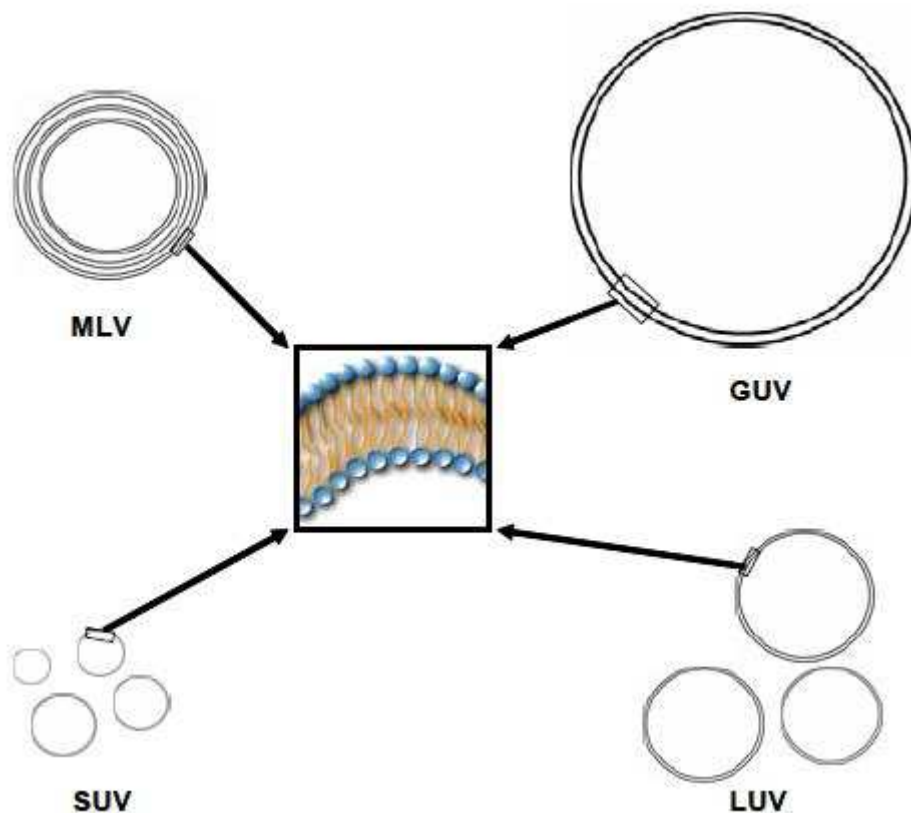


Figure I-10. Représentation schématique des différents types de liposomes. D'après Avanti polar Lipids.

Différentes méthodes pour obtenir des GUVs ont été également décrites dans la littérature. L'une de ces méthodes est basée sur l'hydratation d'un film de lipides séché par une solution aqueuse mais sa durée est assez longue, en moyenne une trentaine d'heure « méthode corse » [57]. Une autre technique basée sur l'évaporation de solvant organique dans une solution aqueuse a été présentée par Moscho *et al.* [51]. Un des avantages de cette méthode est la courte durée nécessaire pour obtenir des GUVs.

I-2-1-1 Adsorption de liposomes à une interface solide-liquide

Lorsqu'un liposome rencontre une surface, il a tendance à former soit une monocouche ou une bicouche de lipides, soit à garder sa forme sphérique et à n'adhérer que très faiblement au substrat [58-60].

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.

Lorsqu'une vésicule s'approche d'une surface, elle va d'abord s'adsorber. De plus, si les interactions liposomes-surface sont fortes, il se produit une déformation importante des liposomes, induisant la rupture et l'étalement des lipides à l'interface solide-liquide [60,61].

En cas d'interaction faible, les vésicules restent intactes lors de leur adhésion au substrat.

Le problème est cependant plus complexe car il faut considérer les interactions liposomes-liposomes en plus des interactions liposome-surface. Si les interactions liposomes-liposomes l'emportent sur les interactions liposomes-surface, les vésicules ont tendance à fusionner les unes avec les autres, donnant lieu à la formation d'une bicouche lipidique.

Les interactions liposomes-liposomes sont directement reliées à la concentration de liposomes à adsorber. Plus la concentration en liposomes est élevée et plus la probabilité de fusion est grande. Si la concentration en vésicules est suffisante, il se forme très rapidement une bicouche lipidique sur une surface de silice propre. Ceci implique d'abord l'adsorption puis la rupture des vésicules.

I-2-2 Les bicouches planes

Les bicouches lipidiques, supportées sont des systèmes biomimétiques à deux dimensions facilement accessibles à des techniques de caractérisation de surface du fait de leur localisation dans l'espace [62-64]. L'épaisseur de la bicouche varie entre 4 et 7 nm suivant les lipides qui la constituent.

Grâce aux travaux de McConnel *et al.* [65], 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 [1,66] et pour le développement de nouvelles surfaces biofonctionnalisées. Actuellement, elles sont de loin les systèmes modèles de membrane cellulaire les plus utilisés. 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.

I-2-3 Dynamique dans les vésicules libres et les bicouches lipidiques supportées

De nombreux travaux [67-69] ont rapporté que les coefficients de diffusion des lipides marqués dans les bicouches lipidiques supportées et dans les GUV par les techniques de FRAP et de FCS étaient comparables.

Plus récemment, une étude par FCS (Fluorescence Correlation Spectroscopy) [70] a montré que la diffusion dans les GUV (où les membranes sont libres) était deux fois plus rapide que dans les bicouches lipidiques supportées dans les mêmes conditions (force ionique, pression osmotique). Par des études de la diffusion brownienne des monocouches de Langmuir en phase fluide par SPT (suivi de particule unique), Forstner *et al.*[71] 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 [72,73]. Quelques exemples de coefficient de diffusion sont présentés dans le tableau I-1.

lipides	système	T °C	D × 10 ⁸ (cm ² /s)
POPC (T _m = 5°C)	multicouches	20	3.4 ± 0.3
DLPC (T _m = -2°C)	multicouches	20	4.6 ± 0.3
DPPC (T _m = 41°C)	MLV	< T _m	0.4 × 10 ⁻²
DPPC	MLV	> T _m	1
DMPC (T _m = 24°C)	MLV	< T _m	1 × 10 ⁻²
DMPC	MLV	> T _m	1.6
DMPC	bicouche sur silicium	20	0.66
DMPC	bicouche sur silicium	30	3.7

Tableau 1.1 Exemples de coefficients de diffusion latérale mesurés dans différents systèmes en utilisant le FRAP (retour de la fluorescence après photoblanchiment) en spot.

I-2-3-1 Diffusion transversale

En utilisant la spectroscopie vibrationnelle par génération des fréquences sommes (SFVS), Liu *et al.* [74] 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 [75]. 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 altèrait 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 [76].

I-3 Adsorption des protéines sur des surfaces solides

L'adsorption des protéines sur une surface solide est le premier phénomène qui se produit lors de la mise en contact d'une surface solide avec une solution de protéines.

Ce phénomène se produit spontanément et constitue un problème majeur essentiellement dans les greffes où le plasma est en contact avec une surface étrangère. Ainsi le succès d'une greffe ou l'intégration d'un matériau implanté dans un organisme dépend en grande partie de la nature des premières molécules protéiques adsorbées à la surface entre le matériau et le fluide biologique qui vont ensuite favoriser sa colonisation par les tissus environnants.

Dans la plupart des implantations telles que les os, tissu, en dentaire, une excellente adhésion de protéines sélectionnées conduit dans la plupart des cas à une biocompatibilité meilleure. Par contre, plusieurs applications telles que la filtration du sang en dialyse ou les implants de lentilles cornéennes exigent des propriétés non adhésives du matériau envers les cellules.

Dans des cas spéciaux tels que les biocapteurs, on a besoin d'une adsorption spécifique de protéines particulière pour obtenir une surface bien caractérisée qui est réactive envers des espèces biologiques spécifiques. La nature de la couche adsorbée dépend aussi

bien des caractéristiques de la molécule et de la surface que des conditions dans lesquelles l'adsorption s'effectue.

Dans le cadre de cette thèse, nous nous sommes intéressés à l'adsorption de protéines sur surfaces solides pour mettre au point des techniques de caractérisation des protéines par couplage de bille fluorescentes, et aussi afin d'établir un contrôle d'adsorption non spécifique par rapport à l'insertion de protéines dans des bicouches. Ce contrôle est nécessaire, par exemple, afin de vérifier si un niveau de fluorescence détecté pourrait être dû à une adsorption dans des défauts des bicouches et non pas une insertion dans les lipides.

CHAPITRE II

Microscopie à Force Atomique et Microscopie de Fluorescence

CHAPITRE II

Microscopie à Force Atomique et Microscopie de Fluorescence

Deux techniques de caractérisation ont été utilisées dans cette : la microscopie de fluorescence et la microscopie à force atomique dont les principes sont détaillés dans ce chapitre.

II-1 La Microscopie à force atomique

La microscopie à force atomique [76,77] fait partie des microscopies à champ proche appelées aussi microscopes à sonde locale. Elle a été inventée dès 1986 par Binnig, Quate et Berger à partir de la microscopie à effet tunnel [78] (ou STM, scanning tunneling microscopy). A la différence du STM, qui utilise les variations d'un courant tunnel pour observer une surface, l'AFM est basée sur les variations d'interaction entre une sonde (pointe) de dimension très faible et une surface.

II-1-1 Dispositif

Une tête d'AFM (Figure II-2) comprend trois composants principaux :

- une sonde, constituée d'une pointe fine de forme pyramidale ou conique, d'une hauteur de quelques micromètres et d'un rayon de courbure d'une dizaine de nm à son extrémité, supportée par un levier d'une centaine de micromètres de long, de quelques dizaines de micromètres de large et de quelques micromètres d'épaisseur (Figure II-1) ;
- un détecteur de déflexion du levier, constitué d'un laser, un miroir de réflexion et un capteur photodiode,
- un système de positionnement piézo-électrique permettant les déplacements dans les trois directions de l'espace et une excitation verticale de la sonde à haute fréquence.

Microscopie à force atomique et microscopie de fluorescence

Les leviers utilisés en AFM sont aussi appelés cantilevers. De ce fait, ils sont généralement en silicium ou en nitrure de silicium (Si_3N_4). Il existe deux types de microlevier selon leur forme : triangulaire et rectangulaires (Figure II-1).

La constante de raideur des leviers peut aller de quelques dixièmes à quelques dizaines de N/m ; elle dépend de la forme du levier. Les leviers les plus épais et les plus courts sont les plus rigides. Les fréquences de résonance fondamentales se situent entre quelques dizaines et quelques centaines de kHz. Les leviers les plus épais et les plus courts sont aussi ceux dont la fréquence de résonance est la plus élevée.

Généralement, les pointes sont intégrées aux leviers. Elles doivent être aussi fines que possible puisque c'est d'elles que dépend la résolution. Les méthodes de microfabrication permettent de concevoir des pointes d'un rayon de courbure à l'apex de quelques nanomètres à plusieurs dizaines de nanomètres. Les pointes peuvent être de forme conique ou pyramidale.

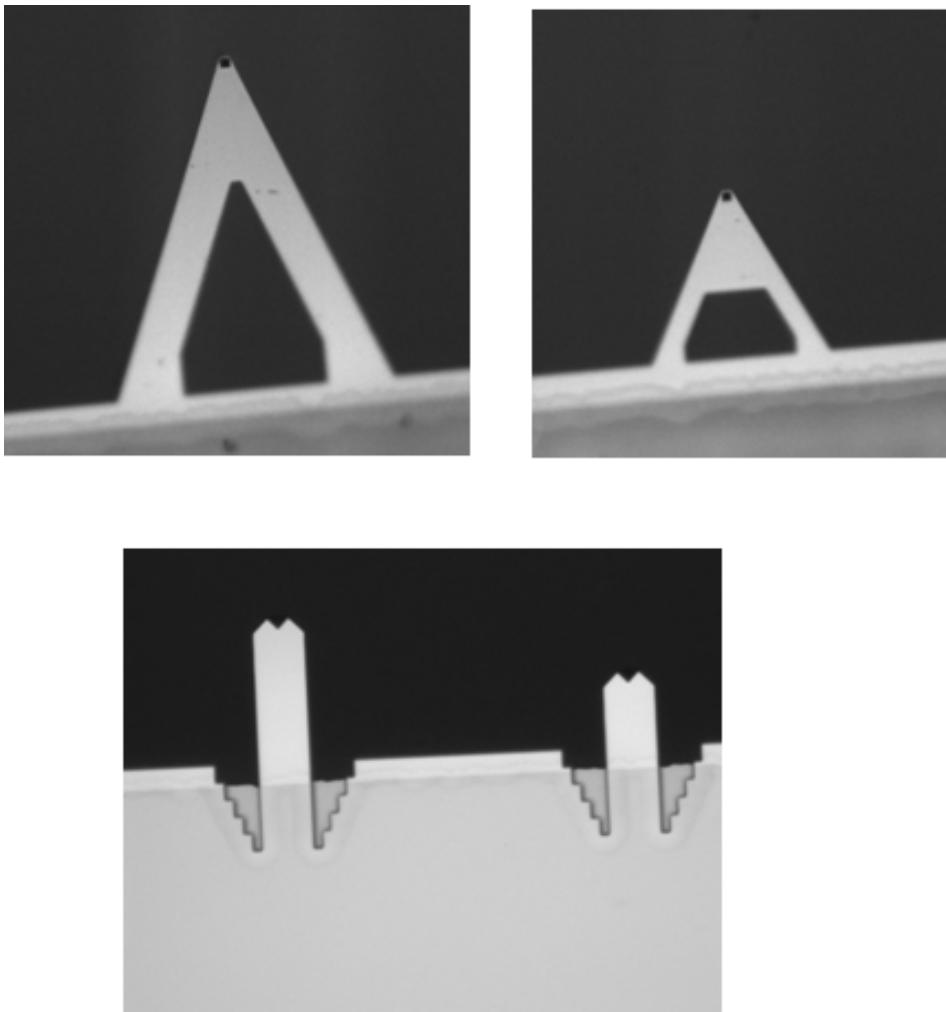


Figure II-1. Différents types de microlevier, image d'en en haut triangulaires, en bas rectangulaires.

II-1-2 Principe de fonctionnement de l'AFM

Le principe général de fonctionnement du microscope à force atomique tel qu'il est schématisé sur la figure II-2 est le suivant :

L'échantillon étudié est monté sur un tube piézo-électrique qui permet des déplacements dans les trois directions de l'espace. Lorsque la pointe est approchée de la surface, une force de quelques nanonewtons est exercée sur elle, ce qui entraîne une déflexion du levier. La détection des déflexions du levier est assurée par un système optique grâce aux déplacements d'un faisceau laser. Il est focalisé à l'extrémité du levier sur sa face supérieure puis est réfléchi via un miroir vers un système de détection optique constitué de photodiodes à quatre cadrans. Chaque cadran délivre une tension proportionnelle à sa surface éclairée ; on peut ainsi suivre les mouvements verticaux et horizontaux du faisceau laser associés respectivement aux déflexions et torsions du levier. Ce système permet d'obtenir une résolution verticale inférieure à l'Å.

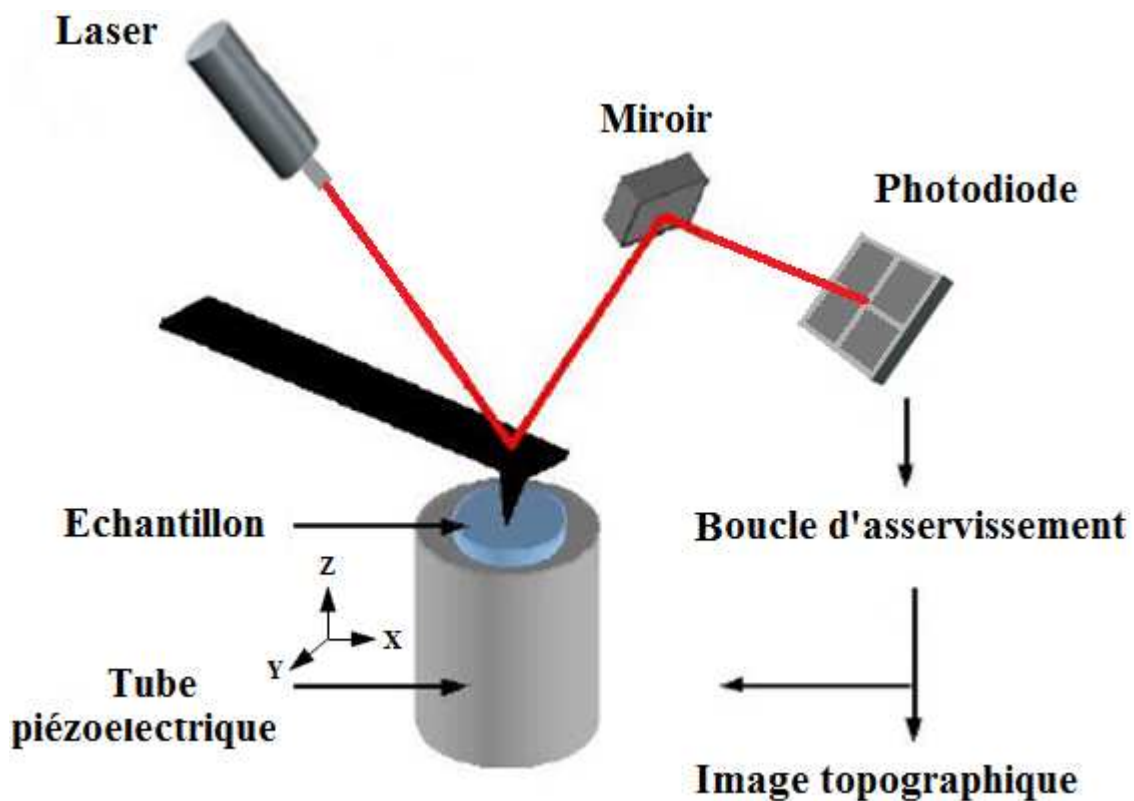


Figure II-2. Dispositif et principe de fonctionnement du microscope à force atomique : un faisceau laser détecte la déflexion verticale du levier par la mesure de la position verticale du faisceau réfléchi dans la photodiode à quadrants. Une boucle d'asservissement maintient la déflexion δZ du levier constante en agissant sur le tube piézoélectrique dont les variations de tension servent à la construction topographique des images.

II-1-3 Le principe d'imagerie AFM

Dans le mode de base d'imagerie à force constante (appelé mode contact), la force appliquée par la pointe sur la surface de l'échantillon est maintenue constante par des déplacements en z de la céramique piézo-électrique. La céramique déplace aussi l'échantillon ou la pointe dans le plan (x,y) . En AFM (Figure II-2). Le signal de mesure est la position du faisceau laser réfléchi par le levier dans une photodiode à quatre quadrants. Toute déflexion verticale du levier se traduit par une variation de l'aire illuminée des quadrants du haut et du bas. La différence d'éclairement entre ces quadrants se traduit par une différence de courant (quelques nA) convertie en tension. Pour faire une image, la pointe balaie la surface à force constante (déflexion constante). Une boucle d'asservissement (boucle de contre-réaction électronique) maintient cette force constante en mode contact en commandant le déplacement en z de l'échantillon par la céramique piézo-électrique. La mesure de ce déplacement selon z permet de retranscrire la topographie de l'échantillon.

En résumé, on obtient par AFM une image iso-force de la surface, qui permet de remonter à la topographie de la surface.

Le grand avantage de l'AFM par rapport au STM est qu'il peut être utilisé avec des échantillons non conducteurs, ce qui facilite ainsi l'étude des échantillons biologiques (plus besoin de métalliser la surface comme pour le STM). Les échantillons n'ont pas besoin d'être fixés ou coupés en tranches puis placés dans le vide comme en microscopie électronique. L'AFM peut fonctionner parfaitement en liquide (eau, tampon).

II-1-4 Les forces en microscopie à force atomique

Une première approche pour décrire les forces mises en jeu en microscopie à force atomique consiste à considérer l'énergie d'interaction qui existe entre deux atomes (ou molécules) non liés. Cette énergie est très souvent exprimée sous la forme d'un potentiel par paire de Lennard-Jones. Ce potentiel est la combinaison d'une interaction attractive de Van der Waals qui prédomine à "grande distance" de séparation et d'une interaction répulsive qui intervient de façon prépondérante à "faible distance" lorsque les orbitales atomiques tendent à s'interpénétrer (principe d'exclusion de Pauli). La force interagissant entre les deux atomes et qui dérive de ce potentiel est illustrée sur la figure II-3.

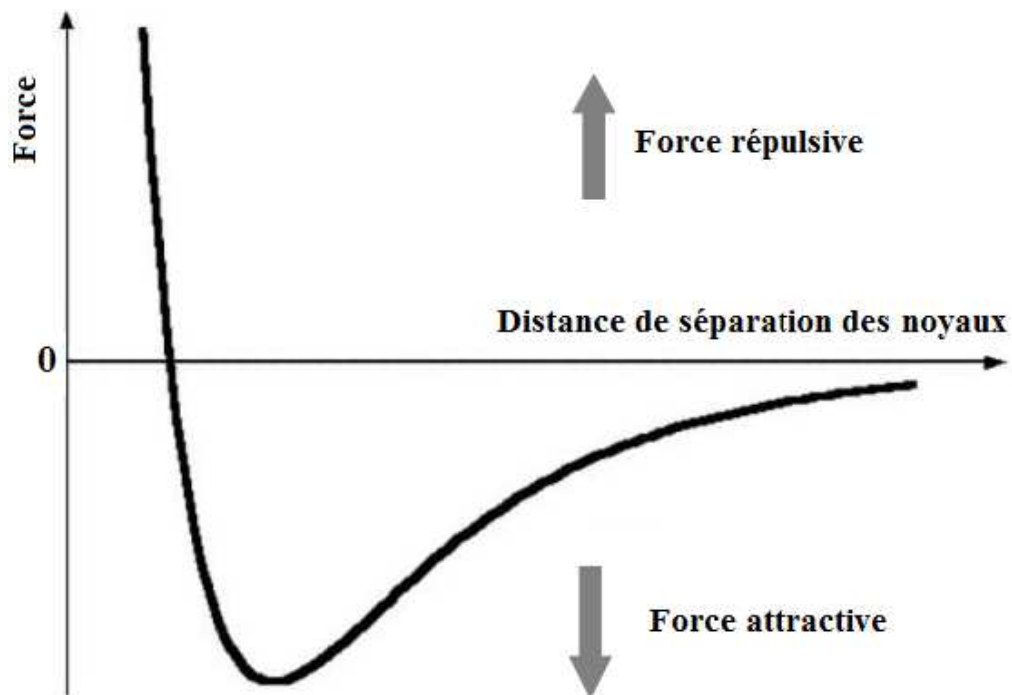


Figure II-3. Représentation de la force d'interaction interatomique selon un potentiel de Lennard-Jones.

II-1-4-1 Forces de Van der Waals

Les forces attractives regroupent principalement les forces de Van der Waals [79]. Il y a trois contributions aux forces de Van der Waals. La première est la polarisation due à certains atomes ou molécules possédant un moment multipolaire permanent. Ils peuvent en outre créer des moments dans les molécules non polaires, ce qui constitue la seconde contribution au potentiel de Vander Waals. Enfin, la troisième contribution est appelée dispersion et correspond à la polarisation instantanée créée par les fluctuations de la position des atomes autour du noyau. Les forces de Van der Waals agissent sur des distances supérieures au 100nm et sont suffisamment fortes pour provoquer une déflexion du microlevier AFM par action de la pointe.

Cependant, en microscopie à force atomique, il convient de considérer l'interaction entre surfaces et non entre atomes ou molécules et il faut donc sommer toutes les contributions. Ces calculs ont été effectués pour différentes géométries (tableau II-2) en introduisant la constante de Hamaker A_H définie par la relation [79]:

$$A_H = \pi^2 C_L \rho_1 \rho_2 \quad (\text{II-1})$$

Avec C_L la constante de London et ρ_1 et ρ_2 sont les densités respectives des deux solides.

Géométrie	Potentiel d'interaction	Force de van der Waals
Sphère-sphère	$U(r) = \frac{-A_H}{6r} \frac{R_1 R_2}{R_1 + R_2}$	$F(r) = \frac{-A_H}{6r^2} \frac{R_1 R_2}{R_1 + R_2}$
Sphère-plan	$U(r) = \frac{-A_H R}{6r}$	$F(r) = \frac{-A_H R}{6r^2}$
Plan-plan	$U(r) = \frac{-A_H}{12\pi r^2}$	$F(r) = \frac{-A_H}{6\pi r^3}$

Tableau II-1. Expression des potentiels d'interaction et des forces de Van de Waals pour les principales géométries, avec R le rayon des sphères, A_H la constante de Hamaker et r la distance d'interaction.

II-1-4-2-Forces répulsives

Lorsque la pointe est à quelques angströms de la surface, il apparaît une force de répulsion créée par la répulsion coulombienne et par l'interpénétration des orbitales électroniques. En effet le principe d'exclusion de Pauli interdit la présence, au même endroit, de deux électrons dans le même état quantique, ce qui ne manquerait pas d'arriver si la pointe s'approche trop près de la surface. Cette interaction a une très courte portée (quelques angströms tout au plus).

Il y a aussi d'autres forces d'interactions telles que les forces magnétiques, les forces électrostatiques, la friction ou la capillarité.

II-1-5 Les modes d'imagerie de l'AFM : avantages et inconvénients

Comme nous venons de le voir, l'AFM est très sensible à différentes forces agissant entre la pointe et la surface. Par la variété de celles-ci, en plus de son rôle classique de caractérisation de la topographie des surfaces, l'AFM est devenu, à travers différents modes d'utilisation, un outil très performant pour l'analyse et la caractérisation des propriétés physico-chimiques de surface à l'échelle nanométrique. On peut classer ces modes selon deux catégories : la première regroupe les techniques classiques pour obtenir une cartographie de la

topographie de surface (contact, non contact, contact intermittent), alors que la seconde rassemble les différents modes utilisés lors des études nanomécaniques (friction, modulation de force, modulation latérale).

II-1-5-1 Mode contact

Comme nous l'avons expliqué plus haut, dans ce mode, la sonde est physiquement constamment au contact de la surface durant le balayage de la surface par la pointe et les forces agissant entre la pointe et la surface sont à l'origine de la déflexion du levier.

Cette méthode n'est pas adaptée à l'étude de surfaces fragiles qui peuvent être endommagées par les forces de cisaillement s'exercent au contact pointe – surface, lors de ce balayage.

Quand la pointe et l'échantillon sont en contact, la force d'interaction F est responsable de la déflexion Δz du microlevier selon la loi de Hooke :

$$F = k \Delta z \quad (\text{II-2})$$

Où k est la constante de raideur du microlevier.

La pointe peut repérer des aspérités de l'échantillon de l'ordre de son rayon de courbure terminal. La force appliquée doit être très faible ; on peut atteindre des forces minimales de l'ordre de 100 pN dans ce mode. En effet, c'est la force nécessaire pour déplacer un atome (casser une liaison chimique d'environ 1eV) sur une distance de 1 nm. Afin de minimiser ces forces, deux autres modes de contact dits intermittents [80,81] ont été développés de telle sorte que la sonde oscille au dessus de la surface.

II-1-5-2 Mode tapping (ou mode contact intermittent)

Le contact pointe-surface n'est plus qu'intermittent durant le balayage de l'échantillon sous la pointe [82]. Plus précisément, le levier vibre à une fréquence proche de sa fréquence de résonance et la pointe balaye la surface de l'échantillon. La surface de l'échantillon est maintenue à une distance de la position d'équilibre du levier telle que l'amplitude des oscillations du levier est maintenue constante par la boucle d'asservissement et est égale à une valeur de consigne. Les amplitudes sont de l'ordre de 20 à 100 nm. Elles changent quand la pointe balaye une surface dont le relief est en bosse ou en creux. Les changements en amplitude et en phase (qui consiste à détecter les variations de phase entre le signal excitateur et la réponse du microlevier) des oscillations à proximité de la surface sont enregistrés. La

topographie de la surface est obtenue en maintenant l'amplitude constante (par analogie, en mode contact, c'est le signal de déflexion absolu qui est maintenu constant). L'échantillon est moins endommagé dans ce mode, et il permet d'accéder à une plus haute résolution latérale. Ce mode est également aussi assez peu sensible aux dérives du signal absolu de déflexion dues aux dilatations thermiques. On peut donc travailler plus longtemps et à plus basse vitesse ce qui peut améliorer la résolution et le confort.

Cependant, l'observation d'un échantillon en milieu liquide est assez compliquée due à l'existence de multiples pics de résonance parasites.

II-1-5-3 Mode non-contact

Dans ce mode, la pointe n'entre pas en contact avec la surface mais oscille à une fréquence au-dessus de la fréquence de résonance du levier à une distance plus ou moins proche de la surface. Les oscillations du levier sont inférieures à 10 nm (Figure II-4). C'est la fréquence d'oscillation du levier qui est maintenue constante et égale à une valeur de consigne à une distance de la position d'équilibre du levier comme en mode tapping. L'échantillon est encore moins endommagé qu'en mode tapping ou bien sûr qu'en mode contact.

L'amplitude des oscillations est suffisamment faible pour que le microlevier reste en régime attractif [83]. Ainsi, à une distance z de la surface, la force attractive F_{att} modifie la raideur effective k_{eff} du ressort selon la relation :

$$k_{eff} = k_F - \frac{\partial F_{att}}{\partial z} \quad (\text{II-3})$$

Il en résulte ainsi une variation de la fréquence de résonance et donc une variation de l'amplitude de vibration. Ce mode n'est néanmoins parfois pas très stable.

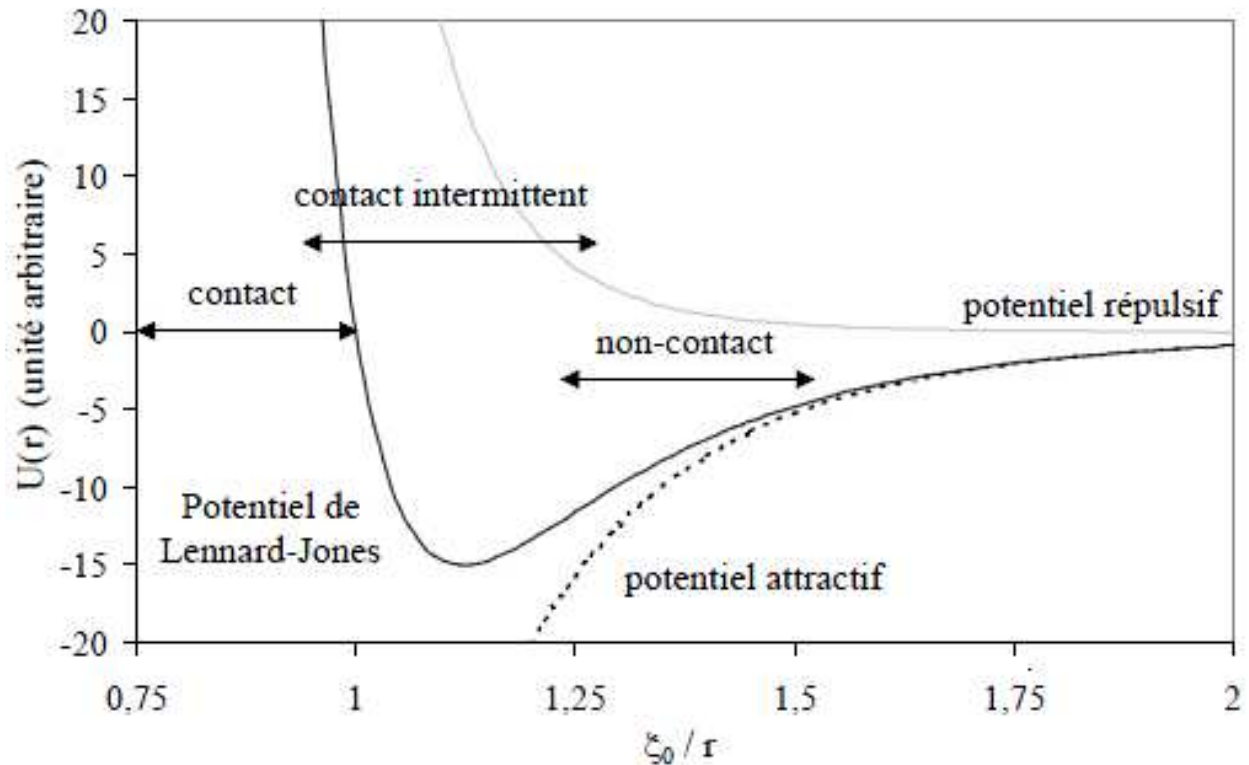


Figure II-4. Représentation du potentiel de Lennard-Jones. L'AFM s'utilise avec un régime répulsif (mode contact), un régime attractif (mode non-contact), ainsi que la combinaison des deux (mode intermittent).

II-1-6 Courbes force-distance

II-1-6-1 principe

Ce mode consiste à construire une courbe d'approche-retrait (appelée aussi courbe de force) de la pointe par rapport à la surface (Figure II-5). Le principe de la mesure de force AFM consiste à mesurer la déflexion du levier de l'AFM en fonction du déplacement de la céramique piézo-électrique. La boucle d'asservissement qui maintient constante la position du levier est coupée. La pointe ne balaie plus la surface de l'échantillon, elle sonde la surface en un point (x,y) grâce au déplacement en z de la céramique piézo-électrique. Le système d'acquisition du signal peut ainsi tracer les variations du signal en fonction de la distance entre la pointe et l'échantillon.

II-1-6-2 Interprétation de la courbe force-distance

L'interprétation de cette courbe est la suivante [84,85] : En partant d'une position éloignée de l'échantillon (1), la surface est progressivement rapprochée de la pointe. Entre les

points 1 et 2, aucune déviation du levier n'est observée, car il n'y a aucune force d'interaction entre la pointe et l'échantillon.

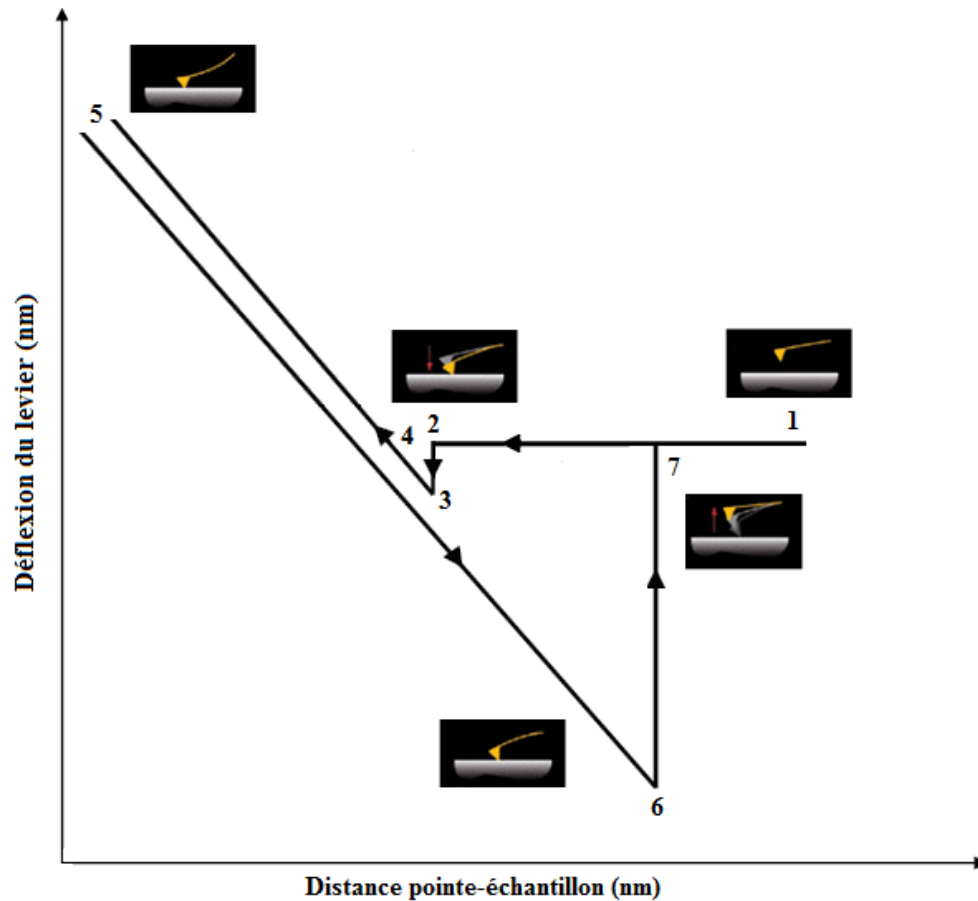


Figure II-5. Courbe force-distance.

Lorsque la pointe s'approche de la surface, les forces de Van Der Waals, agissent à longue portée, le levier commence à fléchir (2) ; il se produit une instabilité. En effet, à ce moment, le gradient de la force attractive devient supérieur à la constante de rappel du microlevier et celui-ci est attiré brusquement à la surface de l'échantillon. Les conditions expérimentales vont varier la distance à laquelle intervient cette instabilité (la hauteur de cette déviation est proportionnelle à la force attractive).

Le point (3) correspond à la force attractive maximale. Si la pointe continue à pénétrer dans le matériau, le sens de la déviation du levier s'inverse, les forces répulsives croissent jusqu'au point (4) où elles compensent exactement les forces attractives : le microlevier est au repos comme en (1). Au-delà, l'interaction répulsive domine et le microlevier change de courbure ; la déviation augmente linéairement.

A partir du point (5), le mouvement de l'échantillon est inversé ; l'échantillon continue à s'éloigner, et la pointe reste au contact de la surface grâce aux forces d'adhésion (F_{adh}) jusqu'au point (6) où il se produit une seconde instabilité : la force élastique du levier l'emporte sur la force d'adhésion, ce qui ramène le microlevier au repos.

La différence entre les points (6) et (7) donne une mesure des interactions à longue distance et permet, si on connaît la raideur du levier, de calculer la force d'adhésion maximale entre la sonde et la surface.

Les courbes force-distance ont été initialement surtout utilisées pour la mesure des forces d'adhésion puis ont rapidement été détournées pour être utilisées à l'indentation des surfaces grâce à la maîtrise des forces appliquées entre la pointe et la surface [86].

II-1-6-3 Hystérésis d'adhésion

Plusieurs études [87,88] ont permis de montrer que l'aire comprise entre la courbe d'approche (aller) et celle de retrait (retour) de la pointe AFM de la surface testée est proportionnelle à l'énergie d'adhésion emmagasinée durant le contact qui est pour cette raison appelée hystérésis d'adhésion. Pour en avoir la valeur exacte, il faut enlever l'influence de la raideur du contact et du levier AFM utilisé : cela se fait en redressant la courbe (Figure II-6). La force F est convenablement convertie à partir de la raideur k du levier et la « distance » correspond ici à la vraie distance pointe échantillon h :

$$h = Z_p + F/k \quad (\text{II-4})$$

Ceci passe par une étape de calibration du levier AFM.

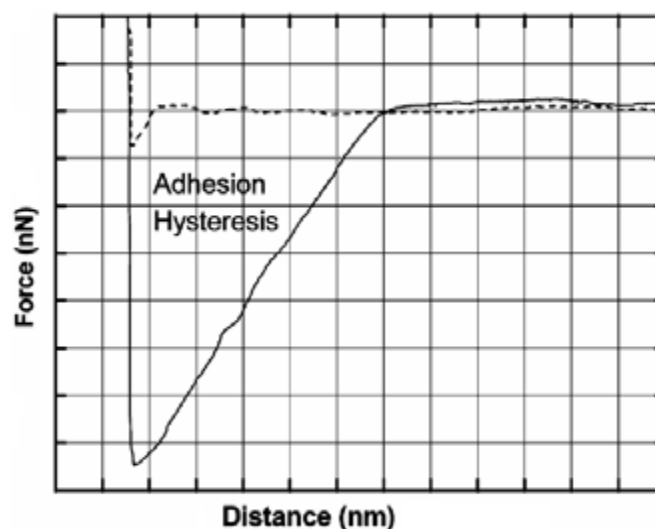


Figure II-6. Redressement de la courbe AFM pour pouvoir calculer l'énergie d'adhésion de la surface testée.

II-1-7 Appareillage utilisé

Dans notre étude, nous avons utilisé essentiellement l'AFM dans les deux modes : en imagerie afin de vérifier la topographie des bicouches lipidiques (chapitre III) ; et en mesure de force pour la nanomécanique que nous allons détailler dans le chapitre IV. Nous avons travaillé en milieu liquide sur deux types de microscopes commerciaux : le Topometrix Explorer (Santa Barbara, CA) et le (Multimode Nanoscope III, Veeco Instruments, Santa Barbara, CA) équipé d'un scanner liquide J (Figure II-7).



Figure II-7. Le microscope à force atomique, Multimode NanoScope III, ici en milieu liquide.

II-1-7-1 Calibration du microlevier

Actuellement, la méthode du bruit thermique de par sa simplicité est largement utilisée pour calibrer la raideur des leviers [89]. Elle consiste à mesurer l'amplitude Z des vibrations d'origine thermique du levier libre hors contact en utilisant le théorème d'équipartition de l'énergie. Le théorème d'équipartition attribue la même énergie à chaque degré de liberté de tout système thermodynamique. Ainsi, à température absolue T , tous les modes propres de vibration d'un microlevier possèdent la même énergie thermique égale à $1/2k_B T$; avec k_B la constante de Boltzmann. Si le microlevier est loin de la surface, on peut considérer que ses mouvements sont uniquement créés par le bruit thermique (si l'on considère que le système est isolé d'autres sources de bruit comme les vibrations mécaniques) et si le microlevier est modélisé par un ressort, l'énergie E du système s'écrit [90]:

$$E = 1/2k_B T = 1/2K_f \langle x^2 \rangle \quad (\text{II- 4})$$

où K_f est la raideur du levier et $\langle x^2 \rangle$ la moyenne quadratique de l'amplitude de vibration du microlevier.

Nous avons utilisé des microleviers en nitrure de silicium Si_3N_4 , (NP Veeco) de raideur 0.06 et 0.12N/m ainsi que des pointes OMCL TR400PSA (Olympus, Japan) de raideur 0.08N/m.

Nous avons utilisé aussi des pointes biolevers BL-RC150VB- séries (Olympus, Japan) pour imager les protéines ; leur raideur étant de 0.03N/m et 0.006N/m.

La calibration a été réalisée en utilisant la méthode du bruit thermique avec un microscope Asylum MFP-3D Stand Alone AFM (en collaboration avec A. Piednoir, LPMCN, UCBL).

II-1-7-2 Caractérisation des pointes AFM (Mesure du rayon de courbure)

La pointe est un élément très important puisque la géométrie réelle du contact n'est pas définie tant que la forme de la pointe n'est pas connue et, puisqu'il est nécessaire de connaître son rayon de courbure pour effectuer toute mesure quantitative.

Ainsi, nous avons réalisé des images par microscope électronique à balayage (MEB) des pointes (Figure II-8) (en collaboration avec A.-M. Trunfio-Sfarghiu, INSA de Lyon) avant de déterminer le rayon de courbure.

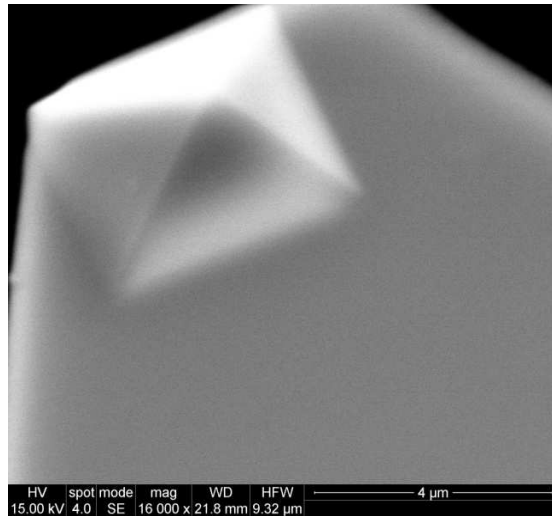


Figure II-8. Image MEB d'une sonde AFM.

Il a été montré [91-94] que l'on pouvait extraire la géométrie de la pointe à partir d'images topographiques d'une surface constituée de pics d'angle au sommet plus petit que celui de la pointe par effet miroir (réseau TGT1, NT-MDT, Zelenograd, Moscow, Figure II-9), [95] : On obtient ainsi une représentation en trois dimensions de la pointe (Figure II-10).

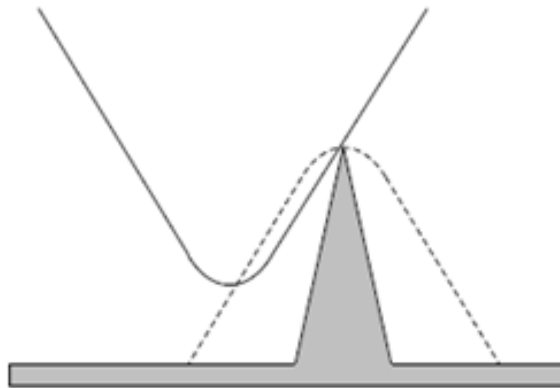


Figure II-9. Lorsque la pointe image un objet dont l'angle au sommet est plus petit que le sien, l'image obtenue est celle de la pointe (en pointillé).

Nous avons trouvé des valeurs individuelles de rayon de 20- 40nm (Figure II-10); le rayon nominal donné par le constructeur étant de 20-60nm.

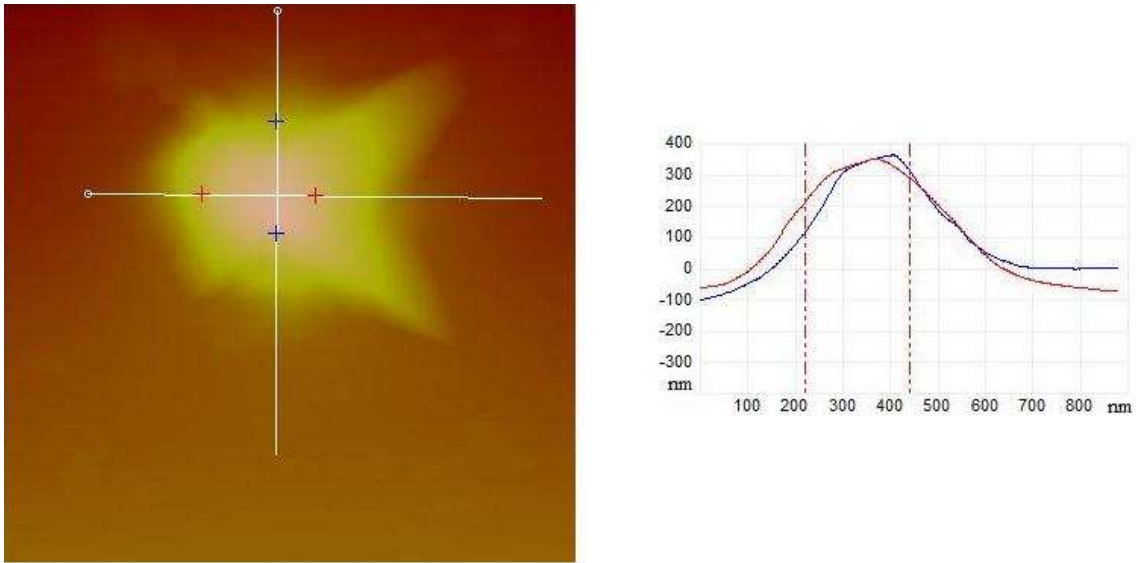


Figure II-10. Mesure du rayon de courbure de la pointe AFM avec la grille TGT1.

II-2 Microscopie de Fluorescence

II-2-1 Principe

La fluorescence est la propriété que possèdent certains corps d'émettre de la lumière après avoir absorbé des photons de plus haute énergie. La microscopie de fluorescence repose sur la formation d'une image par détection de cette lumière émise. Le principe de la microscopie de fluorescence est schématisé sur la figure II-11 : La source de lumière de ce microscope est une lampe à vapeur de mercure qui émet une lumière ayant toute les longueurs d'onde du visible. Le diaphragme de champ d'ouverture nous aide à réaliser la mise au point du microscope et à focaliser le faisceau sur la surface d'un objet transparent (par exemple : surface de verre).

Nous avons utilisé un microscope optique droit (Leica, DMLM) équipé d'une lampe à mercure, d'un objectif de grossissement commercial 20 (Leica PL Fluotar) et d'une caméra C.C.D refroidie (Leica DC 350F). Les observations ont eu lieu à température ambiante. Pour les visualisations on introduit deux filtres et un miroir dichroïque dans le « cube de fluorescence » entouré sur la figure II-11. Nous avons utilisé sur le microscope Leica un cube I3.

- le premier filtre la lumière issue de la source à vapeur de mercure. Il laisse passer seulement la lumière ayant une longueur d'onde capable d'exciter les molécules fluorescentes (par

Microscopie à force atomique et microscopie de fluorescence

exemple le NBD-PC pour les bicouches lipidiques fluorescentes) qui se trouvent sur la surface analysée (à environ 480 nm - lumière bleue - pour le NBD-PC).

- le deuxième, filtre la lumière réfléchi et émise par l'objet. Il laisse passer seulement la lumière ayant une longueur d'onde égale à la longueur d'onde d'émission des molécules fluorescentes qui se trouvent sur la surface analysée (à environ 520 nm - lumière verte - pour le NBD-PC).
- La caméra de fluorescence enregistre les images issues du microscope en transformant les intensités de fluorescence en chaque pixel en nuances de gris : les zones plus claires correspondant à des détails plus fluorescents par rapport aux zones sombres qui ont moins de fluorescence.

Il est important pour comparer les images prises avec le même objectif de garder toujours constants les paramètres principaux de la caméra qui sont le temps d'exposition, le gain, le minimum et le maximum de l'échelle enregistrée des niveaux de gris.

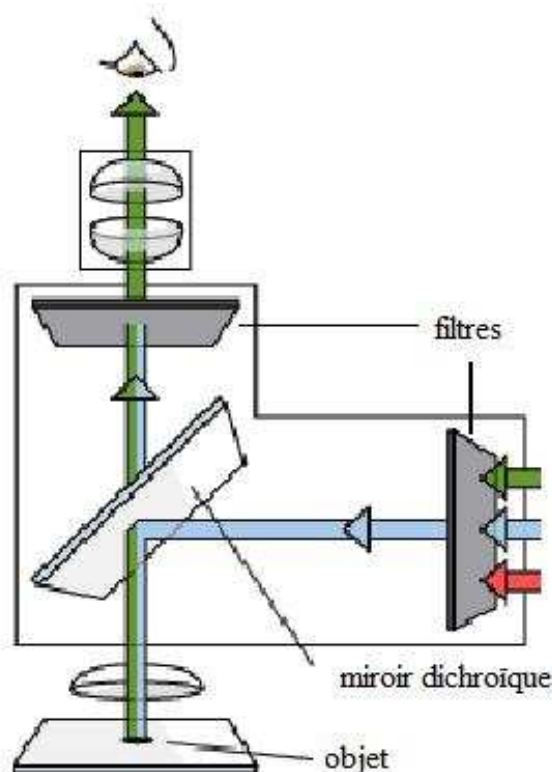


Figure II-11. Principe de fonctionnement du microscope de fluorescence : La lumière provient de la lampe à mercure à droite, elle passe un premier filtre qui sélectionne sa longueur d'onde, elle est réfléchi à 90° par le miroir dichroïque à cette longueur d'onde, excite la fluorescence de l'échantillon. On collecte la fluorescence réfléchi (épi-fluorescence) qui est transmise par le miroir dichroïque puis à nouveau séparée de toute autre longueur d'onde résiduelle par le 2^{ème} filtre.

II-2-2 Marquage des lipides

Des phospholipides marqués sur l'une des chaînes grasses par un fluorophore se mélangent facilement avec un phospholipide diluant, classiquement une sorte de PC. Comme ces molécules sont de véritables phospholipides, elles peuvent être incorporées à une concentration comprise entre 1 et 10 mol% de la quantité totale de lipide, sans déstabilisation de la structure en bicouche.

Dans notre cas, nous avons utilisé le NBD-PC « 1-palmitoyl-2-{6-[(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino] hexanoyl}-sn-glycero-3 phosphocholine » (Avanti Polar Lipids) qui est un fluorophore dont la partie fluorescente est liée chimiquement sur l'une des queues lipidiques. Le NBD-PC a une longueur d'onde d'excitation de 465 nm en lumière bleue et d'émission de 538 nm (lumière verte) (Figure II-12).

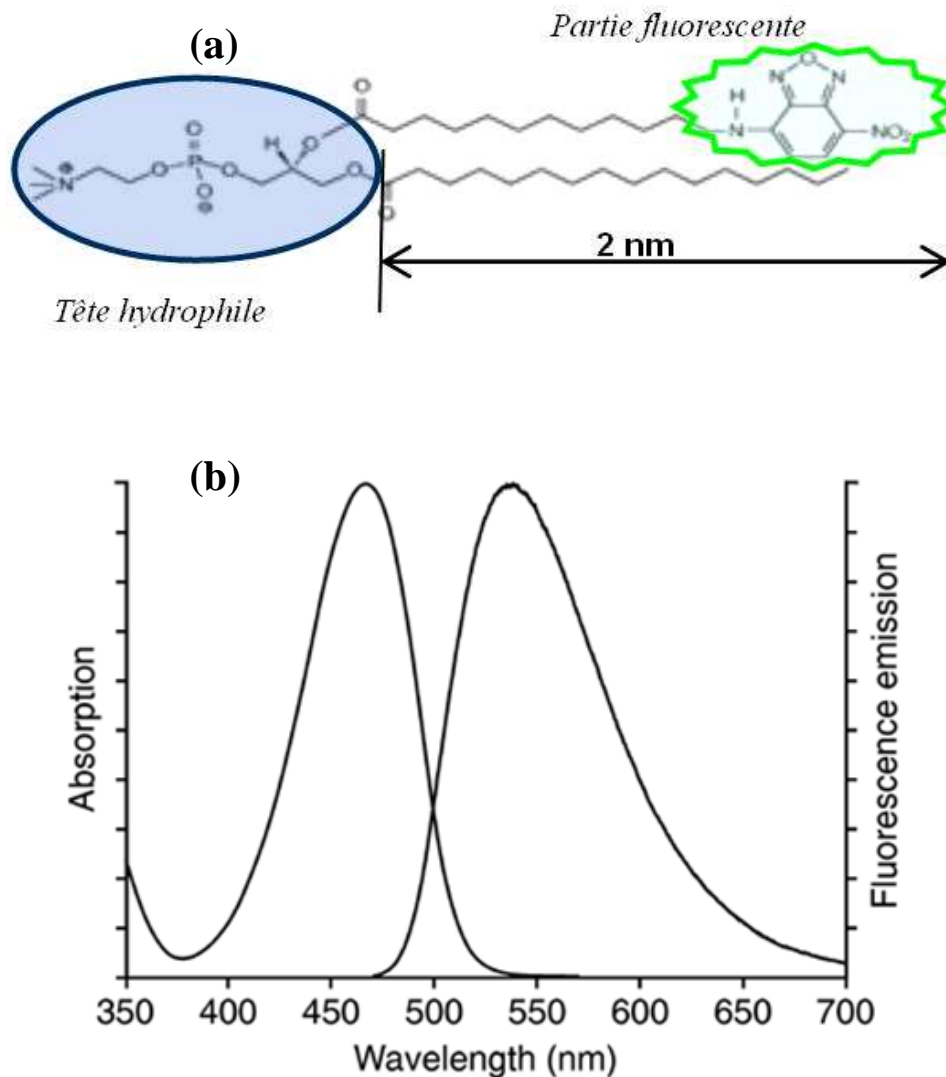


Figure II-12. Lipide visible en lumière bleue : NBD-PC ; **a)** structure chimique de la molécule ; **b)** Spectre d'absorbance (courbe de gauche) et d'émission de fluorescence (courbe de droite).

II-2-3 Exemples d'images

La figure II-13.B montre une bicouche de DOPC préparée par la technique des micelles (voir chapitre III) du premier jour, la surface est dense et homogène ; elle sera donc étudiée par AFM. Parfois nous n'obtenons pas de dépôt homogène, probablement dû à l'oxydation du DOPC (Figure II-13.C). De telles bicouches seront exclues de notre étude par AFM.

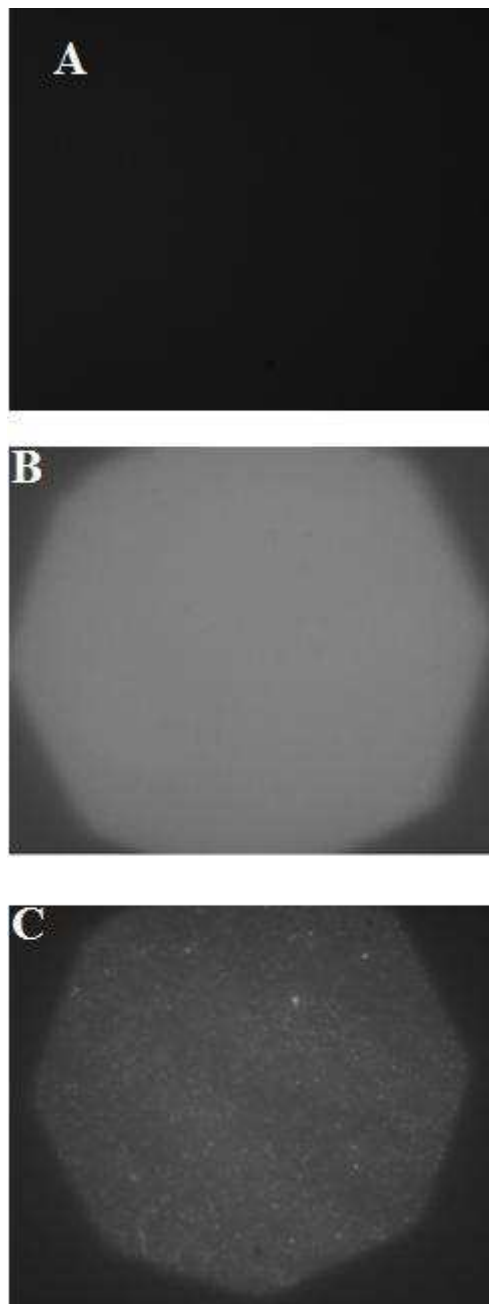


Figure II-13. Images par microscopie de fluorescence dans l'eau: **A.** Surface nue ; **B.** Dépôt homogène d'une bicouche de DOPC-NBDPC fraîchement préparée, **C.** Dépôt non homogène.

II-2-4 Utilisation des billes fluorescentes activées par EDC

Afin de pouvoir visualiser les protéines adsorbées par microscopie de fluorescence, nous avons utilisé aussi des billes fluorescentes de latex commerciales (Yellow-green, 27 nm de diamètre, Molecular Probes) portant un fluorophore (fluorescéine FITC). Ces billes ont une liaison pendante carboxylique activable en surface. En activant le groupe carboxylique en milieu aqueux avec *N*-hydroxysulfosuccinimide (sulfo-NHS), 1-ethyl-3-(3 diméthylaminopropyl carbodiimide-HCl (EDC) (en collaboration avec Christophe Place, ENS Lyon), la bille peut se coupler de manière covalente avec les groupements amines (NH₂) de la protéine (lysine et N-terminal). Le mécanisme d'activation des billes est décrit sur la figure II-14.

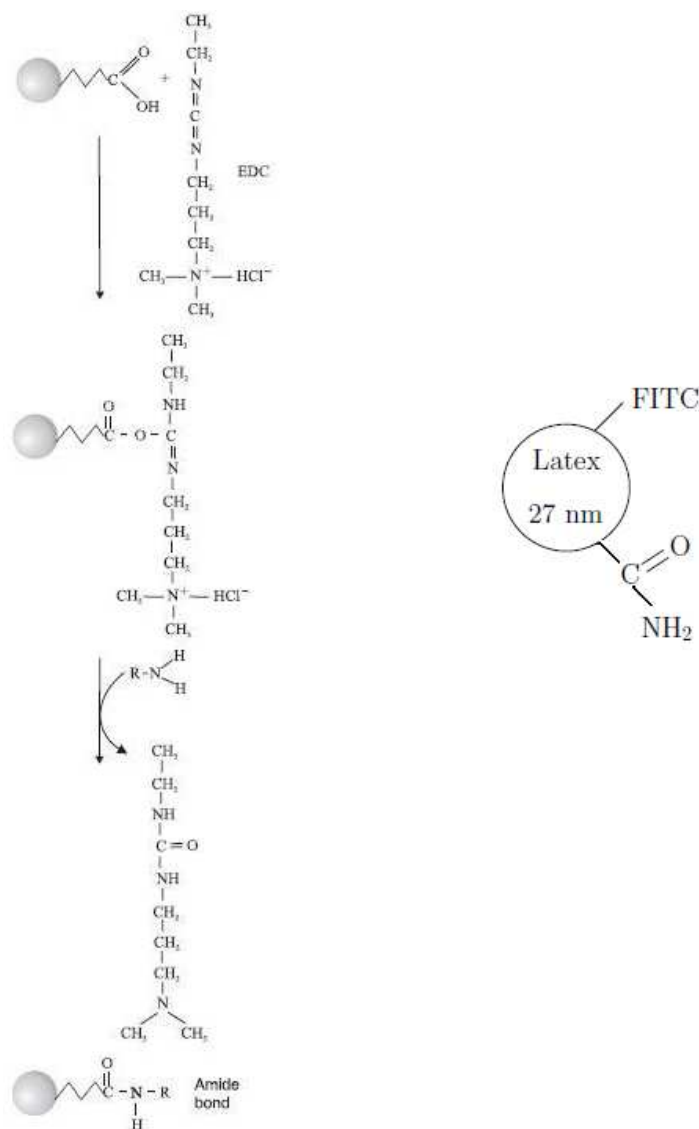


Figure II-14. Mécanisme de l'activation des billes de latex par EDC d'après Invitrogen ; à droite la bille activée.

CHAPITRE III

***Fabrication des membranes phospholipidiques
modèles et leur caractérisation par AFM et
microscopie de fluorescence***

CHAPITRE III

Fabrication des membranes phospholipidiques modèles et leur caractérisation par AFM et microscopie de fluorescence

Dans ce chapitre nous allons présenter les différentes méthodes que nous avons utilisées pour la fabrication des membranes phospholipidiques ainsi que la caractérisation des bicouches que nous avons étudiées.

Avant de détailler les différentes méthodes, nous commençons par la procédure commune aux trois méthodes et qui est la préparation des supports :

III-1 Préparation des surfaces

Nous avons utilisé des surfaces de verre (borosilicates) nu et silanisé ainsi que le mica. Les plans de verre (Pignat, Vaulx-en-Velin, France) sont d'abord lavés grossièrement à la main puis immergés dans un mélange d'eau ultra-pure et d'un savon spécifique au verre (Microson) (Fisher-Bioblock, France) dans une cuve à ultra-sons à 60°C pendant vingt minutes. L'eau ultra-pure utilisée est obtenue par osmose inversée (système Millipore Direct-Q TM.3) et passée à travers un filtre particulaire de 0,22µm. Sa résistivité est de 18.2 MΩ.cm. Les surfaces sont ensuite rincées à l'eau ultrapure pendant 5 minutes, et nettoyées à nouveau pendant 20 minutes aux ultrasons à 60°C dans le détergent. La même procédure est répétée avec l'eau ultrapure. Les plans sont finalement rincés pendant 5 minutes à l'eau ultrapure, et gardés dans l'eau ultrapure.

Nous contrôlons systématiquement la propreté du plan par une observation directe du front de démouillage de l'eau sur la surface. Si la surface est propre, le front est droit et régulier. En présence de défauts, le front s'accroche sur ces défauts. Ces derniers ne seront pas utilisés dans nos expériences.

Fabrication des membranes phospholipidiques modèles et leur caractérisation par AFM et microscopie de fluorescence

L'état de surface des plans est vérifié aussi par des mesures d'AFM. La figure III-1 représente une image d'AFM d'une surface de Pyrex nettoyée selon le protocole indiqué plus haut. Les rugosités mesurées sont de l'ordre de 0.7 nm pic-à-pic sur une surface de $2 \times 2 \mu\text{m}^2$, et présentant une valeur de rms (root mean square) de 0.1 nm.

La rugosité rms décrit les fluctuations de hauteur de la surface autour d'une hauteur moyenne et représente la déviation standard, ou la racine carré du moment d'ordre 2 (variance) en termes de statistique. Elle correspond donc à une description statistique de la dimension verticale de la surface (écart-type de la distribution des hauteurs) et sert de base pour les autres quantités (rugosités).

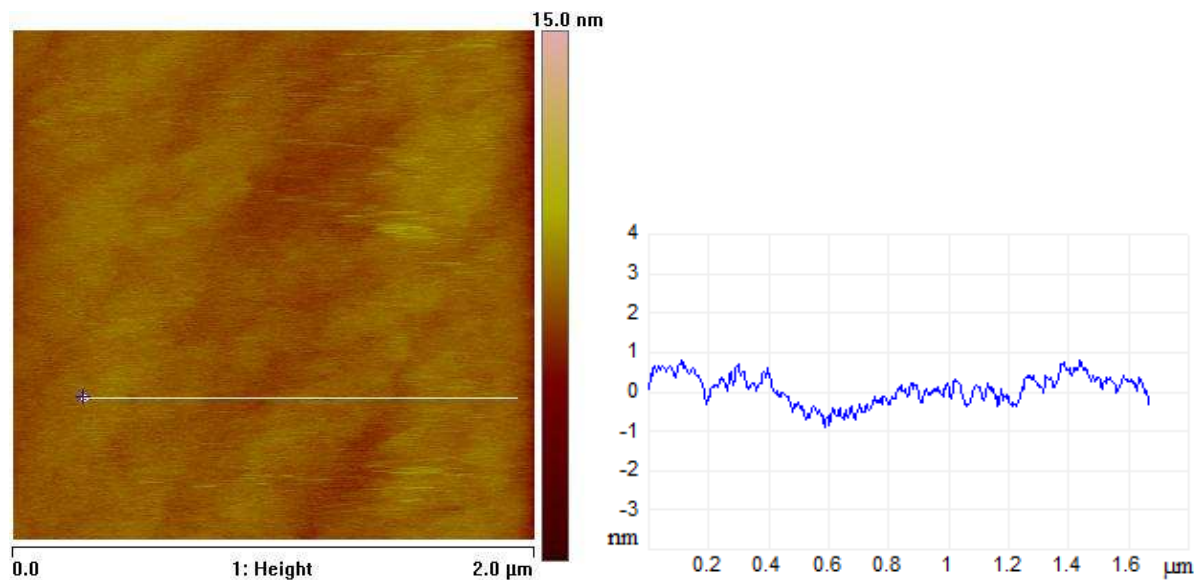


Figure III-1. Topographie de la surface du verre propre ; à droite profil en z selon la ligne indiquée.

Nous avons aussi réalisé des dépôts sur le mica muscovite :

Le mica est une espèce minérale d'aluminosilicates qui révèle après clivage une surface atomiquement plane sur plusieurs centaines de μm^2 . La muscovite est composée de feuillets de silicates d'une épaisseur de 10 \AA environ.

Le mica se compose de couches chargées négativement qui sont liées entre elles par des cations interfoliaires, chargés positivement, K^+ dans le cas de mica muscovite (Na^+ dans le mica paragonite). Chaque strate est constituée de deux couches hexagonales de SiO_4 , qui sont réticulées par des atomes d'aluminium avec des groupes OH incorporés (Figure III-2). Le clivage laisse une distribution aléatoire des ions sur les deux faces du clivage, qui rend les surfaces de mica très hydrophiles.

Fabrication des membranes phospholipidiques modèles et leur caractérisation par AFM et microscopie de fluorescence

Les liaisons électrostatiques entre les ions K^+ et oxygènes de la couche sont faibles et se brisent facilement. Cette couche est perturbée après une procédure simple de clivage avec une bande de "scotch", exposant un plan de base couvert par les ions K^+ , avec une densité de $0,57$ ions/nm² [96,97].

Dans l'air, cette couche est complètement neutralisée par la charge négative du réseau aluminosilicate. Toutefois, dans l'eau, quelques uns des ions K^+ se dissocient de la surface, qui se traduit par une densité de charge de surface négative de $0,015$ charges/nm² à pH 7 [98]. Pour nos expériences d'AFM, nous avons utilisé des feuillets de mica muscovite (Goodfellow, Cambridge Ltd.UK).

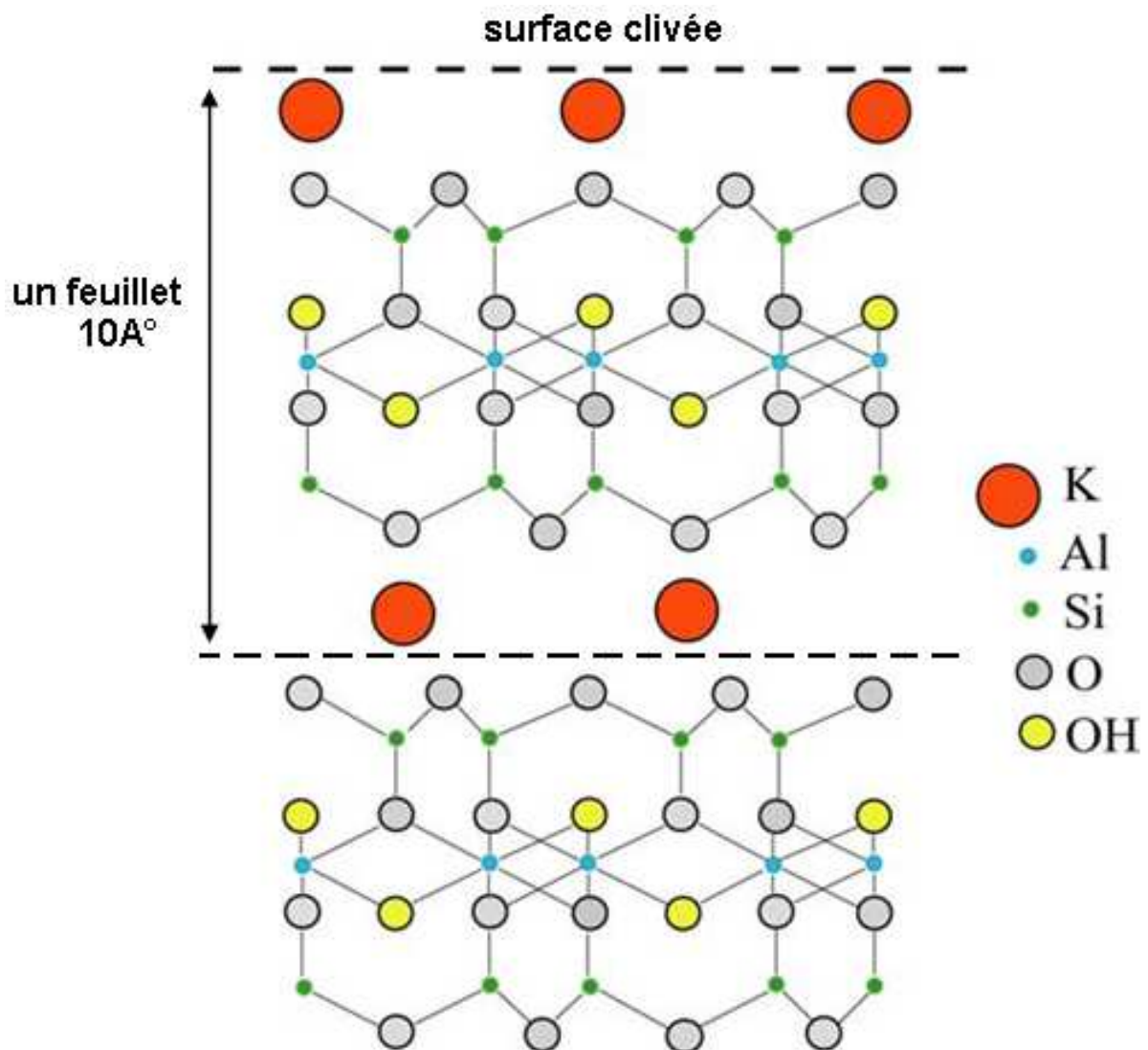


Figure III-2. Structure d'une coupe verticale du mica muscovite fraîchement clivé.

La topographie par microscopie à force atomique montre une surface lisse de rugosité 0.06 nm (Figure III-3).

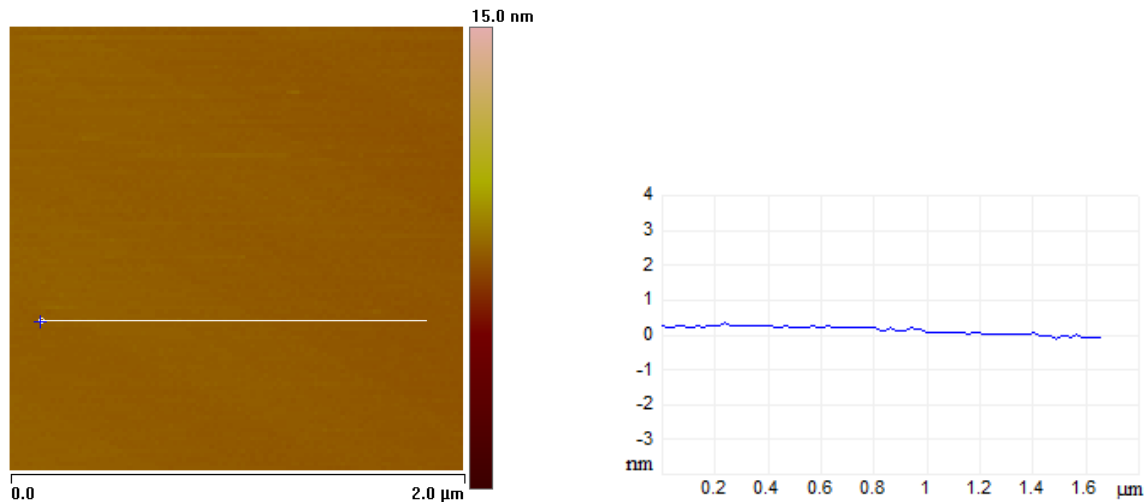


Figure III-3. Topographie du mica visualisée par AFM; à droite profil en z selon la ligne indiquée.

III-2 Lipides utilisés

Les phospholipides que nous avons utilisés dans cette partie sont le DOPC (1,2-Dioleoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholine) phospholipide insaturé (Avanti Polar Lipids) (Figure III-4.A), le DPPC (1,2-Dipalmitoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholine) phospholipide saturé (Figure III-4.B) (Avanti Polar Lipids). Le NBD-PC est utilisé comme fluorophore (voir chapitre II).

III-3 Préparation des membranes supportées

Dans cette thèse, nous avons préparé des bicouches phospholipidiques supportées par trois méthodes différentes :

- Des bicouches DPPC ont été préparées par la méthode LB et qui nous ont servi pour l'étude de l'insertion des protéines dans les membranes supportées (Chapitre V).
- Les bicouches de DOPC ont été préparées par la méthode des micelles dans différentes conditions pour l'étude propriétés nanomécaniques des membranes (chapitre IV).
- Nous avons également préparé des vésicules unilamellaires de type LUV de DOPC et de mélange DOPC/DPPC par la méthode d'extrusion des vésicules dont nous avons étudié la stabilité par AFM.

Fabrication des membranes phospholipidiques modèles et leur caractérisation par AFM et microscopie de fluorescence

D'autres bicouches mixtes de PC /PE/CL (que nous développerons dans le chapitre V) ont aussi été préparées par extrusion de vésicules.

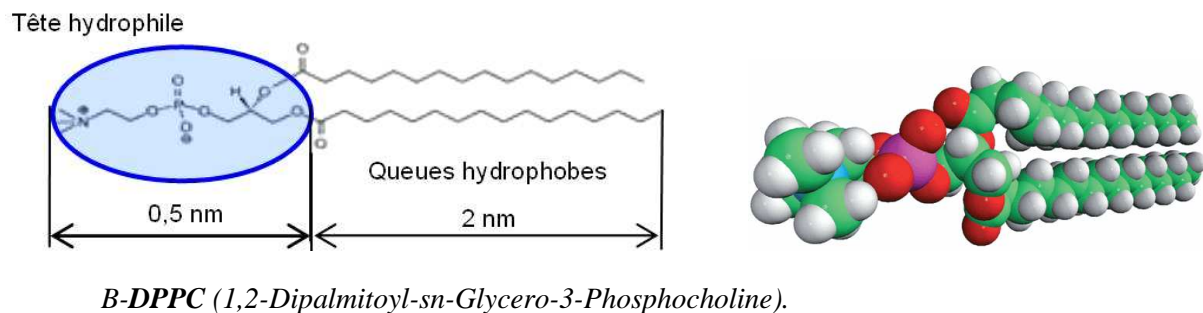
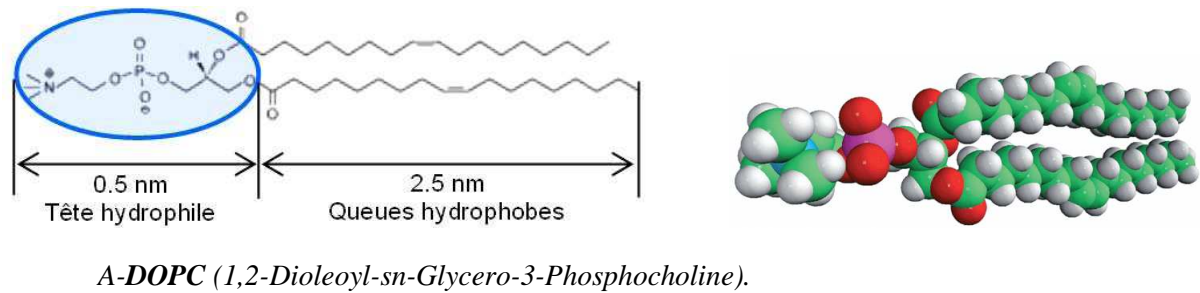


Figure III-4. Structure des différents lipides : DOPC et DPPC.

III-3-1 Méthode de Langmuir-Blodgett

Historiquement, c'est à I. Langmuir (1881-1957) que l'on doit le premier modèle de membrane dans les années 1930. Ses études sur des films d'huile à la surface de l'eau [99] l'ont amené à formuler une théorie générale sur la chimie surfacique qui lui a valu le prix Nobel de Chimie en 1932.

Avec sa collaboratrice K. B. Blodgett (1898-1979), ils introduisent la notion de monocouches, films de surface d'épaisseur atomique ou moléculaire possédant des propriétés bidimensionnelles [100,101]. Ils mirent en évidence le fait qu'une goutte d'huile (molécule amphiphile) déposée sur une surface statique d'eau, s'étale jusqu'à former un film monomoléculaire. Ils mirent également au point la technique, dite de Langmuir-Blodgett, qui

consiste à transférer sur un substrat solide plongé verticalement, à pression de surface constante, une ou plusieurs couches d'une monocouche formée à l'interface air-eau (Figure III-10).

Pour comprendre réellement ce qui se passe lors d'un dépôt Langmuir-Blodgett, nous allons introduire quelques notions fondamentales de chimie-physique telles que la tension superficielle, la pression de surface, l'aire moléculaire, isothermes pression de surface-aire. (Voir annexe)

III-3-1-1 Molécules tensioactives

Certaines molécules peuvent modifier la tension de surface des liquides ; elles sont appelées molécules tensioactives. Ce sont des molécules amphiphiles possédant une partie hydrophile (tête polaire), l'autre est hydrophobe (chaîne aliphatique), parmi elles, on peut citer les acides gras et les phospholipides.

Lorsque ces molécules sont adsorbées à la surface de l'eau, la partie hydrophile est solvatée. Cette solvatation diminue le nombre de liaisons "pendantes" des molécules d'eau de surface. Les liaisons "pendantes" des chaînes aliphatiques sont bien moins énergétiques : la tension de surface diminue.

Le caractère amphiphile des tensioactifs dicte l'orientation des molécules à l'interface (air/eau ou huile/eau) de telle manière que le groupe de tête polaire est plongé dans l'eau et que la longue queue hydrocarbonée est orientée vers l'air, de gaz ou de l'huile.

L'adsorption de molécules tensioactives 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. A la surface de l'eau, on distingue deux types de monocouches de tensioactifs : les films de Gibbs, pour les tensioactifs partiellement solubles, et les monocouches de Langmuir, pour les tensioactifs non solubles où l'équilibre est fortement déplacé vers la formation du film à l'interface (Figure III-5).

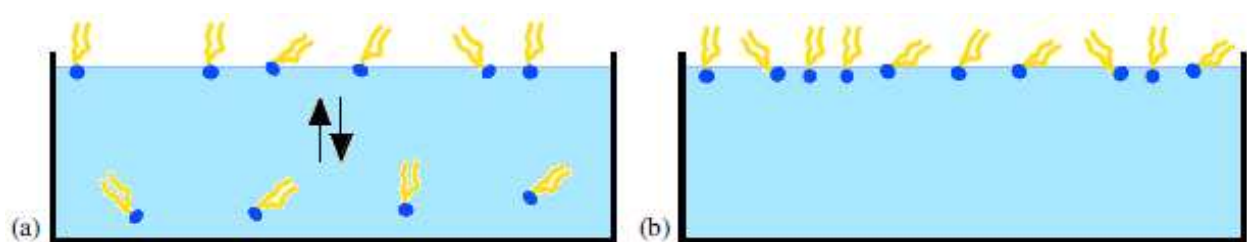


Figure III-5. (a) Films de Gibbs. (b) Film de Langmuir.

III-3-1-2 Cuve de Langmuir et balance de Wilhelmy

Nous avons utilisé une cuve de Langmuir commerciale (Nima Technology,UK, modèle 611). Son corps est en téflon. Etant hydrophobe et inerte chimiquement, le téflon est le matériel le plus approprié pour ce genre de cuves.

La cuve est composée de deux barrières mobiles qui permettent de faire varier l'aire de surface de la cuve (Figure III-6). L'aire de la monocouche est mesurée grâce à la distance entre les barrières mobiles. La cuve possède un mode d'asservissement en pression. Dans ce mode, la distance entre les barrières est corrigée de manière à maintenir la pression de surface constante. C'est grâce à ce mode que nous pouvons faire des dépôts à pression de surface constante. Pour faciliter le dépôt et augmenter la course verticale de la surface solide, un puits de 36 mm de diamètre et de cinq centimètres de profondeur a été creusé dans le corps de la cuve.

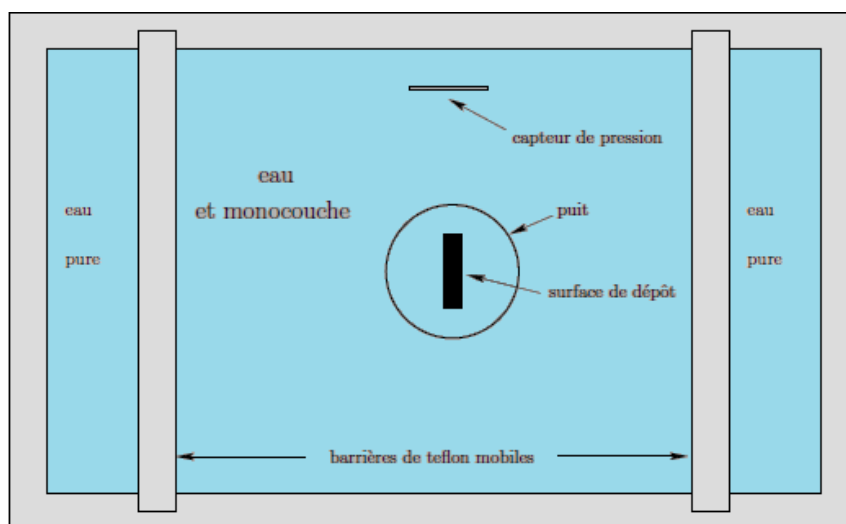


Figure III-6. Schéma de la cuve de Langmuir (vue de dessus).

La pression de surface est mesurée par la méthode de la balance de Wilhelmy avec une résolution de 0.1 mN/m. Dans cette méthode, la mesure est effectuée par la détermination de la force due à la tension de surface sur une lame en papier filtre immergée partiellement et perpendiculairement dans la sous-phase et montée sur l'électrobalance. Cette force est alors convertie en tension de surface (mN/m ou dynes/cm) à l'aide des dimensions de la lame du capteur de pression (Figure III-7).

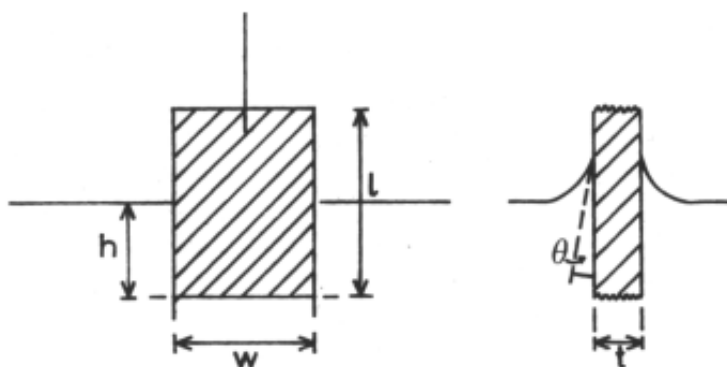


Figure III-7. La plaque de Wilhelmy immergée partiellement dans la surface de l'eau.

Le capteur détecte la force exercée par le ménisque de liquide qui mouille la plaque. Pour une lame rectangulaire de dimension l_p , w_p , et t_p de matériau de densité ρ_p , immergé à une profondeur h_1 dans un liquide de densité ρ_l , il s'exerce sur la plaque 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 résultante des forces est donnée par l'équation suivante :

$$[\text{Force sur la plaque}] = [\text{poids de la plaque}] - [\text{poussée d'Archimède}]$$

$$F = (m_p g) + 2\gamma (t_p + w_p)(\cos\theta) - \rho_l V_p g \quad (\text{III-1})$$

où γ est la tension de surface du liquide, θ est l'angle de contact du liquide sur la lame et g est la constante de gravitation ; w et t largeur et épaisseur de la plaque respectivement. V_p étant le volume de la proportion de la plaque plongée dans le liquide. On écrit ainsi :

$$F = \rho_p g l_p w_p t_p + 2\gamma (t_p + w_p)(\cos\theta) - \rho_l g t_p w_p h_1 \quad (\text{III-2})$$

La pression de surface est alors déterminée en mesurant la variation de la force F pour une plaque fixe entre une surface propre et la même surface en présence d'une monocouche. Si la plaque est complètement mouillée par le liquide (i.e. $\cos\theta = 1$), la pression de surface est alors obtenue par l'équation suivante:

$$\Pi = -\Delta \gamma = -[\Delta F / 2(t_p + w_p)] = -\Delta F / 2w_p ; \text{ si } w_p \gg t_p \quad (\text{III-3})$$

La sensibilité peut donc être augmentée en utilisant une lame très large.

III-3-1-3 Dépôt de Langmuir-Blodgett

A- Préparation de la cuve de Langmuir

Le dépôt nécessite un maximum de propreté et de pureté de produits car des impuretés aussi petites que 1ppm peuvent changer radicalement le comportement de la monocouche. Pour éliminer la contamination de l'air, nous avons travaillé sous une hotte à flux laminaire. Nous commençons par le nettoyage de la cuve avec du chloroforme puis de l'éthanol. Elle est rincée plusieurs fois à l'eau ultrapure (Millipore, MilliQ, résistivité 18.2 M Ω .cm). La vidange de la cuve se fait par aspiration de l'eau par sa surface où les impuretés se concentrent. Après ce nettoyage, nous remplissons la cuve d'eau ultra pure. Nous réglons le bain thermostaté à 20°C. Afin de s'assurer de la non pollution de la surface de l'eau, nous réalisons une isotherme de la surface nue. Si aucune variation de la pression de surface n'est enregistrée pendant la compression, nous validons l'état de propreté de la surface; sinon, nous recommençons un cycle de nettoyage.

Nous immergeons perpendiculairement un plan de pyrex (qui va servir au dépôt de bicouches lipidiques) dans la phase liquide. Le plan est fixé par une pince métallique solidaire d'un bras (dipper). Cette manœuvre doit être réalisée à l'aide d'un mécanisme de précision automatique, c'est à dire ne produisant aucune vibration latérale et se déplaçant verticalement à vitesse constante.

B- Epannage du phospholipide à la surface de l'eau

Environ 50 μ L d'une solution diluée de DPPC 1mmol/l (Avanti Polar Lipids) dans un mélange de chloroforme-éthanol (9:1 en volume) sont épannés goutte à goutte à l'aide d'une microseringue à la surface de l'eau, entre les barrières mobiles, en faisant attention à répartir le lipide le plus uniformément possible sur toute la surface. Une fois la solution déposée, nous attendons 45 minutes afin que le solvant organique s'évapore et que la couche soit homogène. Les phospholipides forment un film de Langmuir à la surface de l'eau (Figure III-8).

C- Isotherme Pression de surface-Aire

Nous réalisons alors une isotherme de cette monocouche qui nous permettra de valider le dépôt à la surface de l'eau. Cette isotherme est enregistrée par la compression du film (réduction de l'aire avec les barrières à une vitesse constante) tout en continuant à surveiller la pression de surface (Figure III-9). L'isotherme obtenue est reproductible : la

Fabrication des membranes phospholipidiques modèles et leur caractérisation par AFM et microscopie de fluorescence

monocouche est à l'équilibre avec la sous-phase aqueuse. Nous disposons donc, à la surface de l'eau d'une monocouche bien caractérisée et à l'équilibre thermodynamique.

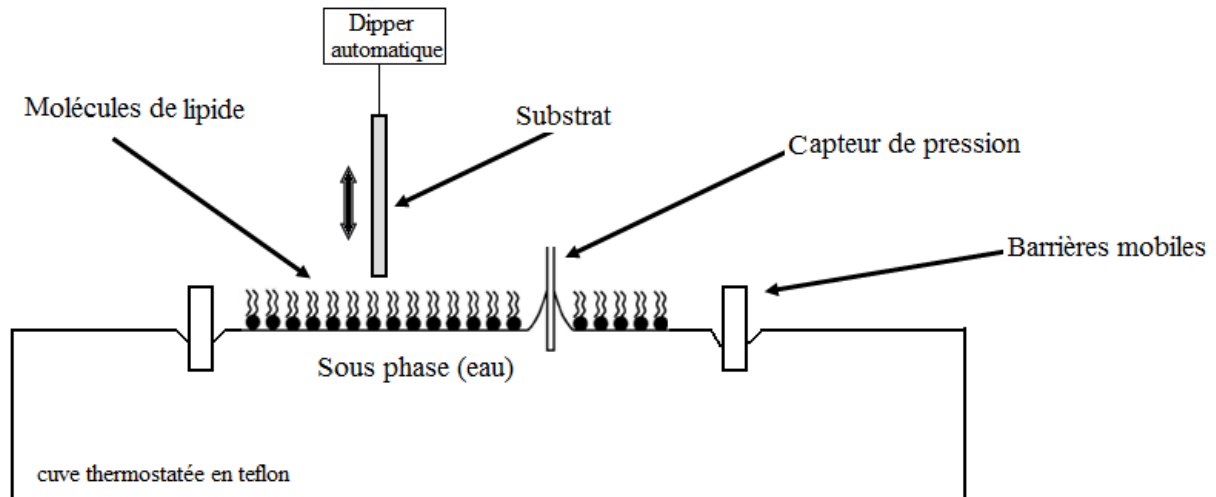


Figure III-8: Illustration de la cuve de Langmuir avec les molécules de phospholipides formant une monocouche à la surface de l'eau entre les deux barrières mobiles.

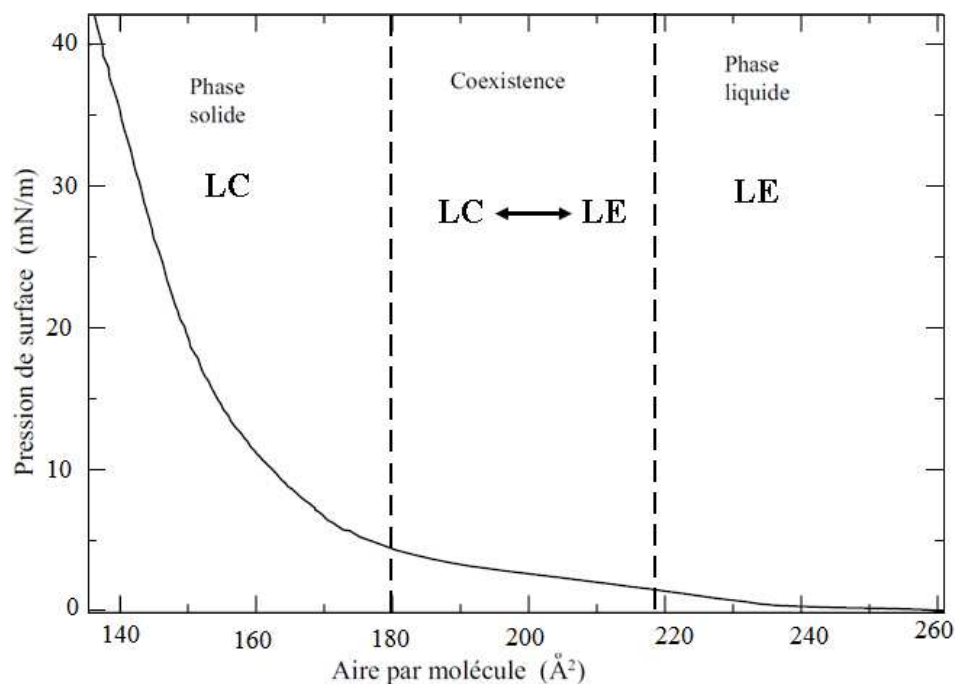


Figure III-9. Isotherme d'une monocouche de DPPC à la surface de l'eau. La température de la sous-phase aqueuse est maintenue à 20°C. En plus des phases LE (liquide expansé) et LC (liquide comprimé) visibles sur l'isotherme, il existe une phase gaz de faible densité. Cette phase a des pressions de surface de l'ordre du dixième de mN/m dans la limite de résolution du capteur de pression utilisé. Nous ne la décelons pas sur l'isotherme.

D- Dépôt de Langmuir-Blodgett

Il y a plusieurs paramètres qu'il faut contrôler pour effectuer le dépôt, il s'agit de : la température, la pression de surface durant le dépôt, la densité de la monocouche à l'interface eau-air, et la vitesse du plan de Pyrex.

Afin d'avoir des dépôts denses, proches des conditions biologiques, nous avons travaillé avec des pressions de surfaces élevées. Il a été montré [102] que la qualité du dépôt est optimale pour des pressions proches de la pression de collapse, pression à partir de laquelle une monocouche de tensioactifs comprimée à l'interface eau-air n'est plus stable. Pour le DPPC, la pression de collapse se situe autour de 50 mN/m. Ainsi, le dépôt d'une monocouche de DPPC sur le plan de Pyrex hydrophile est réalisé en remontant le plan à travers la monocouche de DPPC située à l'interface eau-air avec une pression de surface de 40 mN/m et à une vitesse constante de 5mm/mn. La pression de surface est maintenue constante au cours du dépôt grâce à l'asservissement en pression des barrières mobiles. Lorsque le plan de Pyrex traverse l'interface, les molécules de tensioactifs s'adsorbent de part et d'autre du plan, comme le montre schématiquement la figure III-10. Le taux de transfert est de 98%. Après avoir déposé une monocouche de DPPC sur un plan en Pyrex, la surface est à nouveau plongée dans l'eau, à une vitesse de 5 mm/mn, la pression de surface étant toujours maintenue à 40 mN/m. Une deuxième monocouche de DPPC se dépose alors par-dessus la première, formant une bicouche, comme le montre la figure III-10 (à droite). Le taux de transfert de la deuxième couche de lipide est d'environ 70%.

Une fois la bicouche déposée, elle est placée dans une petite boîte dans le puits au fond de la cuve, qui permettra de retirer la surface de la cuve de Langmuir sans démoiller la bicouche.

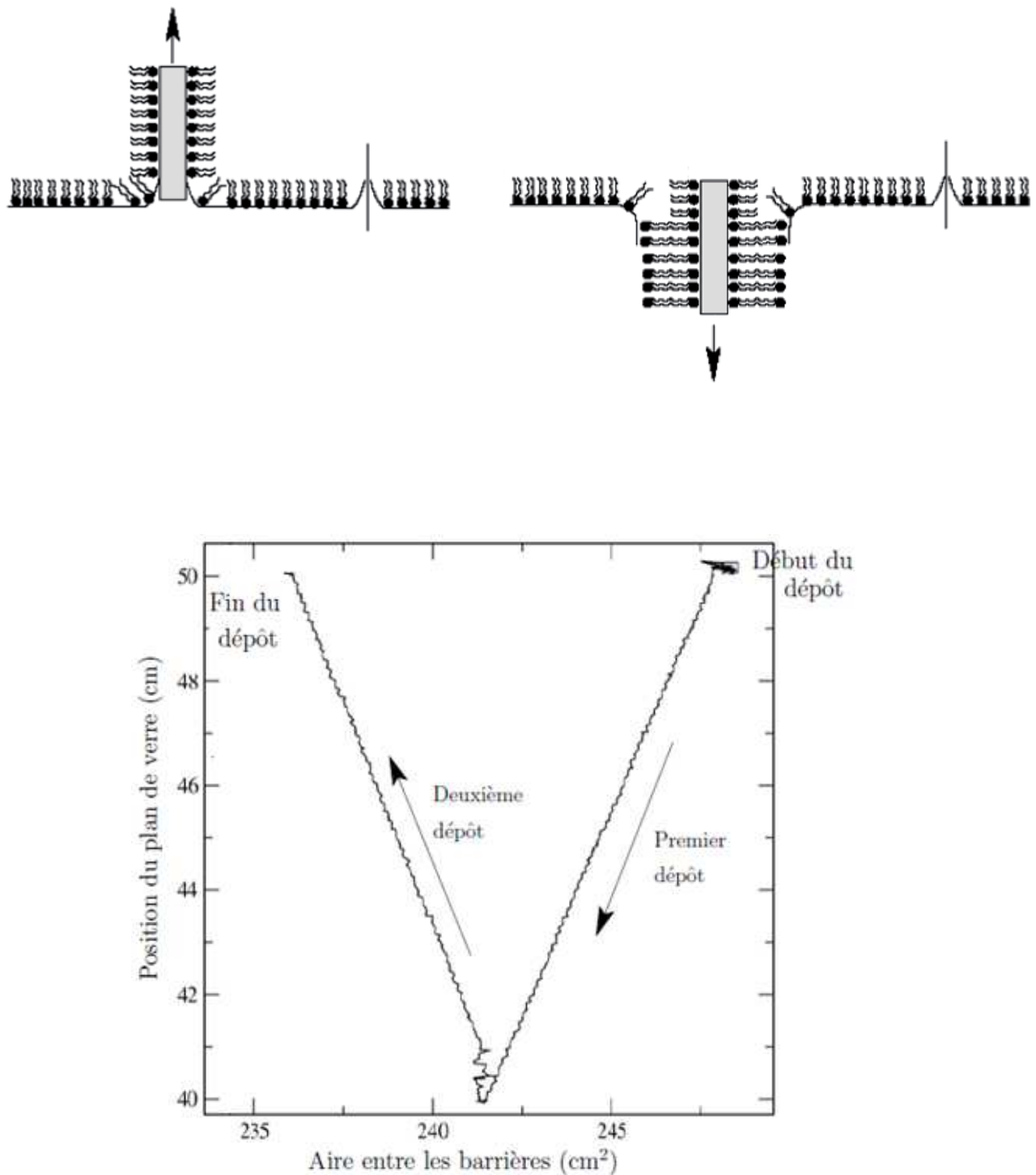


Figure III-10. Méthode de dépôt de Langmuir-Blodgett : un plan de pyrex passe à travers une monocouche de tensioactifs à l'interface eau-air. Après un premier passage (à gauche) se dépose une monocouche, après un second passage (à droite) une bicouche. La courbe représente la variation de l'aire entre les barrières en fonction de la position du substrat. (l'axe de cette position est inversé : 50 mm correspond au plan en bas dans l'eau, 40 mm au plan en haut hors de l'eau).

III-3-1-4 Caractérisation par AFM de bicouches de DPPC déposées par la technique LB

Nous présentons dans la figure III-11 des images à différentes échelles de bicouches de DPPC préparées par la méthode de Langmuir Blodgett. Ces images montrent des trous de profondeur de 6nm en accord avec l'épaisseur d'une bicouche de DPPC sur une surface de verre [103].

A des échelles plus réduites, 100 x100 nm² (Figure III-11.B), la bicouche montre une structure granuleuse. Les grains de cette structure ont des hauteurs maximales de 1.2 nm et une rugosité de la surface (rms), de ~ 0.3nm. Cette valeur de rugosité est en accord avec celle mesurée sur des surfaces de verre nues.

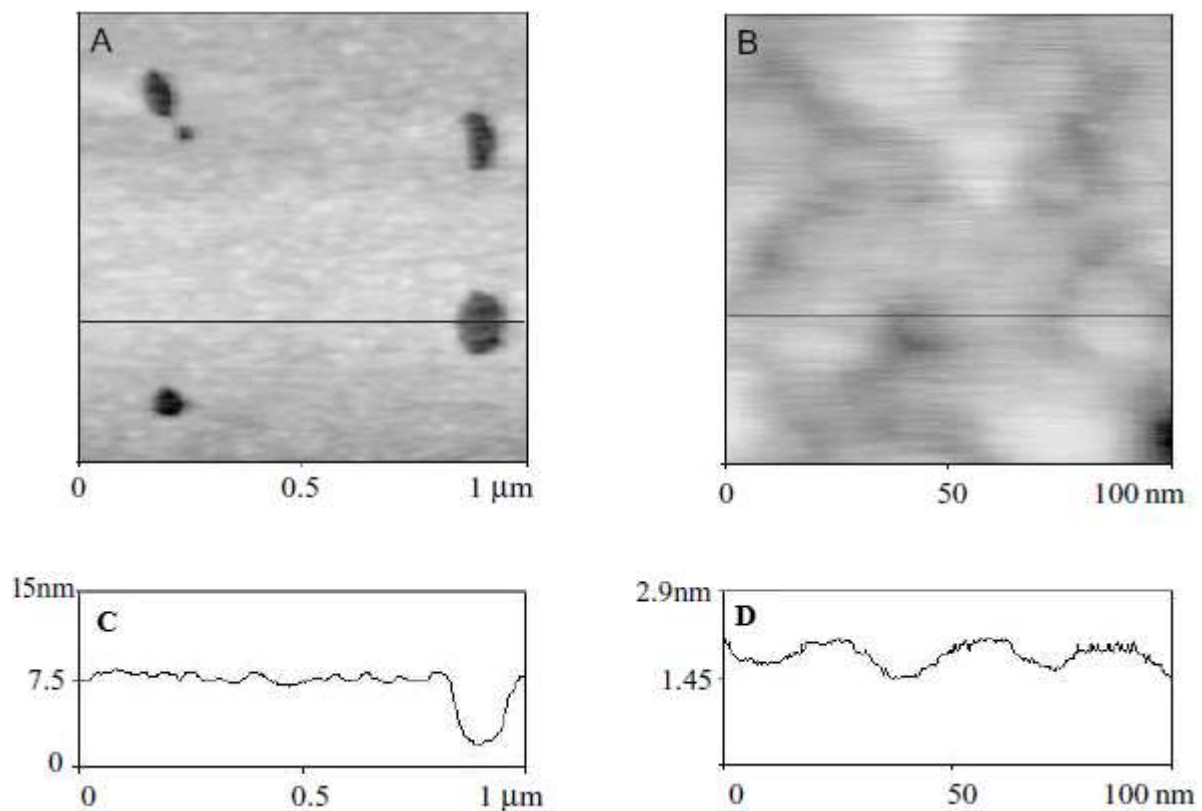


Figure III-11 Images AFM de bicouche de DPPC préparées par LB à différentes échelles (A, B) ; C et D profil de la ligne des images A et B respectivement. Echelle verticale des couleurs correspond à A : 10.5nm ; B : 2.8nm.

III-3-2 Méthode de coadsorption de micelles mixtes

La méthode co-adsorption de micelles mixtes lipide-détergent a été développée par Grant et Tiberg, [104,105] Cette méthode donne des résultats robustes et est moins coûteuse en lipides, de plus elle ne nécessite pas de dispositifs spéciaux.

Le principe consiste à adsorber à partir d'une solution concentrée de lipide et de détergent puis une succession de rinçage et de réadsorption à partir de solution moins concentrée en mélange lipide/surfactant ainsi une bicouche dense et compacte pourra être produite sur la surface.

III-3-2-1 Préparation de micelles mixtes

Cette technique utilise un détergent non ionique, fortement soluble dans l'eau, (d'où son élimination facile avec le rinçage) le DDM (n-Dodecyl- β -maltoside) (Figure III-12), ($cmc=1.67 \times 10^{-4}$ mol/l) pour dissoudre les lipides et former des micelles [105,106].

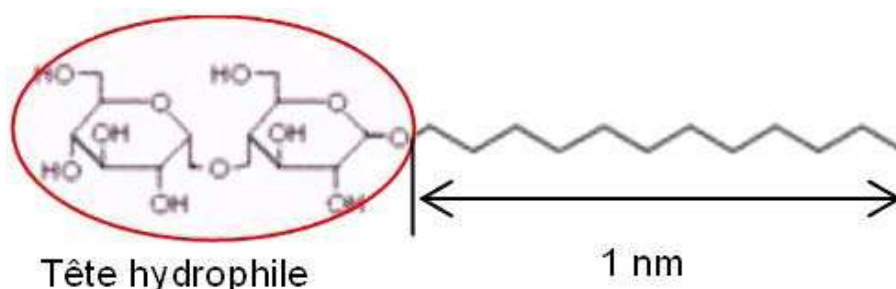


Figure III-12. Structure chimique d'une molécule de n-Dodecyl-beta-D-maltoside (DDM)

Le DOPC a été solubilisé à une concentration de 1mM dans un mélange de chloroforme/ éthanol (9/1, v/v). Le NBD-PC a été rajouté à cette solution à 1% (mol%) afin de pouvoir vérifier par la suite la qualité et l'homogénéité du dépôt à grande échelle par microscopie de fluorescence.

Un aliquot de la solution lipidique est placé dans un tube à essai, puis soumis à un débit d'azote avec une rotation continue; le solvant est ainsi évaporé, (Figure III-13). Nous obtenons un dépôt uniforme de lipides sur la paroi interne du tube.

Des micelles lipide /détergent en rapport massique 1/6 sont obtenues en rajoutant, dans le tube à essai contenant l'étalement lipidique, de l'eau ultrapure et une solution aqueuse DDM

Fabrication des membranes phospholipidiques modèles et leur caractérisation par AFM et microscopie de fluorescence

(0.485mg/ml) pour former à la fin une solution de mélange DOPC/DDM à une concentration finale de 0.114 mg/ml.

Nous agitons doucement pour éviter la formation de mousse du détergent. Toute l'opération est effectuée sous courant d'azote pour éviter l'oxydation des lipides. La solution obtenue est limpide. Elle peut être conservée 3 semaines au réfrigérateur.

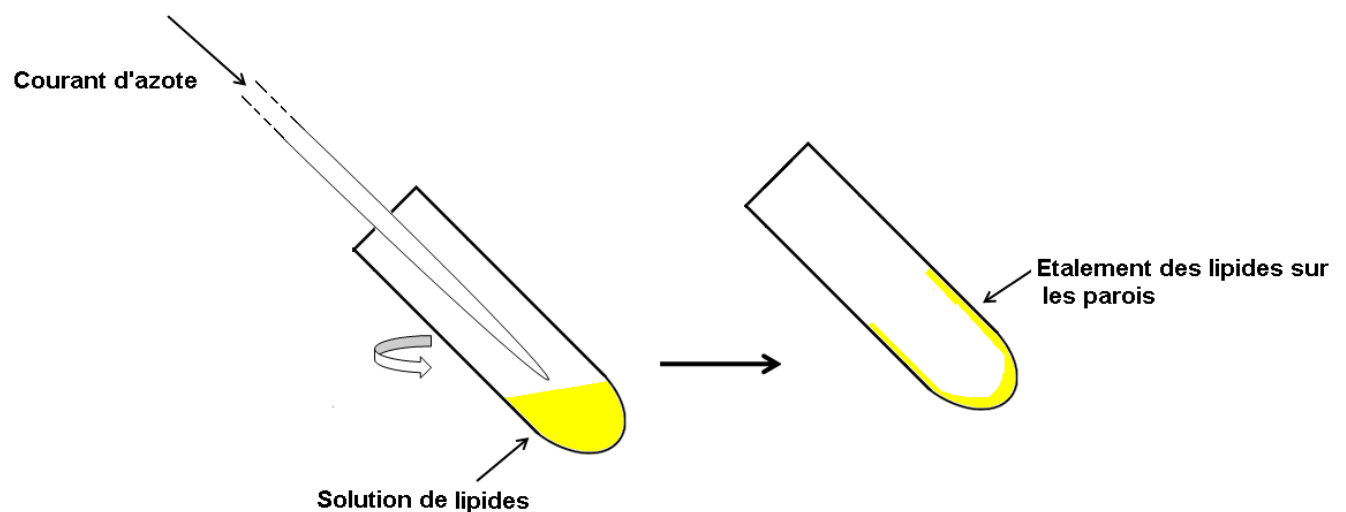


Figure III- 13. Technique de préparation de micelles : étalement sur les parois du tube à essai par évaporation du solvant avec un courant d'azote.

III- 3-2-2 Préparation de bicouches dans l'eau

La technique de dépôt comporte trois étapes essentielles:

1- Incubation de la solution de micelles /DDM 0.114mg/ml sur le verre pendant 5 minutes en présence d'ions Ca^{2+} (CaCl_2) à une concentration de 2mM (Figure III-14).

Les travaux de Hills [107] montrent que ces ions Ca^{2+} sont présents également dans les bicouches lipidiques *in vivo* où leur rôle serait de rigidifier la bicouche en formant des liaisons ioniques entre les parties négatives (phosphates) des têtes lipidiques.

D'autres travaux [108,109] montrent que la présence des ions, comme Ca^{2+} , peut modifier les propriétés physico-chimiques des bicouches lipidiques: charge électrique superficielle, perméabilité, etc.

2- Rinçage lent avec l'eau ultrapure à un débit de 3ml/mn pendant 90minutes afin d'éliminer le détergent et les lipides qui n'ont pas accroché à la surface (Figure III-14).

Fabrication des membranes phospholipidiques modèles et leur caractérisation par AFM et microscopie de fluorescence

3- Après cette étape de rinçage, le surfactant est toutefois susceptible d'être resté dans la bicouche à l'état de traces. Ainsi, pour éliminer toute trace de surfactant et avoir un dépôt lipidique plus compact, une deuxième incubation est parfois nécessaire : ainsi après la première incubation, nous rajoutons une solution de micelles dix fois moins concentrée (0.0114mg/ml), toujours en présence du calcium 2mM. L'incubation dure 5 minutes puis nous effectuons un rinçage lent goutte à goutte pendant 90 minutes comme dans la première étape. Les bicouches sont conservées à l'état hydraté pour qu'elles ne se transforment pas en monocouches (après déshydratation) ou vésicules (après réhydratation). Elles sont étudiées le jour même (AFM et fluorescence).

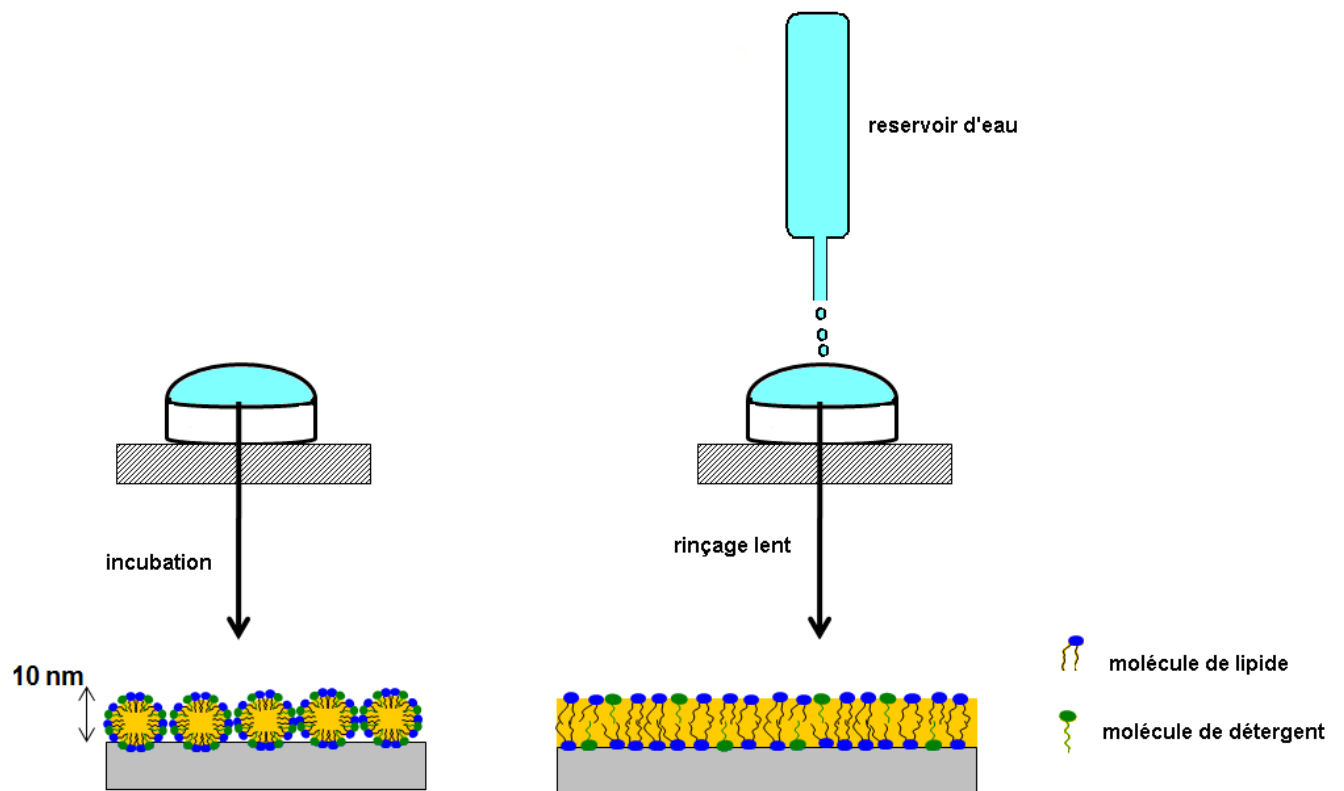


Figure III-14. Dépôt de bicouches lipidiques par la méthode de co-adsorption des micelles lipides-détergents : à gauche : incubation des micelles mixtes; à droite : formation de la bicouche et élimination progressive du détergent par dilution lente.

III-3-2-3 Bicouches de DOPC dans le Tris pH 7.2

La préparation des bicouches de DOPC dans le Tris par la méthode de co-adsorption de micelles mixtes est similaire à celle des bicouches dans l'eau, sauf qu'à la fin du rinçage, l'eau est remplacée par le Tris/ HCl (15mM, pH 7.2).

III-3-2-4 Caractérisation de la bicouche de DOPC sur le verre

Nous vérifions systématiquement l'homogénéité et l'intégrité des bicouches de DOPC (homogénéité de la fluorescence). Nous avons déjà montré à titre d'exemple au chapitre II les images de microscopie de fluorescence de bicouches préparées par co-adsorption de micelles montrant deux exemples avec une bonne ou mauvaise homogénéité ; nous allons donc présenter maintenant les résultats de microscopie à force atomique.

III-3-2-4-1 Par microscopie à force atomique

Les bicouches de DOPC sur le verre, fraîchement préparées montrent une morphologie lisse avec un pic maximum de 0.7nm et une rugosité rms de 0.1nm (Figure III-15). Cette topographie correspond bien à la rugosité de la surface du verre en borosilicate en dessous de la bicouche [110]. Les défauts tels que les trous ne sont pas observés dans ces bicouches.

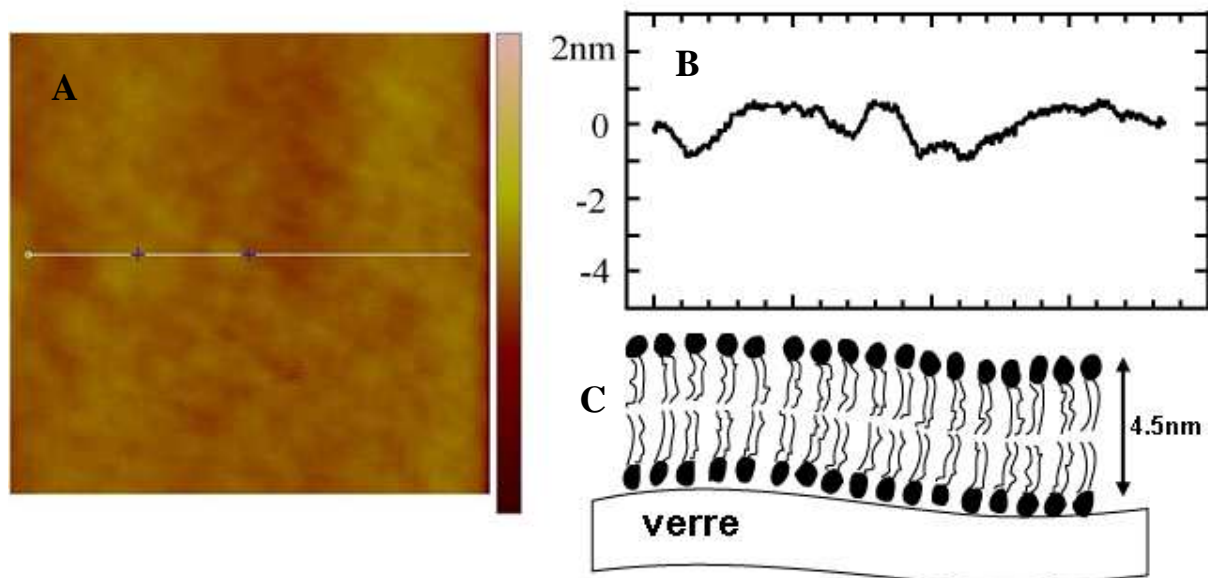


Figure III- 15. Bicouche fraîche de DOPC sur le verre : A-topographie (2 x 2 μ m), échelle verticale des couleurs 15nm ; B- profil de hauteur caractéristique ; C- schéma d'une bicouche de DOPC.

Fabrication des membranes phospholipidiques modèles et leur caractérisation par AFM et microscopie de fluorescence

Après un jour en solution dans l'eau (Figure III-16) ou le Tris (Figure III-17), la structure de la bicouche n'est pas continue pour autant, la bicouche présente des trous de hauteur de 4.5 ± 0.5 nm, déterminée par la section horizontale de plusieurs images.

Ces valeurs corrélient bien avec les épaisseurs des bicouches de DOPC obtenues dans la littérature sur des surfaces de silicium : Tiberg *et al.* [104,111] ont mesuré par ellipsométrie et par réflexion de neutrons une épaisseur de 4.3nm sur silicium avec des bicouches préparées avec la même méthode.

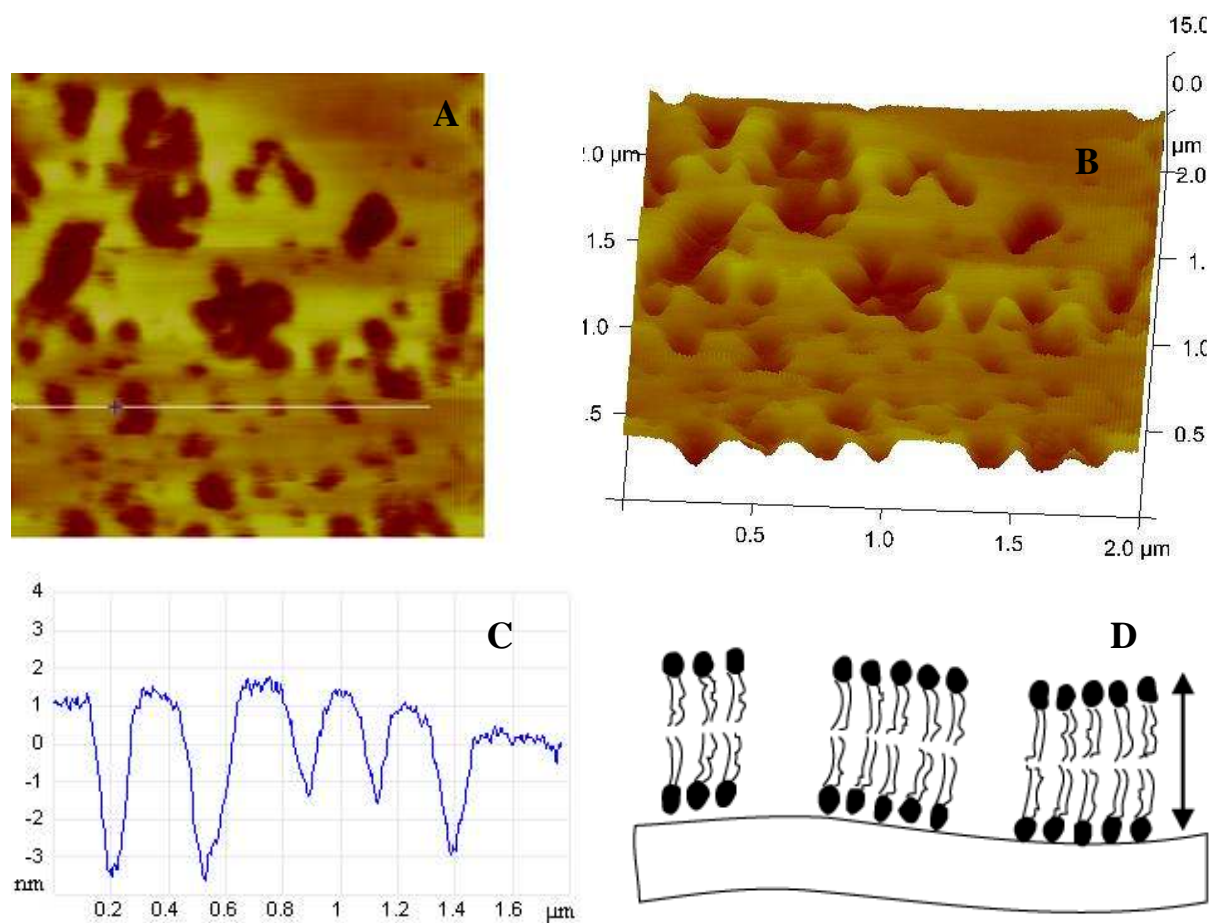


Figure III-16. Bicouche de DOPC dans l'eau, vieille d'une journée présentant des trous:

A- Topographie : échelle verticale des couleurs 15nm ; **B-** la même en 3D ; **C-** profil en z selon la ligne indiquée montrant une profondeur de trous de 4.5 nm environ, **D-** schéma représentant les trous dans la bicouche.

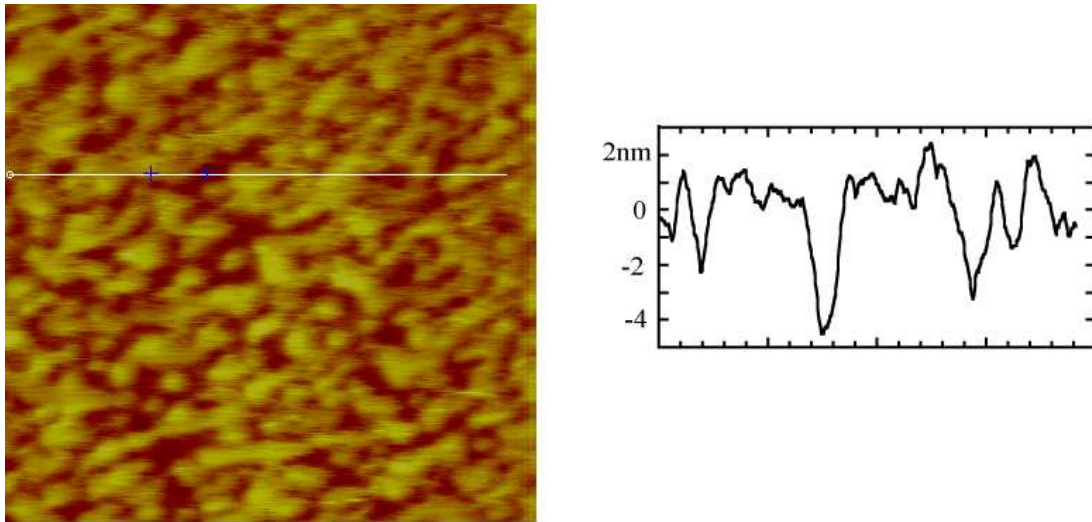


Figure III- 17. Bicouche de DOPC (2 x2 μ m) dans le Tris 15mM, pH 7.2, vieille d'une journée présentant des trous.

Des valeurs similaires ont été obtenues dans des études différentes utilisant la réflexion des rayons X sur les bicouches de DOPC préparées par la méthode de fusion de vésicules sur des substrats en silicium : Miller *et al.* ont mesuré une épaisseur de 4nm sur le quartz contenant une bicouche d'eau de 0.5nm entre le quartz et la monocouche de lipide [112].

Hochrein et al. ont mesuré une distance de 3.6 nm de tête à tête sur des plans de silicium et n'ont détecté aucune bicouche d'eau [113]. La même distance a été obtenue par le groupe de Nagle par la diffusion des rayons X [114], correspondant à une épaisseur de la bicouche de 4.5nm en tenant compte de la taille de la tête de lipide.

III- 3-2-5 Effet de la vitesse de dilution et du vieillissement de la bicouche

Nous avons également étudié, par les expériences AFM, l'effet de la vitesse de dilution sur la densité du lipide et le taux de recouvrement de la bicouche. Le débit utilisé durant le rinçage étant de $Q = 4 ; 2.5$ et 0.7 ml/min correspondant à des taux de dilution de : $R_D = Q/V = 7, 4$ et 1 min^{-1} respectivement où V est le volume de la cuve dans laquelle s'effectue la dilution.

Nous avons trouvé que le taux de recouvrement dépend beaucoup de la vitesse de dilution : plus rapide est la dilution ($R_D = 7 \text{ min}^{-1}$, Figure III-18.C), plus faible est le recouvrement.

Ces résultats sont en accord avec les observations de Tiberg *et al.* [104] qui ont observé des bicouches de lipides denses et compactes sur des surfaces de silice quand le rinçage, après adsorption à partir de solution concentrée, était effectué très lentement.

La structure des défauts, trouvés le deuxième jour d'immersion, dépend de la méthode de préparation. A une vitesse de dilution lente ($R_D = 1\text{min}^{-1}$), les bicouches formées par une seule incubation présentent des îlots faiblement interconnectés (Figure III-18.B) ; alors que les bicouches formées par deux incubations présentent un recouvrement avec des trous isolés (Figure III-18.A). Par conséquent, nous pouvons conclure à partir de ces observations que les bicouches de DOPC couvrent la surface du verre au moins durant le premier jour après leur préparation mais les lipides se désorbent de la bicouche créant des trous et exposant la surface du verre à partir du deuxième jour. Ceci est un paramètre très important à prendre en considération pour l'étude des propriétés des membranes phospholipidiques. La vitesse de dilution joue aussi un rôle très important dans la stabilité de la bicouche et peut déterminer indirectement la quantité du détergent restant dans la bicouche. Ainsi, plus lent est le processus de dilution, plus petite est la quantité du détergent restant à la surface (Figure III-18).

Pour notre étude, nous avons utilisé seulement des bicouches fraîches réalisées avec un taux de dilution intermédiaire de ($R_D = 4\text{min}^{-1}$).

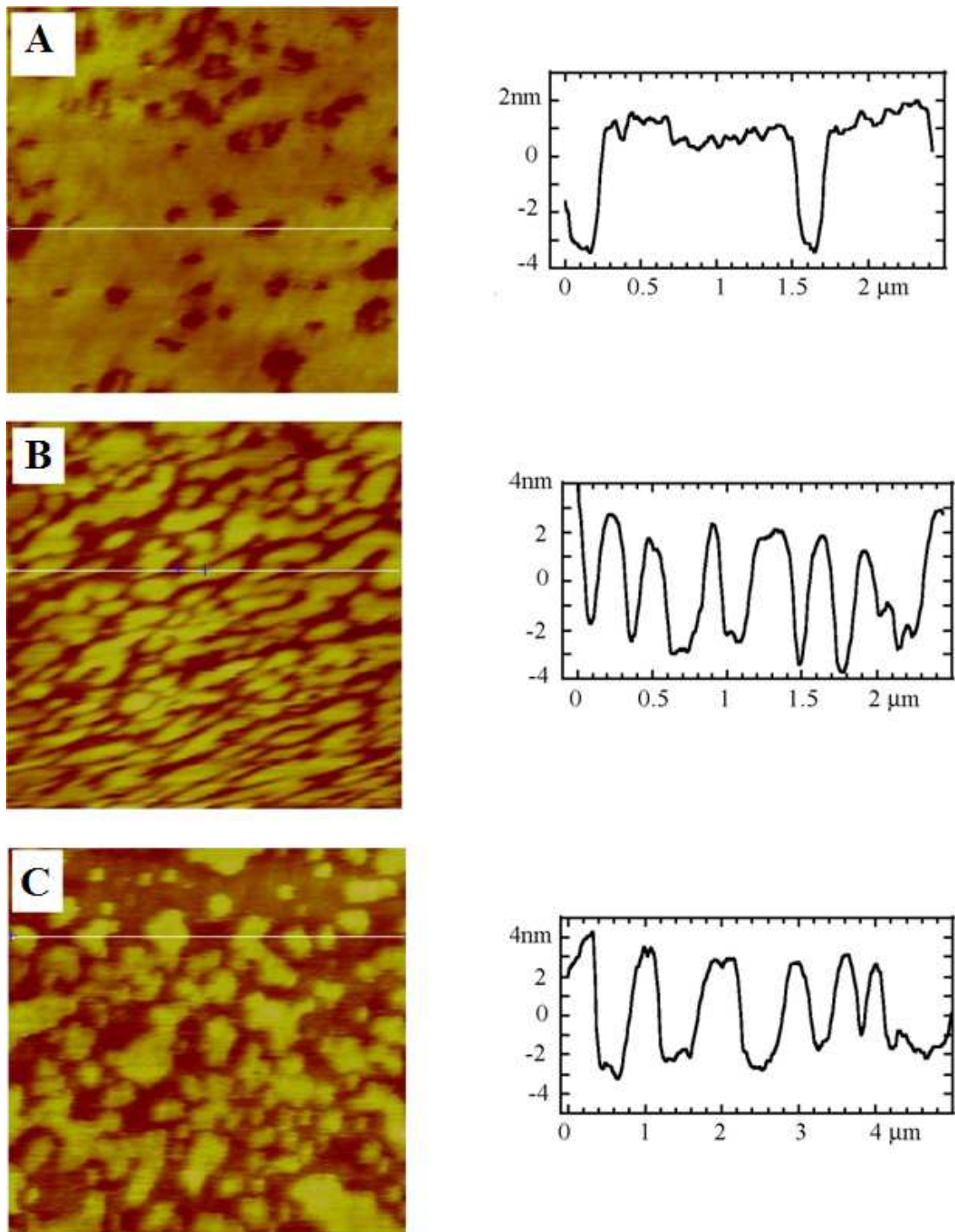


Figure III-18. Bicouches de DOPC vieilles d'une journée préparées par coadsorption de micelles et de façons différentes : **A.** deux incubations ($RD = 1\text{min}^{-1}$) ; **B.** une incubation, ($RD = 1\text{min}^{-1}$) ; **C.** deux incubations ($RD = 7\text{min}^{-1}$).

III-3-3 Méthode de fusion des vésicules

Les vésicules unilamellaires de type LUV ont été préparées par la méthode d'extrusion des vésicules [115,116]. Nous préparons une solution de 20 mg/ml de lipide dans un mélange de chloroforme et d'éthanol (9:1 en volume). Nous rajoutons 1% (wt%) de lipides fluorescents (NBD-PC) à cette solution afin de pouvoir vérifier par la suite la qualité et l'homogénéité du dépôt à grande échelle. La solution est placée dans un ballon conique. Le solvant est évaporé avec rotation continue sous flux d'azote. Les lipides se déposent alors sur les parois du ballon. Nous rinçons deux fois au chloroforme et un troisième à l'éther en évaporant à chaque fois, et ce pour avoir un dépôt uniforme circulaire sur les parois du ballon.

Les lipides sont maintenues toute la nuit sous vide afin d'éliminer toute trace de solvant organique. Les lipides sont alors hydratés avec une solution tampon de Tris, HCl 15mM, pH 7.2, puis vortexés. Nous obtenons ainsi des MLV (multilamellar large vesicles) à une concentration de 20mg/ml.

III-3-3-1 Préparation de vésicules unilamellaires

Pour obtenir des vésicules unilamellaires (LUV), les MLV sont transférées dans des tubes eppendorf, vortexées pendant 10 minutes, soumises à une congélation pendant 5minutes dans un récipient contenant de l'azote liquide puis décongelées en chauffant pendant 10minutes à 37°C dans un bain marie. Toute la procédure est répétée six fois, et entre chaque cycle, les LUV sont vortexées pendant une minute afin d'enlever une couche à chaque fois jusqu'à ce que l'on obtienne une seule couche lipidique.

Les vésicules sont alors extrudées avec un miniextruder (Avanti Polar Lipids) (Figure III-19). Les échantillons sont soumis à 19 passages successifs (à l'aide de deux seringues) à travers des membranes en polycarbonates (Avanti Polar Lipids) de 0.4 et 0.2 μm de diamètre respectivement afin d'obtenir des LUV les plus monodisperses possible.

Les vésicules unilamellaires (LUV) résultantes sont dix fois diluées dans le tampon Tris/ HCl 15mM, pH7.2 et conservées sous azote à 4°C.

III- 3-3-2 Préparation de bicouches (éclatement des vésicules)

Le dépôt des vésicules à été réalisé sur deux types de surfaces solides; le verre et le mica selon la procédure suivante :

Les surfaces sont incubées pendant 1h avec la solution de LUV 10 fois diluée, c'est-à-dire 0.2mg/ml, à laquelle 2mM de Ca^{2+} (CaCl_2) sont ajoutés pour stimuler l'éclatement et la fusion

Fabrication des membranes phospholipidiques modèles et leur caractérisation par AFM et microscopie de fluorescence

des vésicules sur la surface. Le surplus de lipides est éliminé par rinçage en remplaçant le surnageant par la solution tampon Tris 15mM, pH 7.2 (Figure III-20). Les bicouches sont conservées à l'état hydraté dans le Tris, à pH7.2 et utilisées le jour même du dépôt.

Après dépôt, nous vérifions de manière systématique l'homogénéité des bicouches supportées par microscopie de fluorescence. La figure III-21 représente deux images de fluorescence typiques d'une bicouche déposée selon le protocole décrit ci-dessus.



Figure III-19. Le mini-extruder avec les deux seringues.

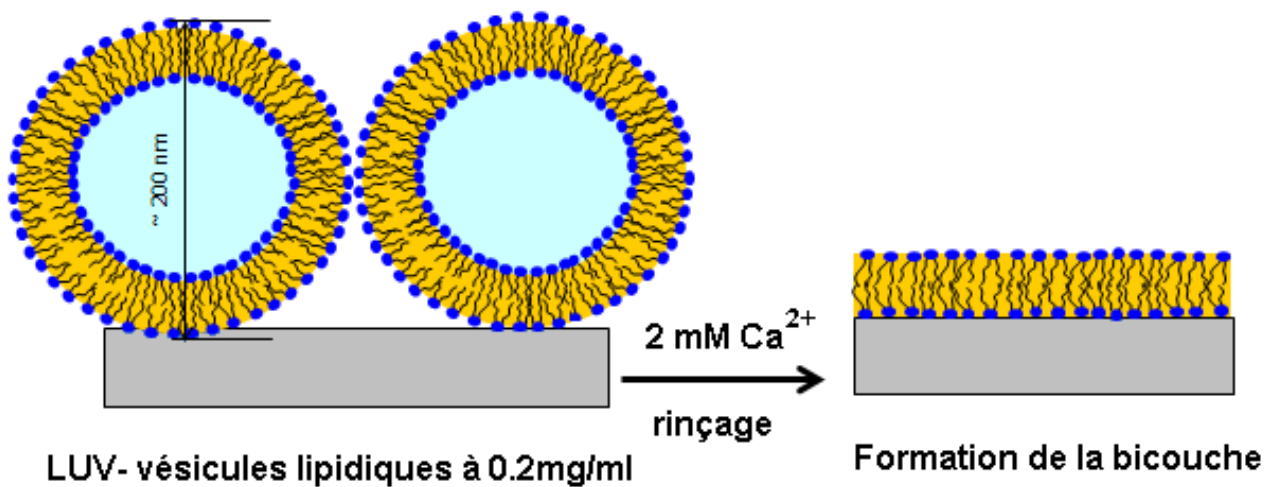


Figure III-20. Formation de bicouche phospholipidique par la méthode de fusion de vésicules.

III- 3-3-3 Caractérisation des bicouches préparées par fusion de vésicules

a- par microscopie de fluorescence

Sur la figure III-21.a, nous présentons une surface dense et homogène, confirmant la fusion et dépôt de la bicouche sur la surface. Sur la figure III-21.b, nous voyons des inhomogénéités à la surface à cause de quelques vésicules qui ne sont pas éclatées.

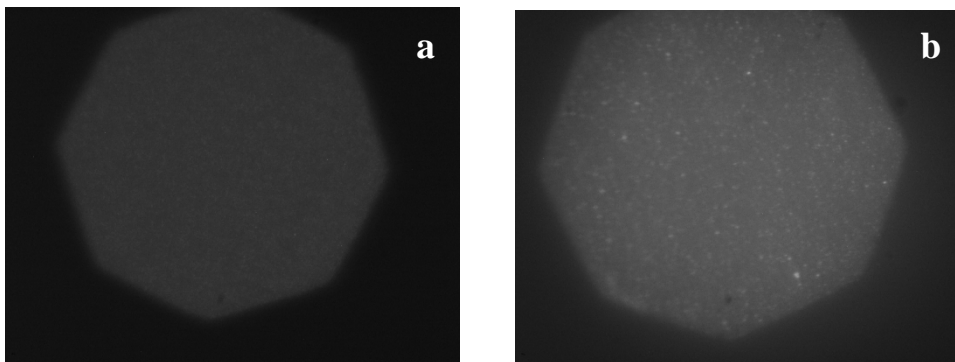


Figure III-21. Image de fluorescence d'une bicouche DOPC sur le verre : à gauche : dépôt homogène ; A droite : surface avec des points plus lumineux que d'autres à cause de vésicules non éclatées.

b- par AFM

Nous vérifions aussi par AFM la qualité du dépôt avant de faire des mesures de force. Sur la Figure III-22, nous présentons l'état de deux bicouches différentes sur le mica : l'une est pratiquement homogène et l'autre présentant des trous et qui sera ainsi exclue de notre étude.

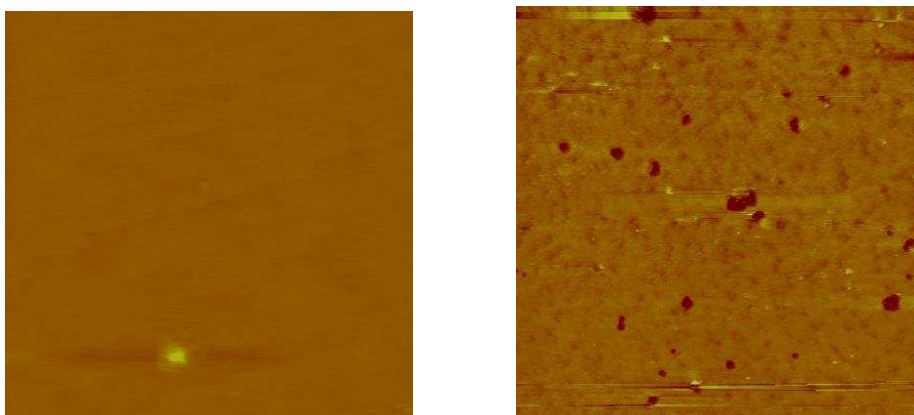


Figure III-22. Topographie de bicouches de DOPC sur le mica : à gauche bicouche homogène qui sera étudié en nanomécanique ; à droite bicouche présentant des trous de hauteurs de 5nm.

III-4 Bilan

Nous avons préparé des bicouches phospholipidiques supportées par trois méthodes différentes.

Nous avons vérifié l'homogénéité et l'intégralité de ces bicouches par AFM et par spectroscopie de fluorescence. Avec les bicouches de DOPC et DPPC préparées par la méthode des micelles et vésicules, nous allons étudier les propriétés nanomécaniques des membranes (chapitre IV). Les bicouches de DPPC préparées par la méthode de Langmuir-Blodgett, vont nous servir à l'étude de l'insertion des protéines dans les membranes phospholipidiques (chapitre V).

Nous avons également préparé des bicouches mixtes de PC /PE/CL, par la méthode d'extrusion de vésicules, dans le but de biomimer la membrane interne de la mitochondrie (chapitre V).

CHAPITRE IV

Etude des propriétés nanomécaniques des membranes phospholipidiques par AFM

CHAPITRE IV

Etude des propriétés nanomécaniques des membranes phospholipidiques par AFM

La microscopie à force atomique est devenue un outil très important pour l'étude de la structure et la stabilité des bicouches phospholipidiques supportées. Elle a été utilisée pour mesurer les interactions entre les bicouches et la pointe [117] et pour observer la nature des défauts dans la bicouche [13]. Plusieurs études ont été reportées concernant l'effet de différents paramètres physico-chimiques sur l'intégrité des bicouches supportées par l'AFM: la dépendance du pH [118], la pression de dépôt de la couche lipidique externe [119] ou de la température [120].

La spectroscopie de force de l'AFM donne des informations expérimentales précieuses sur les forces d'interaction et le comportement mécanique des systèmes avec une résolution nanométrique en position et de quelques dizaines de piconewton en force à travers les courbes force-distance [13]. Des sauts ont été décrits dans les courbes d'approche sur les bicouches lipidiques, cette rupture étant interprétée comme la pénétration de la pointe de l'AFM à travers la bicouche [14]. La force à laquelle se produit ce saut est la force maximale à laquelle la bicouche peut résister avant de « casser ». Ainsi, la mesure quantitative de cette force peut nous éclaircir sur des informations de base concernant la nanomécanique de la cellule de la membrane ainsi que sur sa stabilité [15].

Dans ce chapitre, nous allons présenter et discuter nos résultats sur l'étude de la stabilité des bicouches phospholipidiques supportées dans des conditions différentes, nous avons pu montrer le rôle que jouent le pH et les ions dans la résistance de la bicouche à la nanoindentation de la pointe AFM.

IV-1 Mesures de nano-indentations

Nous avons étudié la résistance nanomécanique des bicouches supportées sur les surfaces de verre et sur le mica. Nous avons effectué cette étude dans les milieux suivants:

- L'eau ultra-pure à pH 5.5.
- Solution tampon Tris/ HCl 15mM, pH 7.2.
- Solution saline NaCl 150mM, pH 5.8.
- Solution saline tamponnée NaCl 150mM, Tris 15mM, pH7.2.

Cette étude a été réalisée par des mesures de nanoindentation de la bicouche avec une pointe AFM. Pour chaque condition nous avons réalisé des centaines, parfois des milliers de courbes force-distance pour la même bicouche et à des endroits différents. La nanoindentation a été réalisée avec le NanoscopeIII (Veeco, CA) avec une force maximale de 20nN.

Une estimation de la pression maximum correspondante exercée par la pointe est obtenue en divisant la force mesurée à la rupture avec une aire de contact géométrique :

$$A=2\pi R\varepsilon \quad (IV-1)$$

où R est le rayon de la pointe AFM, et ε la distance indentée.

En prenant $\varepsilon = h/2 = 2.25$ nm (la moitié de l'épaisseur d'une bicouche de DOPC), $R \sim 30$ nm pour le rayon de la pointe utilisée, nous appliquons pour cette étude une pression maximum de $P \sim 50$ MPa.

La vitesse d'approche de la pointe a été maintenue à 400 nm/s pour toutes les mesures. La force de pénétration, longueur de pénétration et force d'adhésion ont été automatiquement calculé en utilisant notre propre code en C++.

Dans la figure IV-1, nous résumons les types de courbes force-distance en données brutes (*i.e.* déflexion en fonction du déplacement du z-piezo) notées (A1-R1) et (A2-R2), que nous avons obtenus avec une bicouche de DOPC :

Le cycle 1 montre une rupture dans la courbe d'approche qui se produit à une déflexion près de 10 nm correspondant à une force de pénétration de 0.88nN avec un saut de 4.6nm. Comme il a été déjà reporté [117, 121, 122], la bicouche est incapable de résister à la force exercée par la pointe et cette force correspond à la pénétration de la bicouche par la pointe. La courbe de rétraction correspondante (courbeR1) présente une forte adhésion autour de 9.4 nN.

Par contre, lorsque la pointe ne pénètre pas la bicouche (A2), la courbe de rétraction ne présente aucune adhésion (courbe R2) [123].

IV-2 Bicouches de DOPC-NBDPC préparées par co-adsorption de micelles sur le verre

Nous avons étudié la stabilité des bicouches de DOPC contenant à chaque fois 1% de NBD-PC préparées par co-adsorption de micelles sur le verre dans quatre conditions différentes :

- DOPC dans l'eau, pH 5.5.
- DOPC dans le Tris 15mM, pH 7.2.
- DOPC dans NaCl 150mM, Tris 15mM, pH 7.2.
- DOPC dans NaCl 150mM, pH 5.8.

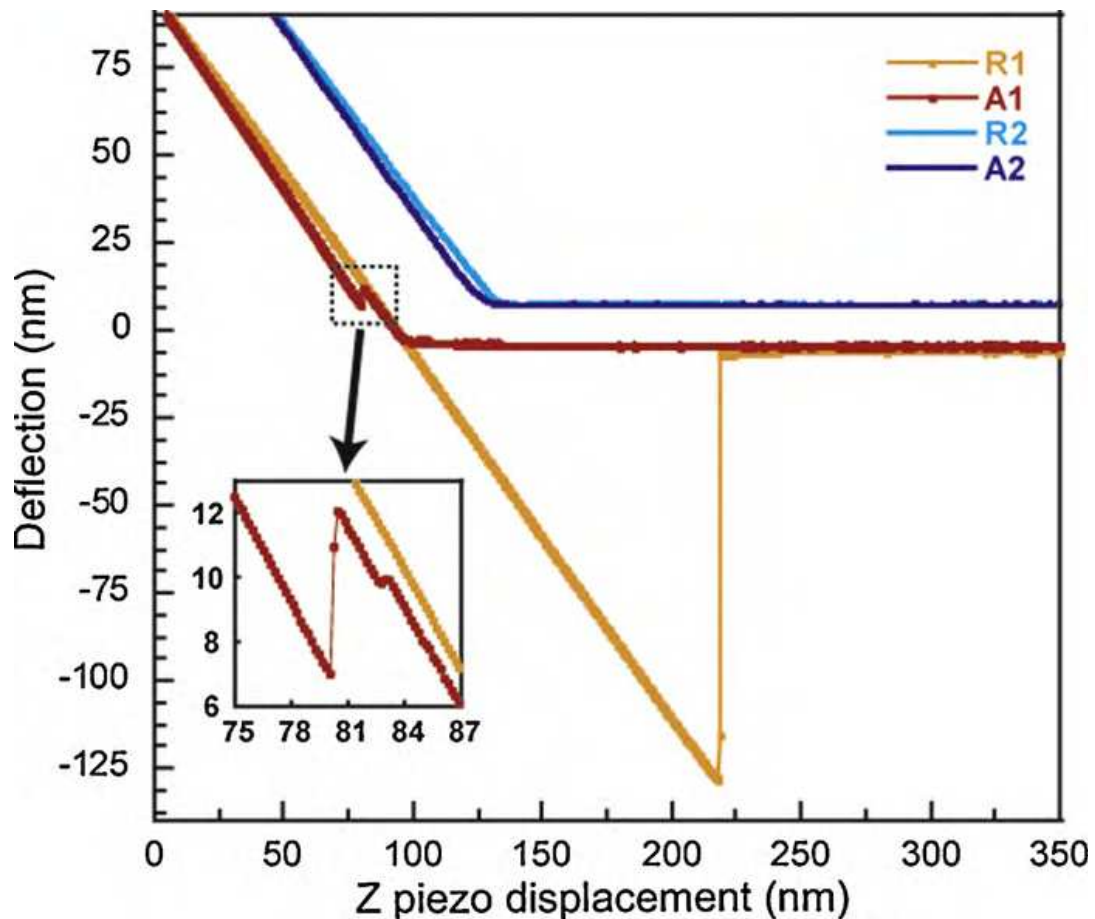


Figure IV-1. Courbes typiques brute déflexion-distance enregistrées avec une bicouche de DOPC sur le verre. $K= 0.08\text{N/m}$. A et R correspondent aux courbes aller et retour respectivement. Cycle 1 dans l'eau ultrapure (pH5.5) ; Cycle 2 dans le Tris15mM, pH7.2.

IV-2-1 Bicouches de DOPC dans l'eau ultrapure, pH 5.5

IV-2-1-1 Bicouches de DOPC préparées par une seule incubation

Les statistiques montrent que la bicouche est pénétrée dans 100% des tests de nano-indentation et que la force de pénétration est de moins de 1nN; la bicouche n'est pas stable et ne peut résister en moyenne à une force supérieure 0.3nN (Figure IV-2.A). La longueur de pénétration est centrée autour de 5nm (exactement 4.75nm) (Figure IV-2.B), ce qui correspond bien à l'épaisseur d'une bicouche de DOPC [123,125]. Au retour, la force d'adhésion diffère d'une bicouche à l'autre, elle va de 0 à 20 nN (Figure IV-2.C).

IV-2-1-2 Bicouches de DOPC préparées par deux incubations

Les bicouches préparées avec deux incubations sont aussi pénétrées dans 100% des cas mais nous constatons une différence importante : la bicouche peut résister à des forces jusqu'à 2 nN. Ces forces dépendent un peu de la pointe utilisée (couleur différente, Figure IV-2 D). La longueur de pénétration est centrée autour de 4.5- 5 nm mais on remarque l'existence d'un maximum secondaire vers le double de cette valeur (Figure IV-2 E). Nous avons donc ajusté cette distribution à l'aide d'une somme de deux gaussiennes de centre multiple d'une même distance élémentaire. La distribution de la force d'adhésion est large comprise entre 6 et 9nN, (Figure. IV-2 F).

IV-2-1-3 Bilan

D'après ces résultats, nous constatons que dans les deux cas les bicouches sont poncturées dans 100% des cas, avec une force un peu plus grande pour le cas de deux incubations. La distribution de la distance du saut est indépendante de la pointe utilisée, elle montre un premier pic large centré à 4.75 et 4.35nm pour une et deux incubations respectivement. Ces valeurs sont robustes même si l'on utilise une distribution bimodale avec deux gaussiennes (courbes pointillées sur la Figure IV-2 B-E) pour ajuster les données. Les histogrammes des forces d'adhésion sont larges, avec des valeurs comprises entre 0 et 20 nN dans les deux cas (une ou deux incubations), mais tendent à varier d'une expérience à l'autre avec la pointe utilisée (Figure IV-2 C, F). La force d'adhésion ne peut donc refléter de la stabilité de la bicouche, et ne constitue pas vraiment un facteur caractéristique de la résistance de la bicouche. Une grande variation est également visible dans la répartition de la force de rupture sur la figure IV-2D selon la pointe utilisée. Elle pourrait indiquer soit de légères variations dans les propriétés de surface des pointes comme il a été déjà remarqué dans des études antérieures [122], ou de différentes quantités de détergent restées dans la bicouche.

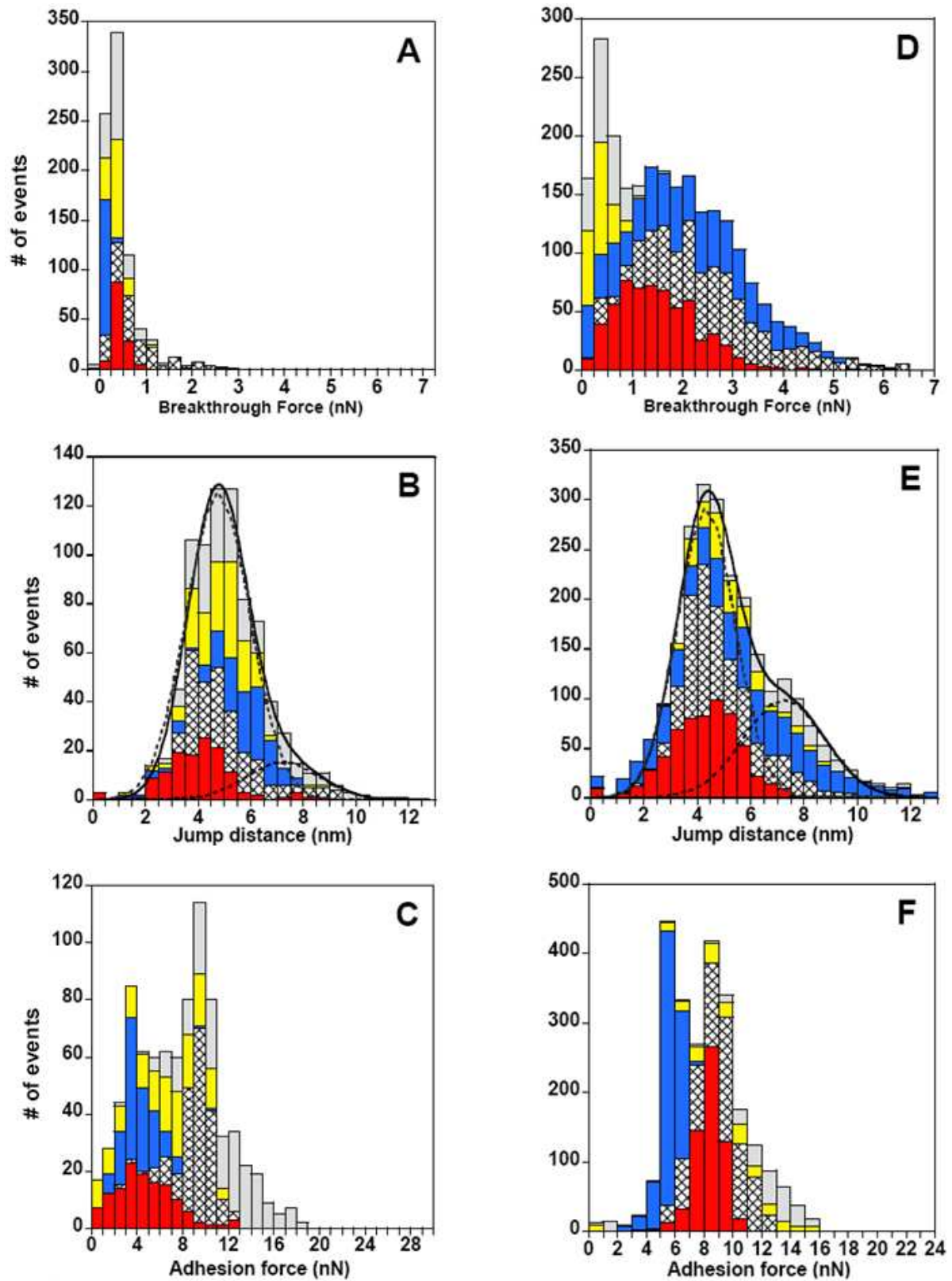


Figure IV-2. Histogrammes des mesures de force de bicouche de DOPC dans l'eau : (A, D) Forces de pénétration ; (B, E) Longueur de pénétration ; (C, F) Forces d'adhésion. (A-C) Une incubation ; (D-F) Deux incubations. Les couleurs correspondent à des expériences différentes, avec des échantillons différents.

IV-2-1-4 Discussion et interprétation

Dans l'eau ultrapure, les bicouches sont systématiquement pénétrées par les pointes AFM. La distance du saut est fréquemment centrée autour de 4.5nm (*i.e.* la hauteur d'une bicouche de DOPC) [112,114]. La distribution présente aussi des queues larges qui vont jusqu'à 10nm (Figure.IV-2 B,E). Ces valeurs correspondent bien à l'épaisseur de deux bicouches de DOPC. Dans une littérature récente, il est suggéré que dans l'eau, une bicouche se forme parfois sur la pointe de l'AFM et peut donc interagir avec la bicouche sur la surface plane, d'où cette double épaisseur [15,105,122]. Cette formation spontanée de la bicouche sur la pointe se produit dans 10 à 25% des cas dans l'eau ultrapure, et dépend du nombre d'incubations comme il est déterminé par les distributions bimodales tracées dans la Figure.IV-2, B et E.

Dans une étude récente menée au laboratoire sur la machine de force de surface (SFA), avec une sphère de 3mm de diamètre qui s'approche d'une bicouche de DOPC préparée par la méthode de coadsorption de micelles mixtes, l'adsorption de la bicouche sur la surface de la sphère de verre se produit dans 100% des cas [12]. Le même phénomène a été reporté par Grant *et al.* [124] avec des surfaces couvertes de bicouches de surfactant.

Cette propension de s'adsorber sur l'autre surface durant le contact est certainement reliée à la présence de traces de détergent qui diminue l'énergie de courbure de la surface : il est possible que l'interaction détergent-lipide dans l'eau provoque une courbure spontanée et une déstabilisation de la bicouche. Le DOPC qui est sensé former une bicouche plane, voit son rayon de courbure spontané drastiquement réduit, en présence du détergent. Ceci explique mieux l'adsorption fréquente sur la sphère de verre de 3mm de la SFA que sur la pointe AFM. L'effet du détergent pourrait être similaire à celui du cholestérol qui provoque la courbure spontanée de la surface. [125,126].

IV-2-2 Bicouches DOPC-NBDPC dans le Tris 15mM (pH7.2)

Rappelons que les bicouches ont été préparées de la même façon que dans l'eau, sauf qu'à la fin, l'eau est remplacée par le Tris/HCl 15mM, le pH du milieu est maintenu à 7.2. Les courbes de force dans le Tris n'ont montré aucune pénétration lorsqu'on applique une force de 20 nN (force maximum appliquée dans toutes nos expériences, Figure IV-3.A-D), ni d'adhésion d'ailleurs. Les bicouches sont résistantes et plus stables dans ce cas. Nous n'avons pas vu de différence remarquable entre une et deux incubations.

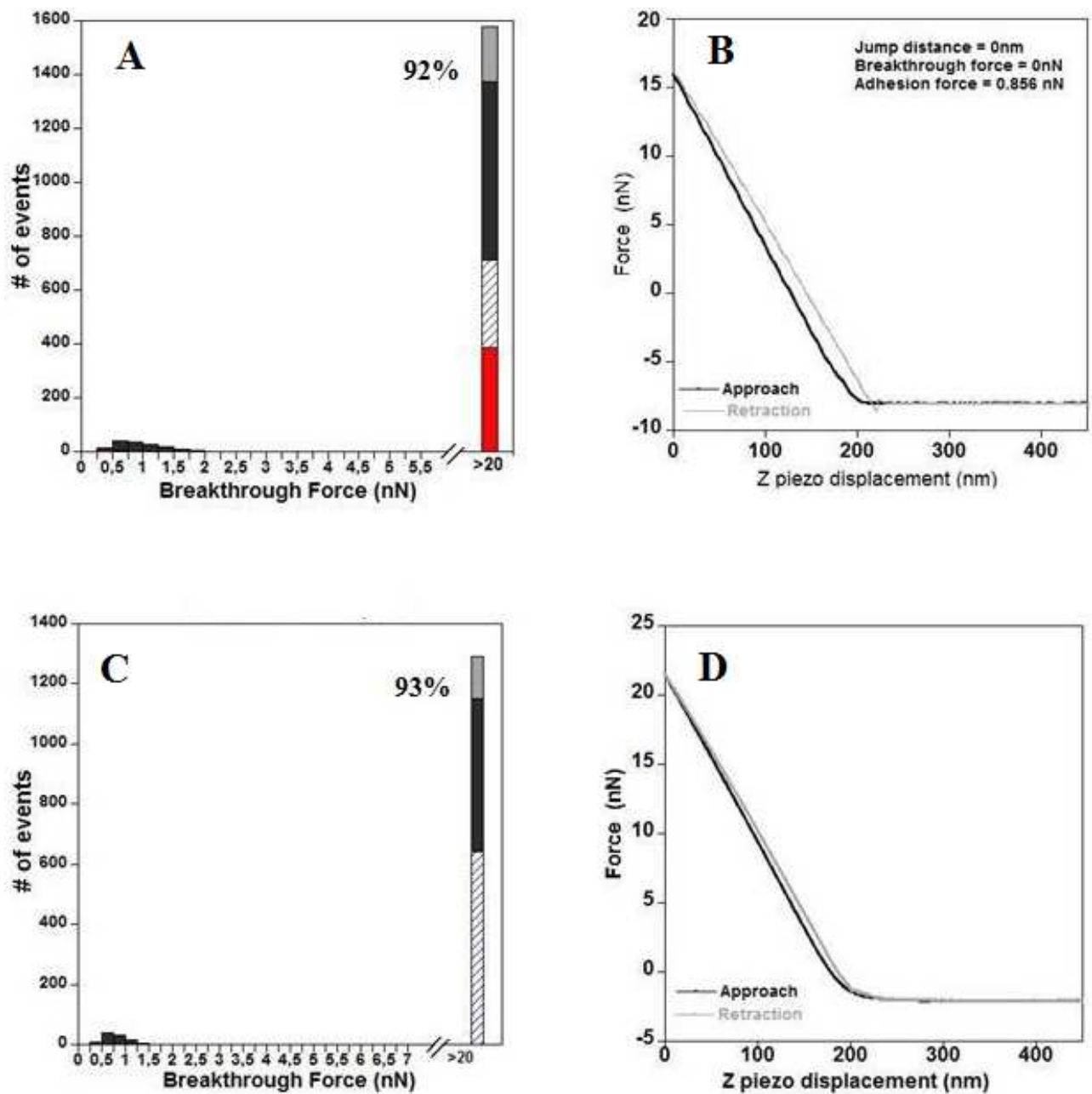


Figure IV-3. Histogrammes correspondant aux forces de pénétration (A,C) et courbes force distance (B,D) de bicouches DOPC dans le tris15mM, pH7.2 (A,B : 1 incubation) et (C,D : deux incubations).

IV-2-3 Bicouches DOPC-NBDPC dans le NaCl 150mM, Tris 15mM (pH 7.2)

Lorsque nous changeons le milieu en solution saline tamponnée ; NaCl 150mM, Tris 15mM, pH 7.2, la bicouche résiste aux forces appliquées et les courbes de force ne montrent

Etude des propriétés nanomécaniques des membranes phospholipidiques par AFM

aucune pénétration (Figure IV-4). Comme nous l'avons constaté pour le tampon Tris, le nombre d'incubation n'est pas un facteur essentiel ici.

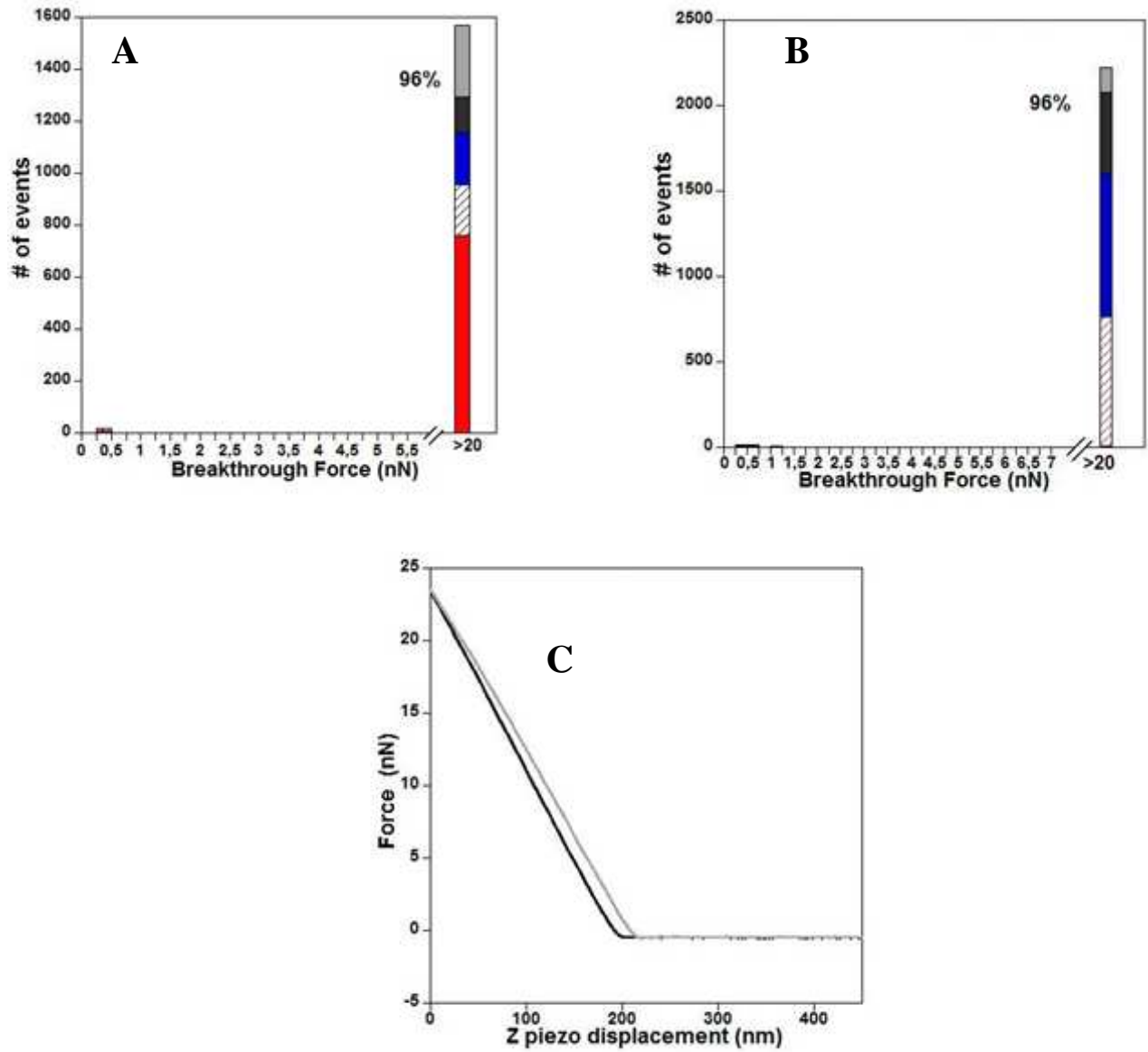


Figure IV-4 Histogrammes des forces de pénétration (A, B) et courbe typique force- distance (C) de bicouches DOPC dans NaCl 150mM, pH7.2 (A :1 et B :2 incubations) .

IV-2-4 Bicouches DOPC-NBDPC dans le NaCl 150mM (pH 5.8)

Dans NaCl 150mM, pH 5.8 (solution non tamponnée), les bicouches résistent à l'indentation avec une fréquence de 68%.

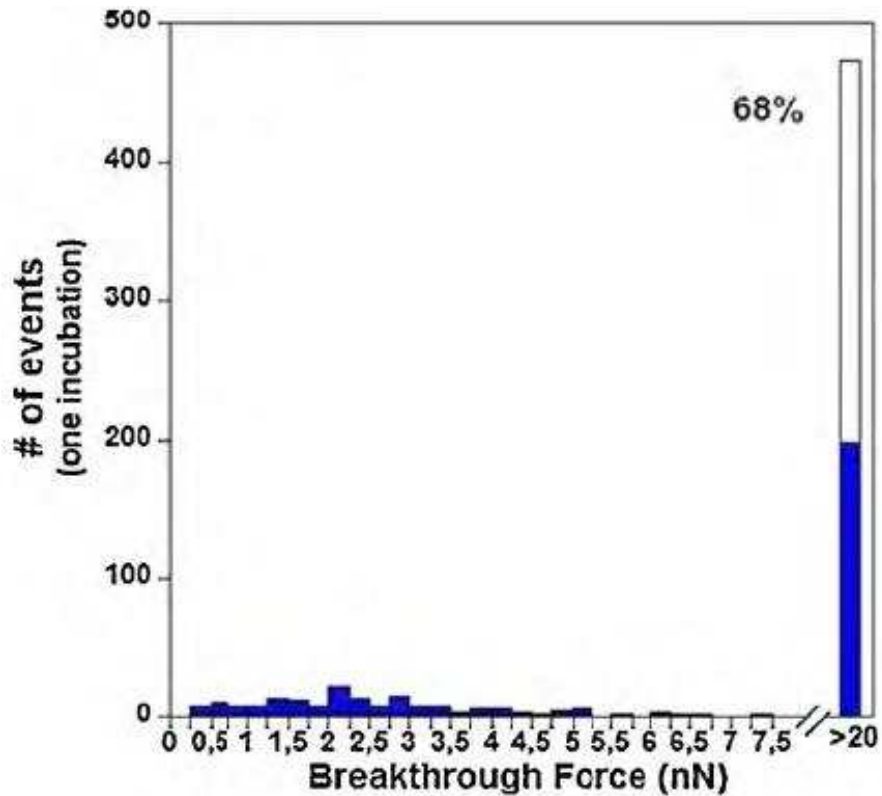


Figure IV-5. Histogramme des forces de pénétration sur bicouche de DOPC-NBDPC dans NaCl 150mM, (pH 5.8).

IV-3 Bicouches de DOPC-NBDPC préparées par éclatement de vésicules sur le verre

Nous constatons que les bicouches préparées par la fusion des vésicules sont plus résistantes que celles préparées par la méthode des micelles. Dans le cas où les bicouches sont indentées, la longueur de pénétration est toujours de l'ordre de l'épaisseur d'une bicouche; ce qui confirme bien le rôle du détergent résiduel dans le cas des micelles. Nous allons présenter les résultats obtenus dans les trois cas :

- Eau ultrapure, pH 5.5
- Tris/HCl 15mM, pH 7.2
- NaCl 150mM, Tris 15mM, pH 7.2

IV-3-1 DOPC-NBDPC dans l'eau ultrapure, pH 5.5

Les bicouches de DOPC préparées à partir de vésicules sont plus stables dans l'eau que celles préparées par la co-adsorption des micelles.

Lorsqu'elles sont pénétrées, la force moyenne est de 10 nN ; dans 50% des cas, cette force est supérieure à 20 nN (Figure IV-6).

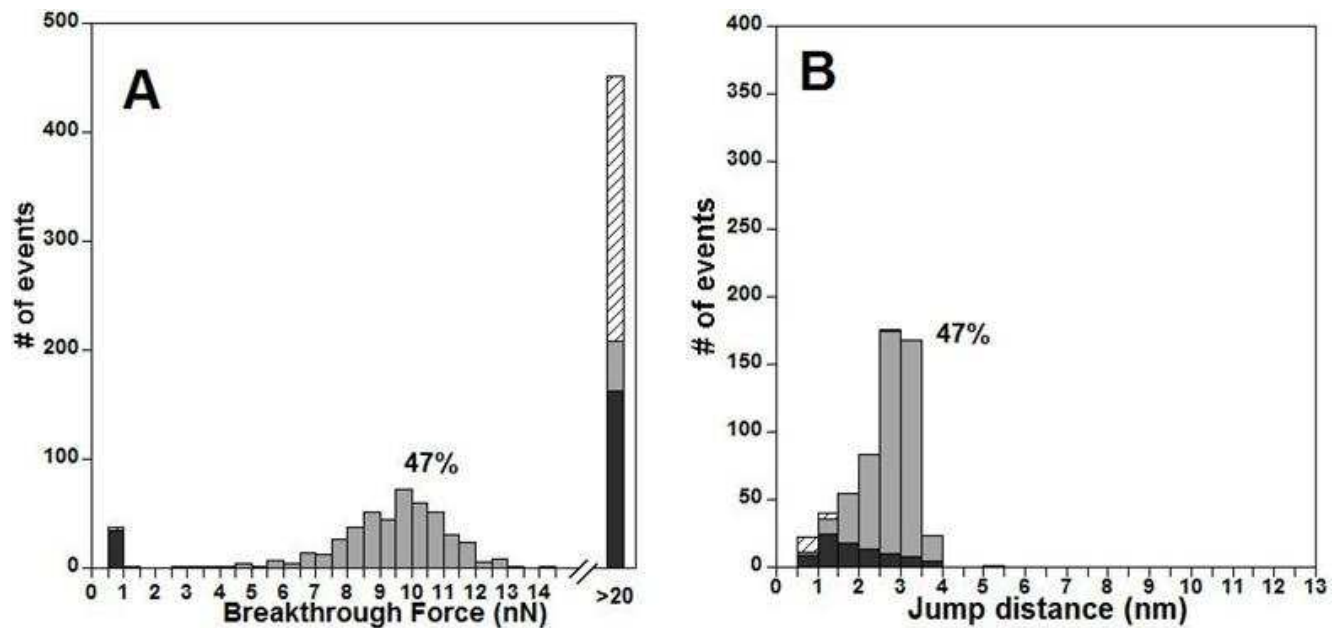


Figure IV-6. Histogrammes des mesures d'indentation dans l'eau sur bicouche DOPC préparée par fusion de vésicules sur le verre (pH 5.5).

IV-3-2 Bicouche DOPC-NBDPC dans le Tris 15mM (pH 7.2)

L'effet du tampon Tris est encore confirmé avec les vésicules, nous n'avons pas obtenu de pénétration en dessous de 20 nN. (Figure IV-7).

IV-3-3 Bicouche DOPC-NBDPC dans NaCl 150mM, Tris 15mM (pH 7.2)

Les bicouches dans le sel ont montré encore une fois une forte résistance à l'indentation en présence du sel à pH 7.2 (Figure IV-8).

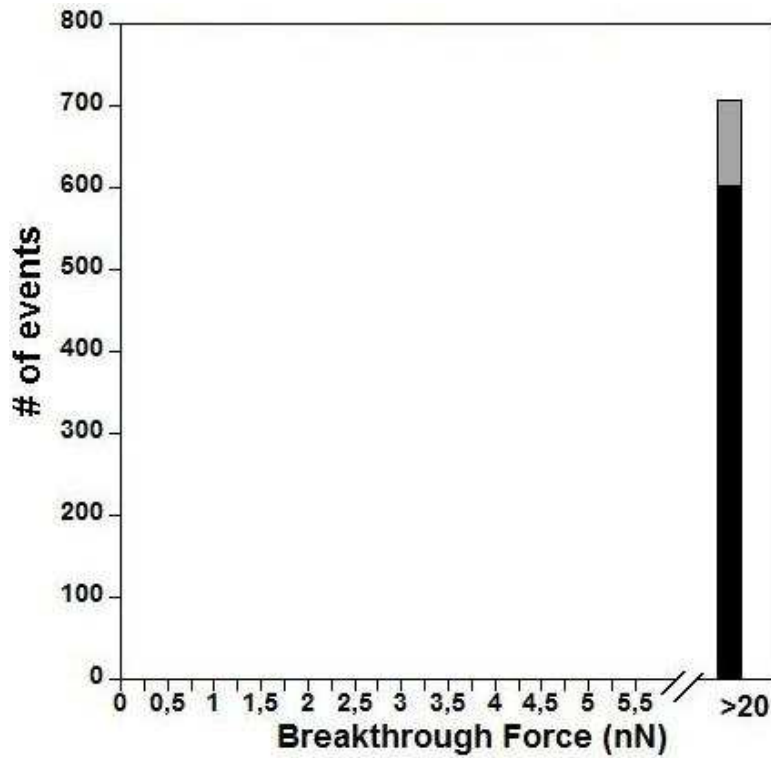


Figure IV-7. Histogramme des mesures d'indentations dans le Tris sur bicouche DOPC (vésicules) sur le verre (pH 7.2).

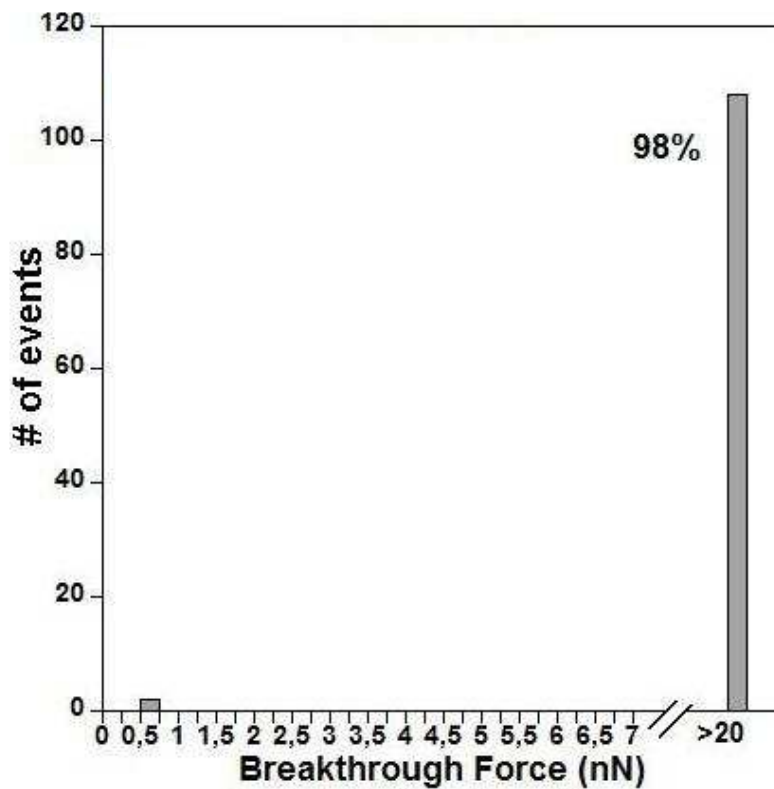


Figure IV-8. Histogramme des forces de pénétration dans NaCl 150mM sur bicouche DOPC (vésicules) sur le verre à pH 7.2.

IV-4 Bicouches de DOPC-NBDPC préparées par éclatement de vésicules sur le mica

Nous avons préparé des bicouches de DOPC-NBDPC par fusion de vésicules en utilisant le mica comme support.

IV-4-1 DOPC-NBDPC dans l'eau ultrapure

Les mesures de force ont montré une non pénétration ni adhésion (Figure IV-10), contrairement au cas du verre où nous avons 50% de pénétration à 10 nN dans l'eau (Figure IV-6).

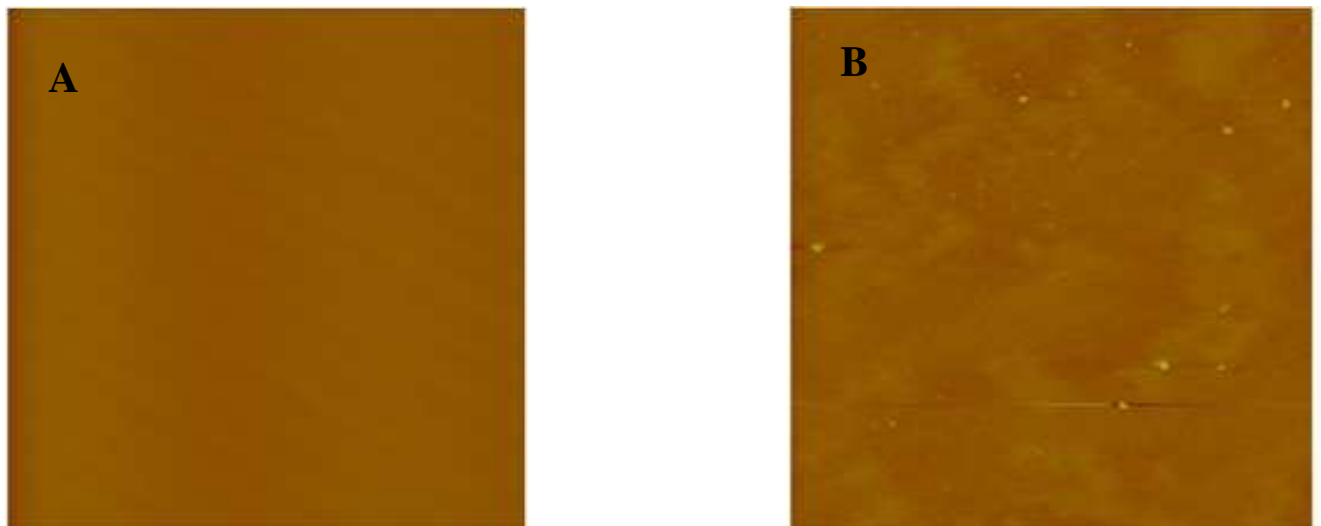


Figure IV-9. A-Topographie du mica nu (10 x 10 μ m) ; B -Une bicouche DOPC sur le mica dans l'eau sur 3 μ m.

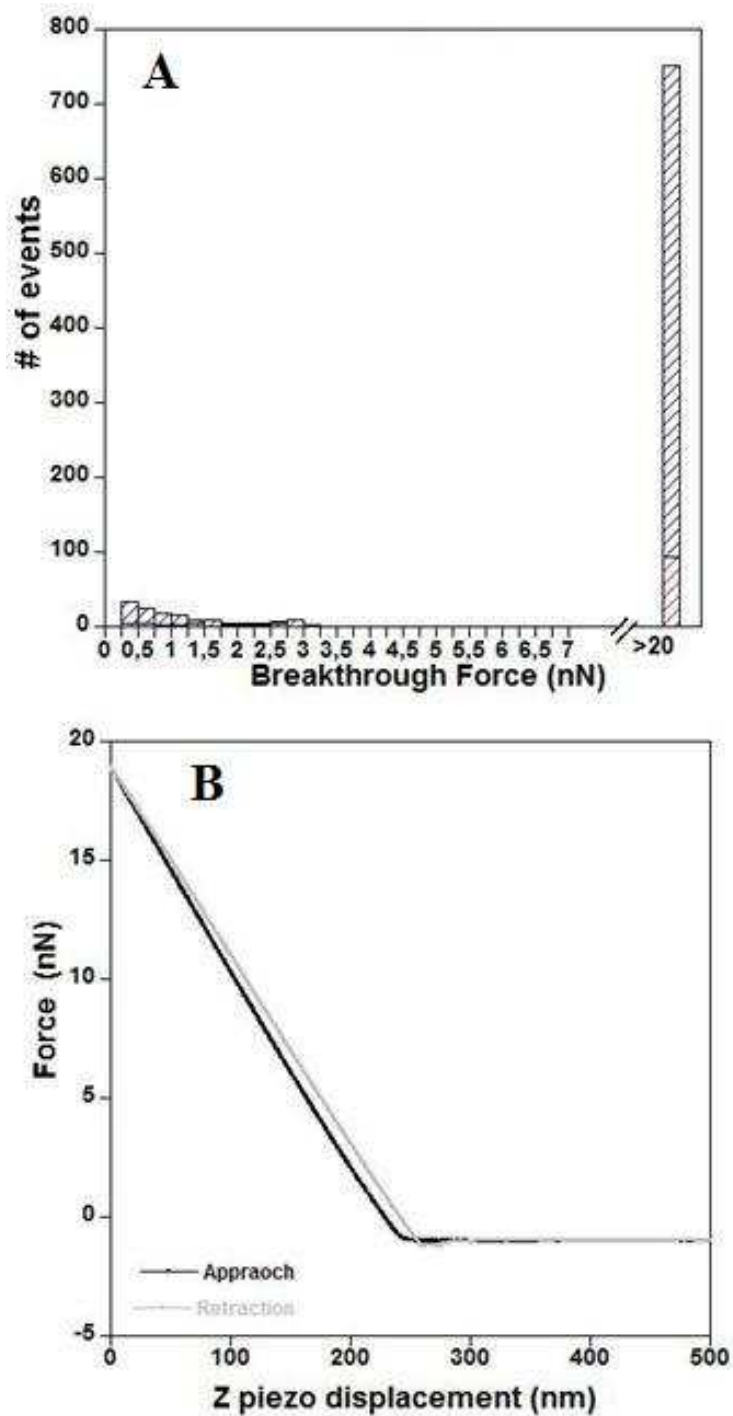


Figure IV-10. (A)- Histogramme de force de pénétration de bicouches DOPC (vésicules) sur le mica dans l'eau à pH 5.8 ; (B)- courbe typique force-déplacement z-piézo.

IV-4-2 DOPC-NBDPC dans le Tris 15mM, pH 7.2

Comme nous l'avons prévu, et d'après les résultats avec le verre ; si la bicouche est stable dans l'eau, elle doit l'être aussi dans le Tris et le sel. C'est ce que nous avons vérifié (Figure IV-11).

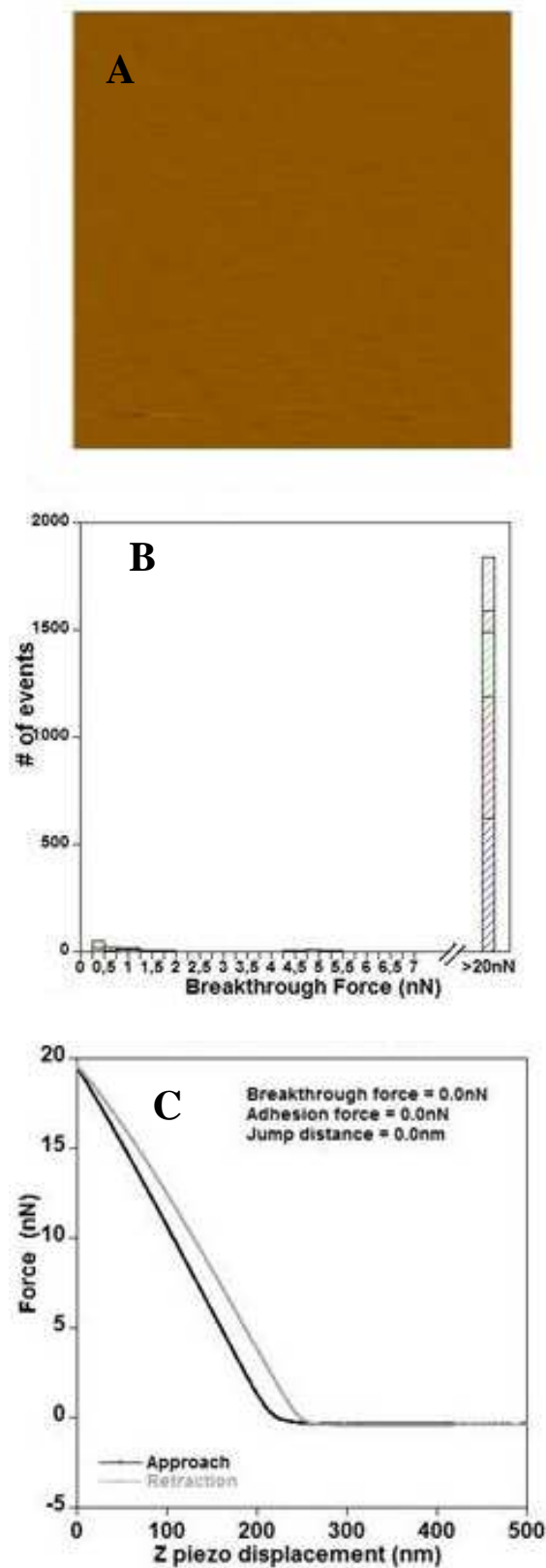


Figure IV-11. Bicouches de DOPC-NBDPC (vésicules) sur le mica dans le Tris pH7.2 :
(A)-Topographie ($1 \times 1 \mu\text{m}$) ; (B)- Histogramme des forces de pénétration ; (C) courbe typique force-déplacement du piézo.

IV-4-3 DOPC-NBDPC dans NaCl 150mM, pH 7.2

Dans le sel tamponné, nous n'observons pas de pénétration ni d'adhésion comme c'est le cas dans le Tris.

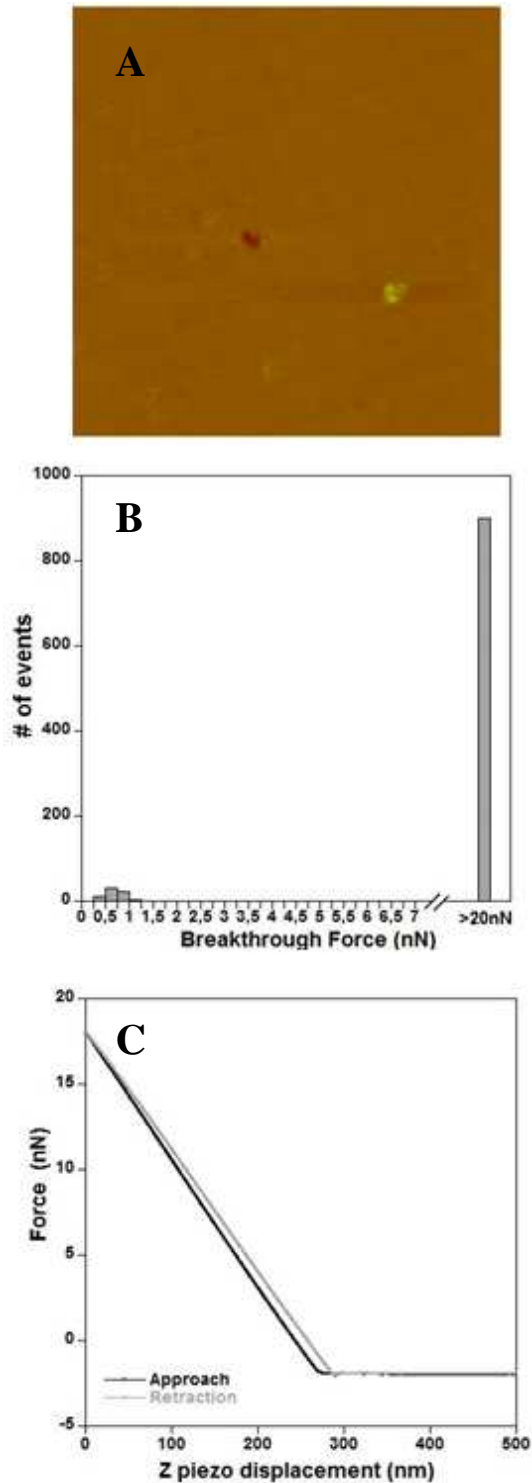


Figure IV-12. Bicouches de DOPC vésicules sur le mica dans NaCl pH7.2 : (A)- Topographie (3x3 μ m); (B)- Histogramme des forces de pénétration ; (C) courbe typique force-déplacement du z-piézo.

IV-5 Bicouches mixtes de DOPC/DPPC préparées par éclatement de vésicules sur le mica

Nous avons réalisé des bicouches mixtes contenant un mélange DOPC/DPPC 1/1 (mol/mol) par la méthode de fusion de vésicules sur le mica.

IV-5-1 Topographie

En topographie nous avons obtenu des domaines avec des hauteurs de moins de 1nm de différence (Figure IV-13) qui sont classiquement obtenus dans la littérature [5].

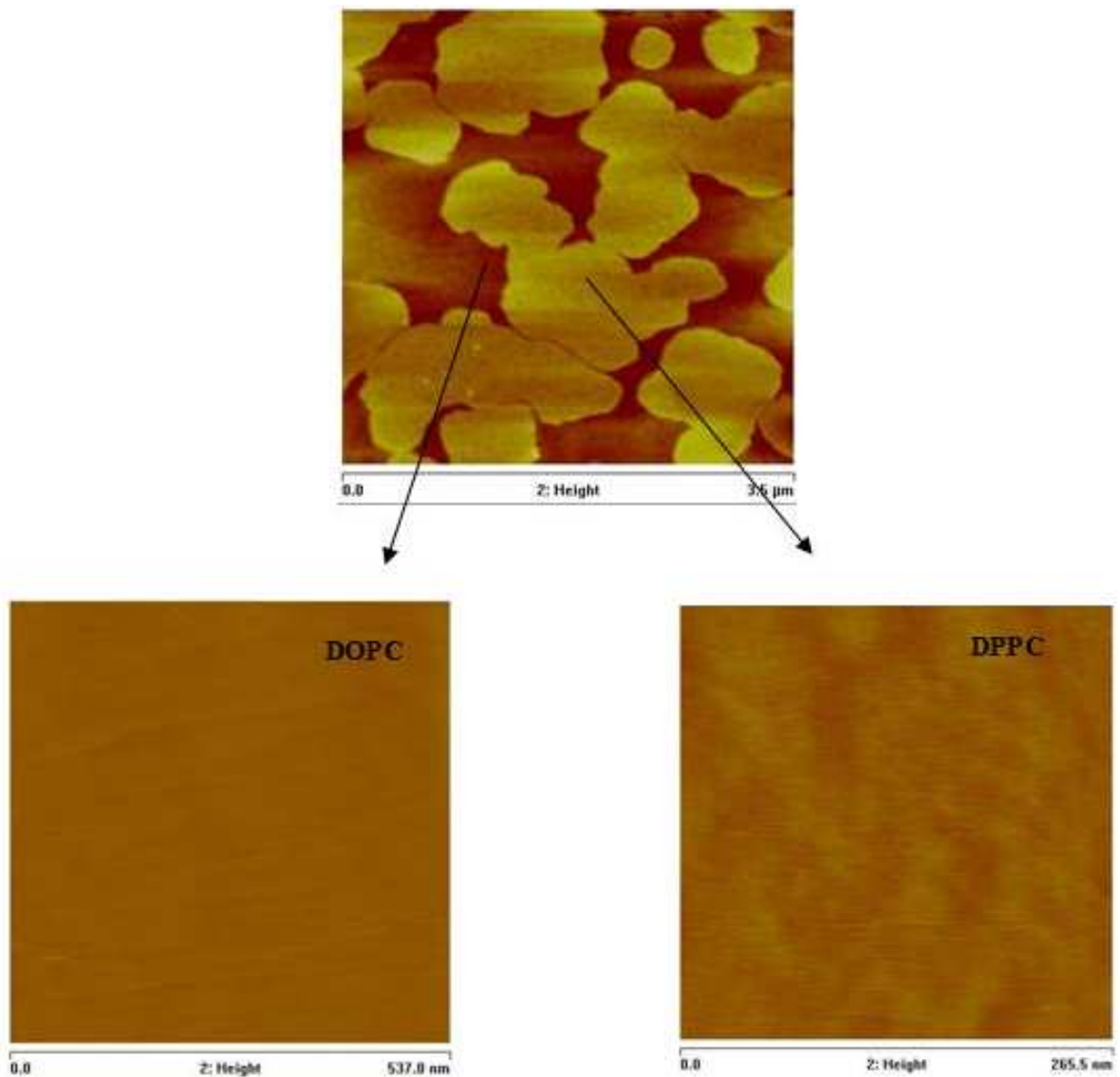


Figure IV-13. Bicouche mixte de DOPC/DPPC 1/1 (mol/mol) sur le mica à pH 7.2.

IV-5-2 Mesure de force

Les mesure de forces sur chaque zone à part ont montré la résistance de cette bicouche à l'indentation ;

DOPC : phase fluide, nous n'avons pas constaté de pénétration, comme dans le cas d'une bicouche de DOPC pure.

DPPC : phase solide, plus stable, pas de pénétration non plus.

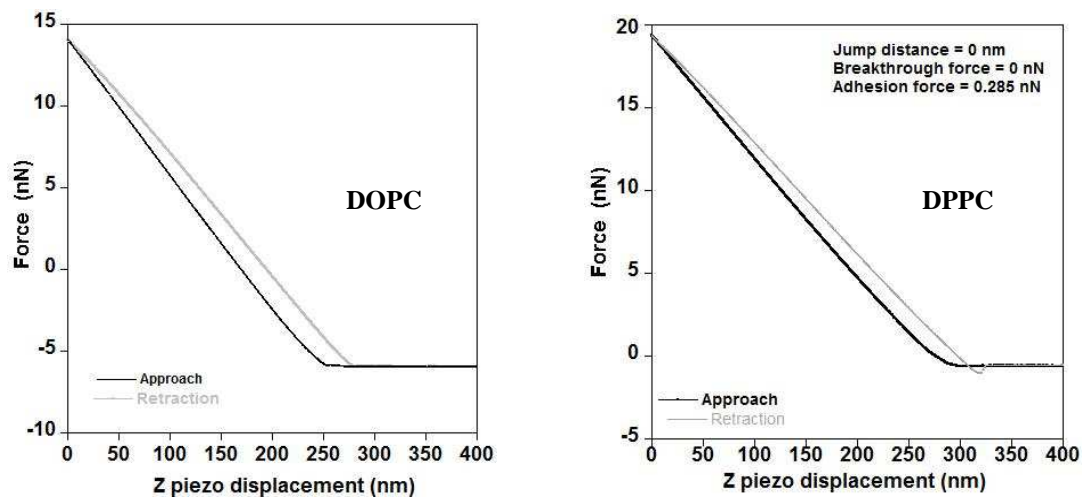


Figure IV-14. Courbes force-distance dans une bicouche mixte DOPC/DPPC sur le mica en solution tampon Tris 15mM, pH 7.2.

IV-6 Bilan

Nous commençons par récapituler nos résultats et terminons par la discussion et la conclusion.

Les bicouches préparées avec les micelles ne résistent pas à des forces supérieures à 0.3-0.5 nN dans l'eau (1 incubation).

- Le nombre d'incubations a un effet mesurable sur la force de pénétration moyenne. Nous enregistrons une résistance jusqu'à 2 nN pour deux incubations.
- Dans le tampon Tris 15 mM, pH=7.2 avec ou sans sel, les bicouches préparées avec les micelles résistent toutes à une indentation $F > 20$ nN.
- Les bicouches préparées avec les vésicules résistent dans l'eau à des forces au moins supérieures à 5 nN et supérieures à 20 nN dans 50% des cas.
- Dans le Tris pH 7.2, elles résistent à des forces supérieures à 20 nN.

- Lorsqu'elles sont indentées, la longueur de pénétration est toujours d'une épaisseur de bicouche pour celles préparées avec les vésicules, d'une ou deux épaisseurs pour celles préparées avec les micelles à cause de l'adsorption d'une bicouche sur la pointe. Nous confirmons encore une fois que les vésicules sont plus résistantes que les micelles.

-Le sel joue un rôle important dans la stabilité des bicouches mais moins que celui du pH.

IV-7 Discussion et conclusion

La résistance à l'indentation de la bicouche de DOPC dans une solution saline est bien corrélée avec une étude de spectroscopie de force qui montre que plus grande est la force ionique, plus grande est la force qui doit être appliquée par la pointe de l'AFM pour pénétrer la bicouche [15]. Les auteurs expliquent la forte résistance à l'indentation comme une augmentation des interactions latérales lipide-lipide (*i.e.*, la cohésion de la bicouche due à la diminution des répulsions latérales entre les têtes chargées) provoquée par l'adsorption d'ions positifs (Na^+ , Ca^{2+}).

Cette conclusion est renforcée par différents résultats expérimentaux et théoriques : lorsque la force ionique augmente, la charge des liposomes PC augmente et ceci est dû à l'adsorption d'ions positifs. Cette charge est nulle dans NaCl 100mM [15,127]. L'augmentation de la concentration de NaCl provoque aussi une diminution du coefficient de diffusion des lipides POPC à l'intérieur de la bicouche [109]. Les simulations par dynamique moléculaire MD ont révélé une liaison forte des ions de sodium à l'oxygène du groupement carbonyle de trois molécules de lipides en moyenne [109]. Ce schéma simplifié pourrait expliquer la résistance à l'indentation normale des bicouches lipidiques supportées dans la solution tampon du Tris à pH 7.2 en l'absence de sel, si on assume que les cations du Tris s'adsorbent sur la bicouche.

Nous constatons aussi que les bicouches préparées par la méthode de fusion des vésicules sont plus résistantes que celles en micelles, ceci est probablement dû à l'absence de traces de détergent.

Les bicouches de DPPC (phase gel) n'ont jamais été indentées. Ces résultats sont en parfaite corrélation avec des expériences de tribologie menées au laboratoire (Thèse de doctorat M-C.Corneci en cours de rédaction, INSA Lyon). Cette étude est menée par la mesure du coefficient de friction μ entre des surfaces hydrophiles de lentilles de HEMA

(hydroxyéthylmethacrylate) et un plan de borosilicates couvertes ou non de bicouches de DOPC ou DPPC.

Il est montré qu'il est possible de réduire le coefficient de friction des surfaces nues par 2 ordres de grandeurs à une valeur très reproductible de 0.002 quand les surfaces sont recouvertes de bicouches de DPPC.

Nous observons une corrélation positive entre la résistance à l'indentation normale, un coefficient de friction faible et stable et l'absence de la dégradation de la bicouche pendant le cisaillement.

Dans l'eau ultrapure (pH 5.5), les bicouches sont facilement poncturées, rapidement endommagées et leurs propriétés lubrifiantes diminuent après 20 minutes de friction ($\mu \sim 0.15$ comme dans le cas de surfaces nues). Cette corrélation existe aussi avec le tampon Tris, pH 7.2 et dans la solution saline tamponnée (NaCl 150mM, pH 7.2) où les bicouches résistent aux forces d'indentation de plus de 20nN, et montrent des coefficients de friction faibles et stables ($\mu \sim 0.035$) et sont faiblement endommagées sous le cisaillement [123].

D'autres résultats ont trouvé des coefficients de friction extrêmement bas entre deux surfaces chargées négativement (du mica [128] ou des « brosses » de polyélectrolytes sur le mica [129]) en présence d'ions.

Richetti *et al.* ont trouvé que les surfactants chargés qui s'auto-assemblent sur les surfaces sont des lubrifiants très efficaces aussi longtemps que les couches adsorbées sur la surface frottantes restent intactes [130].

Ainsi, les répulsions électrostatiques entre les surfaces pourraient expliquer le coefficient de friction bas dans le tampon Tris comparé aux surfaces nues dans l'eau ou couvertes de bicouches. La charge du verre et du nitrure de silicium (pointe AFM) diminue avec le pH [131]. La charge des bicouches PC diminue presque linéairement avec le pH : les bicouches sont environ deux fois plus négatives à pH 7.2 qu'à pH 5.5 [132].

CHAPITRE V

*Adsorption des protéines sur surfaces solides et leur
insertion dans les membranes supportées*

CHAPITRE V

Adsorption des protéines sur surfaces solides et leur insertion dans les membranes supportées

V-1 Introduction

Les phospholipides ne sont plus considérés comme des matrices passives dans lesquelles les protéines sont insérées : un ensemble important de preuves ont montré que les espèces phospholipidiques sont impliquées dans la régulation de la conformation et de l'activité physiologique des protéines membranaires. Néanmoins, les mécanismes de cette implication sont encore largement inconnus.

Ainsi, la localisation des protéines dans la membrane et la compréhension des forces qui régissent son insertion et son interaction avec les phospholipides pourraient aider à élucider les fonctions des biomembranes. En outre, il a été montré que la microscopie à force atomique (AFM), est une technique efficace pour obtenir des informations sur les domaines de phospholipides [133,134] dans des conditions biomimétiques.

C'est dans ce contexte que, en collaboration avec des biochimistes de l'Université Claude Bernard Lyon 1 (UCBL, équipe de B. Roux), nous nous sommes intéressés plus particulièrement à l'étude de l'insertion de la phosphatase alcaline à ancrage GPI (PA-GPI) dans une bicouche de DPPC. Cette étude devait permettre de déterminer l'organisation spatiale de la protéine insérée dans des bicouches de phospholipides ainsi que le rôle des ancrage GPI dans l'ancrage de la protéine.

Afin de réaliser des membranes biomimétiques de la membrane interne de la mitochondrie, nous avons étudié en collaboration avec l'équipe de Biochimie de T. Granjon (UCBL) un autre système qui est l'insertion de la créatine kinase (CK) dans une bicouche de

PC/PE/CL. Ce système est de plus en plus étudié à cause des domaines que forme la cardiolipine CL avec les autres lipides. Ces domaines semblent être impliqués dans l'insertion et la localisation des protéines. [5,135]. Comme d'autres phospholipides anioniques tels que les phosphatidyl glycerol, la cardiolipine exerce ses effets cruciaux à la fois par sa contribution aux propriétés physiques de la phase lipidique des membranes et de ses interactions avec les protéines [136]. Ainsi, l'investigation des propriétés de mélange de CL avec d'autres composants majeurs de la membrane mitochondriale interne (PE et PC) fournira des informations précieuses sur la nature de leurs interactions et leurs implications possibles pour les processus d'intérêt biologique.

Dans ce chapitre, nous allons présenter les résultats de l'étude menée par microscopie de fluorescence et microscopie à force atomique sur l'adsorption des protéines sur surfaces solides ainsi que leur insertion dans des bicouches supportées.

Ce Chapitre sera divisé en trois parties. Une première partie sera consacrée à l'étude de l'adsorption des protéines sur des surfaces solides. L'adsorption a été réalisée selon le cas, sur des surfaces de verre nues ou fonctionnalisées.

Les deux parties suivantes seront consacrées à l'étude de l'insertion de protéines (AP et CK) dans les membranes supportées.

V-2 Etude de l'adsorption de protéines sur surfaces solides

Dans cette première partie, nous présentons des études préliminaires d'adsorption de protéines sur surfaces solides silanisées ou non qui nous ont permis de bien mettre au point les conditions d'études des protéines insérées dans des bicouches lipidiques. Plus particulièrement, nous avons mis au point une technique de couplage des protéines par des billes fluorescentes de 27 nm (détails au chapitre II) afin de faciliter leur repérage par microscopie de fluorescence ou AFM. Cette technique a d'abord été réalisée avec de la BSA sur verre mais aussi avec la phosphatase alcaline sur verre silanisé. Nous commençons donc d'abord par détailler la silanisation des surfaces de verre.

V-2-1 Silanisation de surfaces de verre

La silice est constituée d'un réseau de tétraèdres SiO_4 . Les atomes Si de surface conservent leur coordination avec quatre atomes d'oxygène sous forme de groupes silanols

$\equiv\text{Si-OH}$ ou de ponts siloxanes $\equiv\text{Si-O-Si}\equiv$. La modification de surface se fait par silanisation.

La réaction de silanisation a été développée par Plueddemann [137]. Son application est largement utilisée comme par exemple pour la séparation de composés en chromatographie, pour rendre une surface hydrophobe ou pour fixer sur une surface des molécules ayant des propriétés spécifiques. Elle consiste à greffer de façon covalente un organosilane de formule générale $\text{R}_n\text{SiX}_{(4-n)}$ où R est un radical organique et X un groupement facilement hydrolysable comme le chlore, le fluor ou l'amine, (Figure V-1) sur une surface minérale [138].

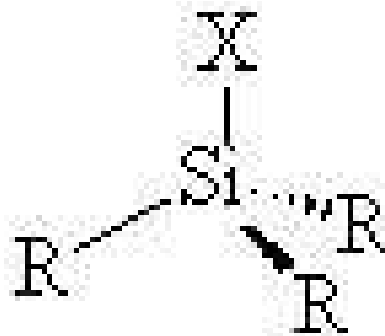


Figure V-1. Organosilane. R est un radical organique et X est un groupement facilement hydrolysable.

a. Protocole de silanisation

Dans un solvant aqueux, les silanes s'adsorbent sur la surface hydratée de la silice, ce qui entraîne l'hydrolyse des groupements facilement hydrolysables X, portés par l'atome de silicium. Puis, dans le cas de silanes trifonctionnels, les molécules subissent une condensation entre elles et/ou à la surface de silice par la création de ponts hydrogènes entre hydroxyles. La condensation des silanols provoque la formation d'un réseau de molécules liées à la surface de façon covalente. Les molécules greffées sont polymérisées horizontalement et verticalement. Donc, un réseau tridimensionnel de polymères de silanes est formé sur la surface (Figure V-2).

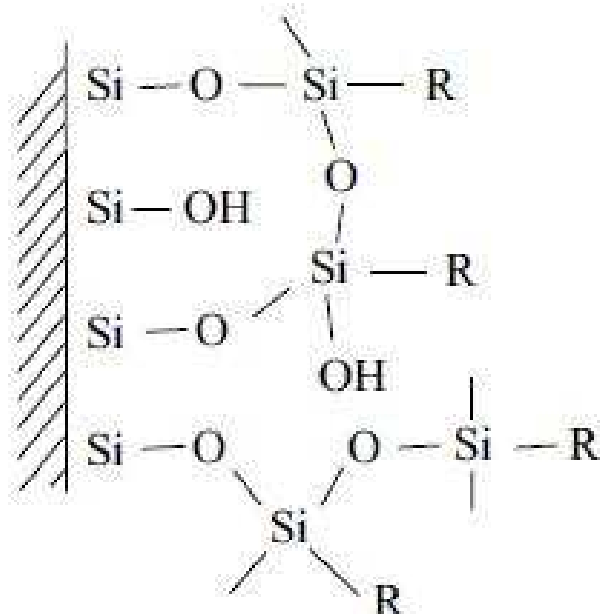


Figure V-2 Polymérisation dans le cas de silanes trifonctionnels (R représente la chaîne carbonée).

Nous réalisons un greffage en solution par voie de solvant (solution de silanes dans un solvant organique). Les molécules de silane sont tout d'abord hydrolysées par le solvant organique puis adsorbées sur la surface de l'échantillon où elles réagissent en formant des liaisons hydrogène puis des liaisons covalentes de type siloxane $\equiv\text{Si}-\text{O}-\text{Si}\equiv$ (Figure V-2). Des travaux comme ceux menés par McGovern *et al.* [139] ont montré que le toluène et le benzène permettaient d'augmenter significativement le taux de silanisation et donc le caractère hydrophobe de la surface.

b. Silanisation avec l'octadécyltrichlorosilane (OTS)

L'organosilane utilisé ici est l'octadécyltrichlorosilane (OTS) de formule chimique $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{17}\text{SiCl}_3$, le solvant étant le toluène. L'utilisation d'un silane trifonctionnel permet non seulement un greffage des molécules en surface mais également une polymérisation transverse par substitution de Cl, ce qui a pour effet d'augmenter la densité du greffage [140] et de ce fait le caractère hydrophobe de la surface. Une chaîne de dix huit carbonés (cas de l'OTS) correspond à une longueur de chaîne optimale pour obtenir un fort caractère hydrophobe [141].

Adsorption des protéines sur surfaces solides et leur insertion dans les membranes supportées

Le mélange OTS/ toluène a été préparé dans une boîte à gant sous atmosphère d'azote avec les proportions de 60 ml toluène/100 μ l OTS. Après incubation pendant 1 heure dans l'OTS, les surfaces de verre préalablement lavées avec la procédure citée précédemment, ont été alors passées aux ultrasons pendant 4 minutes, respectivement dans : toluène- isopropanol- eau milliQ. Ces surfaces ont été séchées sous vide à 90°C pendant une nuit.

Les surfaces ainsi silanisées vont présenter des chaînes de groupements terminaux CH₃ responsables du caractère hydrophobe de la surface.

Les mesures AFM ont montré une rugosité rms variant de 1 à 2 nm selon la surface où un greffage homogène a toujours été observé.

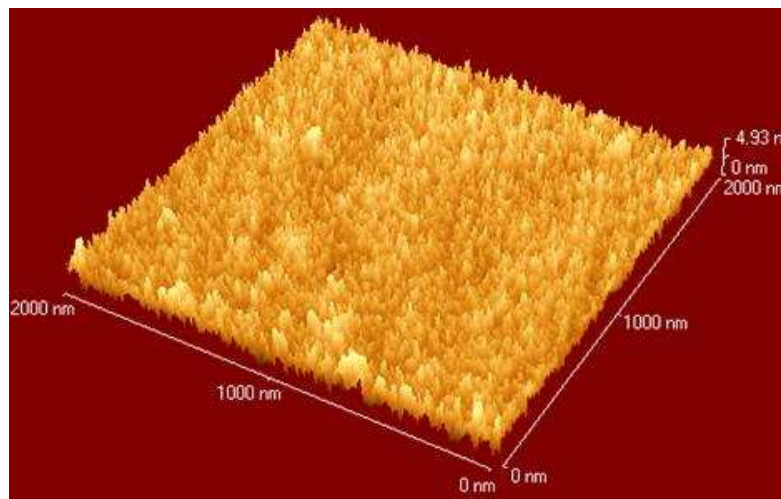


Figure V-3. Topographie AFM (3D) d'une surface silanisé avec l'OTS.

c. Silanisation avec 3-aminopropyltriéthoxysilane (APTES)

L'APTES présente une fonction amine terminale (Figure V-4) active pour greffer une protéine. Nous avons préparé un mélange Toluène/APTES (98:2 v/v) dans une boîte à gant sous atmosphère d'azote. Les surface lavées préalablement ont été incubées dans la solution APTES/toluène pendant une heure. Comme dans le cas de l'OTS, elles ont ensuite été rincées aux ultrasons pendant quatre minutes dans le toluène, l'isopropanol et l'eau millipore respectivement. Ces surfaces ont été alors séchées sous vide à 90°C pendant la nuit.

Adsorption des protéines sur surfaces solides et leur insertion dans les membranes supportées

La figure V-5 représente la topographie de la surface sur une échelle de $2.5 \times 2.5 \mu\text{m}$. La rugosité rms est de 1.35nm.

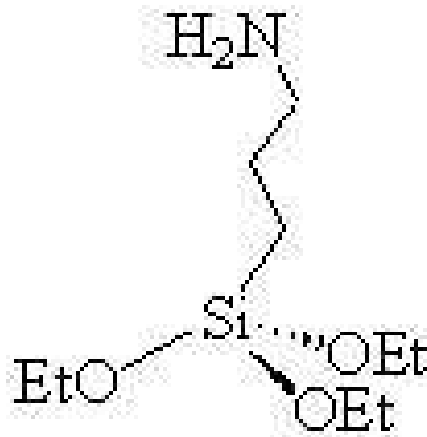


Figure V-4. Molécule de 3-aminopropyltriethoxysilane (APTES)



Figure V-5. Topographie sur $2.5 \mu\text{m}$ de la surface du verre silanisé APTES.

V-2-2 Adsorption de la BSA sur verre

V-2-2-1 L'albumine de sérum bovin (BSA)

Nous avons commencé notre étude sur l'adsorption des protéines par la réalisation de l'adsorption de la BSA (bovine serum albumin) sur la surface du verre ; la BSA est généralement utilisée comme protéine modèle dans plusieurs domaines de recherche, comme entre autres, la biologie moléculaire, la médecine, l'agro-alimentaire et l'environnement. Son faible coût, sa bonne caractérisation et sa grande solubilité dans l'eau en font une protéine de choix pour l'étude des interactions dans un système modèle. De plus, sa séquence est très proche de son équivalent humain (HSA).

La BSA est souvent utilisée en biologie *in vitro* pour ses propriétés d'interactions avec la plupart des surfaces. Elle permet, par exemple, d'empêcher l'adhésion de certains types cellulaires sur des parois en verre ou en matières plastiques.

L'une des propriétés les plus spectaculaire de cette protéine est sa capacité à se lier avec un grand nombre de molécules et/ou de substrats comme les acides gras, la lysolécithine, la bilirubine, la warfarine, le tryptophane et d'autres [142, 143].

L'albumine sérique est reconnue comme une composante principale du sang dès 1839. C'est la protéine la plus petite et la plus abondante dans le système circulatoire, ce qui représente environ 55% du total des protéines dans le plasma sanguin avec la concentration sanguine typique de 5g/100ml [143]. L'albumine sérique est une protéine globulaire très soluble. Elle assure 80% de la pression osmotique du sang et maintient principalement le pH sanguin. Elle joue également un rôle important dans le transport et le dépôt d'une variété de substances endogènes et exogènes dans le sang. Jusqu'à présent, l'albumine sérique est la protéine de transport multifonctionnelle la plus connue.

La structure primaire de BSA est celle d'une chaîne polypeptidique de 582 acides aminés et sa séquence d'acides aminés est bien connue. Le poids moléculaire est de 66430 daltons. La BSA est composée de 100 chaînes latérales acides avec les résidus Asp (41) et Glu (59) et 99 chaînes latérales basiques avec 23 Arg, 59Lys, et 17His. La structure secondaire est formée de 67% de hélice α de six tours et 17 ponts disulfures et entre 16 et 18% de feuillets β . La structure en trois dimensions a également été déterminée [143]. L'albumine a trois domaines homologues (I, N-terminal; II, III, C-terminal), chaque domaine contient deux sous-domaines divisant un motif commun hélicoïdale.

Carter et Ho [143] ont noté que, malgré l'acceptation générale du modèle en forme de cigare, plusieurs groupes de recherche ont déjà fourni des preuves de la molécule sphérique ayant une dimension de ~ 8 nm [144]. Ces résultats ne pouvaient être expliqués que par la structure actuelle en forme de cœur déterminée à partir de données cristallographiques de rayons X de la HSA (Figure V-6) [142]. L'albumine sérique est représentée par un triangle équilatéral dont les côtés sont d'environ 8 nm chacune et une épaisseur moyenne de 3 nm.

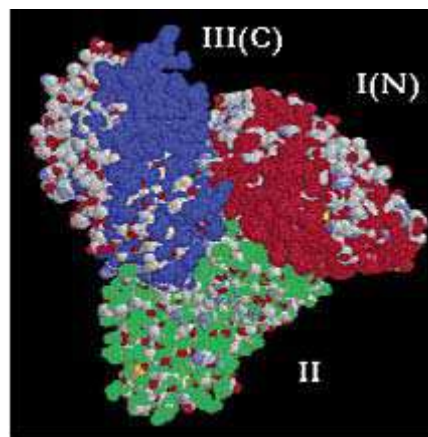


Figure V-6. Structure cristallographique en forme de cœur de la HSA, reproduite d'après [142].

L'adsorption de la BSA sur surface solide a été beaucoup étudiée essentiellement pour résoudre les problèmes de biocompatibilité durant les greffes ou dans l'hémodialyse [145,146]. Ces études nécessitaient des concentrations relativement grandes, ce qui rendait ces études assez limitées. Dans l'espoir de pallier à ces limitations, nous avons réussi à adsorber la BSA sur le verre mais à des concentrations très faibles, ceci a été bien réalisé grâce à la microscopie de fluorescence.

V-2-2-2 Protocole d'adsorption sur pyrex

L'adsorption de la BSA sur le verre a été réalisée de la façon suivante :
Les surfaces de verre ont été incubées dans une solution de BSA de concentration $2.5\mu\text{M}$ en présence de billes fluorescentes FITC 10^4 fois moins concentrées. Nous rinçons avec le TBS pour éliminer les protéines qui ne sont pas adsorbées. Le couplage entre les protéines et les billes fluorescentes se fait en laissant le temps d'une nuit, sous agitation magnétique, à température ambiante, quelques $2.6 \cdot 10^{11}$ billes dans la boîte de 3ml contenant le verre incubé dans la solution de protéines. La réaction est ensuite arrêtée par NH_2OH .

Adsorption des protéines sur surfaces solides et leur insertion dans les membranes supportées

Le TBS est un tampon à $\text{pH} = 7.8$ constitué de :

- NaCl à 150mM, assurant une force ionique identique à celle présente dans les milieux organiques.
- Mg^{2+} à 1mM pour l'activité enzymatique.
- Tris à 10mM qui est le tampon.

V-2-2-3 Résultats

Sur la figure V-7, nous observons la différence de niveau de fluorescence entre une surface nue et une surface incubée dans la BSA en présence de billes FITC: l'augmentation de l'intensité de fluorescence est liée à l'adsorption de la BSA. Notons ici que les images ont été prises avec les mêmes paramètres de réglage (temps d'exposition et gain).

Ainsi nous avons pu visualiser à des concentrations très faibles, la BSA adsorbée sur le verre. Ceci grâce au couplage de billes fluorescentes à la protéine. Cette méthode ouvre des perspectives pour l'étude de l'adsorption des protéines avec des concentrations beaucoup plus faibles que celles utilisées jusqu'à présent dans la littérature.

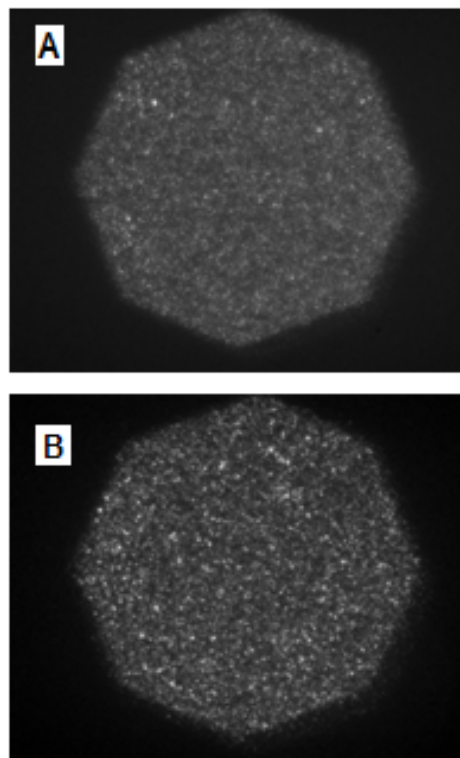


Figure V-7. Adsorption de la BSA sur borosilicates. (A). Verre + billes ; (B) Verre+ billes+ BSA 2.5 μM : L'augmentation de l'intensité de fluorescence est liée à l'adsorption de la BSA.

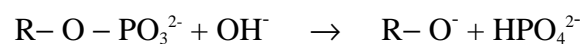
V-2-2-4 Conclusion

Ainsi, nous avons pu montrer par microscopie de fluorescence que la BSA s'adsorbe sur le pyrex à des concentrations beaucoup plus faibles que celle utilisée dans la littérature. Le couplage à l'aide de billes fluorescentes de FITC activées par EDC permet de visualiser par microscopie de fluorescence les protéines.

Ce résultat encourageant nous a motivés pour l'étude de l'adsorption et l'insertion dans des membranes de la phosphatase alcaline à des concentrations très faibles.

V-2-3 Adsorption de la phosphatase alcaline sur le verre silanisé

La phosphatase alcaline est une enzyme qui appartient à la classe des phosphomonoestérases. Ces enzymes permettent la catalyse et l'hydrolyse des groupements phosphates de différentes molécules en milieu alcalin.



Cette enzyme est présente dans un très grand nombre de cellules chez les mammifères : muqueuse intestinale, placenta, cellules germinales, foie, rein, os en fin de croissance...

La phosphatase alcaline peut exister sous les deux formes suivantes :

- Une forme hydrosoluble (notée APs dans ce manuscrit), retrouvée dans le sérum à la suite de sa libération de la membrane par des phospholipases spécifiques.

Nous avons étudié son adsorption sur surface silanisée ainsi que son insertion dans des bicouches phospholipidiques de DPPC préparées par la méthode LB.

- Une forme amphiphile possédant un ancrage glycosylphosphatidylinositol (GPI) lié à l'extrémité C-terminale de la protéine (notée AP-GPI dans ce manuscrit).

Pour définir le rôle de ces ancres GPI, nous avons réalisé l'insertion de cette protéine dans des bicouches supportées de DPPC.

L'AP-GPI est composée d'une partie glycane liée à une molécule phosphatidylinositol localisée dans la bicouche membranaire. Grâce au groupement GPI, la phosphatase alcaline est insérée dans les couches externes des membranes plasmiques.

Les ancres glycosylphosphatidyl inositol (GPI) ont été décrites il y a environ une quinzaine d'années, mais leur rôle biologique n'est pas encore bien connu. Un grand nombre

de protéines membranaires sont attachées à la membrane des cellules eukaryotes par une ancre GPI. Ce sont des protéines d'adhésion (LFA-3), des antigènes (Thy-1), des récepteurs ou de nombreuses enzymes telle la phosphatase alcaline (PA).

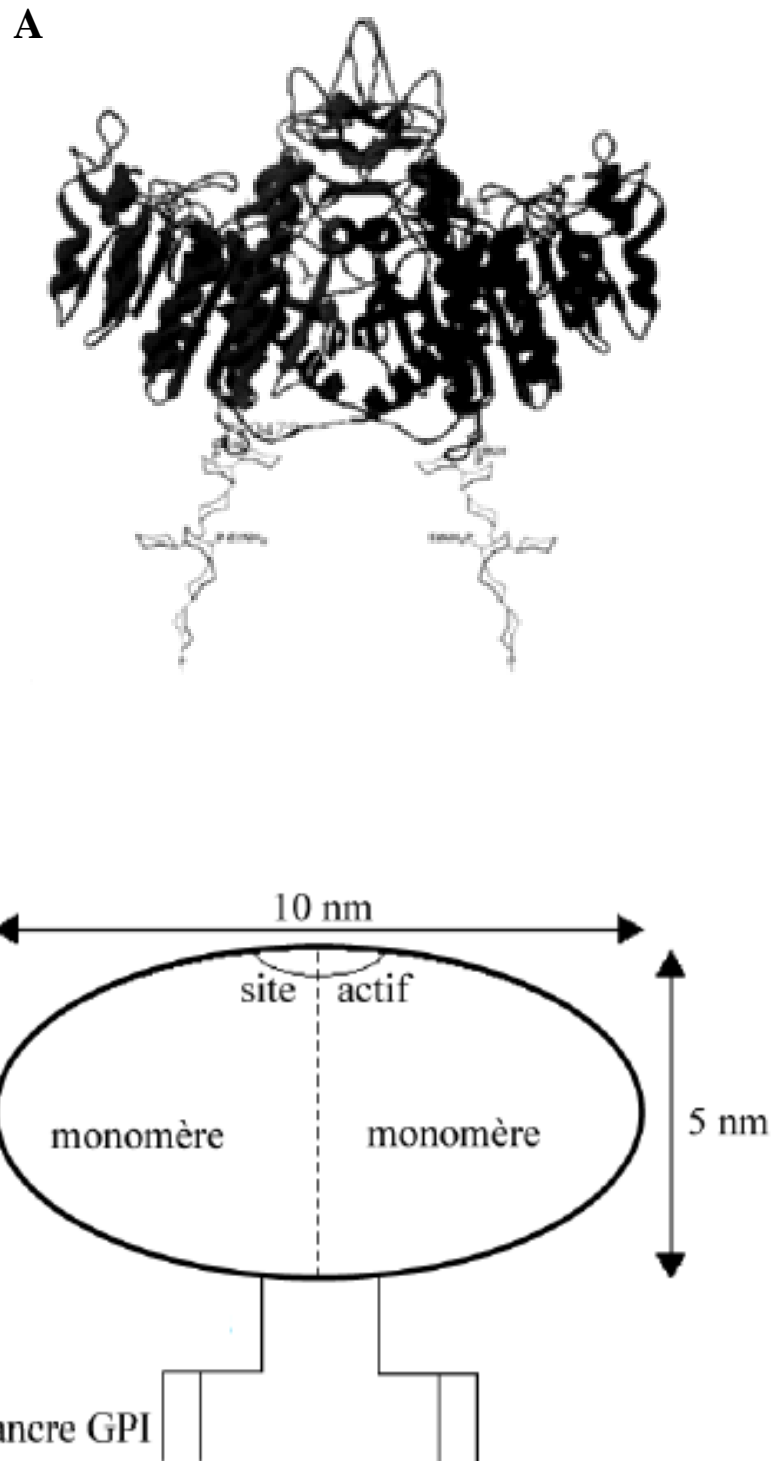
Ces protéines ont des fonctions complètement différentes mais leurs ancres GPI leur confèrent des propriétés communes. Sous certaines conditions comme la présence de phospholipases, les protéines à ancres GPI peuvent se retrouver circulant dans le sang sous une forme soluble active [147]. On retrouve également ces protéines dans les radeaux lipidiques

Cette hypothèse de radeaux lipidiques semble bien confirmée par des expériences de FRET (résonance de fluorescence par transfert d'énergie) [44] ou par des expériences de « cross-linking » [148] qui ont montré que les protéines à ancres GPI sont organisées dans des domaines submicroniques à la surface de la cellule.

La phosphatase alcaline que nous avons utilisée nous a été fournie par Frédéric Ronzon et Bernard Roux du Laboratoire de Physico-Chimie Biologique (UMR Université Lyon1 et CNRS). Elle a été extraite de la muqueuse intestinale bovine et purifiée suivant le protocole d'Angrand [149] modifié par Ronzon [150].

La structure cristalline de la phosphatase alcaline du placenta humain qui présente à 90% une séquence similaire de la PA extraite de l'intestin de bœuf purifiée par l'équipe de Bernard Roux [151] et a été déterminée à 1.8 Å de résolution par les rayons X [152]. Sa partie soluble extra-membranaire est un dimère dont la forme globale peut être assimilée à un ellipsoïde avec un grand axe de 10 nm parallèle à la surface de la membrane et un petit axe de 5nm correspondant à la hauteur extra-membranaire de la molécule (FigureV-8). Chaque monomère présente une ancre GPI lié au groupement C-terminal localisé au même côté de l'ellipsoïde.

Nous avons étudié l'adsorption de la phosphatase alcaline soluble (APs) sur le verre silanisé par APTES et par OTS. L'étude a été menée par Microscopie de fluorescence en utilisant les billes fluorescentes de latex et par microscopie à force atomique.



FigureV-8. (A) Structure de la phosphatase alcaline (AP-GPI) du placenta humain, sans les 2 chaînes en acide gras C14 qui partent de chaque phosphate final de chaque ancre GPI [152]. (B) Forme schématique de la protéine avec ces deux ancres composées chacune de sucres et se terminant par deux chaînes d'acide gras.

V-2-3-1 Adsorption de l'APs sur le verre silanisé APTES

L'incubation de l'APs à 2.5µg/ml en tampon TBS à pH 8.5 a été effectuée sur la surface du verre silanisé avec l'APTES pendant 3h, après nous rinçons avec le tampon TBS. Pour l'étude de fluorescence, nous injectons éventuellement 1nM de billes activées. L'incubation dure une nuit puis nous rajoutons 10µl de NH₂OH à 3M pour arrêter la réaction.

Microscopie de fluorescence

Nous observons, par microscopie de fluorescence, les billes liées de manière covalente à la protéine APs (Figure V-9).

Sur la Figure V-9.A, qui est celle d'une surface silanisée APTES, nue, nous voyons des points lumineux qui sont dus à des amas de billes sur la surface. Sur la Figure V-9.B, nous constatons l'augmentation de la fluorescence sur la même surface recouverte de protéines et qui est dû à l'adsorption de l'APs (liée aux billes) à la surface silanisée.

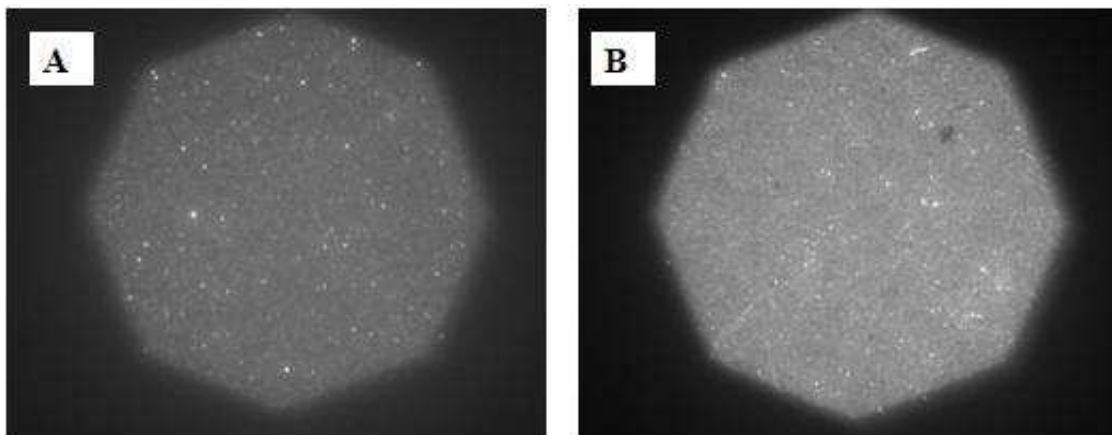


Figure V-9. Images par microscopie de fluorescence : A- verre silanisé APTES ; B- Avec APs adsorbée.

Microscopie à force atomique

Sur la figure V-10, nous observons une surface de verre silanisé APTES incubée avec la protéine APs. La surface est granuleuse avec des hauteurs de 5.6±0.5nm, vu la dimension de la protéine, nous pouvons dire que cela correspond à l'adsorption de l'APs sur la surface silanisée.

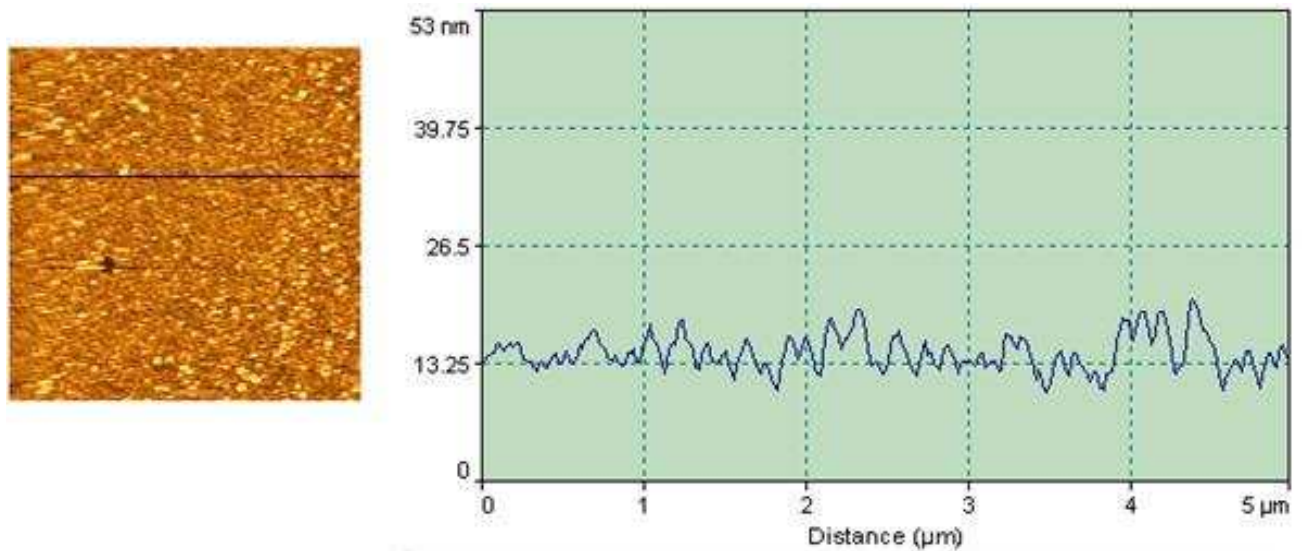


Figure V-10. Image AFM de l'APs adsorbée sur verre silanisé APTES ; à droite : profil de hauteur typique.

V-2-3-2 Adsorption de l'APs sur le verre silanisé OTS

De la même façon, nous avons effectué l'adsorption de l'APs sur le verre silanisé avec l'OTS, éventuellement en présence de billes fluorescentes (FITC) pour la fluorescence.

Microscopie de fluorescence

Nous présentons sur la figure V-11 la surface de verre silanisé à l'OTS avec billes, sans la protéine. La figure V-12 est celle de deux surfaces différentes de protéine adsorbée sur le verre hydrophobe. Nous constatons sur ces dernières que les intensités lumineuses sont inhomogènes, ceci pourrait être du à une adsorption non homogène de la protéine sur la surface. En effet, on observe des agrégats lumineux larges qui correspondent probablement à des régions où la densité de protéine est plus importante. Les petits points lumineux sont dus à des billes isolées ou formant de petits agrégats.

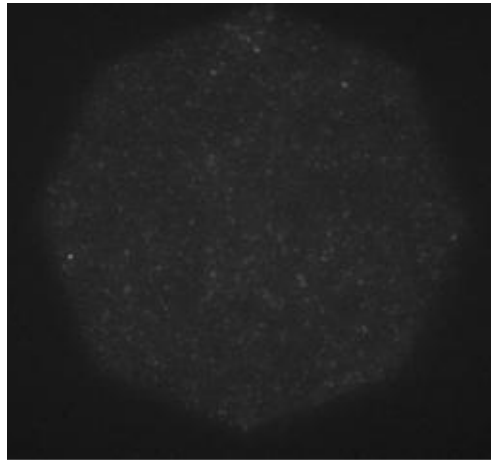


Figure V-11. Verre silanisé OTS en présence de billes.

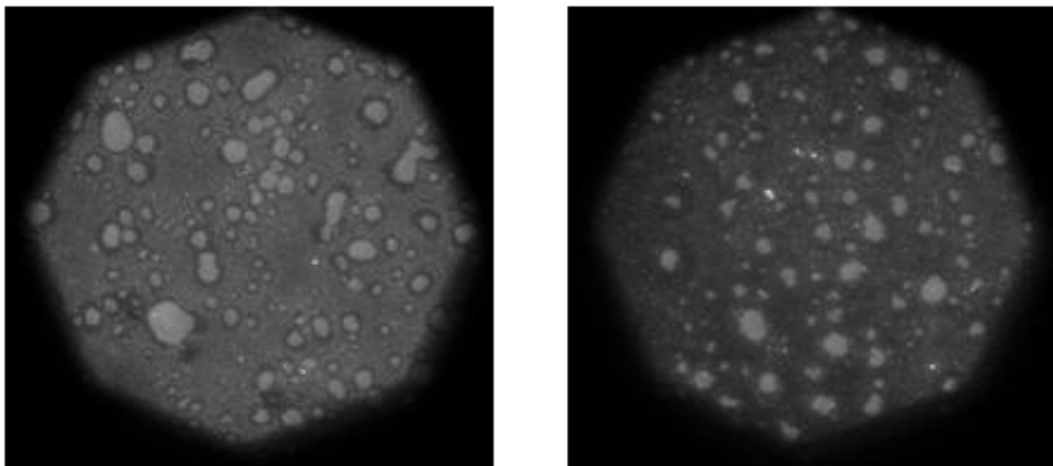


Figure V-12. Images par microscopie de fluorescence de l'APs adsorbée sur verre silanisé OTS en présence de billes fluorescentes.

Imagerie par AFM

Nous avons pu imager, à faible force, la protéine adsorbée à une concentration de $2.5\mu\text{g/ml}$. La figure V-13.a est une image topographique de l'APs adsorbée sur le verre silanisé OTS. La surface est granuleuse avec des hauteurs de $5.4\pm 0.3\text{nm}$ qui correspondent à

Adsorption des protéines sur surfaces solides et leur insertion dans les membranes supportées

la dimension de la protéine. Les images confirment les résultats obtenus par fluorescence où une distribution non homogène de la protéine sur la surface a été observée.

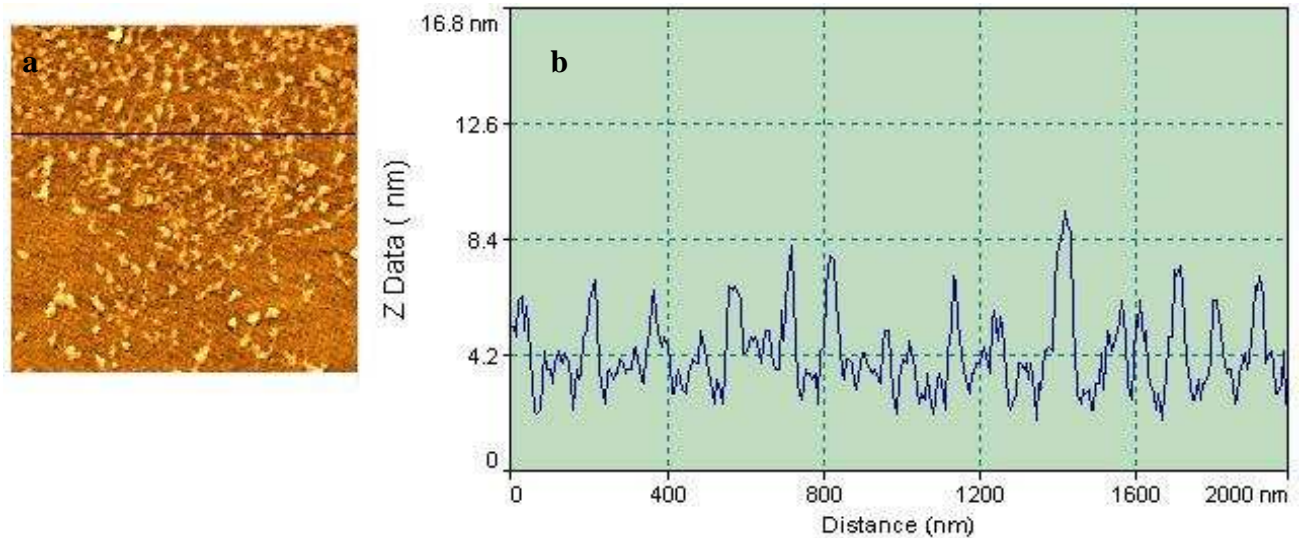


Figure V-13. a- Adsorption de l'APs sur verre silanisé OTS ; b- profil en z selon la ligne indiquée.

V-2-3-3 Conclusion

La microscopie de fluorescence couplée à l'AFM nous ont permis de contrôler l'adsorption de la phosphatase alcaline soluble (APs) sur des surfaces hydrophobes à des concentrations très faibles.

Nous avons observé par AFM des surfaces granuleuses de hauteurs de 5 à 6nm et qui correspondent à peu près à la taille de la protéine.

Une fois ce résultat intéressant obtenu (adsorption à très faible concentration), nous allons étudier l'insertion de protéines et à des concentrations aussi faibles, dans des bicouches supportées.

V-3 Insertion des protéines dans les membranes supportées

Dans un premier temps, nous allons présenter les résultats de notre étude sur l'insertion des deux types de phosphatase alcaline APs et AP-GPI dans des bicouches de DPPC préparées par la méthode de Langmuir-Blodgett.

Cette étude a permis de mettre en évidence le rôle des ancres GPI. Nous avons observé, à la fois en AFM et en microscopie de fluorescence, que les protéines s'insèrent effectivement dans des membranes de DPPC avec une différence nette entre l'APs et l'AP-GPI.

Puis nous parlerons de l'insertion de la créatine Kinase dans une bicouche de PC/PE/CL.

V-3-1 Insertion de la phosphatase alcaline soluble APs dans une bicouche de DPPC

Après avoir préparé les bicouches de DPPC sur le verre par la méthode de Langmuir-Blodgett à une pression de surface de 40mN/m avec un taux de transfert de 5mm/mn, l'incubation de la protéine est réalisée dans des béchers de 3ml à une concentration finale de 1.6 $\mu\text{g/ml}$ d'APS. L'incubation dure 36h avec une légère agitation, ensuite les billes sont couplées à la protéine selon la même procédure citée plus haut.

Microscopie de fluorescence

Sur la Figure V-14, l'image A est celle d'une bicouche nue avec billes, nous constatons des points lumineux dus à une adsorption non spécifique de billes sur la bicouche. Dans le cas d'une bicouche incubée avec l'APs (image B), la fluorescence est légèrement plus élevée que celle d'une bicouche pure.

On conclue ainsi que nous ne pouvons pas clairement discerner une bicouche nue d'une bicouche avec APs.

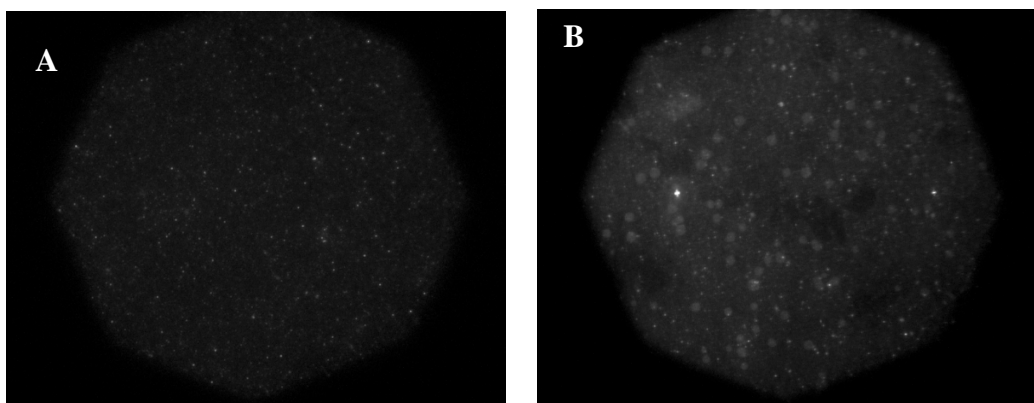


Figure V-14. (A) Bicouche DPPC + Billes. (B) DPPC + billes + APs.

V-3-2 Insertion de la phosphatase alcaline à ancre GPI (AP-GPI) dans une bicouche de DPPC

De la même manière que dans le cas de l'APs, l'insertion de l'AP-GPI a été réalisée sur une bicouche DPPC (40mN/m) préparée par la méthode LB.

L'incubation des protéines dans ces bicouches dure 36 h avec une légère agitation, à une concentration de 3.2 μ g/ml, nous rinçons ensuite avec le TBS.

A-Résultats

Imagerie AFM

Nous avons montré dans le chapitre III des images AFM de bicouches de DPPC nues préparées par la méthode de Langmuir-Blodgett où nous avons observé des trous de 6 ± 0.5 nm, nous présentons maintenant les résultats obtenues après l'insertion des protéines dans ces bicouches.

La figure V-15.A présente des trous de 9 ± 0.5 nm, plus profond que dans le cas de bicouches nues (6nm). Vu la structure de l'AP-GPI (ellipsoïde de grand axe de 10 nm et de petit axe 5 nm), cette hauteur correspond à une bicouche de DPPC pure avec une couche de protéine en dessus.

A une échelle plus petite (Figure V-15.B), la bicouche montre une structure granuleuse avec une hauteur de 2nm et une rugosité rms de 0.4nm. Les protéines sont distribuées d'une façon homogène sur la surface.

Lorsque l'incubation de l'AP-GPI a été effectuée à des concentrations plus faibles (i.e. inférieures 0.16 μ g/ml et moins), nous n'avons jamais observé par AFM une différence claire avec une bicouche pure de DPPC.

Ensuite, nous avons couplées les protéines aux billes fluorescentes de latex pour pouvoir continuer cette étude.

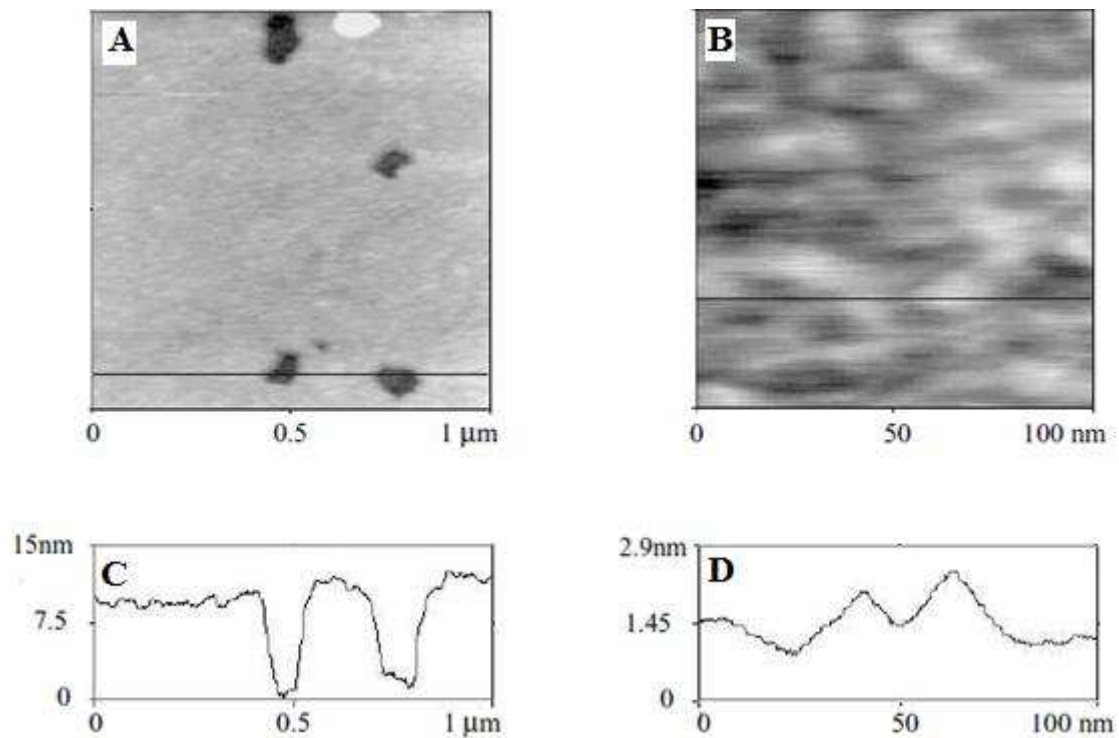


Figure V-15. Bicouche de DPPC après incubation dans une solution de AP-GPI. L'échelle verticale au niveau de gris correspond à C : 16.5nm, D : 2.9nm.

Microscopie de fluorescence

Après incubation des protéines dans ces bicouches selon le protocole cité plus haut, les billes sont couplées à la protéine; nous rajoutons un volume de 2.6×10^{11} billes dans la boîte et laissons à température ambiante toute la nuit.

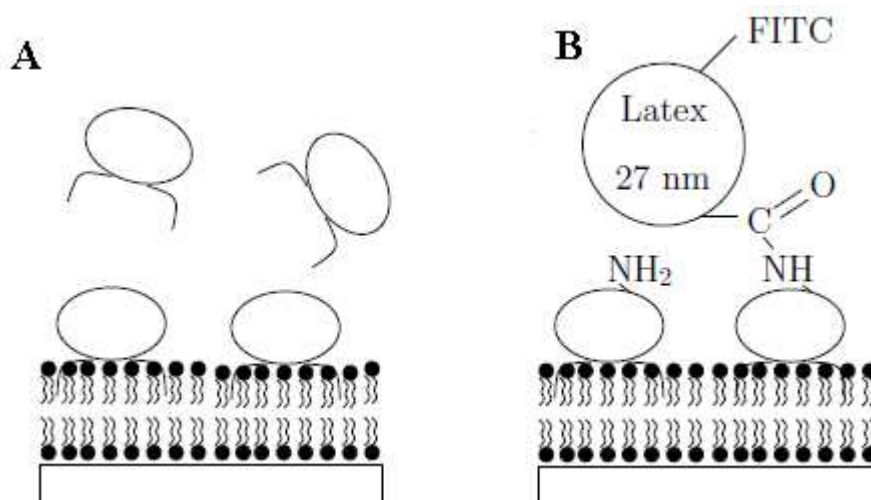


Figure V-16. A- Insertion des protéines AP-GPI dans la bicouche phospholipidique pendant l'incubation. B- couplage des billes de latex portant un fluorophore FITC de manière covalente aux groupements amines des protéines.

Adsorption des protéines sur surfaces solides et leur insertion dans les membranes supportées

Nous observons en microscopie de fluorescence les billes liées de manière covalente au groupement amine de la protéine (Figure V-17). Nous constatons que l'intensité lumineuse augmente avec la concentration de la protéine AP-GPI (images A-C). Les agrégats observés correspondent sans doute à des régions où la densité de protéines est plus importante.

A des concentrations plus faibles (image A), on ne voit que quelques petits points lumineux, dus probablement à des billes isolées ou formant de petits agrégats: (adsorption non spécifique de billes sur la bicouche de DPPC pure).

Avec l'APs (sans ancrés GPI, image D), l'intensité de fluorescence est plus faible que celle avec ancrés GPI à la même concentration (1.6 $\mu\text{g/ml}$, image C). Cette intensité est comparable à celle obtenue pour une bicouche nue.

On peut ainsi conclure que les ancrés GPI favorisent l'insertion de la protéine dans la bicouche. Ce qui met bien en évidence le rôle des ancrés GPI dans l'insertion de la protéine dans la membrane [153].

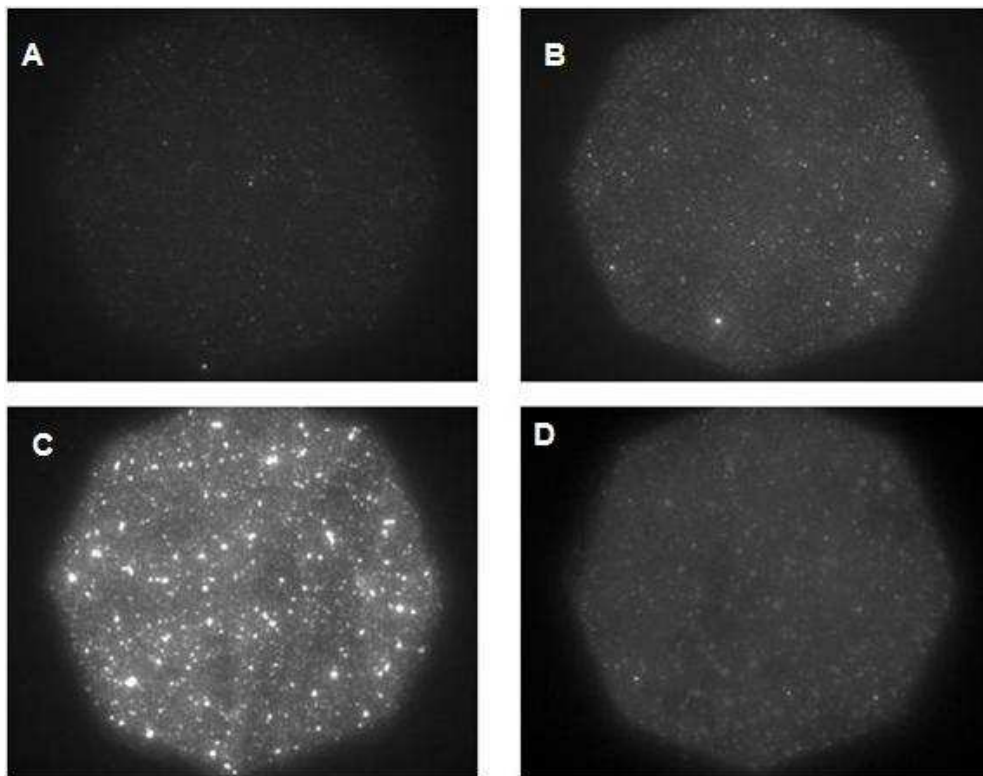


Figure V-17. De (A) à (C), Bicouches de DPPC incubées en présence de (A) 0.016 $\mu\text{g/ml}$ de AP-GPI, (B) 0.16 $\mu\text{g/ml}$ de AP-GPI et (C) 1.6 $\mu\text{g/ml}$ de AP-GPI. (D) Bicouche de DPPC incubée avec 1.6 $\mu\text{g/ml}$ d'APs. Toutes les images sont obtenues avec le même nombre de billes (2.6×10^{11} billes dans 3 ml TBS), le même temps d'exposition et la même ouverture.

B- Conclusion

Plusieurs études ont montré que les protéines à ancras GPI s'insèrent spontanément dans des bicouches supportées de phospholipides et ont été détectées de manière individuelle par AFM [5,16,154].

Dans ces études, les bicouches étaient incubées avec des concentrations en protéines variant de 30 à 50 µg/mL dans des volumes beaucoup petits.

Nous avons observé, à la fois par AFM et par microscopie de fluorescence, que les protéines s'insèrent effectivement dans des membranes de DPPC.

Par nos études de fluorescence, nous avons pu mettre en évidence que, pour des concentrations dix fois inférieures (3.2 µg/mL), les bicouches étaient largement recouvertes de protéines.

Nous avons trouvé que l'intensité de fluorescence était inhomogène sur les bicouches de DPPC ; elle dépend de la présence ou l'absence des ancras GPI et de la concentration de cette protéine dans la phase d'incubation.

En effet, l'intensité de fluorescence est beaucoup plus prononcée pour l'AP-GPI, que l'APs, et elle augmente avec la concentration de l'AP-GPI.

Nous pouvons ainsi en conclure que les ancras GPI favorisent largement l'insertion de la phosphatase alcaline dans les membranes [153].

Une deuxième conclusion importante est que le couplage des protéines à des billes de latex fluorescentes est une méthode qui permet une détection plus facile aussi bien en microscopie de fluorescence qu'en AFM. Cette approche, peu spécifique (couplage aux groupements amine des protéines) peut être mise en œuvre sur d'autres systèmes protéiques.

V-3-3 Insertion de la créatine Kinase (mtCK) dans une bicouche de PC-PE-CL

La membrane interne de la mitochondrie est constituée essentiellement des phospholipides PC, PE et CL avec un rapport molaire de 2/1/1, caractérisé d'un pourcentage élevé d'acides gras insaturés (>50% pour PC et PE, et >80% pour CL) et une haute proportion de chaînes C18 (>50% pour PC et PE, et 83% pour CL) [155,156].

La cardiolipine (CL) est un phospholipide efficace qui a quatre queues et qui porte deux charges négatives. C'est et le lipide le plus insaturé présent non seulement dans les mitochondries [157], mais aussi dans les membranes bactériennes.

Adsorption des protéines sur surfaces solides et leur insertion dans les membranes supportées

En effet, la cardiolipine joue un rôle important dans la stabilisation structurale et l'activation de plusieurs enzymes de la mitochondrie, particulièrement ceux impliqués dans la synthèse et la translocation de l'ATP et l'ADP [158-160].

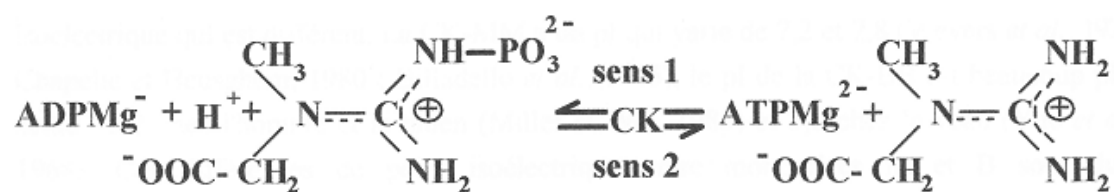
De plus, plusieurs protéines de membranes internes et de transport semblent interagir sélectivement avec la cardiolipine et leur activité dépend de sa présence [161,162].

Nous avons essayé d'élucider le rôle de la cardiolipine dans l'interaction de la protéine créatine kinase avec la membrane interne de la mitochondrie.

Avant d'entamer notre étude par AFM, rappelons brièvement le rôle et la structure de la créatine kinase.

Tous les processus impliqués dans la croissance ou le métabolisme des cellules nécessitent un apport d'énergie : l'ATP constitue la réserve d'énergie universelle.

De fortes quantités de phosphogènes, comme la phosphocréatine, sont accumulés dans les cellules ou tissus excitables. Ce sont des réservoirs de « phosphate à haute énergie » qui permettent de maintenir constant les niveaux d'ATP dans les cellules par un renouvellement grâce à une enzyme clef du métabolisme énergétique, la créatine kinase. Cette enzyme qui est un membre de la superfamille des guanidino kinases, catalyse le transfert réversible du groupement phosphate de la phosphocréatine (PCr) à l'ADP, générant la créatine et l'ATP selon la réaction ci-dessous :



La créatine kinase mitochondriale (mtCK) utilise l'ATP synthétisé dans la mitochondrie pour phosphoryler la créatine en phosphocréatine. Ce phosphagène diffuse ensuite dans le cytosol où il peut être utilisé par CK cytosolique pour phosphoryler l'ADP à l'ATP dans le voisinage immédiat des sites liaison de l'ATP [163,164].

La mtCK existe sous deux formes oligomériques interconvertibles, un dimère et un octamère [165,166]. Les deux isoenzymes sont des protéines solubles qui peuvent être associés avec un

degré variable avec les structures subcellulaires; mais seulement l'octamère est capable de se lier à la face externe de la membrane mitochondriale interne ainsi qu'à des vésicules de phospholipides anioniques [165,167] tandis que les mtCK dimériques n'ont aucune affinité pour la membrane mitochondriale. Le niveau de mtCK est particulièrement élevé sur les sites de contact entre les membranes interne et externe de la mitochondrie [168].

La mtCK est donc un octamère : un cube très ordonné d'environ 9.3x 9.3 x 8.6 nm, composé de quatre dimères allongés en forme de bananes disposés le long d'un axe de symétrie quadruple [169]. Les faces supérieure et inférieure perpendiculaire à cet axe contiennent le C-terminal riche en résidus basiques et sont responsables de la liaison à la membrane via des interactions avec les phospholipides acides [170].

La formation de sites de contact est spécifique à l'isoenzyme octamérique. Seulement l'octamère se lie aux membranes naturelles ou bio-mimiques [165-167].

Le point isoélectrique de l'octamère (autour de 8.8) est significativement plus basique que les autres isoformes [171,172]. Ceci favoriserait les liaisons aux phospholipides membranaires chargés négativement.

Afin de biomimer la membrane interne de la mitochondrie, nous avons commencé par préparer une bicouche mixte des trois lipides PC/PE/CL en proportion molaire (2/1/1) et ce par la méthode de fusion de vésicules sur le mica; puis nous avons inséré la créatine kinase dans cette bicouche.

La fusion de vésicules sur le mica s'est avéré la meilleure méthode pour l'obtention de domaines [173].

V-3-3-1 Préparation des vésicules PC-PE-CL

La phosphatidylcholine (PC) de jaune d'œuf (egg yolk); la phosphatidylethanolamine (PE) de jaune d'œuf (egg yolk) ; la cardiolipine (diphosphatidylglycérol) de cœur de bœuf nous ont été fournis par Thierry Granjon de l'Institut de Chimie et Biochimie Moléculaires et Supramoléculaires (UMR Université Lyon1 et CNRS). Ces trois lipides ont été utilisés dans leur phase liquide dans un mélange chloroforme éthanol.

Des LUV d'un mélange de PC-PE-CL (2/1/1) à concentration finale de 20mg/ml dans le Tris 15mM ont été préparées par la méthode d'extrusion des vésicules (voir Chapitre III), sauf que

Adsorption des protéines sur surfaces solides et leur insertion dans les membranes supportées

cette fois-ci, le solvant a été évaporé par évaporation rotative sous vide à 37°C durant une nuit entière.

V-3-3-2 Réalisation des bicouches

Les vésicules diluées à 0.2mg/ml dans le tampon tris 15mM, pH 7.2 ont été incubées sur le mica fraîchement « clivé » (monté sur le téflon) pendant 2h à 40°C en présence de Ca^{2+} 2mM. Les lipides non adsorbés ont été éliminés par rinçage avec le Tris 15mM. La bicouche a été gardée dans son état hydraté jusqu'à son passage dans la cellule AFM.

V-3-3-3 Résultats AFM

Nous avons vérifié ce dépôt en mode contact et tapping en liquide. En mode contact nous avons scanné à très faible force ($F < 200$ pN) afin de ne pas endommager les lipides. Nous avons utilisé des pointes de raideurs différentes.

a- Topographie en mode contact

Nous observons sur la figure V-18 le dépôt de la bicouche mixte sur le mica. Nous présentons ci-dessous les différents cas obtenus. La différence dans la topographie provient soit du type de pointe utilisée soit de la solution lipidique (ces préparations évoluent très vite et se conservent peu de temps).

Sur ces images, nous constatons la coexistence de domaines en mesurant la différence de hauteur entre le mica nu et la bicouche. Nous obtenons différentes hauteurs de 4.8 ; 5.7 ; 6.3 nm. Ces hauteurs semblent correspondre à l'épaisseur d'une bicouche de phospholipides mais sont très différentes de celles obtenues avec un autre échantillon.

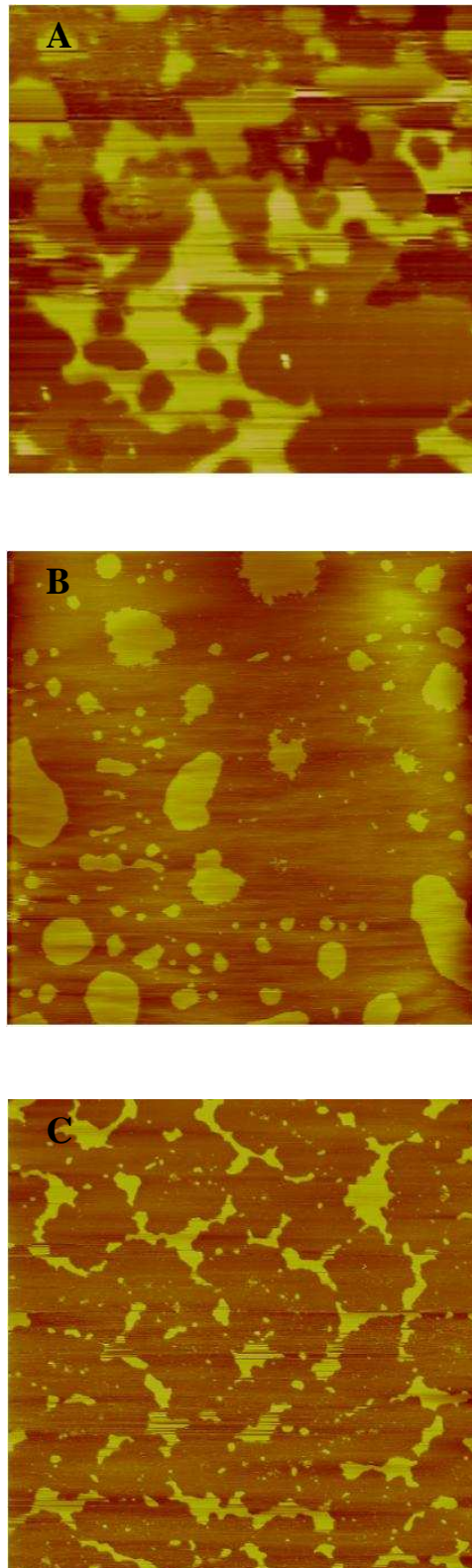


Figure V-18. Bicouches PC/PE/CL sur le mica imagées sur $10 \times 10 \mu\text{m}$ avec des pointes AFM de raideur différentes en mode contact : A- 0.03N/m . B- 0.006N/m . C- 0.08N/m . Les hauteurs mesurées des îlots sont de 4.8 ; 5.7 ; 6.3 nm respectivement.

Avec cet autre échantillon (autre solution de vésicules PC-PE-CL), où le recouvrement est bien meilleur, nous avons obtenu des hauteurs de 1.2 ± 0.4 nm (Figure V-19), qui semblent plutôt correspondre à une différence de hauteurs entre domaines lipidiques comme dans le cas DOPC/ DPPC (Figure IV-13).

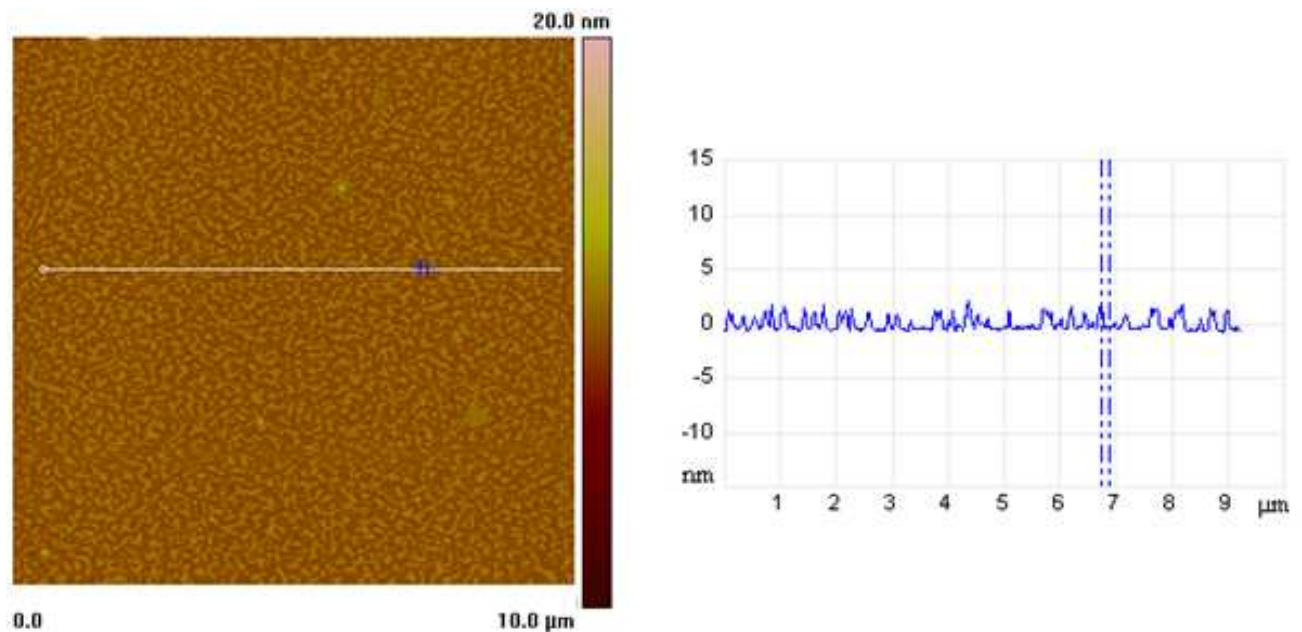


Figure V-19. Bicouche PC/PE/CL sur le mica imagée en mode contact. A droite, profil topographique montrant une différence de hauteur 1.2 ± 0.4 nm.

b-Topographie en mode Tapping

Avec le même échantillon PC-PE-CL, afin de ne pas abimer la bicouche, nous avons aussi utilisé le mode tapping (Figure V-20) : Nous constatons dans les différentes zones des différences de hauteurs entre 4.5 et 5nm. Ces hauteurs semblent correspondre à la hauteur entre une bicouche et la surface du mica nu.

Nous constatons donc qu'il y a une nette différence entre les hauteurs des îlots que se soit en mode contact ou en tapping ou d'une préparation à l'autre. Il est difficile d'expliquer pourquoi il ya de telles différences.

Il y a donc des paramètres que nous ne contrôlons pas. Ces paramètres peuvent être dus à la préparation de la bicouche ; mais plus probablement le fait que l'image topographique change en fonction du mode d'imagerie indique que c'est un problème d'imagerie. Si les couches

Adsorption des protéines sur surfaces solides et leur insertion dans les membranes supportées

sont fragiles ou si elles comportent des charges électriques variables conduisant à une surestimation de la hauteur à cause de la répulsion avec la pointe, on peut rencontrer un contraste topographique variable. Il est en effet bien connu qu'il est très difficile d'imager des surfaces chargées, ce qui est le cas de la cardiolipine.

Il reste que sur la figure V-18 C, nous ne pensons pas que l'image révèle essentiellement le mica nu et seulement quelques îlots de lipides. Nous penchons plus sur l'hypothèse de domaines de lipides dans une autre phase lipidique avec des hauteurs exagérément amplifiées.

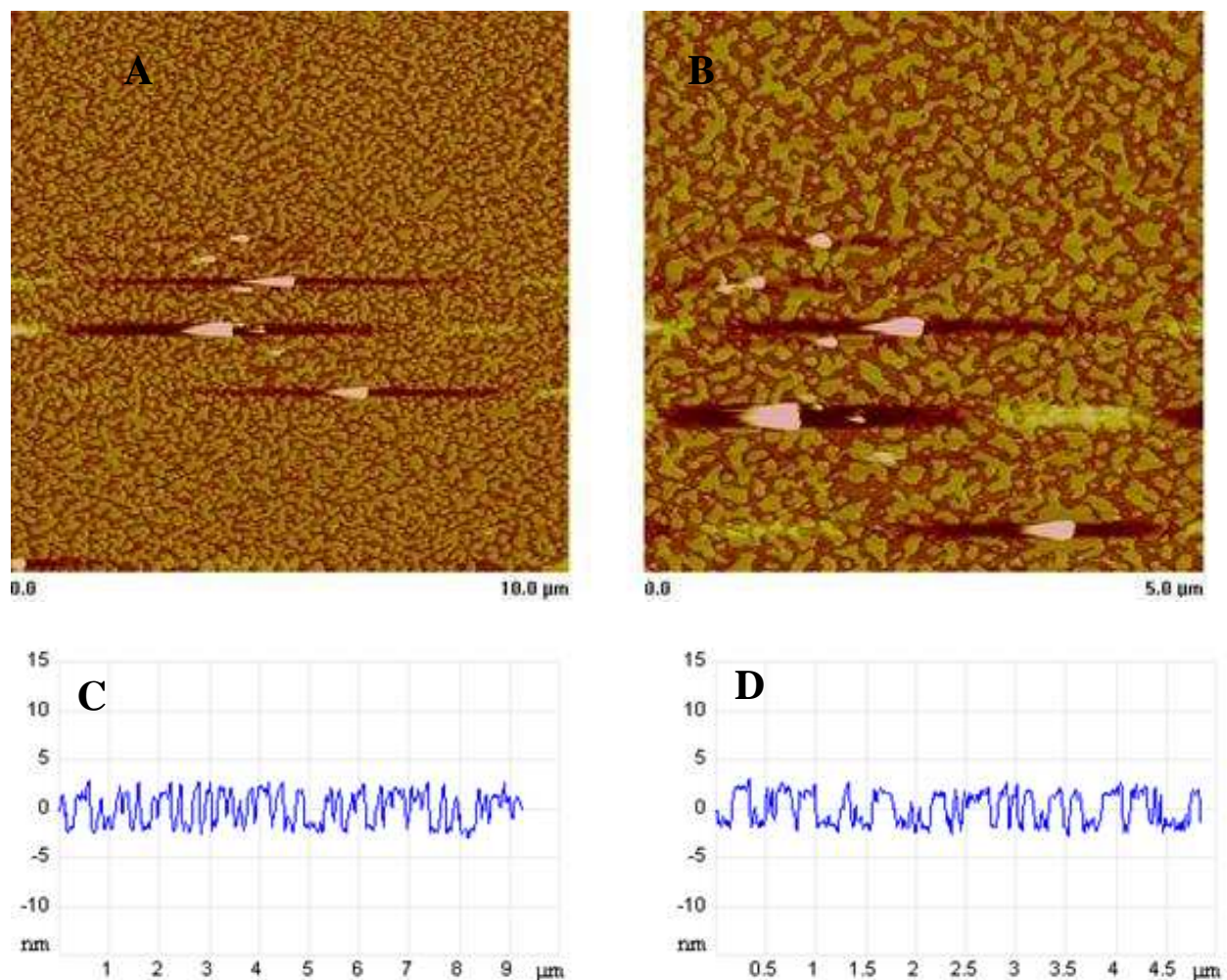


Figure V-20. Bicouches PC/PE/CL sur le mica imagées en mode tapping à différentes échelles (A et B) ; C et D profil topographique d'une ligne de la surface montrant des hauteurs de 4.5 et 5 nm.

c- Mesure de force

Les bicouches sont assez stables ; des mesures de forces n'ont pas montré de pénétration. Elles sont aussi très homogènes ce qui renforce l'hypothèse qu'il n'y a pas de mica accessible à la pointe (Figure V-21).

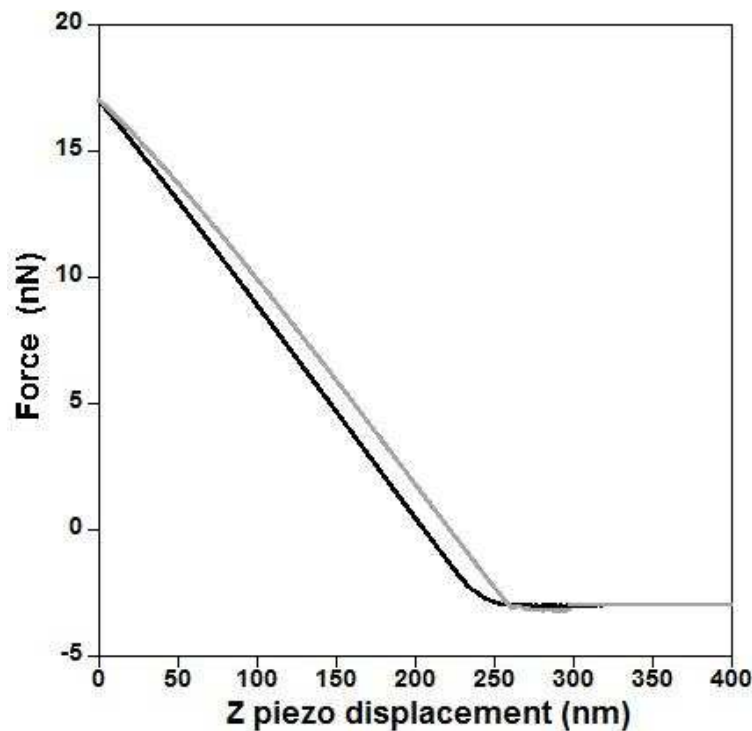


Figure V-21. Courbe force-distance sur une bicouche de PC/PE/CL

V-3-3-4 Discussion et Interprétation

Malgré les problèmes de différence de hauteur variable déjà discutés, nous avons constaté par microscopie à force atomique que ce soit en mode contact ou en tapping, la coexistence de domaines dans les bicouches de PC/PE/CL (2/1/1).

D'un point de vue physico-chimique, de tels domaines se produiraient par la séparation de phase due à des différences structurales ou à la réponse thermique des constituants phospholipidiques de la membrane [56].

Ces domaines ont été observés par une étude AFM [174] sur des bicouches supportées de DPPC, DPPE, CL. La conclusion principale est que la CL hautement insaturée forme des domaines dans les bicouches supportées à cause de sa faible miscibilité avec les autres chaînes de phospholipides saturées.

La stabilité de ces bicouches serait due aux forces d'attractions fortes entre CL et egg PC ou egg PE. Cette attraction est attribuée aux liaisons hydrogènes favorables.

De plus, Domenech *et al.* [175] suggèrent que les têtes polaires des phospholipides, particulièrement la charge négative portée par CL et la possibilité de la formation de liaisons hydrogène par POPE doivent jouer un rôle important dans la formation de domaines.

Inversement, lorsque la CL est mélangée avec du POPC, les interactions électrostatiques sont moins favorisées.

Nous n'avons d'ailleurs pas observé de domaines dans une bicouche mixte PC/CL (3/1) (images non montrées).

L'existence de régions de phospholipides latéralement distinctes est importante en considérant le fait que ces domaines doivent jouer un rôle dans l'insertion des protéines [5,135].

V-3-3-5 Insertion de la Créatine Kinase dans la bicouche

La mtCK octamérique (340 KDa) nous a été fournie par Thierry Granjon, elle a été purifiée selon la méthode de O.Marcillat *et al.* [176]. L'enzyme purifiée a été obtenu dans le Tris-HCl 20mM, 0.1 mM EDTA, et 0.2 mM DTT, pH 7.4 à une concentration de 0.2 g/l. La concentration de la protéine a été déterminée par la méthode de Lawry en utilisant la BSA comme standard.

Après préparation des bicouches PC/PE/CL, nous rajoutons la protéine à une concentration de 0.9 nM.

V-3-3-6 Résultats AFM

Sur les images réalisées par AFM, nous ne constatons pas de changement de la topographie entre la bicouche nue et celle avec la protéine ; ainsi nous ne pouvons pas observer directement la protéine sur la bicouche, mais nous constatons qu'il se produit une diminution de la hauteur de 4.5 nm à 1.5 et 2.7 nm due à l'adsorption de la protéine (Figure V-22).

En comparant la rugosité Ra entre une bicouche nue et la bicouche avec mtCK, nous constatons que cette rugosité augmente légèrement de 0.35 à 0.6 nm.

Cette structure est assez stable : les mesures de forces montrent une résistance à l'indentation de la pointe AFM.

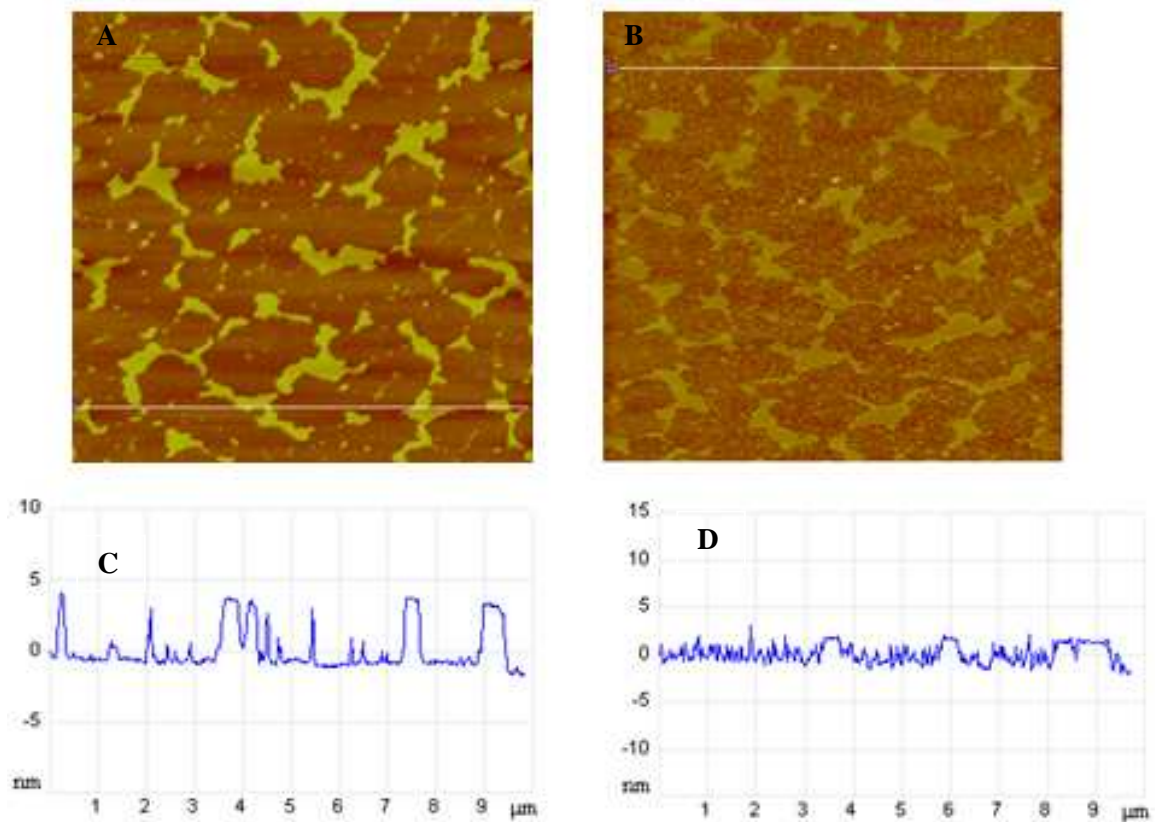


Figure V-22. Images AFM de bicouches de PC/PE/CL sur le mica . (A) avant insertion de la mtCK. (B) après insertion de la mtCK. (C, D) profil de hauteur caractéristique. (A,B :10x10μm) ; la hauteur de la barre de couleur est de 20nm.

V-3-3-7 Interprétation et conclusions

En accord avec d'autres études [177], ce ne sont pas des entités individuelles ou des agrégats de la protéine qui ont été observés sur la bicouche, mais des changements de la rugosité et la hauteur de la bicouche. Ces images ont révélé que la protéine induit une diminution significative de la hauteur des bicouches et une légère augmentation du Ra.

Cette diminution a été observée par Domenech *et al.* [178] lors de l'insertion du cytochrome c dans une bicouche supportée de POPE:POPC:CL (0.5:0.3:0.2, mol:mol:mol) sur le mica.

Néanmoins, ils ont constaté une augmentation presque négligeable de Ra sur le mica, qui serait le résultat de l'adsorption de la protéine sur le substrat mais en quantités plus faible que celles sur la bicouche.

Adsorption des protéines sur surfaces solides et leur insertion dans les membranes supportées

Des études de fluorescence avec l'ANS (8-anilino-1-naphthalene sulfonate), sur des domaines contenant la cardiolipine [178] ont trouvé que la fluorescence diminue en ajoutant le cytochrome c due à la compétition d'adsorption sur les mêmes sites. Cette diminution est plus prononcée dans des liposomes contenant la CL que dans des liposomes neutres.

En s'appuyant sur ces résultats, nous pouvons dire que la mtCK se fixe aux membranes par des interactions électrostatiques entre la cardiolipine et la partie C-terminale, chargée positivement (Lys 380, Lys 379 and Lys 369) [170] qui serait impliquée dans l'interaction avec la membrane interne.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Ce travail est principalement axé sur l'étude des propriétés nanomécaniques des bicouches phospholipidiques préparées par coadsorption de micelles mixtes et fusion de vésicules.

Nous avons étudié aussi l'adsorption et l'insertion des protéines dans des membranes modèles. Ces études ont été menées en exploitant deux techniques expérimentales qui sont la microscopie de fluorescence et la microscopie de force atomique.

La microscopie à force atomique est devenue un outil très important pour l'étude de la structure et la stabilité des bicouches phospholipidiques supportées. Elle a été utilisée pour mesurer les interactions entre les bicouches et la pointe et pour observer la nature des défauts dans la bicouche.

Nous avons étudié la stabilité de ces bicouches à travers leur résistance à l'indentation de la pointe AFM.

La caractérisation mécanique des bicouches lipidiques a permis de montrer leur résistance à des pressions supérieures à quelques dizaines de MPa. Cette résistance est bien plus importante que les pressions développées dans une articulation saine au cours de la marche normale, qui sont estimées à seulement quelques MPa. Cela a confirmé que les bicouches lipidiques jouent un rôle important dans la biolubrification du régime limite articulaire.

Nous avons étudié l'influence du pH et des ions sur la résistance de ces bicouches, ainsi que l'influence du mode de préparation.

Nous avons montré que les bicouches préparées par la méthode de fusion des vésicules sont plus résistantes que celles en micelles, ceci est probablement dû à l'absence de traces de détergent.

Conclusion générale et perspectives

Nous avons trouvé que les bicouches préparées dans l'eau ultrapure ne résistent pas à une force d'indentation d'environ 1nN exercée par la pointe AFM. En présence de la solution tampon Tris à pH 7.2, les bicouches résistent à plus de 20nN de force. Les ions jouent aussi un rôle important sur l'intégrité des bicouches mais moins que celui du pH.

Ces résultats sont en parfaite corrélation avec des expériences de tribologie menées au laboratoire où nous avons observé une corrélation positive entre la résistance à l'indentation normale, un coefficient de friction faible et stable et l'absence de la dégradation de la bicouche pendant le cisaillement. Dans l'eau ultrapure (pH 5.5), les bicouches sont facilement poncturées, rapidement endommagées et leurs propriétés lubrifiantes diminuent après 20 minutes de friction.

Nous avons mis au point une technique de couplage des protéines avec des billes fluorescentes de 27 nm de diamètre afin de faciliter leur repérage par microscopie de fluorescence ou AFM. Ainsi, nous avons pu réaliser l'adsorption des protéines sur surfaces solides avec des concentrations beaucoup plus faibles que celles utilisées jusqu'à maintenant dans la littérature. Ceci constitue un résultat très intéressant, particulièrement pour les études de biocompatibilité où l'adsorption des protéines joue un rôle essentiel dans la conception et l'utilisation de membranes artificielles et de matériaux biocompatibles que ce soit dans l'hémodialyse ou dans les greffes.

En couplant les deux méthodes, l'AFM et la microscopie de fluorescence, nous avons étudié l'insertion des protéines dans les membranes modèles. Nous avons ainsi mis en évidence le rôle des ancres GPI dans les membranes biologiques.

Comme perspectives, nous espérons reprendre une étude systématique sur l'effet d'autres paramètres tels que l'insaturation et la longueur de la chaîne lipidique sur la stabilité des membranes phospholipidiques.

Nous espérons arriver à contrôler la formation des domaines dans les bicouches mixtes de PC/PE/CL et comprendre leur interaction avec la créatine kinase.

Nous espérons aussi étudier plus en détail les interactions protéines- bicouches lipidiques.

ANNEXE

ANNEXE**Propriétés spécifiques des surfaces****A-1 Tension superficielle**

Les molécules dans un liquide ont un certain degré d'attraction entre elles. Le degré de cette attraction, appelée aussi cohésion, dépend des propriétés de la substance.

A l'intérieur du liquide, chaque molécule est soumise à des forces dirigées dans toutes les directions : leur résultante est donc nulle.

Les molécules qui sont à la surface par contre ne sont soumises qu'à l'attraction des molécules qui se trouvent à l'intérieur du fluide. Le résultat est l'apparition d'une force attractive nette dirigée vers l'intérieur et l'interface air /eau qui va spontanément minimiser son aire et la diminuer de manière à limiter le nombre d'atomes ou de molécules en surface. On appelle cette propriété tension de surface.

Ainsi, les gouttes de liquides libres sans gravité tendent donc à être sphériques, car la sphère est la forme qui présente le plus petit rapport surface/volume.

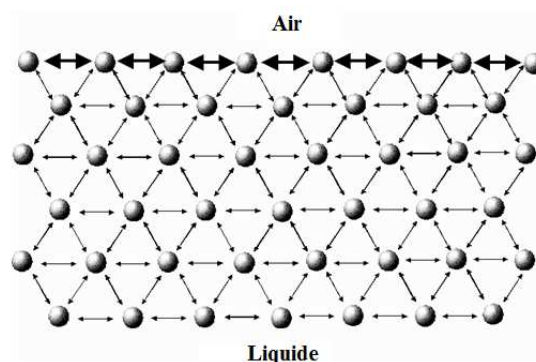


Figure A-1. Illustration schématique de l'interaction des molécules à l'interface et en volume

On peut expliquer les effets de surface en faisant intervenir les énergies de Helmholtz et de Gibbs. Ces grandeurs dépendent de l'aire superficielle par le biais de la quantité de travail nécessaire pour faire varier la surface.

En quantité infinitésimales, dA ou dG sont égales (dans des conditions différentes) au travail réalisé pour modifier l'énergie d'un système.

Puisque le travail nécessaire pour faire varier la surface, σ , d'un échantillon d'une quantité infinitésimale $d\sigma$, est proportionnel à γ , on obtient :

$$dW = \gamma d\sigma \quad (A-1)$$

La constante de proportionnalité γ est appelée « tension superficielle ». Ayant les dimensions d'un rapport énergie /surface, γ s'exprime normalement en (J/m^2), toutefois γ est plus souvent exprimée en $\text{N}\cdot\text{m}^{-1}$.

On peut écrire que le travail nécessaire pour faire varier la surface à volume et température constants, est égal au changement d'énergie d'Helmholtz, soit :

$$dA = \gamma d\sigma \quad (A-2)$$

L'énergie d'Helmholtz diminuant ($dA < 0$), les surfaces tendent naturellement à se contracter. Pour une surface d'eau, en équilibre avec sa vapeur, la tension superficielle est particulièrement élevée, de l'ordre de 70 mN/m à température ambiante ; alors qu'elle est de l'ordre de 20 mN/m pour un alcane dans les mêmes conditions. Cette différence est due à la nature des interactions et à l'énergie de cohésion qui en découle. Dans le cas de l'eau, liquide polaire, les liaisons hydrogènes (de l'ordre de $10 k_b T$ [179]), apportent au système une forte cohésion contrairement aux liaisons Van der Waals d'un alcane (de l'ordre de $k_b T$ [179]).

A-2 Pression de surface

La pression de surface π , l'équivalent de la pression pour un système tridimensionnel, est définie par la diminution de la tension de surface de l'eau pure par le film adsorbé, soit :

$$\pi = \gamma_0 - \gamma \quad (A-3)$$

où γ_0 et γ sont respectivement la tension superficielle de l'eau ($\gamma_0 = 72,8 \text{ mN}/\text{m}$ à 20°C) et la tension superficielle d'une surface recouverte par un film. La pression de surface est donc un indicateur de l'état d'organisation d'un film à la surface. Une pression de surface élevée sera caractéristique d'un état ordonné.

A-3 Aire moléculaire

L'aire moléculaire (A) est définie par l'aire moyenne occupée par un ensemble de molécules sur une surface d'aire donnée. Elle est d'autant plus faible que le film est compact. Il existe donc une relation étroite entre la pression de surface et l'aire moléculaire caractérisée par la courbe donnant l'évolution de π en fonction de A , appelée isotherme de compression. En comprimant le film à l'interface grâce à des barrières mobiles, il est alors possible de contrôler sa compacité.

A-4 Isotherme pression de surface-Aire

L'isotherme est la courbe de la pression de surface en fonction de l'aire par molécule à une température fixe.

Dans la figure de l'isotherme de π - A (Figure A-2), des phases distinctes à compressibilité différente peuvent être distinguées. Tout d'abord, à la pression la plus basse, les molécules sont en phase gazeuse (G). Ensuite, avec l'augmentation de pression, la région de la phase liquide élargie (LE) s'affichera après la coexistence des phases G et LE. Avec une pression plus élevée, la phase liquide condensé (LC) s'affichera après la coexistence de phases LE et LC.

Avec plus de pression, la phase condensée ou solide proche de la verticale apparaît. L'isotherme π - A est une signature d'une molécule. Toutes ces phases peuvent ne pas être toutes distinguées pour une molécule particulière et dépendent aussi fortement de la température et de la vitesse de compression.

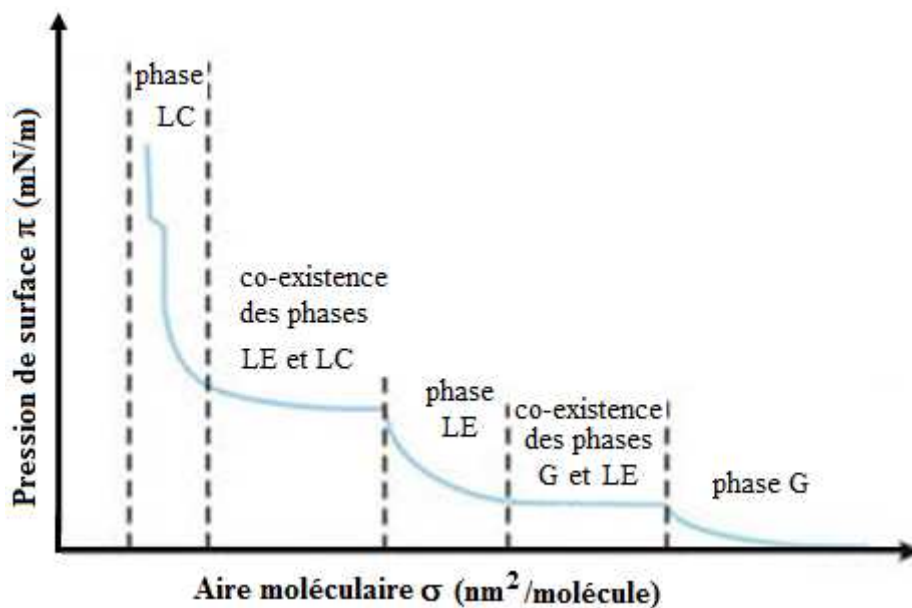


Figure A-2. Isotherme de compression d'une monocouche d'amphiphile

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

- [1] E. Sackmann (1996) Supported membranes: scientific and practical applications. *Science*, **271**, 43-48.
- [2] E.T. Castellana, P.S. Cremer (2006) Solid supported lipid bilayers: from biophysical studies to sensor design. *Surf. Sci. Rep.*, **61**, 429-444.
- [3] K. Simons, E. Ikonen (1997) Functional rafts in cell membranes. *Nature*, **387**, 569-572.
- [4] Pike, L.J. (2004) Lipid rafts: heterogeneity on the high seas. *Biochem J*, **378**, 281-292.
- [5] P.E. Milhiet, M.C. Giocondi, O. Baghdadi, F. Ronzon, B. Roux, C. Le Grimellec (2002) Spontaneous insertion and partitioning of alkaline phosphatase into model lipid rafts. *EMBO Rep.*, **3** (5), 485-490.
- [6] B.A. Hills (1995) Remarkable antiwear properties of joint surfactant. *Ann. Biomed. Eng.*, **23**, 112-115.
- [7] S.A. Johnston (1997) Osteoarthritis, joint anatomy, physiology, and pathobiology. *Vet. Clin. North Am. Small Animal Pract.*, **27**, 699-723.
- [8] I.M. Schwarz, B.A. Hills (1998) Surface-active phospholipid as the lubricating component of lubricin. *British Journal of Rheumatology*, **37**, 21-26.
- [9] B.A. Hills (1989) Oligolamellar lubrication of joints by surface active phospholipid. *J. Rheumatol.*, **16**, 82-91.
- [10] D.A. Swann, F.H. Silver, H.S. Sayter (1985) The molecular structure and lubricating activity of lubricin isolated from bovine and human synovial fluids. *Biochem. J.* **225**, 195-201.
- [11] S. Garcia-Manyes, F. Sanz (2010) Nanomechanics of lipid bilayers by force spectroscopy with AFM: a perspective. *Biochim. Biophys. Acta*, **1798** (4), 741-749.
- [12] S. Leroy, A. Steinberger, C. Cottin-Bizonne, A.M. Trunfio-Sfarghiu, E. Charlaix (2009) Probing biolubrication with a nanoscale flow. *Soft Matter*, **5**, 4997-5002.
- [13] Y.F. Dufre ne, G.U. Lee (2000) Advances in the characterization of supported lipid films with the atomic force microscope. *Biochim. Biophys. Acta*, **1509** (1-2), 14-41.

Bibliographie

- [14] S. Loi, G. Sun, V. Franz, H.J. Butt (2002) Rupture of molecular thin films observed in atomic force microscopy. II. *Experiment, Phys. Rev. E*, **66** (031602) 1-7.
- [15] S. Garcia-Manyes, G. Oncins, F. Sanz (2005) Effect of ion-binding and chemical phospholipid structure on the nanomechanics of lipid bilayers studied by force spectroscopy. *Biophys. J.*, **89**, 1812-1826.
- [16] P.E. Milhiet, M.C. Giocondi, O. Baghdadi, F. Ronzon, C. LeGrimellec, B. Roux (2002) AFM detection of GPI protein insertion into DOPC/DPPC model membranes. *Single Mol.*, **3**, 136-141.
- [17] G. Decher, J.D. Hong (1991) Buildup of ultrathin multilayer films by a self-assembly process: I. consecutive adsorption of anionic and cationic bipolar amphiphiles. *Makromol. Chem., Macromol. Symp.*, **46**, 321-327.
- [18] G. Decher, J.D. Hong, J. Schmitt (1992) Buildup of ultrathin multilayer films by a selfassembly process: III. Consecutively alternating adsorption of anionic and cationic polyelectrolytes on charged surfaces. *Thin Solid Films*, **210-211** (2) 831-835.
- [19] K. Boesze-Battaglia, R. Schimmel (1997) Cell membrane lipid composition and distribution: implications for cell function and lessons learned from photoreceptors and platelets. *J. Exp. Biol.*, **200**, 2927-2936.
- [20] E. Shechter (1993) " Biochimie et Biophysique des membranes" 2nd ed. Masson.
- [21] K. Simons, G. Van Meer (1988) Lipid sorting in epithelial cells. *Biochemistry*, **27**, 6197-6202.
- [22] X.M. Li, J.M. Smaby, M.M. Momsen, H.L. Brockman, R.E. Brown (2000) Sphingomyelin interfacial behavior: The impact of changing acyl chain composition. *Biophys. J.*, **78**, 1921-1931.
- [23] J.M. Holopainen, J.Y.A. Lehtonen, P.K.J. Kinnunen (1997) Lipid microdomains in dimyristoylphosphatidylcholine/ceramide liposomes. *Chem. Phys. Lipids*, **88**, 1-13.
- [24] L. Liscum, K.W. Underwood (1995) Intercellular cholesterol transport and compartmentation. *J. Biol. Chem.*, **270**, 15443-15446.
- [25] Y. Lange, J. Ye, M. Rigney, T.L. Steck (1999) Regulation of endoplasmic reticulum cholesterol by plasma membrane cholesterol. *J. Lipid Res.*, **40**, 2264-2270.
- [26] B. De Kruffy (1975) Lipid-sterol interactions in liposomes and membranes. *Biochem. Soc. Trans.*, **3**, 618- 621.
- [27] P.L. Yeagle (1985) Cholesterol and the cell membrane. *Biochim. Biophys. Acta*, **822**, 267-287.
- [28] H. Lodish, A. Berk, S.L. Zipursky, P. Matsudaira, D. Baltimore, J. Darnell (2000) "Molecular cell biology". W.H. Freeman

Bibliographie

- [29] B. Alberts, D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, J.D. Watson (1994) "Biologie Moléculaire de la Cellule" Médecine-Sciences Flammarion, 3^{ème} édition.
- [30] J. Koolman, K.H. Röhm, (1995) "Atlas de poche de Biochimie", Médecine-Science Flammarion, 2^{ème} édition.
- [31] L. Pauling, R. B. Corey, H. R. Branson (1951) The Structure of Proteins: Two Hydrogen-Bonded Helical Configurations of the Polypeptide Chain. *PNAS*, **37**, 205-211.
- [32] L. Pauling, R. B. Corey (1951) The pleated sheet, a new layer configuration of polypeptide chains, *PNAS*, **37**, 251-256.
- [33] J. Delaunay (2001) "Biochimie", Hermann ed. Paris
- [34] K.V. Damodaran, K.M. Jr. Merz, B.P. Gaber (1995) Interaction of small peptides with lipid bilayers. *Biophys J.*, **69**, 1299-1308.
- [35] A.G. Lee (2004) How lipids affect the activities of integral membrane proteins. *Biochim. Biophys Acta*, **1666**, 62-87.
- [36] A.D. Albert, J.E. Young, P.L. Yeagle (1996) Rhodopsin-cholesterol interactions in bovine rod outer segment disk membranes. *Biochim Biophys Acta*, **1285**, 47-55
- [37] S.J. Singer, G.L. Nicolson (1972) The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*, **175**, 720-731.
- [38] R. Lipowsky, E. Sackmann (1995) "Structure and Dynamics of Membranes" Handbook of Biological Physics. Elsevier, North Holland.
- [39] A. Zachowski (1993) Phospholipids in animal eukaryotic membranes – transverse asymmetry and movement. *Biochemical Journal*, **294**, 1-14.
- [40] P.F. Devaux (1991) Static and dynamic lipid asymmetry in cell-membranes. *Biochemistry*, **30**, 1163-1173.
- [41] Glaser, M. (1993) Lipid domains in biological membranes. *Current Opinion in Structural Biology*, **3**, 475-481.
- [42] W.L. Vaz, P. Almeida, (1993) Phase topology and percolation in multi-phase lipid bilayers: is the biological membrane a domain mosaic? *Current Opinion in Structural Biology*, **3**, 482-488.
- [43] N.M. Hooper (1999) Detergent-insoluble glycosphingolipid/cholesterol-rich membrane domains, lipid rafts and caveolae. *Mol. Membr. Biol.*, **16**, 145-156.
- [44] R. Varma, S. Mayor (1998) GPI-anchored proteins are organized in submicron domains at the cell surface. *Nature*, **394**, 798-801.

Bibliographie

- [45] S.N. Ahmed, D.A. Brown, E. London (1997) On the origin of sphingolipid/ cholesterol-rich detergent-insoluble cell membranes: physiological concentrations of cholesterol and sphingolipid induce formation of a detergent-insoluble, liquid-ordered lipid phase in model membranes. *Biochemistry*, **36**, 10944-10953.
- [46] P.F. Almeida, W.L Vaz, T.E Thompso (1992) Lateral diffusion in the liquid phases of dimyristoylphosphatidylcholine/cholesterol lipid bilayers: a free volume analysis. *Biochemistry* **31**: 6739-6747.
- [47] R. Koynova, M. Caffrey (1998) Phases and phase transitions of the phosphatidylcholines. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1376**, 91-145.
- [48] O.G. Mouritsen (1991) Theoretical models of phospholipid phase transition. *Chem. Phys. Lipids*, **57**, 179-194.
- [49] T. Heimburg (2000) A model for the lipid pretransition : coupling of ripple formation with the chain-melting transition. *Biophysical Journal*, **78**, 1154-1165.
- [50] M. Rappolt, G. Pabst, G. Rapp, M. Kriechbaum, H. Amenitsch, C. Krenn, S. Bernstorff, P. Laggner (2000) New evidence for gel-liquid crystalline phase coexistence in the ripple phase of phosphatidylcholines. *European Biophysics Journal with Biophysics Letters*, **29**, 125-133.
- [51] A. Moscho, O. Orwar, D.T Chiu, B.P. Modi, R.N. Zare (1996) Rapid preparation of giant unilamellar vesicles. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 11443-11447.
- [52] U. Seydel, K. Brandenburg, B. Lindner, H. Moll, H. (1981) The influence of phospholipidosis inducing drugs on the phase transition of lipids. *Thermochim. Acta*, **49**, 35-48.
- [53] J.R. Silvius, B.D. Read, R.N. McElhaney (1979) Thermotropic phase transitions of phosphatidylcholines with odd - numbered n-acyl chains. *Biochim. Biophys. Acta* **555**: 175-178.
- [54] M.J. Blandamer, B. Briggs (1998) Formation of vesicular bilayers in aqueous solutions containing mixtures of dialkyldimethylammonium bromides. *J. Mol. Liq.*, **75**, 181-187.
- [55] P. Garidel, A. Blume (2000) Miscibility of phosphatidylethanolamine-phosphatidylglycerol mixtures as a function of pH and acyl chain length. *Eur. Biophys. J.*, **28**, 629-638
- [56] H.B. Binder, V. Barragan , F.M. Menger (2003) Domains and rafts in lipid membranes. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **42**, 5802-5827.
- [57] K. Akashi, H. Miyata, H. Itoh, K. Jr. Kinoshita (1998) Formation of giant liposomes promoted by divalent cations: critical role of electrostatic repulsion. *Biophys J*, **74**, 2973-2982.
- [58] I. Raviakine, A. Brisson (2000) Formation of supported phospholipid bilayers from unilamellar vesicles investigated by atomic force microscopy. *Langmuir*, **16**, 1806-1815.

Bibliographie

- [59] J. Jass, T. Tjarnhage, G. Puu (2000) From liposomes to supported, planar bilayer structures on hydrophilic and hydrophobic surfaces: an atomic force microscopy study. *Biophys. J.*, **79**, 3153-3163.
- [60] R. Richter, A. Mukhopadhyay, A. Brisson (2003) Pathways of lipid vesicle deposition on solid surfaces: a combined QCM-D and AFM study. *Biophys. J.*, **85**, 3035-3047.
- [61] E. Reimhult, F. Hook, B. Kasemo (2002) Temperature dependence of formation of a supported phospholipid bilayer from vesicles on SiO₂. *Phys. Rev. E. Stat. Nonlin. Soft. Matter. Phys.*, **66**, 051905.
- [62] Z.V. Feng, S. Granick, A.A. Gewirth (2004) Modification of a supported lipid bilayer by polyelectrolyte adsorption. *Langmuir*, **20**, 8796-8804.
- [63] A.S. Muresan, K.Y.C. Lee (2001) Shape evolution of lipid bilayer patches adsorbed on mica: An atomic force microscopy study, *Journal of Physical Chemistry B*, **105**, 852-855.
- [64] J. Kim, G. Kim, P.S. Cremer (2001) Investigations of water structure at the solid/liquid interface in the presence of supported lipid bilayers by vibrational sum frequency spectroscopy. *Langmuir*, **17**, 7255-7260.
- [65] H.M. McConnell, T.H. Watts, R.M. Weis, A.A. Brian (1986) Supported planar membranes in studies of cell-cell recognition in the immune system. *Biochim. Biophys. Acta*, **864**, 95-106.
- [66] A.A. Brian, H.M. McConnel (1984) Allogenic simulation of cyto-toxic T-cells by supported planar membranes. *PNAS, USA-Biological Sciences*, **81**, 6159-6163.
- [67] L. Zhang, S. Granick (2005) Lipid diffusion compared in outer and inner leaflets of planar supported bilayers. *The Journal of Chemical Physics*, **123**, 211104.
- [68] L.K. Tamm, H.M. McConnel (1985) Supported phospholipid bilayers. *Biophysical Journal*, **47**, 105-113.
- [69] T.V. Ratto, M.L. Longo (2002) Obstructed diffusion in phase-separated supported lipid bilayers : a combined atomic force microscopy and fluorescence recovery after photobleaching approach. *Biophysical Journal*, **83**, 3380-3392.
- [70] M. Przybylo, J. Sykora, J. Humpolickova, A. Benda, A. Zan, M. Hof (2006) Lipid diffusion in giant unilamellar vesicles is more than 2 times faster than in supported phospholipid bilayers under identical conditions. *Langmuir*, **22**, 9096-9099.
- [71] M.B. Forstner, L. Käs, D. Martin (2001) Single lipid diffusion in Langmuir monolayers. *Langmuir*, **17**, 567-570.
- [72] M. Hetzer, S. Heinz, S. Grage, T.M. Bayerl (1998) Asymmetric molecular friction in supported phospholipid bilayers revealed by NMR measurements of lipid diffusion. *Langmuir*, **14**, 982-984.

Bibliographie

- [73] J. Yang, J. Appleyard (2000) The main phase transition of mica-supported phosphatidylcholine membranes. *Journal of Physical Chemistry B*, **104**, 8097- 8100.
- [74] J.Liu, J.C. Conboy (2005) 1,2-Diacyl-Phosphatidylcholine flip-flop measured directly by sum-frequency vibrational spectroscopy. *Biophysical journal*, **89**, 2522-2532.
- [75] D. Marsh (1996) Lateral pressure in membranes. *Biochim. Biophys. Acta*, **1286**,183-223.
- [76] G. Binnig, C. F. Quate and C. Gerber (1986) Atomic Force Microscope. *Physical Review Letters*, **56**, 930-933.
- [77] G. Binnig (1992) Force microscopy. *Ultramicroscopy*, **42-44 (1)**, 7-15.
- [78] G. Binnig, H. Rohrer (1987) Scanning tunneling microscopy-from birth to adolescence. *Rev. Mod. Phys.*, **59**, 615-625.
- [79] J.N. Israelachvili (1991) "Intermolecular and surface forces" Academic Press, Londres.
- [80]P.K. Hansma, J.P. Cleveland, M. Radmacher, D.A. Walters, P.E. Hillner, M. Bezanilla, M. Fritz, D. Vie, H.G. Hansma, C.B. Prater, J. Massie, L. Fukunaga, J. Gurley, V. Elings (1994) Tapping mode atomic force microscopy in liquids. *Appl. Phys. Lett.*, **64**, 1738-1740.
- [81] C. B. Prater (1994) Vibrating probe (AC) methods in atomic force microscopy. Atomic Force/ Scanning Tunneling Microscopy. Cohen S. H. Plenum Press, New York.
- [82] Q. Zhong, D. Imniss, K. Kjoller, V.B Elings (1993) Fractured polymer/silica fiber surface studied by tapping mode atomic force microscopy. *Surf. Sci.*, **290**, L688-L692
- [83] R. Luthi, E.Meyer, L. Howald, H. Haefke, D. Anselmetti, M. Dreier, M. Ruetschi, T. Bonner, R.M. Overney, J. Frommer, H.J. Guntherodt (1994) Progress in noncontact dynamic force microscopy. *J. Vac. Sci. Technol B* **12**, 1673-1676.
- [84] N.A. Burnham, R.J. Colton, H.M. Pollock (1993) Interpretation of force curves in force microscopy. *Nanotechnology*, **4**, 64-80
- [85] A.B.Cappella, G.Dielter (1999) Force-Distance Curves by Atomic Force Microscopy. A Review, *Surface Science Reports*, **34**, 1-104.
- [86] N.A. Burnham, R.J. Colton (1989) Measuring the nanomechanical properties and surface forces of materials using an atomic force microscope. *J.Vac. Sci. Technol. A* **7**, 2906-2913.
- [87] J. Gavaille, J. Takadoum (2002) Study of Surface Forces Dependence on pH by atomic force microscopy. *Journal of Colloid and Interface Science*, **250**,104-107.
- [88] [J. Gavaille, J.Takadoum (2003) Surface charges and adhesion measured by atomic force microscope influence on friction force. *Tribology International*, **36**, 865-871.

Bibliographie

- [89] R. Levy, M. Maaloum (2002) Measuring the spring constant of atomic force microscope cantilevers: thermal fluctuations and other methods. *Nanotechnology*, **13**, 33-37.
- [90] J. L. Hutter, J. Bechhoefer (1993) Calibration of atomic-force microscope tips. *Rev. Sci. Instrum.*, **64**, 1868-1873.
- [91] D.J. Keller, F.S. Franks (1993) Envelope reconstruction of probe microscope images. *Surf.Sci.*, **294**, 409-419.
- [92] P. Markiewicz, M.C. Goh (1994) Atomic force microscopy probe tip visualization and improvement of images using a simple deconvolution procedure. *Langmuir*, **10**, 5-7.
- [93] S. Dongmo, M. Troyon, P. Vautrot, E. Delain, N. J. Bonnet (1996) Blind restoration method of scanning tunneling and atomic force microscopy images. *Vac. Sci. Technol.B*, **14**, 1552-1556
- [94] J.S. Villarubia (1994) Morphological estimation of tip geometry for scanned probe microscopy. *Surf.Sci.*, **321**, 287-300.
- [95] L. Mantelius, J.O. Tegenfeldt, P. van Heeren (1994) Direct observation of the atomic force microscopy tip using inverse atomic force microscopy imaging. *J. Vac. Sci. Technol. B*, **12**, 2222-2226.
- [96] M. Stelze, E. Sackmann, (1989) Sensitive detection of protein adsorption to supported lipid bilayers by frequency dependent capacity measurements and microelectrophoresis. *Biochim. Biophys.Acta*, **981**, 135-142.
- [97] D. J. Müller, M. Amrein, A. Engel (1997) Adsorption of biological molecules to a solid support for scanning probe microscopy. *J. Struct. Biol.*, **119**, 172-188.
- [98] R.M. Pashley (1981) Hydration forces between mica surfaces in Li⁺, Na⁺, and Cs⁺ electrolyte solutions: a correlation of double layer and hydration forces with surface cation exchange properties. *J. Colloid Interface Sci.*, **83**, 531-546.
- [99] I. Langmuir (1917) The Constitution and fundamental properties of solids and liquids. II. Liquids. *JACS*, **39**, 1848-1906
- [100] K. B. Blodgett (1935) Films built by depositing successive monomolecular layers on a solid surface. *JACS*, **57**, 1007-1022.
- [101] K. B. Blodgett, I. *Langmuir* (1937) Built-up films of barium stearate and their optical properties. *Phys. Rev.*, **51**, 964-982.
- [102] T.D. Osborn, P. Yager (1995) Modeling success and failure of Langmuir-Blodgett transfer of phospholipid bilayers to silicon dioxide. *Biophysical Journal*, **68**, 1364-1373
- [103] J. Mou, D.M. Czajkowsky, Z. Shao (1996) Gramicidin A aggregation in supported sel state phosphatidylcholine bilayers. *Biochemistry*, **35** (10), 3222-3226.

Bibliographie

- [104] F. Tiberg, I. Harwigsson, M. Malmsten (2000) Formation of model lipid bilayers at the silica-water interface by co-adsorption with non-ionic dodecyl maltoside surfactant. *Eur. Biophys. J.*, **29**, 196-203.
- [105] L.M. Grant, F. Tiberg (2002) Normal and lateral forces between lipid covered solids in solution: Correlation with layer packing and structure. *Biophys. J.*, **82**, 1373-1385.
- [106] D. Lichtenberg, E. Opatowski, M.M. Kozlov (2000) Phase boundaries in mixtures of membraneforming amphiphiles and micelle-forming amphiphiles. *Biochim Biophys Acta*, **1508**, 1-19.
- [107] B.A. Hills (2000) Boundary lubrication in vivo. *Proc Inst Mech Eng H-J Eng Med.*, **214(1)**, 83-94.
- [108] C.G. Sinn, M. Antonietti, R. Dimova (2006) Binding of calcium to phosphatidylcholine–phosphatidylserine membranes. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, **282–283**, 410-419.
- [109] R.A. Böckmann, A. Hac, T. Heimburg, H. Grubmüller (2003) Effect of sodium chloride on a lipid bilayer. *Biophys. J.* **85**, 1647-1655.
- [110] J.P. Rieu, F. Ronzon, B. Roux (2002) Adsorption and aggregation of glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchored alkaline phosphatase on methylated glass surfaces studied by tapping mode atomic force microscopy. *Thin Solid Films*, **406**, 241-249.
- [111] H.P. Vacklin, F. Tiberg, R.K. Thomas (2005) Formation of supported phospholipid bilayers via co-adsorption with β -D-dodecyl maltoside. *Biochem. Biophys. Acta*, **1668**, 17-24.
- [112] C.E. Miller, J. Majewski, T. Gog, T.L. Kuhl (2005) Characterization of biological thin films at the solid-liquid interface by X-ray reflectivity. *Phys. Rev. Lett.*, **94**, 238104, 1-4.
- [113] M.B. Hochrein, C. Reich, B. Krause, J.O. Rädler, B. Nickel (2006) Structure and mobility of lipid membranes on a thermoplastic substrate. *Langmuir*, **22 (2)**, 538-545.
- [114] J. Pan, S. Tristram-Nagle, N. Kucerka, J.F. Nagle (2008) Temperature dependence of structure, bending rigidity, and bilayer interactions of dioleoylphosphatidylcholine bilayers. *Biophys. J.*, **94**, 117-124.
- [115] H. Schönherr, J. M. Johnson, P. Lenz, C.W. Frank, S. G. Boxer (2004) Vesicle adsorption and lipid bilayer formation on glass studied by atomic force microscopy. *Langmuir*, **20**, 11600-11606.
- [116] J. M. Johnson, T. Ha, S. Chu, S.G. Boxer (2002) Early steps of supported bilayer formation probed by single vesicle fluorescence assays. *Biophys. J.*, **83**, 3371-3379.
- [117] S. Garcia-Manyes, G. Oncins, F. Sanz (2005) Effect of temperature on the nanomechanics of lipid bilayers studied by force spectroscopy. *Biophys. J.*, **89**, 4261-4272.

Bibliographie

- [118] S.W. Hui, R. Viswanathan, J.A. Zasadzinski, J.N. Israelachvili (1995) The structure and stability of phospholipid bilayers by atomic force microscopy. *Biophys. J.*, **68**, 171-178.
- [119] M. Benz, T. Gutschmann, N. Chen, R. Tadmor, J. Israelachvili (2004) Correlation of AFM and SFA measurements concerning the stability of supported lipid bilayers. *Biophys. J.*, **86**, 870-879.
- [120] Y. Fang, J. Yang (1997) The growth of bilayer defects and the induction of interdigitated domains in the lipid-loss process of supported phospholipid bilayers. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.*, **1324**, 309-319.
- [121] A.M. Trunfio-Sfarghiu, Y. Berthier, M.H. Meurisse, J.P. Rieu (2008) Role of nanomechanical properties in the tribological performances of phospholipid biomimetic surfaces. *Langmuir*, **24**, 8765-8771.
- [122] I. Pera, R. Stark, M. Kappl, H.J. Butt, F. Benfenati (2004) Using the atomic force microscope to study the interaction between two solid supported lipid bilayers and the influence of synapsin I. *Biophys. J.*, **87**, 2446-2455.
- [123] F. Dekkiche, M.C. Corneci, A.M. Trunfio-Sfarghiu, B. Munteanu, Y. Berthier, W. Kaabar, J.P. Rieu (2010) Stability and tribological performances of fluid phospholipid bilayers: Effect of buffer and ions. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **80**, 232-239.
- [124] L.M. Grant, T. Ederth, F. Tiberg (2000) Influence of surface hydrophobicity on the layer properties of adsorbed nonionic surfactants. *Langmuir*, **16**, 2285-2291.
- [125] Z. Chen, R.P. Rand (1997) The influence of cholesterol on phospholipid membrane curvature and bending elasticity. *Biophys. J.*, **73**, 267-276.
- [126] J.R. Coorsen, R.P. Rand (1990) Effects of cholesterol on the structural transitions induced by diacylglycerol in phosphatidyl-choline and -ethanolamine bilayer systems. *Biochem. Cell Biol.*, **68** (1), 65-69.
- [127] Z. Pawlak, J. Kotynska, Z.A. Figaszewski, A. Oloyede, A. Gadomski, A. Gudaniec (2007) Impact of the charge density of phospholipid bilayers on lubrication of articular cartilage surfaces. *JAMME J.*, **23**, 47-50.
- [128] U. Raviv, J. Klein (2002) Fluidity of bound hydration layers. *Science*, **297**, 1540-1543.
- [129] M. Chen, W.H. Briscoe, S.P. Armes, J. Klein (2009) Lubrication at physiological pressures by polyelectrolyte brushes. *Science*, **323**, 1698-1701.
- [130] A. Blom, C. Drummond, E.J. Wanless, P. Richetti, G.G. Warr (2005) Surfactant boundary lubricant film modified by an amphiphilic diblock copolymer. *Langmuir*, **21**, 2779-2788.
- [131] B.J. Kirby, E.F. Hasselbrink Jr. (2004) The zeta potential of microfluidic substrates. 1. Theory, experimental techniques, and effects on separations. *Electrophoresis*, **25**, 187-202.

Bibliographie

- [132] R. Zimmermann, D. Küttner, L. Renner, M. Kaufmann, J. Zitzmann, M. Müller (2009) Charging and structure of zwitterionic supported bilayer lipid membranes studied by streaming current measurements, fluorescence microscopy, and attenuated total reflection Fourier transform infrared spectroscopy. *Biointerphases*, **4**, 1-6.
- [133] F. Tokumasu, A.J. Jin, G.W. Feigenson, J.A. Dvorak (2003) Atomic force microscopy of nanometric liposome adsorption and nanoscopic membrane domain formation. *Ultramicroscopy*, **97**, 217-227.
- [134] [146] S. Merino, Ò. Domènech, I. Díez, F. Sanz, M. Viñas, M.T. Montero, J. Hernández-Borrell (2003) Effects of Ciprofloxacin on Escherichia coli lipid bilayers: an atomic force microscopy study. *Langmuir*, **19**, 6922-6927.
- [135] S. Merino, Ò. Domènech, M. Viñas, M.T. Montero, J. Hernández-Borrell (2005) Effects of lactose permease on the phospholipid environment in which it is reconstituted: a fluorescence and atomic force microscopy study. *Langmuir*, **21**, 4642-4647
- [136] K.E. McAuley, P.K. Fyfe, J.P. Ridge, N.W. Isaacs, R.J. Cogdell, M.R. Jones (1999) Structural details of an interaction between cardiolipin and an integral membrane protein. *PNAS, USA*, **96**, 14706-14711.
- [137] E. P. Plueddemann (1982) "Silane coupling agents" Plenum Press, New York.
- [138] P. Boehme, G. Vedantham, T. Przybycien, G. Belfort (1999) Self-assembled monolayers on polymer surfaces: kinetics, functionalization and photopatterning. *Langmuir*, **15**, 5323- 5328.
- [139] M.E. McGovern, K.M.R. Kallury, et M. Thompson (1994) Role of solvent on the silanization of glass with octadecyltrichlorosilane. *Langmuir*, **10**, 3607-3614.
- [140] J. Duchet, B. Chabert, J.P. Chapel, J.F. Gérard, J. M. Chovelon, N. Jaffrezic-Renault (1997) Influence of the deposition process on the structure of grafted alkylsilane layers. *Langmuir*, **13**, 2271-2278.
- [141] J. Duchet (1996) Système modèle polyéthylène/verre : rôle de chaînes connectrices greffées sur l'adhésion. Thèse de Doctorat, Université Claude Bernard Lyon 1.
- [142] S. Curry, H. Mandelkow, P. Brick, H. Franks (1998) Crystal structure of HSA complexed with fatty acid reveals an asymmetric distribution of binding sites. *Nature Struct. Biol.*, **5**, 827-835.
- [143] D.C. Carter, J.X. Ho (1994) Structure of serum albumin. *Advances in Protein Chemistry.*, **45**, 153-203.
- [144] A. J. Luft, F. L. Lorscheider (1983) Structural analysis of human and bovine alpha-fetoprotein by electron microscopy, image processing, and circular dichroism. *Biochemistry*. **22**, 5978-5981.

- [145] Y.X Wang, J. L. Robertson, W.B. Spillman, Jr., R.O. Claus (2004) Effects of the chemical structure and the surface properties of polymeric biomaterials on their biocompatibility. *Pharmaceutical Research*, **21**, 1362-1373.
- [146] P. Roach, D. Farrar, C.C. Perry (2005) Interpretation of Protein Adsorption: Surface-Induced Conformational Changes. *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 8168-8173
- [147] M.T. Lehto et F.J. Sharom (2002) Proximity of the protein moiety of a GPI-anchored protein to the membrane surface: A fret study. *Biochemistry*, **41**, 8368-8376.
- [148] T. Friedrichson, T.V. Kurzchalia (1998) Microdomains of GPI-anchored proteins in living cells revealed by crosslinking. *Nature*, **394**, 802-805.
- [149] M. Angrand, A. Briolay, F. Ronzon, B. Roux (1997) Detergent-mediated reconstitution of a glycosyl-phosphatidylinositol-protein into liposomes. *Eur. J. Biochem.*, **250**, 168-176
- [150] F. Ronzon, B. Desbat, T. Buffeteau, C. Mingotaud, J.P. Chauvet, B. Roux (2002) Structure and Orientation of a Glycosylphosphatidyl Inositol Anchored Protein at the Air/Water Interface. *J.Phys.Chem. B*, **106**, 3307-3315.
- [151] O. Nosjean, A. Briolay et B. Roux (1997) Mammalian GPI-proteins : sorting, membrane residence and functions. *Biochim. Biophys. Acta*, **1331**, 153-186.
- [152] M.H. Le Du, T. Stigbrand, M.J. Taussig, A. Ménez, E.A. Stura (2001) Crystal structure of alkaline phosphatase from human placenta at 1.8 Å Resolution. Implication for a substrate specificity. *J. Biol. Chem.*, **276**, 9158-9165.
- [153] J.P Rieu, F. Ronzon, C.Place, F.Dekkiche, B.Cross, B. Roux (2004) Insertion of GPI-anchored alkaline phosphatase into supported membranes: a combined AFM and fluorescence microscopy study. *Acta Biochimica Polonica*, **51 (1)**, 189-197.
- [154] D.E. Saslowsky, J. Lawrence, X. Ren, D.A. Brown, R.M. Henderson, J.M. Edwardson (2002) Placental alkaline phosphatase is efficiently targeted to rafts in supported lipid bilayers. *Biol. Chem.*, **277**, 26966-26970.
- [155] J. Comte, B. Maisterrena, D.C. Gautheron (1976) Lipid composition and protein profiles of outer and inner membranes from pig heart mitochondria. Comparison with microsomes. *Biochim. Biophys. Acta.*, **419**, 271-284.
- [156] M. Schlame, D. Rua, M.L. Greenberg (2000) The biosynthesis and functional role of cardiolipin. *Prog. Lipid Res.*, **39**, 257-288.
- [157] M. Schlame, K. Beyer, M. Hayer-Hartl (1991) Molecular species of cardiolipin in relation to other mitochondrial phospholipids. *Eur. J. Biochem.*, **199**, 459.
- [158] S. Arnold, B. Kadenbach (1997) Cell respiration is controlled by ATP, an allosteric inhibitor of cytochrome c oxidase. *Eur. J. Biochem.*, **249**, 350-354.

Bibliographie

- [159] R. Serrano, B.J. Banner, E. Racker (1976) Purification and properties of the proton translocating adenosine triphosphatase complex of bovine heart mitochondria. *J. Biol. Chem.* **251**, 2453-2461.
- [160] F.L. Hoch (1998) Cardiolipins and mitochondrial proton-selective leakage. *J. Bioenerg. Biomem.* **30**, 511-532.
- [161] M. Zhang, E. Mileykovskaya, W. Dowhan (2002) Cardiolipin is required for supercomplex formation in the inner mitochondrial membrane. *J. Biol. Chem.*, **277**, 43553-43556.
- [162] H. Schagger (2002) Respiratory chain supercomplexes of mitochondria and bacteria. *Biochim. Biophys. Acta*, **1555**, 154-159.
- [163] T. Wallimann, M. Dolder, U. Schlattner, M. Eder, T. Hornemann, T. Kraft, M. Stolz (1998) Creatine kinase: an enzyme with a central role in cellular energy metabolism. *Magma*, **6**, 116-119
- [164] D. Brdiczka (1991) Contact sites between mitochondrial envelope membranes. Structure and function in energy- and protein-transfer. *Biochim. Biophys. Acta*, **1071**, 291-312.
- [165] O. Marcillat, D. Goldschmidt, D. Eichenberger, C. Vial (1987) Only one of the two interconvertible forms of mitochondrial creatine kinase binds to heart mitoplasts. *Biochim. Biophys. Acta*, **890**, 233-241.
- [166] J. Schlegel, B. Zurbriggen, G. Wegmann, M. Wyss, H.M. Eppenberger, T. Wallimann (1988) Native mitochondrial creatine kinase forms octameric structures. Isolation of two interconvertible mitochondrial creatine kinase forms, dimeric and octameric mitochondrial creatine kinase: characterization, localization, and structure-function relationships. *J. Biol. Chem.*, **263**, 16942-16953.
- [167] M. Rojo, R. Hovius, R. Demel, T. Wallimann, H.M. Eppenberger, K. Nicolay (1991) Interaction of mitochondrial creatine kinase with model membranes. a monolayer study. *FEBS Lett.* **281**, 123-129.
- [168] A. Bakker, I. Bernaert, M. Debie, T. Ravingerova, A. Ziegelhoffer, H. Vanbelle, W. Jacob (1994) *Biochim. Biophys. Acta Molec. Cell Res.*, **1224**, 583-588.
- [169] K. Fritz-Wolf, T. Schnyder, T. Wallimann, W. Kabsch (1996) Structure of mitochondrial creatine kinase. *Nature*, **381**, 341-345.
- [170] U. Schlattner, F. Gehring, M. Vernoux, M. Tokarska-Schlattner, D. Neumann, O. Marcillat, C. Vial, T. Walliman (2004) C-terminal lysines determine phospholipid interaction of sarcomeric mitochondrial creatine kinase. *J. Biol. Chem.*, **279**, 24334-24342.
- [171] E. Quéméneur, O. Marcillat, D. Eichenberger, C. Vial (1989) Isoelectric point heterogeneity of the two oligomeric forms of heart mitochondrial creatine kinase. *Biochemistry*, **18**, 365-371.

Bibliographie

- [172] M. Wyss, J. Schlegel, P. James, H.M. Eppenberger, T. Wallimann (1990) Mitochondrial creatine kinase from chicken brain. Purification, biophysical characterization, and generation of heterodimeric and heterooctameric molecules with subunits of other creatine kinase isoenzymes. *J. Biol. Chem.*, **265**, 15900-15908.
- [173] Z.V. Leonenko, A. Carnini, D.T. Cramb (2000) Supported planar bilayer formation by vesicle fusion: the interaction of phospholipid vesicles with surfaces and effect of gramicidin on bilayer properties using atomic force microscopy. *Biochim. Biophys. Acta*, **1509**, 131-147.
- [174] S. Sennato, F. Bordi, C. Cametti, C. Coluzza, A. Desideri, S. Rufini (2005) Evidence of domain formation in cardiolipin-glycerophospholipid mixed monolayers. A thermodynamic and AFM study. *J. Phys. Chem.*, **109**, 15950-15957.
- [175] Ò. Domènech, J. Torrent-Burgués, S. Merino, F. Sanz, T. Montero, J. Hernández-Borrell (2005) Surface thermodynamics study of monolayers formed with heteroacid phospholipids of biological interest. *Colloids Surf., B Biointerfaces*, **41**, 233-238.
- [176] O. Marcillat, C. Perraut, T. Granjon, C. Vial, M. J. Vacheron (1999) Cloning, Escherichia coli expression, and phase-transition chromatography-based purification of recombinant rabbit heart mitochondrial creatine kinase. *Protein. Expr. Purif.*, **17**, 163-168.
- [177] E.J. Choi, E.K. Dimitriadis (2004) Cytochrome c adsorption to supported anionic lipid bilayers studied via atomic force microscopy. *Biophys. J.*, **87**, 3234-3241.
- [178] O. Domènech, L. Redondo, L. Picas, A. Morros, M.T. Montero, J. H. Borrell (2007) Atomic force microscopy characterization of supported planar bilayers that mimic the mitochondrial inner membrane. *J. Mol. Recognit.* **20**, 546-553.
- [179] P.W. Atkins (1994) Physical Chemistry. W. H. Freeman.

RESUMES

RESUME

Les membranes modèles constituées d'une bicouche mixte (phospholipides et protéines) stabilisées au voisinage d'une surface solide sont des systèmes qui permettent d'approcher certains comportements élémentaires de la membrane biologique tout en contrôlant les caractéristiques physico-chimiques de ces systèmes.

La fabrication de membranes phospholipidiques supportées, couplée à une technique de caractérisation adaptée à cette échelle spatiale comme la microscopie à force atomique (AFM) va permettre d'étudier les propriétés et le fonctionnement particulier d'une protéine dans un environnement bien contrôlé. Dans ce contexte, nous avons en particulier étudié l'insertion de phosphatase alcaline à ancrés GPI et de créatine kinase dans des bicouches supportées.

L'étude des interfaces moléculaires articulaires a conduit à la mise en évidence de bicouches lipidiques adsorbées sur les surfaces articulaires frottantes.

La caractérisation nanomécanique des bicouches phospholipidiques par mesures d'indentation à l'aide de la pointe AFM a permis de montrer leur résistance à des pressions supérieures à quelques dizaines de MPa. Cette résistance est bien plus importante que les pressions développées dans une articulation saine au cours de la marche normale, qui sont estimées à seulement quelques MPa. Cela a confirmé que les bicouches lipidiques jouent un rôle important dans la biolubrification du régime limite articulaire.

MOTS-CLES : Microscopie à force atomique (AFM), Microscopie de Fluorescence, Bicouches phospholipidiques, Membranes cellulaires, Adsorption, Protéines, Nanomécanique, Biolubrification, Ancres GPI.

ABSTRACT

Model membranes constituted of mixed bilayer (phospholipids and proteins) stabilized near a solid surface are widely used systems that can approach basic behaviors of biological membranes.

The fabrication of supported phospholipid membranes coupled to a characterization technique adapted to this spatial scale as the atomic force microscopy (AFM) allows the investigation of the properties and functions of a particular protein in a well controlled physico-chemical environment. In this context, we studied the insertion of anchored GPI phosphatase alkaline and creatine kinase in supported bilayers.

The analysis of joint molecular interfaces has led to the identification of lipid bilayers adsorbed on the joint rubbing surfaces. The nanomechanical characterization of phospholipid bilayers by measuring their indentation with an AFM tip showed their resistance to pressures above a few tens of MPa. This resistance is much greater than the pressure developed in healthy knee joint in a normal gait, which is estimated to only few MPa. This confirms that lipid bilayers play a key role in joint biolubrication.

Keywords: Atomic force microscopy (AFM), Fluorescence microscopy, Phospholipid bilayers, Cellular membranes, Adsorption, Proteins, Nanomechanics, Biolubrication, GPI anchors.

ملخص :

إن الأغشية النموذجية المتكونة من طبقة ثنائية مختلطة (فوسفوليبيدات و بروتينات) المثبتة على سطح صلب هي نظم يمكن أن تنهج السلوكيات الأساسية للغشاء البيولوجي .

إن تصنيع الأغشية الفوسفوليبيدية المثبتة مقرونة بوجود تقنية توصيف تتكيف مع هذا السلم النانومتري كمجهر القوة الذرية (AFM) ، يسمح بدراسة خصائص وعمل بروتين معين في محيط يتم التحكم بشكل جيد في خصائصه الكيميائية والفيزيائية .

في هذا السياق ، تمت دراسة إدماج الفوسفاتاز القاعدية (Phosphatase alkaline) والكرياتين كيناز (Créatine Kinase) في طبقات ثنائية مثبتة .

لقد أدت دراسة السطوح الجزيئية المفصلية إلى إثبات وجود طبقات دهنية ممتزة على سطوح الإحتكاك .

لقد أظهرت دراسة الخصائص النانوميكانيكية للطبقات الثنائية الفوسفوليبيدية بواسطة مسبار الـ (AFM) مقاومتها لضغوط أكبر من عشرات الـ MPa .

إن هذه المقاومة أكبر بكثير من الضغط الذي يظهره مفصل الركبة السليم أثناء المشي العادي والذي يقدر ببعض الـ MPa فقط .

هذا ما يؤكد الدور الذي تلعبه الطبقات الثنائية الليبيدية في التزييت البيولوجي.

الكلمات المفتاحية

مجهر القوة الذرية (AFM) ، مجهر اللف ، الطبقات الثنائية الفوسفوليبيدية ، الأغشية الخلوية ، إمتزاز ، بروتينات ، التزييت البيولوجي.