# Mouillage Spécifique de Gouttes d'Emulsion sur des Substrats Biomimétiques

Jacques Fattaccioli

▶ **To cite this version:**

Jacques Fattaccioli. Mouillage Spécifique de Gouttes d'Emulsion sur des Substrats Biomimétiques. Biophysique [physics.bio-ph]. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2006. Français. NNT : . tel-00106357

**HAL Id: tel-00106357**

**https://theses.hal.science/tel-00106357**

Submitted on 20 Oct 2006

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

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

THÈSE de DOCTORAT de l'UNIVERSITÉ PARIS VI

École Doctorale de Chimie Physique et Analytique de Paris Centre

Spécialité : Matière Condensée : Chimie et Organisation

présentée par

**Jacques FATTACCIOLI**

pour obtenir de grade de Docteur de l'Université Paris VI

Sujet de la thèse :

# Mouillage Spécifique d'Émulsions sur Substrats Biomimétiques

Soutenue publiquement le 11 septembre 2006 devant le jury composé de :

| | | |
|---|---|---|
| M. | Stefan HERMINGHAUS, | Rapporteur |
| M. | Philippe POULIN, | Rapporteur |
| M. | Jérôme BIBETTE | Directeur de Thèse |
| Mme. | Françoise BROCHARD | Présidente du Jury |
| M. | Robijn BRUINSMA | Examinateur |
| Mme | Nelly HENRY | Examinatrice |

*À Sébastien*
*Mon cousin, ami et frère.*

# Remerciements

Voilà ! Cinq années ont passé. De début septembre 2001 à début septembre 2006, cinq ans au sein du Laboratoire Colloïdes et Matériaux Divisés, que j'ai connu au berceau, quand il s'appelait encore le Laboratoire Colloïdes et Nanostructures et que nos bureaux étaient au troisième étage du bâtiment.

Mes premiers remerciements, chaleureux et pleins de reconnaissance, vont bien évidement à Jérôme Bibette, qui a été un directeur de thèse tout à fait exceptionnel. J'ai beaucoup appris à ses cotés, scientifiquement et humainement, tout en bénéficiant d'une grande liberté de choix et d'action. Être sous sa direction a été un plaisir.

Je remercie Pierre Turq, Christian Amatore et Valérie Cabuil de m'avoir accepté dans l'UMR et de m'avoir permis d'effectuer ce travail de doctorat. Merci aux deux premiers pour leurs encouragements à des moments où j'en avais grand besoin.
Avant d'intégrer ce laboratoire embryonnaire, j'avais eu une petite discussion avec Jacques Lewiner, qui m'avait convaincu de venir y faire mon stage de DEA. Cette discussion fut la bonne, merci à lui !

Je remercie Stephan Herminghaus (Max Planck Institute de Göttingen) et Philippe Poulin (Centre de Recherche Paul Pascal à Bordeaux) d'avoir accepté d'assumer le rôle de rapporteur. J'ai particulièrement apprécié les discussions que nous avons pu avoir après la soutenance proprement dite. Merci à Françoise Brochard-Wyart (Institut Curie) d'avoir accepté de présider le jury de soutenance. Je la remercie, ainsi que Pierre-Gilles de Gennes, pour l'intérêt qu'ils ont su porter à ce travail et pour leur encouragements prodigués lors qu'une petite réunion du mois de Février 2006. Merci à Robijn Bruinsma (UCLA, États-Unis) et Nelly Henry (Institut Curie, Paris) d'avoir accepté de faire partie du jury de soutenance.

Je remercie Jean Baudry pour sa patience et sa disponibilité tout au long de cette thèse. Son rôle n'a fait que prendre de l'ampleur dans ce travail, notamment parce que l'essentiel de

mes connaissances en microscopie, instrumentation et diffusion de la lumière viennent de lui. Je le remercie du temps qu'il a passé au développement de la méthode de caractérisation des gouttes.

Je remercie Nelly Henry pour m'avoir laissé utiliser son précieux cytomètre en flux, sans lequel le travail de thèse serait encore sûrement au point mort.

Je remercie Jean-François Muzy, de l'Université de Corse, d'avoir développé avec une grande rapidité les simulations qui nous ont permis de valider certaines hypothèses relatives aux expériences d'adhésion.
Merci à Pierre Nassoy, pour les nombreuses discussions dites "from the cave" à propos d'adhésion, de protocoles de fonctionnalisation et de bien d'autre chose. Je le remercie plus particulièrement pour avoir relu avec intérêt un épreuve du manuscrit.

Je remercie Évelyne Coudrier, pour les quelques mois que j'ai passé dans son laboratoire à apprendre la culture et la coloration de cellules sur lamelles. Elle a su m'apprendre la nécessité d'une rigueur expérimentale pour tout ce qui touche, de près ou de loin, à la biologie. Ces semaines dans son laboratoire m'ont permis d'adapter avec succès les protocoles de coloration de cellules aux lamelles de verre qui m'ont servi comme substrats d'adhésion.

Merci à la société Ethypharm et au CNRS d'avoir financé les trois premières années de ma thèse, et un grand merci à Françoise Vinet, Isabelle Texier du LETI-CEA Grenoble pour la dernière année de financement. Merci bien évidement à Mathieu Goutayer pour l'année de transfert de savoir-faire. J'espère que tout cela lui sera profitable.

Une thèse, c'est aussi beaucoup de discussions, toutes aussi passionnantes les unes que les autres. À ce titre, je tiens à saluer pour le temps qu'ils ont su passer à écouter : David Andelman de l'Université de Tel-Aviv (Israël),Véronique Schmidt du CRPP (Bordeaux), Marc Fermigier et David Quéré du Laboratoire PMMH à l'ESPCI, et Élie Raphaël du Laboratoire Physico-Chimie Théorique de l'ESPCI.

Enfin, au cours de ces cinq années, beaucoup de personnes sont passées au laboratoire, à titre d'étudiant, d'invité ou de permanent. Je tiens particulièrement à remercier Rémi Dreyfus, pour les discussions chaleureuses en soirée, et surtout pour m'avoir très gentiment communiqué sa névrose des droites qui passent (ou ne passent pas) par l'origine. Ces années sur les mêmes bancs, à PC et au laboratoire, furent très agréables. Un grand merci à Fernando Leal-Calderòn (ISTAB, Bordeaux) et Cécile Goubault pour m'avoir initié à la science des émulsions et no-

tamment à la mise en œuvre des protocoles de formulation. Cécile a aussi participé, au même titre qu'Emanuel Bertrand, aux réunions qui ont permis le développement de la méthode de caractérisation par cytométrie. Je les remercie d'avoir pris beaucoup de temps à ce moment là.
Un grand merci à Lætitia Cohen-Tannoudji et Julie Guery pour m'avoir très calmement supporté pendant les années de cohabitation dans la 114-E. Merci à Lise Michelot, pour sa gentillesse et sa disponibilité concernant les multiples problèmes administratifs qui émaillent notre vie quotidienne. Au passage, je salue respectueusement Jean-Yves et Isabelle pour leur aide précieuse et indispensable.
Merci à (par ordre alphabétique...) Abdes El-Harrak (très bons gateaux...), Ajay Sood et sa gentillesse, Anne Kœnig et ses kougloffs, Audrey Royère (our nice half-blonde girl), Benjamin Rotenberg, Benoît Dubertret, Catherine Rouzeau, Coraline Brangbour, Dana Breed, David Weitz, Djamal Zerrouki (P... c'est de la m.... !), Erwan Grasland-Mongrain, Florence Thivilliers, Howard Stone pour les dimanches matins devant la porte de l'école, Jacob Klein, Julien Legrand (qui nous a bien sali le labo avec son goudron), Julien Sylvestre, Lydie Bressy, Marie Pellissier, Nicolas Bremond, Nicolas Lequeux et son planneur, Sebastien Abramson, Swapan Mandal, Thomas Tixier (Tu connais pas le Reggae-Punk-Double-Grind-Core ?) et sa lumineuse Suzie, et d'autres que j'ai pu oublier...

Plus personnellement, je tiens à remercier très respectueusement Bernard Dugacek Sensei pour l'enseignement de Karate-dō qu'il délivre, mais aussi pour le soutien que m'ont apporté ses cours lors de certains moments très durs de ces dernières années. Au passage, je salue les membres du club Kimeydo pour les bons moments que nous avons passé ensemble.

Je remercie toute l'équipe d'Ourania, et particulièrement Emmanuel, Catherine, Paco et Slaven, pour les merveilleuses années en leur compagnie. Merci pour les enseignements et la bonne humeur. Je ne serai peut être pas là sans vous.

Je remercie mes camarades et amis : Igal+Audrey, Marie A., Frederic A., JeanJacques+Laurence, Claire, Sophie+Jens, Fabrice+Delphine, Jérome+Karine, Pierre+Lætitia, Ghjuvan-Dumè+Cécile, Christian, Sarra, Josée,Emmanuelle, Marie+Mathieu, Dams, Myriem , Seb+Carole, Vince, Rufina, Jean-Gab+Herga (ah le charango), Geo, Christophe, ManuT, Bobo+Juliette, et ceux que j'ai pu malencontreusement oublier dans mon énumération. Que ces derniers me pardonnent, je pense a eux avec gratitude.
Ich möchte besonders Marc, Marie, Kolja und Yasar bedanken. Ihr seid aus Deutschland nach der mündliche Prufüng gekommen. Danke schön für alles, seit diese Nacht wann ich bei euch Licht gesehen habe. Das war Kunstflecken 2000. Un es war wunderbar. Küsschen.

Je remercie affectueusement mes parents, ma grand-mère, ma famille en général, et particulièrement Josée, Charles, Angélina et Sébastien pour leur soutien indéfectible durant ces longues années d'études.

The last but not the least : je remercie Serena, amoureusement et amicalement, pour son soutien, sa bonne humeur et son mauvais caractère. Je tiens aussi à remercier sa famille (grands parents, parents, oncles, tantes, frères, sœurs et compagnons) pour leur chaleur et leur gentillesse.

*Cent fois sur le métier remets ton ouvrage.*

# Table des matières

**Index des Notations** **i**

**En guise de préambule...** **iii**

**I Adhésion Cellulaire et Modélisations** **1**

**1 Adhésion Cellulaire** **3**
1.1 Adhésion et couples ligand-récepteur . . . . . 4
1.1.1 Physico-Chimie de la reconnaissance spécifique . . . . . 4
1.1.2 Adhésion cellulaire : Trois cas concrets . . . . . 5
1.1.2.1 Cohésion Endothéliale . . . . . 5
1.1.2.2 Leucocytes . . . . . 6
1.1.2.3 Synapse immune . . . . . 7
1.2 Couples Ligand-Récepteur . . . . . 8
1.2.1 Constante cinétiques et Énergie de liaison . . . . . 9
1.2.2 Le couple Streptavidine-Biotine . . . . . 11
1.3 Adhésion de surfaces par des liaisons ligand-récepteur . . . . . 12

**2 Mouillage non spécifique** **17**
2.1 Goutte posée sur un substrat . . . . . 17
2.2 Émulsions et mouillage métastable . . . . . 18
2.2.1 Description de l'interface des gouttes . . . . . 18
2.2.2 Film de mouillage métastable . . . . . 20
2.2.3 Microscopie de la ligne triple . . . . . 22
2.2.4 Zone de transition et effets de ligne . . . . . 22
2.3 Cellules et Membranes . . . . . 23
2.3.1 Bicouches fluides : Liposomes et Polymersomes . . . . . 23

2.3.2 Propriétés Élastiques des membranes . . . 25
2.3.2.1 Tension de membrane . . . 26
2.3.3 Adhésion de vésicules . . . 28
2.3.3.1 Étude de l'adhésion par la technique des micropipettes . . . 28
2.3.3.2 Étude de l'adhésion de membranes sur des substrats solides . . . 31

**3 Ajout de Ligands et Adhésion Spécifique 37**
3.1 Adhésion de billes d'agarose . . . 37
3.2 Adhésion Spécifique et Micropipettes . . . 38
3.3 Vésicules sur substrats plans . . . 40
3.4 Cinétique . . . 42

**II Matériaux et Caractérisation 45**

**1 Émulsions Fonctionnalisées 49**
1.1 Réalisation d'émulsions monodisperses . . . 52
1.2 Caractérisation des Gouttes d'Émulsion en FACS . . . 54
1.2.1 Généralités sur la cytométrie en flux . . . 55
1.2.1.1 Présentation du cytomètre en flux . . . 55
1.2.1.2 Fluidique : . . . 56
1.2.1.3 Optique : . . . 57
1.2.1.4 Histogrammes et Diagrammes de Points . . . 59
1.2.2 Caractérisation d'émulsions par cytométrie en flux . . . 60
1.2.2.1 Introduction . . . 60
1.2.2.2 Théorie de Mie et Montage Optique . . . 61
1.2.3 Exploitation des courbes . . . 66
1.2.3.1 Analyse granulométrique . . . 66
1.2.3.2 Analyse de la fluorescence . . . 68
1.2.3.3 Suivi du vieillissement de l'émulsion . . . 70
1.3 Fonctionnalisation de la surface . . . 71
1.3.1 Matériaux . . . 72
1.3.2 Étape 1 - Liaison de la biotine : Étape d'activation . . . 73
1.3.3 Étape 2 - Liaison de la biotine : Liaison Covalente . . . 73
1.3.4 Étape 3 - Fixation de la streptavidine . . . 74
1.3.5 Saturation de l'interface en streptavidine . . . 74
1.3.6 Densité de streptavidine sur les gouttes en fonction de la taille . . . 75

1.3.7 Effet des rinçages sur la densité de streptavidine . . . 76
1.3.8 Désorption de la streptavidine au stockage . . . 77
1.4 Courbe finale de concentrations . . . 78

**2 Lamelles de verre** **81**
2.1 Fonctionnalisation des Lamelles par de la biotine . . . 82
2.1.1 Protocole de fonctionnalisation . . . 82
2.1.1.1 Matériaux . . . 82
2.1.1.2 Étape 1 : Dépôt de Poly-L-Lysine sur le verre . . . 84
2.1.1.3 Étape 2 : Fixation des polyéthylène oxyde . . . 84
2.1.2 Caractérisation de la quantité de biotine en surface . . . 85
2.1.2.1 Protocole de dépôt de la streptavidine . . . 86
2.1.2.2 Mesure en microscopie de fluorescence . . . 87
2.1.2.3 Mesure au spectrofluorimètre . . . 88
2.2 Courbe finale des concentrations . . . 89

**III Mouillage spécifique des gouttes d'émulsion** **91**

**1 Configuration de l'expérience, Matériaux et Mesures** **95**
1.1 Présentation de l'expérience . . . 95
1.1.1 Chambre de mesure . . . 95
1.1.2 Angle de contact : Hypothèses et Mesure . . . 97
1.2 Grandeurs Observables . . . 99
1.2.1 Statistique sur le rayon . . . 99
1.2.2 Précision de la mesure : Tension de ligne . . . 100

**2 Mouillage Non Spécifique** **103**
2.1 Définition de l'expérience témoin . . . 103
2.2 Effet de la force ionique, du pH et du tensioactif . . . 104

**3 Mouillage Spécifique** **107**
3.1 Rappels des caractéristiques des matériaux . . . 107
3.2 Effet de l'adhésion spécifique sur la tension de ligne . . . 108
3.3 Mouillage Spécifique : Énergie et Intensité . . . 109
3.4 Energie d'adhésion $\varepsilon$ en fonction de $\Gamma^l_{biot}$ . . . 109
3.4.1 Recrutement des protéines dans la zone adhérée . . . 112
3.4.2 Gélification des streptavidines dans la zone adhérée . . . 112

3.5 Modèle descriptif et simulation numérique . . . . . 113
3.6 Comparaison entre le modèle et les expériences . . . . . 115
3.7 Cinétique de croissance du rayon de contact . . . . . 116
3.8 Taux de couverture faible . . . . . 117
3.8.1 Effet de la densité de PEG-3400-Biotine . . . . . 118
3.8.2 Structure de la zone de contact en couronne . . . . . 118
3.8.3 Cinétique de formation de la zone de contact . . . . . 120

**IV Conclusion** **123**

**V Annexes** **129**

**A Techniques de mesure de particules colloïdales** **131**
A.1 Techniques de dosage biochimique de particules . . . . . 131
A.2 Techniques de mesure de taille . . . . . 133
A.2.1 Diffusion de la lumière : mesure moyenne . . . . . 134
A.2.2 Field Flow Fractionation : mesure séparative . . . . . 135

**B Polyethylèneglycols** **137**
B.1 Modèle statistique des PEO en solution aqueuse . . . . . 138
B.2 Modèle statistique des PEO à une interface . . . . . 140

# Index des Notations

| | | |
|---|---|---|
| $\gamma$ | : | Tension de surface des interfaces eau/huile, |
| $\sigma$ | : | Tension de membrane des bicouches, |
| $\kappa$ | : | Module de courbure d'Helfrich, |
| $l_c$ | : | Longueur d'extrapolation, |

| | | |
|---|---|---|
| $R$ | : | rayon des gouttes d'émulsion, |
| $\rho$ | : | rayon de la zone de contact, |
| $\theta$ | : | angle de contact, pris comme angle d'ouverture entre le substrat et la goutte, |

| | | |
|---|---|---|
| $C_{max}$ | : | Concentration maximale en volume du mélange composé de PEG-2000 et de PEG-3400-Biotine , |
| $x_{biot}$ | : | Fraction molaire en PEG-3400-Biotine |

| | | |
|---|---|---|
| $\Gamma^g_{biot}$ | : | Densité surfacique en biotine à la surface des gouttes, |
| $\Gamma^l_{biot}$ | : | Densité surfacique en PEG-3400-Biotine sur les lamelles de verre, |
| $\Gamma^g_{sa}$ | : | *Binding Capacity* en streptavidine à la surface des gouttes en dehors de la zone d'adhésion, |
| $\Gamma^l_{sa}$ | : | *Binding Capacity* en streptavidine à la surface des lamelles fonctionnalisées, |
| $\Gamma^p_{sa}$ | : | Densité surfacique en streptavidine dans la zone de contact (liée à de la biotine ou libre), |
| $\Gamma^b_{sa}$ | : | Densité en streptavidine dans la zone de contact liée à de la biotine. |

# En guise de préambule...

Durant ce travail de thèse, nous avons exploré la capacité des émulsions à adhérer de manière spécifique à des surfaces biomimétiques et plus précisément, nous avons étudié la relation entre la composition des gouttes à leur interface et l'énergie d'adhésion associée à la formation d'un angle de contact macroscopique. Ces expériences font partie d'un projet beaucoup plus vaste dont l'objectif est la mise au point de nouveaux vecteurs ciblés de principes actifs.

Dans une première partie, nous rappellerons l'importance de la compréhension de l'adhésion cellulaire et les réponses que la physique peut y apporter. Notamment, nous reviendrons sur les principaux résultats obtenus dans le domaines de l'adhésion d'objets souples (liposomes, émulsions) induite par les interactions non-spécifiques et spécifiques.

Dans une seconde partie, nous présenterons les matériaux que nous avons développé pour notre étude et les méthodes de caractérisation qui y sont associées.

Enfin, nous détaillerons les résultats obtenus relatifs aux mesures d'énergie d'adhésion spécifique.

En annexe, nous avons résumé les principales méthodes de mesure de taille et de dosages biochimiques relatives au particules colloïdales, ainsi que les résultats relatifs au propriétés physicochimiques des polyéthylène oxyde .

# Première partie

# Adhésion Cellulaire et Modélisations

# Chapitre 1

# Adhésion Cellulaire

Les organismes multicellulaires sont construits à partir d'ensembles coopératifs, les tissus, dont deux des principaux composants sont les cellules et un réseau de polymères, la matrice extracellulaire, qui assure le soutien mécanique de l'ensemble. Chez les vertébrés, ces tissus peuvent être par exemple conjonctifs, musculaires, nerveux ou épithéliaux[1].

Que l'on considère les situations physiologiques de l'organisme sain (fécondation, prolifération, différenciation, migration, activation) ou celles relatives à l'organisme malade (formation de métastases cancéreuses, invasion d'un tissu par un agent pathogène, thromboses, inflammation, réaction de l'organisme vis-à-vis des biomatériaux), le phénomène d'adhésion cellulaire apparaît comme un processus fondamental permettant un très haut degré d'organisation et de coordination à la fois spatiale et temporelle de ces tissus, nécessaires au bon fonctionnement de l'ensemble.

Cette adhésion cellulaire est contrôlée par la présence et la modulation dynamique d'interactions spécifiques [18, 118] entre les membranes extérieures des cellules. La spécificité est induite par des molécules membranaires spécialisées qui peuvent s'associer entre elles par complémentarité géométrique et physico-chimique - On les appelle molécules d'adhésion, ou *Cell Adhesion Molecules* (CAMs)). De manière imagée, on se représente la complémentarité entre deux CAMS comme la complémentarité nécessaire à une clef vis-à-vis de sa serrure pour pouvoir actionner le mécanisme d'ouverture.

[1] On pourra se référer au livre Molecular Biology of the Cell [4] d'Alberts *et al.* et d'un cours en ligne de Pierre Bongrand http ://www.crmcn.univ-mrs.fr/confs/bio2003/bongrand.pdf.

## 1.1 Adhésion et couples ligand-récepteur

### 1.1.1 Physico-Chimie de la reconnaissance spécifique

Les progrès technologiques – reposant en particulier sur des techniques de génie génétique et l'utilisation d'anticorps monoclonaux – ont permis d'isoler et de caractériser plusieurs dizaines de molécules d'adhésion que l'on peut classer en familles, à partir de similitudes structurales ou de fonctionnement.

Bien que ces molécules adhésives puissent être des sucres [123] ou des peptides [135], la grande majorité d'entre elles sont des protéines, c'est-à-dire des macromolécules structurées composées d'un enchaînement primaire de plusieurs centaines d'acides aminés liés entre eux par des liaisons peptidiques. Les acides aminés sont au nombre de 20, et peuvent être neutres ou chargés, polaires ou apolaires, et peuvent créer des liaisons hydrogène à partir de certains de leurs groupements chimiques (alcools, acides, amines).
L'enchaînement primaire est créé à partir de l'expression génétique de certaines fragments d'ADN en ARN, puis par traduction de cet ARN en un polypeptide construit pas-à-pas dans le reticulum endoplasmique de la cellule.

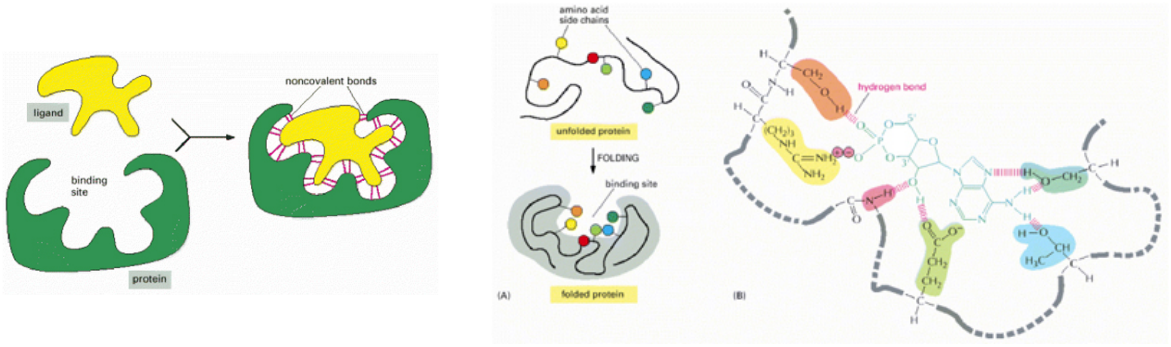



FIG. 1.1 – L'adhésion sélective d'une protéine avec un ligand s'effectue à partir d'une complémentarité géométrique et physico-chimique, grâce à la formation de nombreuses liaisons faibles entres leurs groupements chimiques respectifs à l'intérieur du site de liaison. Source [4].

La fonction d'une protéine lui est conférée par sa structure tridimensionnelle engendrée par le repliement précis de la chaîne linéaire. Ce repliement s'effectue tout d'abord à l'échelle de quelques acides aminés, en fonction des interactions répulsives (ioniques, stériques, effets de solvant) et attractives (liaisons hydrogène, ioniques, solvatation) qui existent entre ceux qui se situent à proximité. Puis à l'échelle de la protéine entière (structure tertiaire), voire à l'échelle de plusieurs protéines assemblées (structure quaternaire).

Ces repliements s'accompagnent de la constitution de poches qui permettent l'interaction spécifique avec d'autres espèces chimiques nommées ligands (ions, molécule, macromolécule) par l'intermédiaire de multiples liaisons faibles (essentiellement hydrogène) organisées spatialement (Fig. 1.1).

Le mécanisme physico-chimique de la reconnaissance s'effectue en plusieurs étapes, aidées par le comportement dynamique de la chaîne polypeptidique : reconnaissance géométrique, puis reconnaissance chimique, avec consolidation par exclusion des molécules d'eau et réorientation de certains groupements chimiques à l'intérieur de la poche. La première conséquence de ce mécanisme est que de petites modifications dans la structure primaire peuvent sensiblement influer sur la conformation de la poche et donc sa fonction. La deuxième conséquence, dans le cas ou la protéine présente plusieurs sites de liaison, est que la présence du ligand dans un des sites peut induire des modifications de structure du reste de la protéine et donc permettre une régulation des capacité de liaison des autres sites [98].

### 1.1.2 Adhésion cellulaire : Trois cas concrets

Parmi les innombrables phénomènes associés à l'adhésion entre des cellules, nous avons choisi d'en présenter trois à propos desquels il est possible d'isoler formellement, si ce n'est une fonction, du moins une caractéristique générale de fonctionnement. Nous aborderons le rôle des CAMs dans la cohésion mécanique endothéliale, puis leur rôle dans l'adhésion dynamique des globules blancs dans les vaisseaux, et enfin la nécessité de leur structuration dans l'espace intercellulaire dans le cas de l'adhésion des lymphocytes.

#### 1.1.2.1 Cohésion Endothéliale

L'endothélium vasculaire est une monocouche de cellules qui tapisse l'intérieur de tous les vaisseaux sanguins. C'est une membrane semi-perméable qui permet notamment les échanges gazeux ainsi que le trafic des globules blancs entre le sang et les organes.
Entre deux cellules jointives, on peut isoler trois catégories d'assemblages intercellulaires : les jonctions étanches dont le rôle est d'empêcher la diffusion des molécules perpendiculairement à l'endothélium, les jonctions de communication qui assurent un couplage chimique et électrique entre cellules adjacentes et enfin les jonctions adhérentes qui permettent la tenue mécanique.
Ces jonctions adhérentes sont formées à partir d'une famille de molécules dont il existe plusieurs dizaines de variantes et qui interviennent dans la cohésion mécanique de nombreux tissus : les cadhérines [98]. Ces protéines sont constituées de cinq domaines identiques pour la partie extracellulaire et d'une partie intracellulaire reliée au réseau d'actine. La cohésion entre les

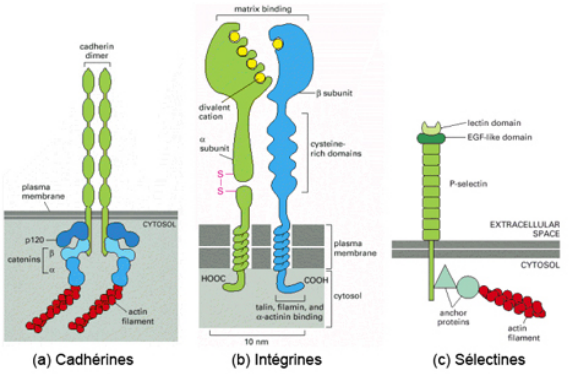



FIG. 1.2 – Trois types de molécules adhésives extra-membranaires : (*a*) les cadhérines, responsables notamment de la cohésion dans les tissus épithéliaux ; (*b*) les intégrines, formées de deux sous unités $\alpha$ et $\beta$, dont le rôle est de permettre l'adhésion à la matrice extracellulaire de collagène et (*c*) les sélectines qui interviennent dans la réponse immunitaire des leucocytes. Source [4].

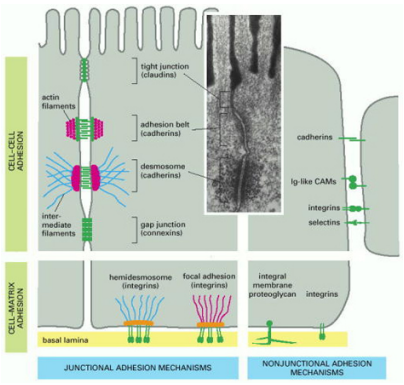



FIG. 1.3 – Représentation schématique au niveau de la cellule d'un endothélium : On voit les trois types de jonctions entre les cellules : étanches, adhérentes et de communication, ainsi que les zones de contact avec la matrice extracellulaires crées grâce à la présence d'integrines. Source [4].

surfaces s'effectue par des interactions faibles homotypiques (cadhérine-cadhérine) dépendant fortement de la concentration en calcium. Pour exister, ces interactions nécessitent la mise en jeu de molécules appelées caténines qui stabilisent les complexes formés dans leur partie intracellulaire.

#### 1.1.2.2 Leucocytes

Lorsqu'un tissu subit une agression telle qu'un traumatisme mécanique, une brûlure ou une infection, on observe très rapidement la mise en place d'une réaction inflammatoire, caractérisée par l'arrivée de différentes populations de leucocytes circulants, dont le rôle est d'éliminer les cellules mortes ou les débris tissulaires ainsi que d'éventuels microorganismes pathogènes [97].

Les cellules endothéliales, activées par des facteurs tels que la présence de bactéries ou de produits de l'organisme, vont exprimer des molécules de sélectine à leur surface qui interagissent avec des molécules portées par la membrane des leucocytes circulant dans le flux sanguin ou lymphatique, ce qui a pour effet de les ralentir sans toutefois les arrêter. Les sélectines, individualisées il y a une dizaine d'année [12], se caractérisent par une interaction faible et extrêmement labile avec des ligands de la famille des sucres sialylés.
Ralentis, les leucocytes s'activent alors en rendant fonctionnels des membres de la familles des

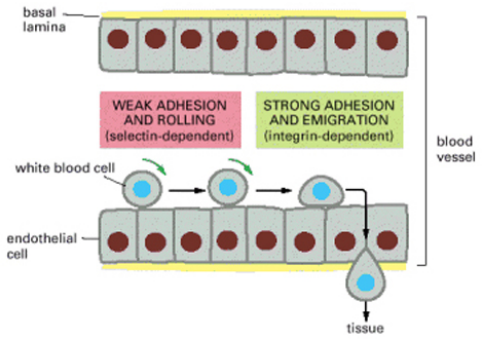



FIG. 1.4 – Schéma représentatif du mécanisme de *rolling* des leucocytes sur une paroi à proximité d'une zone d'inflammation : freinés par la présence de sélectines, et arrêtés par les intégrines, les leucocytes pénètrent au travers de l'endothélium pour atteindre les couches plus profondes. Source [4].

intégrines (notament LFA-1) à leur surface en réponse à une signalisation chimiotactique des cellules endothéliales. Les intégrines se lient à leurs ligands sur la paroi, conduisant à une immobilisation des leucocytes. Enfin, ces derniers vont se diriger vers les jonctions intracellulaires afin de migrer à travers la barrière endothéliale et pénétrer les tissus inflammés plus profonds. La famille des intégrines compte une trentaine d'éléments et leur caractéristique commune est liée à une structure hétérodimérique constituée de deux chaînes polypeptidiques ($\alpha$ et $\beta$) différentes. L'activité des intégrines peut être modulée par des modifications de leur conformation ou de leur association au cytosquelette. Les intégrines peuvent engendrer des signaux intracellulaires qui interviennent dans les processus de survie ou de prolifération liés à l'attachement à un substrat. Elle interviennent notamment dans le cadre de l'adhésion des tissus à la matrice extracellulaire de collagène comme représenté sur la figure 1.3

#### 1.1.2.3 Synapse immune

Dans de nombreux cas, la reconnaissance d'un récepteur avec un ligand de la cellule cible ne suffit pas à déclencher la production d'un signal intracellulaire et l'activation de la fonction biologique associée [41]. Par exemple, lorsqu'un lymphocyte T (Fig. 1.5) interagit avec une cellule cible, la réponse immunitaire complète ne survient que lorsque les complexes protéiques mobilisés par la reconnaissance s'organisent en une structure intercellulaire dont la taille caractéristique peut atteindre plusieurs microns, la synapse immune [73].

Les récepteurs TCR sont à la périphérie de la zone de contact au début de la formation, puis diffusent vers le centre, laissant les récepteurs LFA à la périphérie de manière à former la synapse dite mature. Bien qu'une modélisation ne tenant compte que de la diffusion passive ait permis de simuler la formation de ces structures [130], les coefficients de diffusion des protéines dans le modèle sont largement supérieurs à ceux associés uniquement à la diffusion brownienne bidimensionnelle, suggérant donc des mécanismes actifs [85]. Ces résultats ont été confirmés

par des expériences montrant que des cellules n'ayant plus la capacité de former des filaments d'actine étaient incapables de former une synapse mature.

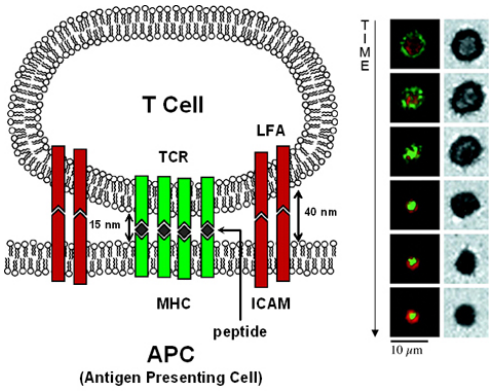



FIG. 1.5 – La formation d'une synapse immune entre une lymphocyte T et une cellule cible montre une réorganisation temporelle des récepteurs LFA et TCR qui conduit à la synapse mature. Au début TCR et LFA ne sont pas totalement segrégés mais les TCR sont à la périphérie et peu à peu l'inversion survient et les TCR se retrouve au centre. Source [130].

L'existence de synapses a aussi été démontrée chez le lymphocyte B avec le même type de géométrie circulaire [86]. Au centre, on trouve des récepteurs igM et à la périphérie des récepteurs de type CD45 et CD22. À la différence du lymphocyte T, un lymphocyte B peut former une synapse mature uniquement à partir de mécanismes impliquant une diffusion passive des protéines. De plus, malgré le fait que les igM et les CD45 et CD22 aient des tailles différentes, leur taille relative n'influe pas sur la répartition cœur-couronne qui s'établit [86].

Les récepteurs igM dans la zone de contact ne restent localisés que s'ils peuvent se lier à leur ligand. Sinon, ils sont expulsés. Des expériences ont notamment montré qu'en supprimant les ligands, les récepteurs igM portés par la surface du lymphocyte B ne sont pas répartis de manière homogène, mais sont bel et bien exclus à cause du peuplement de la zone adhérée, notamment par les CD45/CD22. Les igM restent donc à la périphérie de la zone de contact.

## 1.2 Formalisme associé aux couples ligand-récepteur

Nous avons noté que l'adhésion s'effectue à partir de molécules adhésives localisées sur la partie externe des surfaces cellulaires. Les questions relatives à la compréhension de ces interactions individuelles – à quelle vitesse un ligand accroche son récepteur, au bout de combien de temps le couple se dissocie, la force exercée à-t-elle un rôle ? – ont pu être posées puis résolues ces trente dernières années, notamment grâce à des expériences permettant de sonder avec une grande précision la mécanique locale d'un couple de molécules adhésives.

### 1.2.1 Constante cinétiques et Énergie de liaison

La formation d'une liaison ligand-récepteur [19, 119] est décrite par un mécanisme bimoléculaire dont l'équation bilan s'écrit :

$$L + R \rightleftarrows LR$$

La formation d'un lien L/R peut être homolytique, si le ligand et le récepteur sont de la même famille ou hétérolytique si le ligand et le récepteur sont complémentaires mais structurellement différents (Fig. 1.6).

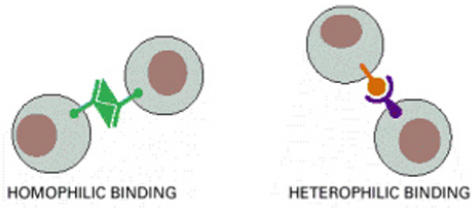



FIG. 1.6 – Représentation schématique des différents types d'assemblages entre un ligand et un récepteur : (*a*) homophilique : le ligand et le récepteur sont identiques ; (*b*) hétérophilique : le ligand et le récepteur sont différents mais complémentaires. Source [4].

Les constantes cinétique d'attachement $k_{on}$ et de détachement $k_{off}$ sont liées à la constante d'affinité de l'équilibre

$$K_a = \frac{k_{on}}{k_{off}} \frac{[\mathrm{M}^{-1}.\mathrm{s}^{-1}]}{[\mathrm{s}^{-1}]} \tag{1.1}$$

dont l'énergie libre associée peut varier de quelques fractions de kT [123] à 35kT pour le couple biotine-streptavidine [77] ($10^4 \leq K_a \leq 10^{15}$ $\mathrm{M}^{-1}$). Pour les couples courants, les énergies sont toutefois de l'ordre de la dizaine de kT.

Les constantes cinétiques $k_{on}$ et $k_{off}$ dépendent non seulement des couples choisis et des conditions physico-chimiques, mais aussi des contraintes mécaniques appliquées aux molécules et aux degrés de liberté qui leur sont accessibles [19].

Le $k_{\mathrm{on}}$ d'un couple se décompose en un terme de diffusion des espèces et un terme de réaction. En solution, seule la composante diffusionnelle est limitante, ce qui explique la gamme étroite des valeurs mesurées pour des couples L/R différents ($10^6 \leq k_{\mathrm{on}} \leq 10^9$ $\mathrm{M}^{-1}.\mathrm{s}^{-1}$) [156]. La gamme des $k_{\mathrm{off}}$ mesurés est beaucoup plus étendue ($10^{-6} \leq k_{\mathrm{off}} \leq 10^4$ $\mathrm{s}^{-1}$), impliquant que le temps de vie $t_{off} = 1/k_{\mathrm{off}}$ d'une liaison L/R à force nulle puisse s'étendre de quelques millisecondes à plusieurs jours.

En solution, les valeurs des $k_{\mathrm{on}}$ et $k_{\mathrm{off}}$ peuvent être mesurées à l'aide d'une technique unique (Fig. 1.7) : le *Biacore*®. Un canal microfluidique transportant les ligands est scellé au contact d'une couche d'or sur laquelle sont adsorbés des polymères hydrosolubles portant les récep-

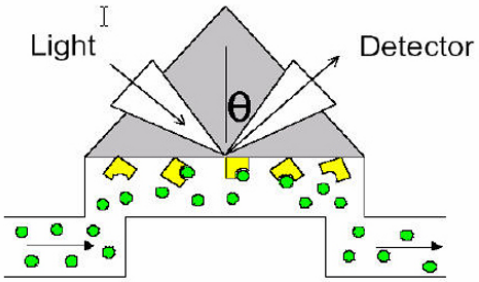



FIG. 1.7 – Schéma de principe de la technique Biacore® qui mesure les constantes cinétiques de couples ligand-récepteur en volume : les récepteurs sont fixés sur une couche d'or sur laquelle on a préalablement adsorbé un polymère hydrophile. Les ligands sont transportés par un canal microfluidique au contact de la couche d'or. La réaction est suivi par une mesure d'épaisseur effectuée à partir d'un signal de plasmons de surfaces.

teurs[2]. La formation ou la dissociation des liens L/R s'accompagne d'une variation d'épaisseur de quelques nanomètres de la couche adsorbée, modifiant ainsi le signal de plasmons de surface crée par l'illumination laser de la couche d'or. La représentation de cette variation d'épaisseur en fonction du temps permet de déduire les constantes cinétiques. La présence des polymères entre la surface d'or et les récepteurs permet de donner à ces derniers une mobilité semblable à celle qu'ils auraient en solution.

Si nous revenons maintenant à la problématique de l'adhésion entre une cellule et une surface, la seule description tridimensionnelle des constantes cinétiques se révèle insuffisante pour au moins deux raisons :

1. Les molécules adhésives ne sont pas en solution, mais attachées à des surfaces, ce qui leur interdit certains déplacements. Nous avons vu que le $k_{\text{on}}$ est très sensible à la composante diffusionnelle de la réaction, donc nous nous attendons à une forte modification de sa valeur à 2D.
2. Très souvent des forces d'amplitude et de direction variables s'exercent pendant un certain temps sur le couple L/R nouvellement formé : dans le cas des leucocytes qui roulent, le flux hydrodynamique a tendance à emporter la cellule et ainsi tirer sur les liens sucres/sélectines. Nous comprenons intuitivement que la durée vie de la liaison sera différente (et en général inférieure) du cas où uniquement les fluctuations browniennes conduisent à la dissociation.

Peu de techniques expérimentales permettent de mesurer des valeurs de $k_{\text{on}}$ bidimensionnels [31, 84, 121]. Alors que dans le cas des constantes tridimensionnelles, les valeurs déterminées par diverses techniques coïncident, cela ne peut être la cas dans le cas bidimensionnel puisque la configuration géométrique du système influe directement sur les degrés de libertés accessibles aux CAMs et ainsi sur la rapidité à laquelle ils pourront se rapprocher et réagir. Une analyse

[2]La technique *Biacore*® est commercialisée par la société du même nom dans les laboratoires académiques, mais surtout dans l'industrie chez les sociétés de diagnostic ou d'immunologie. On trouve un nombre important d'articles rapportant des données cinétiques pour des couples L/R dans des conditions expérimentales variées.

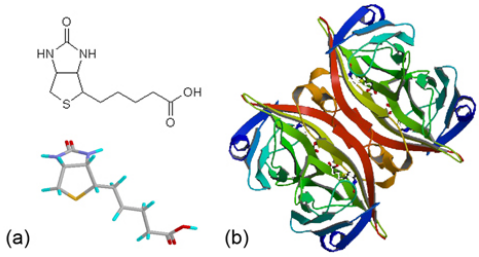



FIG. 1.8 – La biotine est une petite molécule organique qui a la capacité de se lier à la streptavidine par une interaction d'environ 35kT. La streptavidine peut lier quatre biotines. Son poids moléculaire est de 70000 g/mol .

dimensionnelle simple conduit à une relation de type $k_{\text{on}}^{2D} = k_{\text{on}}^{3D}/a$ entre les constantes d'associations bi- et tridimensionnelles, $a$ étant homogène à une longueur. Usuellement, on considère des valeurs allant du nanomètre à la centaine de nanomètres pour le paramètre $a$ utilisé comme paramètre ajustable dans des expériences de cinétique [9, 20, 39]. En réalité, toute la complexité microscopique de la réaction est comprise dans ce paramètre $a$ qui contient à la fois les information relatives aux mouvements des protéines à la surface, mais aussi aux mouvements des surfaces elles-mêmes qui participent à la formation du lien.

Le détermination de constantes de dissociation bidimensionnelles s'appuie sur un nombre beaucoup plus important de techniques expérimentales [19] dont trois sont parmi les plus connues : la chambre à flux hydrodynamique laminaire [120], les techniques de micropipettes [54, 52] et la microscopie à force atomique [64, 99]. Les mesures effectuée sur de nombreux couples confirment notre intuition : une force de quelques dizaines de piconewtons qui s'exerce sur un lien L/R diminue sa durée de vie de 50%.

### 1.2.2 Le couple Streptavidine-Biotine

La biotine, communément appelée vitamine H ou B8, est une petite molécule hydrosoluble (MW=244 g/mol). C'est une coenzyme de carboxylases qui interviennent dans le catabolisme des sucres et lipides d'organismes vivants très variés (bactéries, instectes, mammifères).
On trouve dans le blanc d'oeuf une protéine, l'avidine, dont le rôle est d'immobiliser la biotine qui se trouve en solution, de manière à endiguer le développement d'organismes indésirables.
L'action de l'avidine sur la biotine a été découvert dans les années 1930 chez les mammifères, et a donné son nom à la *maladie de l'oeuf cru* : des rat nourris en excès d'oeuf crus présentaient des symptomes (cutanés, digestifs, acidose sanguine, etc.) qui se résorbent après administration d'une forte dose en biotine.

La streptavidine (*Abbrev.* SA) est un homologue de l'avidine, produite et purifiée chez *Streptomyces avidinii*. Avidine et Streptavidine sont des protéines tetramériques formés de quatre fragments identiques pouvant lier une biotine chacun [77]. La masse molaire totale de la pro-

téines est de 70000 g/mol dans les deux cas. On préfère toutefois souvent utiliser la streptavidine plutôt que l'avidine à cause leur différence en terme de point isoélectrique : alors que celui de la streptavidine est proche des pH physiologiques (pI$\sim$ 5-6), celui de l'avidine est fortement basique (pI$\sim$10).

La constante d'affinité du complexe en solution est très élevée [78], de l'ordre de $10^{-14}$ L.mol$^{-1}$, correspondant à une enthalpie libre de réaction moléculaire de l'ordre de la trentaine de kT. Le couple biotine/(strept)avidine constitue la liaison non covalente la plus forte de la nature. Pour mémoire, une liaison covalente carbone-carbone dans une molécule est de 150 kT. En volume, le taux de dissociation de la liaison à force nulle est de $k_{\text{off}} = 10^{-7}\ s^{-1}$, ce qui correspond à un temps de vie estimé de l'ordre de plusieurs semaines.
Des travaux de génie biochimique réalisés par Stayton *et al.* ont montré que l'affinité importante entre les deux espèces était liée à la présence de tryptophane dans une poche parfaitement ajustée [93, 150] à la biotine. Cette configuration très particulière explique la faible sensibilité de l'énergie de liaison à la température [71], au pH et à la salinité [74].

Des mesures ont été réalisées pour connaître la force à exercer sur le couple biotine/streptavidine lié à une surface pour la dissocier, notamment à l'aide de la technique appelée Biomembrane Force Probe (BFP) dérivée de la technique des micropipettes [52]. Il a été très récemment montré qu'en dehors de toutes autres considérations, la force nécessaire pour rompre une liaison dépend de l'histoire du lien [125], à savoir la manière dont celui-ci a été formé. Le potentiel de la liaison biotine/streptavidine est composé de trois puits qui ne sont pas tous accessibles suivant les conditions expérimentales, et on peut donc mesurer des temps de détachement différents alors que la force appliquée est la même. Les expériences de Merkel *et al.* ont en outre montré que la force à appliquer dépend du taux de charge [pN/s] : plus la force est appliquée vite, plus la liaison apparaît solide [106].

## 1.3 Adhésion de surfaces par des liaisons ligand-récepteur

La membrane plasmique d'une cellule est formée d'une bicouche composée de deux feuillets, dont les proportions en phospoglycérides, sphingolipides et de cholestérol sont différentes (Fig. 1.9). À cette bicouche sont associés des protéines ou complexes protéiques transmembranaires , et notamment les molécules adhésives. Ces molécules ont la possibilité de diffuser dans le plan de la membrane, soit de manière passive (diffusion brownienne) soit active (par l'intervention de mouvements du cytosquelette et consommation d'ATP).

La surface externe de la bicouche est recouverte d'une couche diffuse fortement chargée négativement, appelée matrice péricellulaire ou *glycocalyx*, dont l'effet est essentiellement anti-adhésif [6, 30, 116, 29, 137].

FIG. 1.9 – *Gauche* : Les membranes des cellules sont composées de lipides à double chaîne en proportions différentes au sein des organelles. – *Droite* : Représentation schématique de la membrane plasmique d'une cellule montrant la bicouche, les filaments du cytosquelette, les protéines intégrales et les molécules glycosylées du *glycocalyx*. Source [4].

L'adhésion entre deux cellules nécessite l'approche des surfaces biologiques à une distance compatible avec la création de liaisons entre molécules adhésives. Les contacts intercellulaires responsables de la formation d'interactions adhésives peuvent se produire de manière passive (migration hydrodynamique, agitation thermique) ou de manière active grâce à des fluctuations contrôlées des membranes ou des tissus.

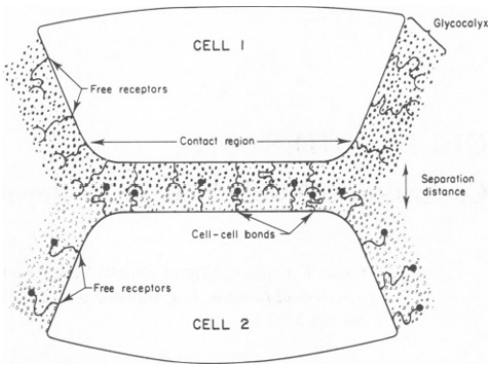



FIG. 1.10 – Représentation schématique du premier modèle d'adhésion cellulaire proposé par Bell *et al.* en 1984. Ce modèle fait intervenir des interactions attractives associées à la formation de couples ligand-récepteur et des interactions répulsives causées par la présence de *glycocalyx*. Source [9].

Si l'on considère qu'un lien a pu se former et que celui-ci ne s'est pas rompu, la question se pose de savoir comment la consolidation de la zone d'adhésion s'effectue et comment s'exprime l'énergie effective associée à cette consolidation. Le premier modèle physique abordant ce problème a été posé par Bell, Dembo et Bongrand en 1984 [9]. Basé sur un formalisme inspiré de la physique des colloïdes et prenant en compte une vision simplifiée de la membrane cellulaire externe, ce modèle ne considère que les interactions répulsives causées par la présence de *glycocalyx* et

les interactions attractives correspondant à la formation de liens spécifiques entre les surfaces (Fig. 1.10). Dans ce modèle, aucune hypothèse n'est faite concernant la géométrie des surfaces à l'exception d'une aire de contact formée par les deux membranes et de leur espacement. Les molécules sont caractérisées par une constante d'association thermodynamique et sont laissées libres de diffuser à 2D de manière passive.

Ce modèle prédit une accumulation de couples L/R – proportionnellement à leur constante d'affinité – dans la zone d'adhésion entre les membrane. Ce phénomène a été observé expérimentalement, notamment entre deux vésicules tenues par des micropipettes adhérant par des liens streptavidine/biotine [111].

Intuitivement, on voudrait écrire l'énergie à fournir par un opérateur pour détacher les membranes comme :

$$W = \Gamma U \tag{1.2}$$

avec $\Gamma$ la densité de liens dans la zone d'adhésion et $U$ l'énergie de liaison. En réalité, Bell *et al.* ont montré que cette énergie ne dépendait que de la différence de pression osmotique bidimensionnelle entre les espèces moléculaires dans et hors de la zone d'adhésion pour un processus de détachement lent. En effet, la loi d'Young-Dupré doit prend en compte les pressions osmotiques des espèces et s'écrit donc comme

$$\gamma \cos\theta = \gamma - \Gamma_{Dedans} - \Gamma_{Dehors} \tag{1.3}$$

En l'absence d'une énergie d'adhésion non spécifique, on peut écrire $W = \gamma(1 - \cos\theta)$ soit :

$$W = \Gamma_{Dedans} - \Gamma_{Dehors} \tag{1.4}$$

Dans le cas de faibles densités surfaciques, l'énergie d'adhésion ainsi calculée peut être très inférieure à la somme des énergies de liaison des couples formés.

En réalité, détacher une cellule d'un substrat nécessite une énergie bien souvent supérieure de plusieurs ordres de grandeurs à la somme des énergies de liaisons des couples formés. Cette consolidation spectaculaire ne peut pas s'expliquer uniquement par les mécanismes simples du modèle BDB : elle nécessite la mise en jeu de processus actifs faisant appel à la dynamique du corps cellulaire.

La membrane plasmique est soutenue par un ensemble organisé de structures polymériques – le cytosquelette – qui confère à la cellule l'essentiel de ses propriétés mécaniques. Le cytosquelette est composé d'un réseau de fibres – filaments d'actine, filaments intermédiaires et microtubules –

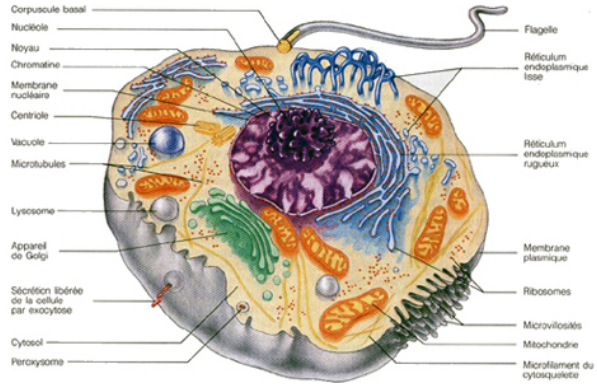



FIG. 1.11 – Représentation schématique de l'organisation interne d'une cellule eucaryote, faisant apparaître son architecture membranaire interne et ses organelles (mitochondries, ribosomes, etc.). Source [4].

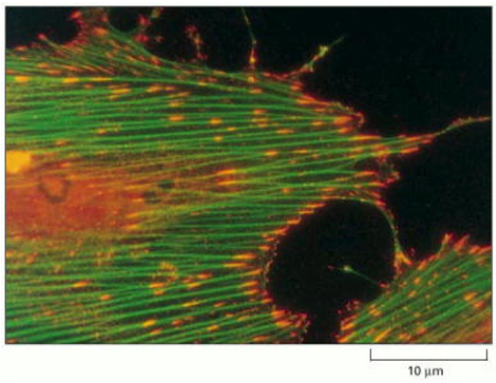



FIG. 1.12 – Représentation en fausses couleurs d'une coupe confocale des filaments d'actine (vert) et des points d'adhésion focale (rouge) d'une cellule adhérant sur un substrat. Source [4].

crées dynamiquement par polymérisation/dépolymérisation continue. En réponse à la formation de liens spécifiques, les membranes cellulaires ont la capacité de se déformer de manière à créer une aire de contact qui peut atteindre une surface de quelques microns carrés [29, 122].

Simultanément à la réorganisation membranaire, l'adhésion provoque une concentration ponctuelle [5] de certains récepteurs (*points focaux*) dans les régions de contact (Fig. 1.12). Cette concentration est produite par une diffusion active des protéines et s'accompagne d'une orientation des microfilaments d'actine qui augmentent la rigidité membranaire locale de manière à renforcer l'attachement [115].

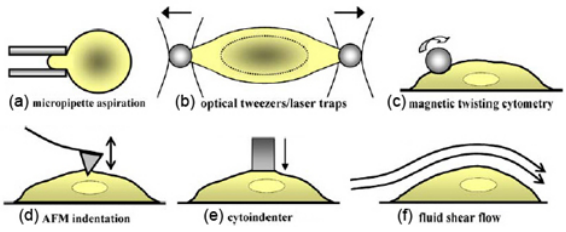



FIG. 1.13 – Différentes techniques expérimentales utilisées dans l'étude mécanique des cellules adhérées ou en suspension. Source [100].

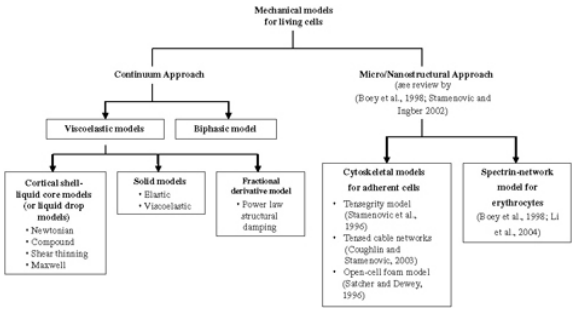



FIG. 1.14 – Organigramme présentant l'ensemble des modèles mécaniques développés relatifs à la mécanique cellulaire. Source [100].

La mécanique du comportement des cellules soumises à une contrainte a été intensément étudiée [16, 100] expérimentalement (Fig. 1.13) et théoriquement. Les modèles obtenus sont très nombreux (Fig.1.14) et dépendent à la fois du type de déformation imposée, mais aussi des échelles spatiales et temporelles de cette déformation, notamment comparées aux temps et longueurs caractéristiques de la machinerie cellulaire. Les différentes cellules d'un même organisme, bien que partageant un patrimoine génétique identique, peuvent présenter des réponses mécaniques très différentes d'un type à l'autre, et pour un même type à des âges différents du développement.

Même si dans certains cas [32, 155] des modèles de type fluides complexes (visqueux, visco-élastiques, cœur-peau) sont pertinents dans des cas biologiques réels, il est plus simple pour le physicien d'avoir recours à des surfaces souples modélisant et simplifiant le comportement cellulaire. Depuis une trentaine d'année ce sont les vésicules lipidiques qui se sont naturellement imposées dans les expériences d'adhésion.

# Chapitre 2

# Mouillage non spécifique

L'étude de l'adhésion de surfaces souples liquides emprunte une grande partie de son formalisme à celui de la physique du mouillage. Nous rappellerons dans un premier temps les principaux résultats s'y rapportant. Ensuite, nous discuterons de l'effet lié à la présence d'une monocouche de molécules tensioactives à l'interface sur le phénomène de mouillage. Enfin, nous présenterons les principales données relatives à l'adhésion non spécifique de vésicules lipidiques, d'un point de vue thermodynamique, puis cinétique.

## 2.1 Goutte posée sur un substrat

Lorsque on pose une goutte de liquide sur une surface solide [44, 42], on peut observer deux régimes d'équilibre distincts : une situation de mouillage partiel, avec un angle de contact fini, et une situation de mouillage total.

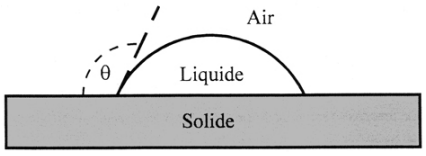



FIG. 2.1 – Représentation schématique d'une goutte de liquide mouillant partiellement un substrat solide. La mouillage est caractérisé par un angle de contact $\theta$ qui est fixé par les interactions entre les surfaces.

Dans le cas du mouillage partiel, la partie mouillée de la surface est délimitée par une ligne de contact où les trois phases se rencontrent : le liquide de la goutte $l$, la phase continue environnante $v$ (de l'air en mouillage "classique) , et la phase du substrat solide $s$.
La forme de la goutte et son angle de contact est fixée par le paramètre d'étalement $S$ défini comme

$$S = \gamma_{sv} - \gamma_{sl} - \gamma_{lv}$$

où $\gamma_{sv}$, $\gamma_{sl}$ et $\gamma_{lv} = \gamma$ sont respectivement les tensions interfaciales solide/vapeur, solide/liquide

et liquide/vapeur.

L'angle de contact à l'équilibre loin de la ligne de contact est gouverné par la loi de Young-Dupré, qu'on déduit de l'équilibre local des forces sur la ligne et qui s'écrit comme :

$$\gamma_{sl} - \gamma_{sv} - \gamma \cos\theta = 0 \tag{2.1}$$

On exprime le paramètre d'étalement en fonction de l'angle de contact $\theta$ :

$$S = -\gamma(1 + \cos\theta)$$

Si S est inférieur à $-2\gamma$, l'angle de contact est nul et si S est nul, alors le mouillage est total.

Les tensions de surface $\gamma_{sv}$, $\gamma_{sl}$ et $\gamma$ correspondent à l'énergie à fournir par unité de surface pour accroître l'interface entre les milieux $s/v$, $s/l$ et $l/v$ respectivement. Les tensions superficielles des liquides sont d'ordinaire égales à plusieurs dizaines de $\mathrm{mJ/m^2}$.

La détermination expérimentale d'un angle de contact à l'équilibre montre souvent un hysteresis dû à la présence de défauts chimiques ou physiques auxquels la ligne triple entre les trois phases s'ancre. Dans le cas de substrats non idéaux solides, l'angle de contact n'est donc pas unique, et on le caractérise par deux valeurs qui sont l'angle d'avancée et de reculée qui correspondent aux angles de contacts mesurés lorsque l'on déplace la ligne de contact dans les deux directions opposées parallèles au substrat.

## 2.2 Émulsions et mouillage métastable

### 2.2.1 Description de l'interface des gouttes

Une émulsion est définie comme une dispersion liquide de gouttes présentant une taille caractéristique de l'ordre du micron. La métastabilité de la dispersion est assurée par la présence à l'interface entre les deux phases d'une monocouche de molécules amphiphiles constituées d'une partie hydrophile et d'une partie hydrophobe.

La modélisation mécanique des films minces (monoucouche, bicouche lipidique, etc.) a été réalisée au début des années 1970 [27, 80, 57]. Ces films peuvent être caractérisés par trois types de déformation : élongation (*Stretching*), cisaillement (*Shearing*) et courbure (*Bending*), que nous avons représenté sur la figure 2.2. Les déformations sont des combinaisons de ces trois déformations élémentaires, dont les classes de symétrie sont différentes : déformation isotrope pour

l'étirement, déformation à surface constante pour le cisaillement et déformation perpendiculaire au plan de la membrane pour la courbure.

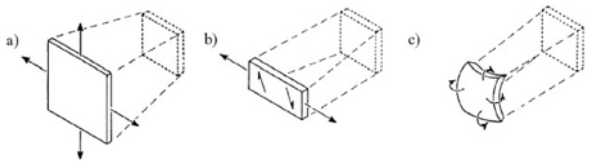



FIG. 2.2 – Schéma de représentation des trois modes élastiques de déformation des membranes : ($a$) cisaillement dans le plan avec variation d'aire, ($b$) cisaillement induisant une extension latérale à aire constante, et ($c$) courbure. Source [69].

La densité d'énergie (énergie par unité de surface) d'un film mince peut donc s'écrire comme la somme de ces trois termes :

$$\mathcal{F}_{\text{film}} = \mathcal{F}_{\text{Stretching}} + \mathcal{F}_{\text{Shearing}} + \mathcal{F}_{\text{Bending}} \tag{2.2}$$

La densité d'énergie de *streching* est égale à la tension de surface $\gamma$. La tension de surface représente l'énergie à fournir pour augmenter l'aire $A$ d'une quantité élémentaire d$A$.

$$\mathcal{F}_{\text{Streching}} = \gamma$$

La tension de surface d'une émulsion est fixée par la concentration surfacique en molécules amphiphiles à l'interface [44]. Lorsque la concentration en tensioactifs dans le volume (eau ou huile) augmente, la densité de molécules tensioactives à l'interface augmente aussi, ce qui entraîne une diminution de la tension de surface. Au delà d'une concentration appelée *Concentration Micellaire Critique* (CMC), le potentiel chimique de tensioactif reste constant puisque le tensioactif ajouté en excès s'associe pour former des micelles. Pour des tensioactifs classiques moléculaires à simple chaîne lipophile, la CMC varie entre $10^{-5}$ et $10^{-3}$ mol/L . La tension de surface de l'interface au delà de la CMC est généralement inférieure à la dizaine de mJ/m$^2$ ($\sim 10$ kT/nm$^2$).

Dans le cas où le tensioactif utilisé est très peu soluble dans le volume ou si son temps d'adsorption ou de désorption de l'interface est de l'ordre du temps de déformation de la goutte, on doit tenir compte d'un terme d'élasticité dynamique, le *module d'élasticité de Gibbs* $\epsilon$. En effet en cas d'augmentation locale de l'aire de l'interface, la densité surfacique en surfactant diminue et ne peut être corrigée suffisamment rapidement. Le système réagit donc en opposant une réponse élastique à cet étirement. Dans toutes les expériences que nous avons réalisées, les temps caractéristiques d'échanges à l'interface étaient toujours négligeables devant le temps caractéristique des phénomènes observés.

La densité d'énergie de cisaillement est obtenue à partir de l'expression de la loi de Hooke :

$$\mathcal{F}_{\text{Shearing}} = \frac{1}{2}\mu(l^2 + l^{-2} - 2) \tag{2.3}$$

où $l = (L_0 + \Delta L)/L_0$ est le taux d'extension latérale et $\mu$ le module de cisaillement.
L'interface des émulsions est liquide, donc ce terme peut être négligé puisque son coût énergétique associé est nul.

L'énergie de courbure, est liée à des contraintes géométrique et stériques hors du plan dues à la physico-chimie des molécules adsorbées à l'interface :

$$\mathcal{F}_{\text{Bending}} = \frac{1}{2}\kappa(H - H_0)^2 + \kappa_G K \tag{2.4}$$

Le terme $H = c_1 + c_2$ – $c_1$ et $c_2$ étant les deux courbures principales – est la courbure moyenne de la membrane et $K = c_1 c_2$ est la courbure gaussienne. La membrane est caractérisée par trois paramètres phénoménologiques : la rigidité de courbure $\kappa$ qui contient tout le détail microscopique de la membrane (rigidité des queues hydrophobes, taille des têtes polaires, natures des interactions de paires dans le film, etc.), la courbure spontanée $H_0$ liée à la courbure intrinsèque des surfactants, et enfin le module élastique gaussien $\kappa_G$ que l'on peut négliger puisqu'il est associé au terme K dont l'intégrale sur la surface de l'objet est invariante tant que la topologie de la membrane ne change pas (pas de formation de "trous" ou de "poignées"). Les valeurs typiques du modules de courbure $\kappa$ pour des monocouches de tensioactif [**?** ], mesurées par des techniques de diffusion de rayonnement sur des microémulsions ou des micelles sont aux alentours de kT.

### 2.2.2 Film de mouillage métastable

Si on considère le cas d'une goutte d'huile qui se dépose sur une surface hydrophobe, un tensioactif solubilisé dans la phase continue se mettra à la fois à la surface du solide et à l'interface de la goutte [49]. L'adhésion de la goutte dépendra alors, en plus des interactions de Van der Waals classiques, de l'interaction entre les monocouches de molécules amphiphiles adsorbées. Si ces interactions sont suffisamment répulsives, la goutte ne se déposera pas sur le solide, alors que si elles sont attractives, on peut envisager un phénomène d'adhésion. La présence d'un angle de contact sera due à l'existence d'une énergie d'adhésion assez importante pour déformer la goutte.

Contrairement au cas du mouillage classique avec une ligne triple au contact des trois phases en présence, il y a existence d'un film de phase continue entre le substrat et la goutte. Ce film est

dans le cas que nous avons évoqué très similaire à un film de savon formé par deux monocouches de tensioactifs. Il est métastable, l'état stable correspondant à sa rupture et à la mise en contact du substrat avec le liquide de la goutte.

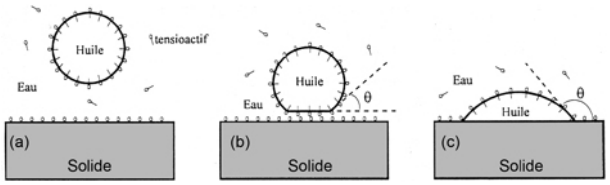



FIG. 2.3 – Représentation schématique du mouillage d'une goutte d'émulsion sur un substrat solide dans le cas d'existence d'un film métastable ($b$) et dans le cas ou ce film est rompu ($c$) laissant les trois phase en présence au contact.

L'étude des conditions de formation des films et de leur énergie d'adhésion associée a été initiée par Aronson et Princen, puis approfondie par Poulin *et al.* à partir de la mesure des angles de contact entre des gouttes d'émulsions dont l'adhésion est induite par la température et ses effets sur la solubilité des surfactants dans la phase continue [7, 127]. Une mauvaise solubilité des surfactants conduit notamment à une adhésion très importante entre les interfaces couvertes de manière à minimiser la surface d'exposition au solvant. Cette solubilité peut être variée en changeant la nature des tensioactifs, des phases liquides et la température.

L'utilisation d'émulsions, et notamment le fait que toutes les gouttes ont la même tension de surface, permet de réaliser une mesure d'angle de contacts statistique : en microscopie de transmission, les zones de contact entre les gouttes apparaissent comme des films blancs dont il est aisé de déduire les paramètres géométriques.

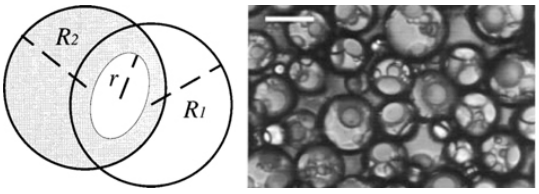



FIG. 2.4 – Les zones de contact apparaissent dans le plan focal du microscope comme des ellipses claires dont on peut mesurer les paramètres géométriques et ainsi mesurer l'angle de contact entre plusieurs dizaines de gouttes. Source [127].

La structure du film adhésif est semblable à celle d'une bicouche de tensioactif de quelques nanomètres d'épaisseur, caractéristique des films noirs de Newton [126]. Les énergies d'adhésion mesurées sont de l'ordre de kT par tensioactif, soit environ $10^5$ kT pour deux gouttes micrométriques.

### 2.2.3 Microscopie de la ligne triple

La forme d'une goutte d'émulsion mouillant un substrat est contrôlée par un équilibre entre les interactions attractives dans la surface de contact et l'énergie de déformation de la goutte. Le processus d'adhésion peut être formellement séparé en deux étapes : la première correspond à une déformation, énergétiquement défavorable, de la goutte à volume constant conduisant à la formation de l'angle de contact et à une augmentation de l'aire totale de l'objet. La deuxième étape correspond à la mise à l'équilibre du film , le système gagnant alors l'énergie d'interaction $\varepsilon A$ où $A$ est l'aire du film.

La gravité n'intervient pas puisque la taille des gouttes est toujours très inférieure à la longueur capillaire $l_c = \sqrt{\frac{\gamma}{g\Delta\rho}}$ où $g$ est l'accélération de la pesanteur et $\Delta\rho$ la différence des masses volumiques. Avec des valeurs classiques pour des émulsions ($\gamma$=1 mN/m ; $\Delta\rho$=100 Kg.m$^{-3}$), on trouve une longueur capillaire de $l_c = 1$ mm.

On a l'habitude de considérer un terme de longueur d'extrapolation (ou improprement longueur capillaire liée à la courbure) $\lambda = \sqrt{\frac{\kappa}{\gamma}}$ qui représente la longueur caractéristique sur laquelle se fait la jonction entre le film et l'angle de contact macroscopique. Ce terme est implicitement représentatif de l'importance de l'énergie de courbure dans la déformation de la goutte. Une application numérique avec les valeurs que nous avons rappelées nous donne une longueur $\lambda \sim$ nm à comparer au rayon des gouttes qui est de l'ordre de plusieurs microns.
Une goutte adhérant sur un substrat peut donc être modélisée par une sphère tronquée caractérisée par un angle de contact $\theta$.

### 2.2.4 Zone de transition et effets de ligne

La description que donne la loi d'Young-Dupré de l'angle de contact à l'équilibre suppose que l'on se situe assez loin de la ligne triple, ce qui assure la discontinuité des tensions de surface dans l'expression du paramètre d'étalement.

En fait, la discontinuité n'est pas physique, et proche de la ligne triple, les tensions varient continûment [154]. Notamment dans le cas d'émulsions adhésives, la tension de surface passe de sa valeur dans le film à sa valeur hors du film sur une certaines longueur caractéristique $\delta$ du système. Elle donne une mesure de la zone de transition à partir de laquelle les surfaces adhésives commencent à percevoir leurs interactions de surfaces réciproques. Localement, la loi

d'Young-Dupré subit une déviation, d'autant plus importante que les interactions sont à longue portée.

Cette zone de transition est localisée le long de la ligne de contact et son influence est proportionnelle au périmètre de la zone de contact. L'énergie d'adhésion est elle proportionnelle à la surface du film. L'effet de la zone de transition sur l'énergie est donc négligeable dans le cas de gouttes dont la zone de contact est grande devant le micron. Formellement, on exprime l'effet de cette zone de transition par l'existence d'une tension de ligne $\tau$ [J/m], qui a été introduite par Gibbs comme un analogue de la tension de surface pour un périmètre imaginaire sur lequel on moyenne toutes les interactions entre les surfaces existant dans la couronne d'épaisseur $\delta$. Dans le cas où un effet de ligne existe, la valeur de l'angle de contact dépend de la taille des gouttes.

La tension de ligne peut être calculée théoriquement et sa valeur, comprise en valeur absolue entre $10^{-12}$ et $10^{-10}$ J/m, peut être positive ou négative selon la nature des interactions dans la zone de transition [47]. Une tension de ligne positive signifie que les effets de bord sont démouillants, à savoir défavorables à l'accroissement de la taille du film. C'est le cas notamment lorsque les interactions sont répulsives près de la ligne de contact.

Des expériences ont été réalisées avec des gouttes liquides sur des supports solides ou sur des surfaces liquides et il est clair qu'il est malaisé de déterminer cette tension. Il a notamment été démontré que beaucoup d'effets étaient susceptibles de fausser les valeurs publiées, et bien souvent de surestimer le terme $\tau$ de plusieurs ordres de grandeurs.

## 2.3 Cellules et Membranes

### 2.3.1 Bicouches fluides : Liposomes et Polymersomes

Les liposomes sont des vésicules unilamellaires dont la membrane est constituée d'une bicouche de lipides. On classe généralement les liposomes en trois classes distinctes correspondant à des domaines de tailles différents (quelques dizaines de nanomètres, quelques centaines de nanomètres et quelques dizaines de microns). Les plus petites, aussi appelées SUV pour Small Unilamellar Vesicles, sont commercialement utilisées comme vecteurs thérapeutiques de principes actifs [66]. Seules les plus grosses, les GUV (Giant Unilamellar Vesicles) sont observables en microscopie

optique, et ce sont donc elles qui sont utilisées dans les expériences d'adhésion.

Les lipides entrant dans leur composition sont des molécules amphiphiles à double chaîne aliphatique ($C_8$ à $C_{16}$) : leur CMC est très faible (de $10^{-6}$ à $10^{-10}$ mol/L respectivement) et leur courbure spontanée est proche de zéro (Fig. 2.5-a). En volume, les lipides s'autoassemblent en bicouches fermées (Fig. 2.6), multiples (phases multilamellaires) ou simples (liposomes). Au sein d'une même bicouche, les parties hydrophobes des lipides se font face alors que les parties hydrophiles sont dirigées vers le solvant aqueux (Fig. 2.5-a). On trouve dans le commerce une quantité importante de lipides naturels ou synthétiques, dont certains ont été modifiés de manière à présenter des ligands de type biotine ou du polyéthylène glycol .

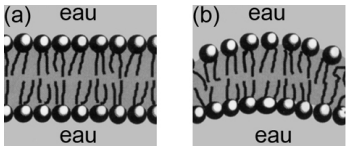



FIG. 2.5 – (*a*) Représentation de l'arrangement bidimensionnel des lipides dans la bicouche. Les parties hydrophobes se font faces alors que les parties hydrophiles sont dirigées vers le solvant aqueux. (*b*) Si on courbe localement la bicouche, la monocouche interne est en compression alors que la monocouche externe est en extension. Source [16, Chap. 5].

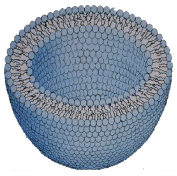


FIG. 2.6 – Représentation schématique en coupe d'un liposome. Source : `http://www.ibi.cc/`

Contrairement aux émulsions où la monocouche d'amphiphiles sépare une phase huile et une phase eau, une bicouche lipidique sépare deux phases aqueuses (Fig. 2.5-a). Toutefois, elle est quasiment imperméable aux molécules de taille moyenne, comme les sucres par exemple, mais est perméable à l'eau. Il est donc possible de produire des vésicules dont la phase interne et la phase externe n'ont ni la même densité ni la même osmolarité, comme nous le verrons dans la description des expériences.

Les propriétés de diffusion bidimensionnelle sont semblables pour des protéines ou des lipides incorporés dans la membrane : dans le cas où la bicouche est liquide, le coefficient de diffusion est presque toujours compris entre $10^{-8}$ et $10^{-7}$ $cm^2/s$ [63].

Depuis quelques années, une nouvelle catégorie de structures colloïdales vésiculaires autoassemblées, les polymersomes, est apparue dans la littérature [46]. Ce sont des liposomes formés par assemblages de copolymères diblocs ayant une partie hydrophile (polyéthylène oxyde ) et une partie hydrophobe (polyéthylène). L'épaisseur de leur membrane est beaucoup plus importante que l'épaisseur d'une bicouche lipidique, et leur perméabilité à l'eau très inférieure.

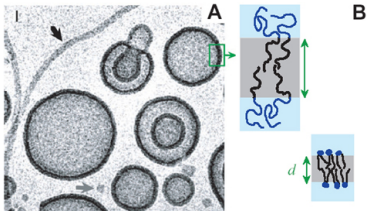



FIG. 2.7 – (*A*) : Image en microscopie électronique en transmission de polymersomes réalisés par autoassemblage de copolymères diblocs PS-PEO. (*B*) Schéma de structure de la membrane (en haut) et schéma de sutructure s'une membrane lipidique classique (en bas). Les épaisseurs sont à l'échelle. Source [46].

### 2.3.2 Propriétés Élastiques des membranes

Avant de s'intéresser aux nombreux résultats concernant l'adhésion non spécifique des membranes, il faut préciser les différences qui existent avec les émulsions ou les liquides simples dans l'air du point de vue mécanique et physico-chimique.

Le terme $\mathcal{F}_{\text{Stretching}}$ est lié à l'élongation des bicouches lipidiques qui est limitée à de faibles déformations qui n'excèdent pas quelques pourcents de l'aire totale [138]. En effet, par comparaison avec les monocouches de tensioactifs qui sont toujours en équilibre d'adsorption avec le volume environnant, il n'existe ni réservoir de lipides coexistant en solution avec les liposomes, ni d'échanges de lipides entre les liposomes qui permettraient d'accroître l'aire de la bicouche à composition constante.
La densité surfacique d'énergie d'étirement dépend de la variation relative de surface par lipide de manière quadratique :

$$\mathcal{F}_{\text{Streching}} = \frac{1}{2} K_a \left( \frac{\Delta A}{A} \right)^2 = \frac{1}{2} K_a \left( \frac{A - A_o}{A_o} \right)^2 \tag{2.5}$$

$K_a$ est le module de compressibilité, et sa valeur est de l'ordre de $0,5$ J/m$^2$ pour des globules rouges et de $0,10$ J/m$^2$ pour des vésicules lipidiques et les polymersomes [50, 112, 107, 45]. Cette différence s'explique par la présence, dans le cas du globule rouge, d'un mélange de lipides avec du cholestérol qui tend à rigidifier la membrane.

L'énergie élastique de cisaillement pur à surface constante (*shearing*) est négligeable pour des liposomes lipidiques à température ambiante du fait de leur état liquide. En revanche, dans le

cas d'une membrane polymérisée, cristalline ou d'un globule rouge, ce module peut être plusieurs ordres de grandeurs plus importante et nous devons en tenir compte [45].

Lorsqu'une bicouche d'amphiphiles est soumise à une déformation à aire constante hors du plan, la monocouche externe est en extension alors que la monocouche interne est en compression (Fig. 2.5-b). Le module de courbure peut s'exprimer en fonction de paramètres géométriques et du module d'élongation : $\kappa = e^2 K_a/b$, où $e$ est l'épaisseur de la membrane et $b$ un coefficient numérique.

Les techniques permettant de mesurer le module de rigidité de courbure $\kappa$ sont nombreuses et peuvent faire appel à une analyse des fluctuations de forme de vésicules quasi-sphériques à l'aide d'une analyse spectrale microscopique des contours [117], ou à une étude de la réponse élastique de la membrane à une déformation mécanique créée par aspiration dans une micropipette [95]. Pour des vésicules constituées d'un même type de lipide, des polymersomes ou des globules rouges, ces techniques donnent des valeurs sensiblement équivalentes du module $\kappa$, autour de $10^{-19}$J, soit de l'ordre de 10 à 20 kT. Pour les cellules, en revanche, les valeurs du module de courbure sont beaucoup plus grandes et peuvent aller jusqu'à une valeur de 100 kT pour Dictyostelium Discoideum [147].

#### 2.3.2.1 Tension de membrane

D'un point de vue formel, l'enthalpie d'une membrane est définie par l'intégration de sa densité d'énergie $\mathcal{F}_{\text{Enthalpique}} = \mathcal{F}_{\text{Streching}} + \mathcal{F}_{\text{Shearing}} + \mathcal{F}_{\text{Bending}}$ sur l'ensemble de sa surface. Dans le détail des termes dont nous avons discuté dans le paragraphe précédent, il n'apparaît pas de terme de tension de surface au même titre que dans le cas des monocouches de surfactants pour des émulsions. Le terme de *stretching* ne fait apparaître qu'une composante élastique liée au module de compressibilité $K_a$ de la bicouche.

Il est toutefois possible de définir un terme analogue à une tension de surface, appelé *tension de membrane*, dont l'origine physique dépend de deux régimes distincts : l'un enthalpique, l'autre entropique.
La composante enthalpique est la plus simple à concevoir et apparaît dans le cas d'une membrane préalablement tendue : par analogie avec la tension de surface, on définit $\sigma_{\text{Enthalpique}} = \partial \mathcal{H}\mathcal{A}/\partial \Delta A$ qui dépend donc de l'élasticité latérale de la membrane en réponse à une variation

d'aire. Plus précisément, ce terme de tension est lié à l'augmentation de l'aire par tête de lipide au sein de la bicouche et s'écrit comme :

$$\sigma_{\text{Enthalpique}} = K_a \Delta A / A \tag{2.6}$$

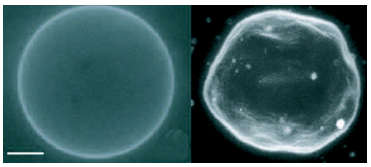


FIG. 2.8 – Images en microscopie de fluorescence d'un liposome tendu sans fluctuations (*gauche*) et d'un liposome sans tension dont la membrane montre des fluctuations thermiques (*droite*). Source [129].

En fait, une membrane à l'équilibre ne présente qu'une tension très faible ($\sim 10^{-7}$ N/m) qui autorise l'existence de fluctuations thermiques (Fig. 2.8) causées par les chocs des molécules d'eau dans lesquelles baigne la bicouche. Ces fluctuations browniennes, dans le cas d'une membrane sans contrainte extérieure, existent à toutes les échelles spatiales avec une probabilité associée au module de courbure $\kappa$.

Lors d'une mesure du contour d'une vésicule au microscope, les limitations de la résolution optique font que l'on n'image pas le contour réel de la membrane, mais un contour apparent projeté sur le contour moyen. L'aire réelle de la membrane est constante, ainsi que son volume, mais l'aire apparente varie en réponse à une extension mécanique. On stocke ainsi une aire sous forme de fluctuations, qu'il est entropiquement défavorable de déplier [65, 81].

La variation d'aire relative d'une membrane soumise à une tension mécanique entre l'aire réelle et l'aire projetée s'exprime donc par la somme de deux termes :

$$\frac{\Delta A}{A} = \frac{\mathrm{kT}}{8\pi\kappa} \ln\left(\frac{a^2}{\pi^2\kappa}\sigma\right) + \frac{\sigma}{K_a} \tag{2.7}$$

où $a$ est la distance entre deux molécules de lipides dans la bicouche ($a \sim 5$Å). Le premier régime correspond au dépliement des fluctuations et le second à une extension effective de l'aire par lipide dans la bicouche [50]. Ainsi, contrairement au cas des monocouches de tensioactifs, il existe pour les bicouches une relation entre la tension de membrane mécanique et l'aire projetée mesurée expérimentalement.

Il est possible de mesurer la tension d'une vésicule lourde de rayon $R_0$ posée sur un substrat en utilisant une méthode développée par Puech *et al.* [128]. Sous l'effet de son poids $\Delta\rho g$, fixé par la différence de densité des phases internes et externes, la vésicule se déforme et sa surface apparente

augmente. L'équilibre entre la contribution gravitationnelle et surfacique fixe l'amplitude de la déformation qu'il est possible de mesurer en microscopie interférentielle à proximité de la lamelle à partir du rayon du méplat $a$ qui s'est formé. La tension peut alors s'écrire comme

$$\sigma = \Delta\rho g \frac{R_0^4}{a^2} \tag{2.8}$$

Cette tension est comprise entre $\sigma$=$10^{-7}$ et $10^{-4}$ J/m$^2$ pour une vésicule libre.

Au sein d'une population de vésicules de même taille, toutes n'ont pas exactement le même nombre de lipides par unité de surface. Puisqu'aucun échange de lipides entre deux vésicules ne s'effectue, les vésicules n'ont pas toutes la même tension à l'équilibre même si leurs aires projetées sont semblables. Pour des vésicules de tailles différentes que l'on a préalablement gonflées en augmentant l'osmolarité de la phase interne, la tension varie comme le rayon de la vésicule au carré [128].

### 2.3.3 Adhésion de vésicules

L'étude de l'adhésion de vésicules contrôlée par les interactions colloïdales non-spécifiques a été menée à la fois théoriquement et expérimentalement avec succès depuis une trentaine d'années. Dans La loi de Young-Dupré est généralement applicable si l'on considère la tension de membrane de la bicouche à la place de la tension de surface. La caractère variable de la tension de membrane oblige à séparer les expériences menées en deux grands groupes, suivant si $\sigma$ est contrôlée par l'opérateur, par l'intermédiaire d'une micropipette par exemple, ou si $\sigma$ est laissée libre de varier au cours du processus d'adhésion, ce qui est le cas dans les expériences où on étudie l'adhésion de vésicules posées sur des substrats solides en microscopie interférentielle.

#### 2.3.3.1 Étude de l'adhésion par la technique des micropipettes

La technique d'analyse basée sur l'aspiration à tension contrôlée de vésicules est basée sur des études réalisées au début des années 60 avec des cellules par Rand et Burton [131], puis développée entièrement, théoriquement et expérimentalement, par E. Evans à partir de 1974 [58].

La technique des micropipettes permet de mettre une vésicule en légère dépression hydrostatique par rapport au milieu extérieur dans laquelle elle est suspendue. La micropipette est un fin tube capillaire en verre, dont le diamètre n'excède pas quelques microns, avec lequel on aspire une

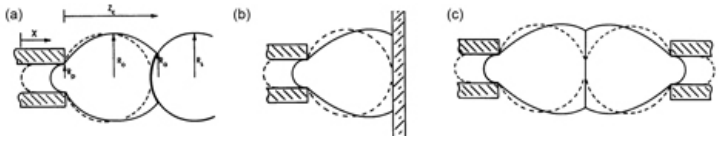



FIG. 2.9 – Trois cas possibles d'adhésion entre une vésicule tenue par une micropipette et une surface adhésive : le cas ($a$) correspond au cas d'une vésicule de faible tension adhérant sur une autre très tendue et ainsi rendue indéformable ou sur une surface sphérique solide comme une bille de verre. Le cas ($b$) correspond à l'adhésion d'une vésicule sur une surface plane, et le cas ($c$) à l'adhésion de deux vésicules de même tension et de même taille. Source [59].

portion de membrane. La dépression $\Delta P$ est contrôlée par une dénivellation et peut être aussi faible que 0,1 Pa.
L'aspiration fait pénétrer une extension tubulaire de la membrane à l'intérieur de la pipette. La tension de la vésicule est entièrement contrôlée par la dépression et le diamètre interne de la micropipette. En effet, l'égalité des pressions de Laplace impose [131] :

$$\sigma = \frac{1}{2}\left(\frac{\Delta P}{\frac{1}{r_p} + \frac{1}{R_v}}\right) \tag{2.9}$$

Les tensions accessibles communément avec la technique des micropipettes sont comprises entre $10^{-6}$ et $10^{-3}$ J/m$^2$ [50]. Cette technique a été utilisée pour mesurer la dépendance de l'aire projetée de la vésicule en fonction de la tension de membrane et du module de courbure telle que nous l'avons reportée à l'équation 2.7.

À l'approche d'une surface adhésive, les fluctuations thermiques résiduelles permettent de nucléer une zone d'adhésion qui croît jusqu'à ce que l'équilibre mécanique des forces soit atteint. Cette adhésion induit une augmentation de surface de la vésicule hors de la micropipette et un raccourcissement de la longueur $\Delta L$ de languette de membrane dans la micropipette. Par un modèle thermodynamique simple, il est possible d'exprimer l'énergie d'adhésion en fonction des paramètres géométriques mesurables [59] :

$$W = -\Delta P(\pi r_p^2)\frac{\Delta L}{\Delta A_c} \tag{2.10}$$

où $A_c$ est l'aire de contact entre la vésicule et la surface.

Nous avons représenté sur la figure 2.9 les trois cas possible d'adhésion entre une vésicule tenue par une micropipette et une surface adhésive : le cas (a) correspond au cas d'une vésicule de faible tension adhérant sur une autre très tendue et ainsi rendue indéformable ou une surface

sphérique solide comme une bille de verre. Le cas (b) correspond à l'adhésion d'une vésicule sur une surface plane, et le cas (c) à l'adhésion de deux vésicules de même tension et de même taille.

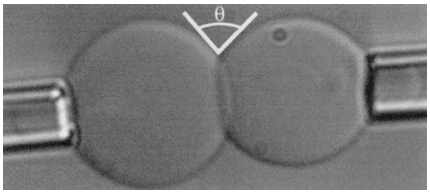



FIG. 2.10 – Sur cette figure, deux vésicules sous tension adhérent avec un angle de contact macroscopique $\theta$. La loi d'Young-Dupré s'applique et on peut écrire l'énergie d'adhésion comme $W = \sigma(1 - \cos\theta)$. Source [123].

Il est possible d'exprimer une relation entre l'énergie d'adhésion $W$ et l'angle de contact macroscopique $\theta$ de type Young-Dupré en remplaçant la tension de surface $\gamma$ par la tension de membrane $\sigma$ [51] :

$$W = \sigma(1 - \cos\theta) \tag{2.11}$$

Dans le cas des membranes, l'angle de contact n'est pas unique puisque la tension de membrane peut être variée par l'expérimentateur en modifiant la valeur de la dépression.

La technique des micropipettes est une technique quantitative de mesure : à partir d'une membrane, il est possible à la fois de caractériser totalement sa réponse élastique, et ensuite en fixant la tension, de mesurer l'énergie d'adhésion sans paramètre ajustable. Cette technique a permis de mesurer l'énergie d'adhésion entre des vésicules de DMPC et de SOPC, cette dernière étant de l'ordre de $W_{ad} = 10^{-5}$ J/m$^2$ [51, 55], ainsi que l'effet de l'introduction d'un polymère hydrophile inerte dans la solution qui permet d'augmenter cette énergie d'adhésion d'un facteur 10 grâce aux interactions attractives de déplétion qu'il génère [56].

L'existence de fluctuations thermiques de membrane nécessite la prise en compte d'une interaction stérique additionnelle, répulsive, et à longue portée par rapport aux interactions de solvatation. La dépendance de cet interaction répulsive en fonction de la distance intermembrane $h$ s'exprime comme $1/h^2$, à comparer avec les interactions attractives de Vand der Waals en $1/h^2$ entre deux sphères dont le rayon est grand devant $h$.
Parsegian et Evans [62, 114] ont montré la présence d'une répulsion pour une distance intermembrane de 2 à 3 nm dans le cas de vésicules formées de lipides neutres, qu'ils ont attribué à ces fluctuations. De plus, il a été montré qu'exercer une tension latérale sur les membranes favorisait leur adhésion mutuelle [143].

#### 2.3.3.2 Étude de l'adhésion de membranes sur des substrats solides

L'étude de l'adhésion d'objets souples sur des surfaces solides a été en partie rendue possible par l'utilisation d'une technique de microscopie interférentielle, la RICM, mise en œuvre pour la première fois par Curtis en 1964 pour visualiser les contacts focaux de cellules adhérentes sur du verre [36].

La microscopie de contraste interférentiel en réflexion (*Reflection Interference Contrast Microscopy*) est basée sur l'exploitation des franges d'interférences d'égale épaisseur (anneaux de Newton) localisées sur la lamelle de verre et causées par la proximité de deux dioptres optiques formés par la surface de l'objet et la surface de la lamelle. Le faisceau incident monochromatique (Fig. 2.11) caractérisé par un angle d'incidence $\theta$ et une intensité $I_0$, se réfléchit partiellement à l'interface verre/eau ($I_1$) et la partie transmise se réfléchit à l'interface eau/objet ($I_2$). L'objet à étudier est caractérisé par un certain profil géométrique dans le plan perpendiculaire au plan focal que l'on note $h(x)$. Ce profil induit une différence de marche entre les faisceaux $I_1$ et $I_2$ telle que l'intensité des franges d'interférence suivant l'axe $x$ s'écrit :

$$I(\theta) = I_1 + I_2 + 2\sqrt{I_1 I_2}\cos[2kh(x)\cos\theta + \delta]$$

avec $k = \frac{2\pi}{\lambda}$ le nombre d'onde de la lumière incidente et $\delta$ un décalage de phase causé par la réflexion à l'interface eau/objet. En règle générale, l'indice des objets (lipides) est supérieur à celui de l'eau ($n_3 > n_2$), donc ce terme est égal à $\pi$.
Nous avons représenté sur la figure 2.12 les franges et leur profil obtenues par Rädler *et al.* en RICM d'une bille de verre sphérique de diamètre de 16 microns [132]. L'utilisation d'une source incohérente et d'un objectif avec une grande ouverture numérique modifie le profil en atténuant les ordres d'interférence lointains.

La figure 2.13 représente l'image en microscopie de contraste interférentiel de la zone de contact d'un liposome adhérant sur un substrats de verre [3]. L'exploitation des premiers ordres d'interférence permet de remonter au profil de la membrane proche de la ligne de contact sur une hauteur de l'ordre du micron. Pour peu que l'on ait accès à plusieurs ordres, la reconstitution du profil est fidèle et précise, à l'exception de la distance entre la membrane et le verre qui ne peut pas être déterminée de manière absolue, à cause de la difficulté de calibrer correctement les intensités en fonction de tous les paramètres en présence (épaisseur de la membrane, etc.) et à la courbe des variations du cosinus qui n'est pas bijective à proximité de la lamelle [133]. Plusieurs améliorations expérimentales ont été apportées de manière à pouvoir mesurer l'épaisseur avec

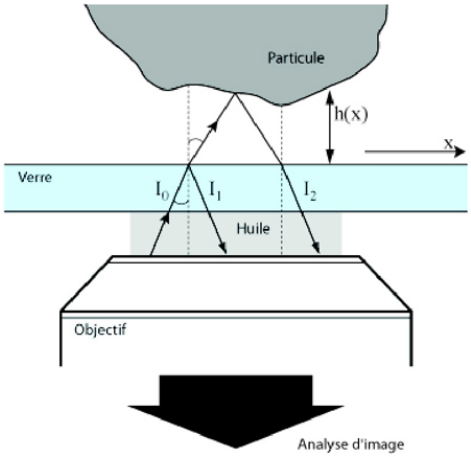



FIG. 2.11 – Schéma de principe de la technique de RICM : On image sur la lamelle les interférences produites par la proximité avec la surface inférieure de l'objet à étudier. L'illumination s'effectue en lumière monochromatique pour augmenter le contraste.

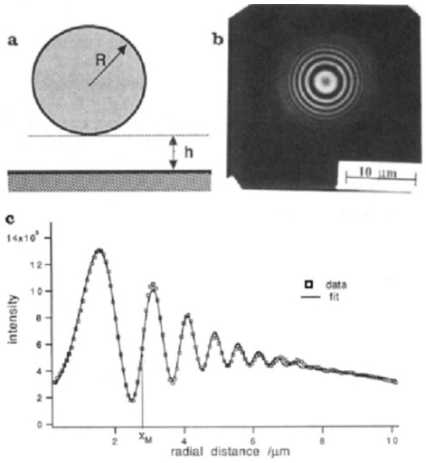



FIG. 2.12 – Pour une bille de verre de 16$\mu$m de diamètre située à une distance $h$ de la lamelle, on a représenté sur le courbe du bas le profil radial d'intensité des franges d'interférences. Source [133].

une précision de l'ordre du nanomètre, mais aucune n'est vraiment aisée à mettre en œuvre. La première consiste à déposer une couche nanométrique de $MgF_2$ sur les lamelles de verre de manière à corriger les indices des dioptres et ainsi rendre la fonction cosinus bijective entre 0 et 100 nm par l'ajout d'un décalage de phase [133]. La plus simple à utiliser a été réalisée très récemment, et propose de connaître la hauteur en comparant les profils d'interférences obtenus à deux longueurs d'ondes distinctes : la mesure du décalage entre les pics permet de remonter à la valeur de l'épaisseur recherchée [140].

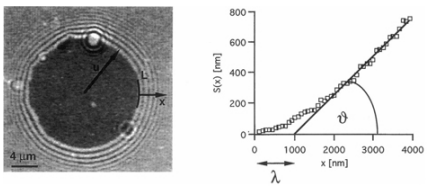



FIG. 2.13 – *Gauche* : Image en RICM de la zone de contact d'une vésicule fortement adhérée sur un substrat. L'ordre zéro correspond à la surface de contact, et on voit les premiers ordres des franges d'interférence. – *Droite* : Reconstitution expérimentale du profil à partir des franges d'interférence, et détermination de l'angle de contact $\theta$ et de la longueur capillaire $\lambda$. Source [3].

Nous avons représenté sur la figure 2.14 le profil d'un liposome adhéré sur une lamelle , laissant apparaître un angle macroscopique de contact $\theta$ à l'équilibre. Comme dans le cas des émulsions adhésives, on peut définir une longueur d'extrapolation $\lambda = \sqrt{\frac{\kappa}{\sigma}}$ associée à l'existence d'un module de courbure non nul et à la tension de membrane [3].

Cette adhésion induit un surcroît de tension liée à l'augmentation de l'aire projetée de la vésicule : nous avons représenté sur la figure 2.15 l'évolution cinétique de la tension de membrane dans le cas de vésicules adhérant sur une surface fonctionnalisée par de la caséine biotinylée [37, p. 115].

Si on considère des valeurs moyennes de tension de membrane et de module de courbure on obtient des valeurs de la longueur d'extrapolation allant de $\lambda$=100 nm à 1 $\mu$m . Cette longueur d'extrapolation varie en fonction de la tension et donc de l'angle de contact.

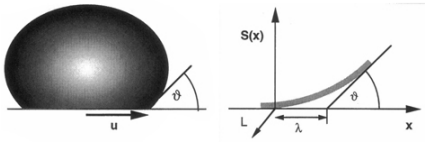



FIG. 2.14 – *Gauche* : Représentation schématique d'une vésicule adhérant sur un substrat avec un angle de contact macroscopique $\theta$. – *Droite* : Schéma agrandi de la zone de contact, qui fait apparaître une longueur d'extrapolation $\lambda$ qui dépend de la valeur relative de la tension de membrane par rapport au module de courbure. Source [3].

L'étude de la forme à l'équilibre de vésicules adhérant par des interactions de Van der Waals, réalisée en RICM statique par Rädler *et al.* [134], montre que les fluctuations de membrane sont atténuées dans la zone de contact mais qu'une rugosité subsiste. Une étude dynamique des fluctuations permet de mesurer l'ensemble des paramètres élastiques de la membrane.

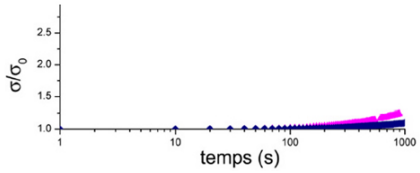



FIG. 2.15 – Évolution de la tension de membrane avec le temps au cours de l'étalement de deux vésicules sur une surface biotinylée. La tension n'est pas constante et son augmentation est exponentielle. Source [37, p. 115].

La résolution analytique de la forme d'une vésicule adhérant sur un substrat en fonction de l'énergie d'adhésion avait été traité par Seifert et Lipowsky en 1990 [142] dans la limite d'une énergie d'adhésion infinie (ou d'un module de courbure tendant vers zéro), mais ce n'est que très récemment qu'un traitement tenant compte de l'ensemble des paramètres élastiques de la membrane a été réalisé par Tordeux *et al.* [153].

L'étude expérimentale de l'adhésion de vésicules géantes produite par des interactions électrostatiques a été réalisée par Nardi *et al.* [109, 110] entre des vésicules portant 1% de lipides chargés

positivement et des bicouches supportées par du verre contenant 10% de lipides chargés négativement. En fonction du pH de la solution (Fig. 2.16-a), les vésicules présentent deux modes d'adhésion différents : le premier montre une zone de contact homogène, et l'énergie d'adhésion respecte la loi de Young-Dupré ; la seconde montre en revanche l'existence d'une transition de phase des lipides de la vésicule, qui induit la formation de zones fortement adhésives où les membranes sont très proches et de zones moins adhésives nommées *blisters*. Les réarrangements entre les lipides des deux membranes sont facilités par le fait que les lipides sur le verre peuvent diffuser dans le plan de la lamelle. Dans ce dernier cas, la loi de Young-Dupré n'est plus vérifiée, et la transition de phase survient alors que l'énergie d'adhésion est beaucoup plus grande que la tension nécessaire pour lyser la membrane.

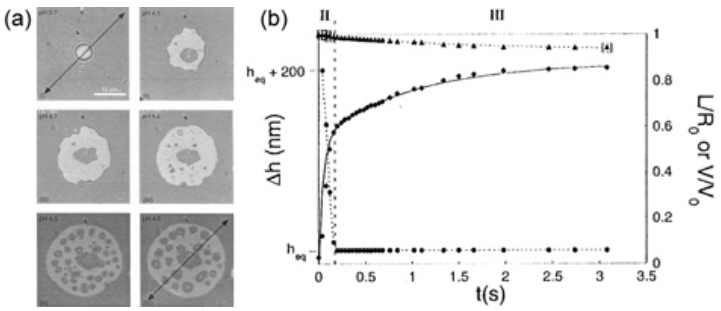



FIG. 2.16 – *Gauche* : Images RICM d'une vésicule négativement chargée adhérant sur un substrat plan liquide de charge positive : on voit l'apparition de zones plus sombres qui correspondent à des distances intermembrane plus faibles. Il y a séparation de phase entre les lipides négatifs liés et les lipides neutres comportant des polyéthylène glycol à une extrémité. Source [110]. – *Droite* : Cinétique de croissance d'une zone de contact entre une vésicule et une surface de verre de charges opposées. La cinétique très rapide s'explique par une compétition entre l'étalement et la dissipation visqueuse dans le film de phase continue. Source [10].

La dynamique de mouillage induit par des interactions électrostatiques a été étudiée par Bernard *et al.* en microscopie d'ondes évanescentes [10], entre une vésicule légèrement chargée négativement et un substrat de verre sur lequel on a préalablement adsorbé de la poly-L-lysine qui est un polyélectrolyte positif. L'évolution du rayon de contact avec le temps (Fig. 2.16-b) a une croissance exponentielle qui fait intervenir trois temps caractéristiques associés à des phénomènes distincts : le premier correspond au temps nécessaire pour que la vésicule rentre en contact avec le substrat et initie son adhésion. Ce temps dépend des interactions répulsives associées aux fluctuations et au temps nécessaire pour drainer le liquide de l'espace entre la membrane et le verre. Le deuxième temps caractéristique est lié au mouillage proprement dit, et sa valeur

est de l'ordre de la cinquantaine de millisecondes. Un modèle classique tiré de la dynamique de mouillage de liquides simples permet de retrouver le temps caractéristique en ne considérant que la dissipation visqueuse dans le coin de membrane qui avance. Cette première phase de mouillage s'effectue à volume constant, et à la fin de cette deuxième phase, le très faible excès d'aire est résorbé et la membrane se retrouve sous tension. Enfin, le troisième temps caractéristique, de l'ordre de la seconde, est lié à l'ouverture de pores et à la diminution du volume de la vésicule.

# Chapitre 3

# Ajout de Ligands et Adhésion Spécifique

Dans ce chapitre, nous n'allons pas présenter l'ensemble des (nombreux) travaux théoriques et expérimentaux traitant de l'adhésion d'objets colloïdaux souples induite par la formation de liens ligand-récepteur. Pour les études thermodynamiques, nous nous sommes limités à trois cas distincts : le premier concerne l'adhésion de billes élastiques d'agarose , la seconde concerne l'adhésion de vésicules étudiées par la technique des micropipettes et la dernière l'adhésion de vésicules posées sur des substrats. Pour ce dernier cas, nous ferons un point sur les expériences de cinétique de croissance de zones de contact.

## 3.1 Adhésion de billes d'agarose

Avant de s'intéresser à l'adhésion d'objets déformables dont la surface est liquide, rappelons tout d'abord les résultats quantitatifs obtenus dans l'étude de l'adhésion de billes élastiques de polymère induite par des interactions de type biotine-streptavidine.

Moy *et al.* ont étudié en microscopie de contraste interférentiel l'adhésion de billes d'agarose présentant de l'iminobiotine à la surface sur des lamelles de verre fonctionnalisées par de l'avidine [108]. La mesure d'énergie d'adhésion entre les billes et le substrat est déduite d'une approche JKR [88] validée dans le cas d'une adhésion non spécifique sur une lamelle de verre chargé (Fig. 3.1-a). L'énergie d'adhésion $W$ est connue sans paramètre ajustable, à partir de la mesure du module d'Young $K$ du gel d'agarose et de la connaissance du rayon de la bille $R$ et du rayon de

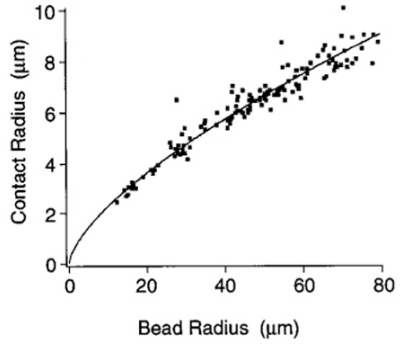



FIG. 3.1 – Représentation de la variation du rayon de contact en fonction du rayon de la bille pour les expériences d'adhésion de billes d'agarose fonctionnalisées par de l'iminobiotine sur des substrats de verre présentant de la streptavidine. Le comportement est parfaitement décrit par un approche JKR d'adhésion de particules élastiques. Source [108].

contact $\rho$ déduit de l'ordre zéro des franges d'interférences de Newton :

$$W = \frac{K}{6\pi}\frac{a^3}{R^2} \tag{3.1}$$

L'iminobiotine à la particularité de prendre en fonction du pH une forme chargée et une forme neutre. Sachant que l'avidine se lie exclusivement à la forme neutre, la constante d'association entre l'iminobiotine et l'avidine dépend continûment du pH de la solution [76].

Dans cette configuration où ni ligands, ni récepteurs ne peuvent diffuser à 2D, l'énergie d'adhésion $W$ est proportionnelle au logarithme de la constante d'association $K_a$ des couples pour les constantes d'association supérieurs à $10^{-7}$ $M^{-1}$. On a donc

$$W \propto \log K_a = -\frac{\Delta_r G_{\text{Iminobiotine-Avidine}}}{\text{kT}} \tag{3.2}$$

L'énergie d'adhésion est donc proportionnelle à l'énergie de liaison entre l'iminobiotine et l'avidine, ce qui est conforme avec les prévisions théoriques. Toutefois, il n'est pas possible d'aller plus loin dans l'exploitation de la constante de proportionnalité, notamment à cause de la rugosité des surfaces qui rend difficile la caractérisation des densités des ligands et récepteurs accessibles à la réaction.

## 3.2 Adhésion Spécifique et Micropipettes

L'ensemble des développements théoriques concernant les expériences d'adhésion avec des micropipettes ont été développées par Evans dans les années 1980 [51, 59, 55, 56]. Toutefois, peu d'expériences ont été réalisées dans le cadre de l'adhésion causée par la présence de couples

ligand-récepteur. Les expériences de micropipettes ont connu des développements expérimentaux plus poussés dans le cadre de la BFP et l'étude de liens spécifiques uniques [52].

Dès les premiers papiers décrivant la technique (1985), E. Evans avait soulevé le problème de la modélisation correcte du rapport entre l'énergie d'adhésion et la présence de liens ligand-récepteur [61, 60]. En effet, s'il est clair que la loi de Young-Dupré s'applique sans équivoque dans le cas de deux vésicules adhérant par des interaction de Van der Waals ou de déplétion, ce n'est pas toujours le cas dans le cas d'une adhésion causée par l'existence de liens discrets car ceux-ci peuvent se répartir de manière inhomogène dans la zone de contact et modifier substantiellement l'énergie de détachement.

La condition de continuité reste valide dans le cas de liens ayant une énergie de liaison faible. Dans ce cas, la loi d'Young peut être appliquée, et un moyen de vérifier cette hypothèse consiste à faire varier la tension de la vésicule de manière croissante puis décroissante et à tracer la variation de l'énergie calculée par la loi d'Young. Si les courbes se superposent, la condition de continuité est respectée [61, 124].

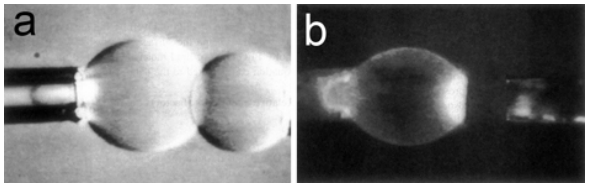



FIG. 3.2 – Image en contraste de phase ($a$) et en épifluorescence ($b$) de deux vésicules adhérant par des liens biotine-avidine. On voit sur la photo de gauche l'existence d'un angle de contact macroscopique et sur la photo de droite une accumulation d'avidine fluorescente dans la zone de contact. Source [111].

Noppl-Simson et Needham [111] ont montré que dans le cas de l'adhésion de deux vésicules lipidiques par des liens biotine-avidine fluorescente, on observe une augmentation de fluorescence dans dans la zone de contact par rapport à la zone hors contact. Cette différence de densité en avidine s'explique par la mise à l'équilibre chimique à 2D des ligands et des récepteurs, rendue possible par le caractère liquide des surfaces.

Ce caractère liquide des surfaces impose [9, 43] que l'expression de l'énergie d'adhésion entre les membranes ne soit pas liée à l'énergie de liaison entre ligands et récepteurs, mais uniquement à la différence de pression osmotique à 2D entre les couples L/R dans la zone de contact ($\Gamma_{in}$) et

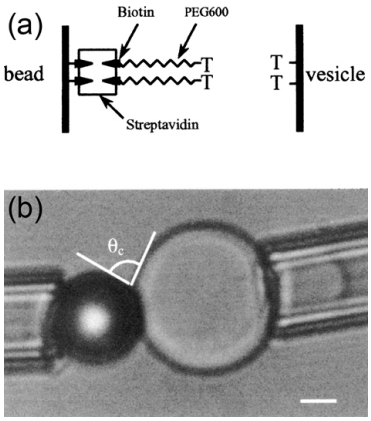



FIG. 3.3 – Étude par la technique de micropipettes de l'adhésion entre une vésicule et une bille de verre induite par des interactions faibles entre des bases d'ADN. Le faiblesse des liens formés permet d'effectuer un traitement statistique puisque la température laisse le loisir au système d'atteindre son équilibre. Source [124].

les ligands et récepteurs hors de la zone ($\Gamma_{out}$) :

$$W = (\Gamma_{in} - \Gamma_{out})\mathrm{kT} \tag{3.3}$$

Cette relation a été vérifiée sous une forme plus générale par Pincet *et al.* [124] dans le cas d'une vésicule adhérant sur une bille de verre par des interactions attractives et relativement faibles (de l'ordre de quelques kT) entre les bases d'ADN (Fig. 3.3). Bien que les ligands placés sur la bille de verre ne puissent pas diffuser à la surface de la bille, la réversibilité des échanges causée par la faiblesse des interactions autorise d'assimiler formellement ce cas expérimental au cas de deux surfaces liquides. La température du milieu laisse au système le loisir de trouver sa configuration thermodynamique. L'approche retenue par les auteurs fait intervenir un calcul microcanonique des configurations accessibles aux récepteurs présents sur la vésicule. Moyennant l'ajustement d'un paramètre géométrique relatif à la taille des sites réactifs, les énergies entre les bases déterminées par ces expériences sont en très bon accord avec les valeur rapportées par ailleurs.

## 3.3 Vésicules sur substrats plans

L'étude thermodynamique de l'adhésion de vésicules sur des substrats plans a été réalisée sur des lamelles de verre où était déposée une bicouche de lipides donnant aux ligands incorporés des propriétés diffusionnelles proches de celles dont ils disposent dans une membrane libre. Les vésicules sont composées de lipides classiques, de lipides fonctionnalisés par une partie polyéthylène glycol et de lipides fonctionnalisés par un récepteur du ligand de la lamelle. Le rôle du polyéthylène glycol est de simuler la répulsion du *glycocalyx* cellulaire [3, 25, 26].

Nous avons évoqué dans notre chapitre sur les bicouches leur propriété de n'être perméable qu'a l'eau. L'intérieur des vésicules est rempli d'une solution aqueuse d'un sucre de manière à avoir une densité plus importante que celle de la phase continue et ainsi spontanément se poser sur la lamelle. Toutefois, on s'arrange pour que la pression interne des vésicules ne soit pas trop importante et que leur membrane présente des fluctuations. En effet, ces dernières sont un frein à la formation du premier contact si elles sont de trop grande amplitude, mais elles sont nécessaires pour l'amorçage d'une adhésion spontanées des ligands.

Les expériences montre une coexistence (Fig. 3.4) de deux zones d'intensités différentes, dont l'analyse des fluctuations indique qu'elles se situent à des distances différentes du substrat. Elle correspondent à des zones d'adhésion forte, où la membrane de la vésicule est très proche de la membrane supportée (quelques nanomètres) , et à des zones d'adhésion faible où la membrane montre des fluctuations de plus grande amplitude (de l'ordre de 10 nanomètres). Ces distances ne sont pas mesurées absolument, puisque la techniques RICM classique ne le permet pas, elles sont déduites de l'amplitude des fluctuations qui donnent un bon ordre de grandeur de la distance recherchée.

FIG. 3.4 – *Gauche* : Image en RICM d'une vésicule adhérant sur un substrat avec formation de zones de contact de forte adhésion (noir) et de faible adhésion (gris). Source [25]. – *Droite* : Les zones de forte adhésion correspondent à des zones concentrées en couples ligand-récepteur alors que les zones de faible adhésion correspondent à une forte concentration en polymères répulsifs. Source [26].

On caractérise la libre diffusion des polyéthylène glycol à la surface de la vésicule par une pression osmotique bidimensionnelle $\Pi$, à l'origine d'une répulsion entropique qui s'oppose à l'adhésion des membranes. La prise en compte de cette répulsion supplémentaire, associée aux interactions ligand-récepteur et aux interactions DLVO classiques mène à l'existence d'un potentiel global

d'interaction entre la vésicule et le substrat plan présentant deux puits de profondeur et de distance différentes [26].

Le premier puits (Fig. 3.4), situé à quelques nanomètres et relativement profond, correspond aux zones d'adhésion forte où les liens spécifiques se localisent. Le second puits, situé à une dizaines de nanomètres, correspond aux zones d'adhésion faible. Son existence est liée à l'équilibre entre les répulsions entropiques et l'attraction de Van der Waals. Dans ces zones, seuls les polyéthylène glycol sont présent. On assiste donc à une séparation de phase bidimensionnelle médiée par l'adhésion et la présence d'un gaz de polyéthylène glycol à la surface de la membrane.

D'un point de vue théorique, on trouve un nombre d'articles très important disséquant l'ensembles des termes intervenant dans l'écriture correcte du potentiel d'interaction pour calculer l'énergie d'adhésion effective entre les surfaces (cf. l'introduction de [148]). Les difficultés d'interprétation proviennent en partie du fait que les modèles de fluctuations d'Helfrich ont été réalisés pour des vésicules en volume sans tension de membrane or dans les cas que nous avons décrits, les vésicules ont une tension et sont proches d'une paroi.

## 3.4 Cinétique

Boulbitch *et al.* ont étudié la cinétique de croissance du rayon de contact de vésicules portant des peptides RGD comme ligands et du polyéthylène glycol [20]. Les ligands sont complémentaires des intégrines adsorbées physiquement sur la lamelle de verre et ne peuvent ainsi pas diffuser. Nous avons représenté sur la figure 3.5-a une série d'images typique de ces expériences : comme on peut le voir, la vésicule adhère faiblement au substrat (a1) même en l'absence de liens spécifiques. La membrane de la vésicule adhérée présente des oscillations d'amplitude moyenne ($\sim$ 10nm) qui permettent la formation d'un premier contact, non nécessairement centré (a2, flèche). Puis la zone d'adhésion forte croît petit à petit jusqu'à occuper la surface initiale en contact avec la lamelle.

La loi de croissance varie en fonction de la densité de ligands sur la vésicule. Pour des densités faibles, la diffusion des ligands de la zone non adhérée à la zone adhérée est le phénomène limitant et le rayon de contact de la zone de forte adhésion croît comme $\rho(t) \propto t^{1/2}$.
Pour des densités de ligands fortes, la croissance de la zone de contact est limitée par la réaction entre RGD et intégrines au sein d'un volume réactionnel défini par une étroite bande sur le bord

de la zone adhérée, dont la largeur est associée aux fluctuations thermiques les plus probables de la membrane. Si les densités des ligands et des récepteurs libres ne varient pas en amont du front d'adhésion, ce dernier se déplace à vitesse constante et le rayon de la zone de contact croît comme $\rho(t) \propto t$.

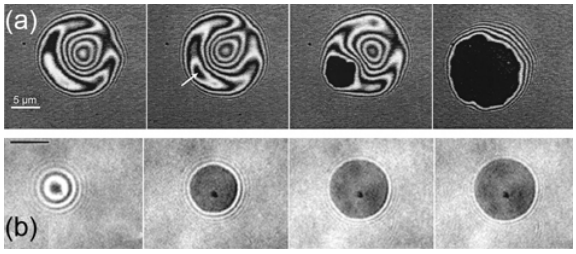



FIG. 3.5 – Images en RICM de la cinétique d'étalement de vésicules lipidiques extraits des travaux de Boulbitch *et al.* (*haut*) et Cuvelier *et al.* (*bas*). Dans les images du haut, la vésicule est déjà adhérée par des interactions non spécifiques. Dans les images du bas, la croissance s'effectue de manière isotrope. Source [20, 38].

De leur coté, Cuvelier *et al.* ont étudié la cinétique de croissance du rayon de contact de vésicules [38] composées d'une fraction de lipides biotinylés saturés par de la streptavidine à leur surface et adhérant sur des surfaces de verre fonctionnalisées soit par une monocouche de PEG-3400-Biotine , soit par une monocouche de caséine biotinylée. Dans les deux cas, la densité en biotine sur la lamelle est de $3.10^4$ $\mu\text{m}^{-2}$ . Nous avons représenté sur la figure 3.5-b une série d'images montrant l'évolution de la zone de contact au cours du temps. Contrairement au cas précédent, la vésicule n'adhère pas du tout à la lamelle en l'absence de liens biotine-streptavidine et la croissance de la zone de contact s'effectue de manière parfaitement isotrope à partir de son centre.

Pour le cas des lamelles fonctionnalisées par du PEG-3400-Biotine , la loi de croissance de l'angle de contact varie en fonction de la densité en streptavidine sur les gouttes. Si cette densité est faible, on retrouve la loi de type $\theta(t) \propto t^{1/2}$ liée à une limitation par la diffusion des espèces. Si maintenant cette densité est 100 fois supérieure, la loi de croissance de l'angle est une loi exponentielle associée à une compétition entre l'étalement de la goutte et une dissipation visqueuse dans le film dont la constante de temps n'excède pas quelques secondes. Contrairement aux expériences de Boulbitch *et al.* , la présence de PEG-3400-Biotine rend la réaction très rapide devant le temps caractéristique de dissipation visqueuse associée à l'étalement, ce qui explique que la cinétique ne dépende pas de la constante cinétique de réaction entre la streptavidine et la biotine.

Lorsque les lamelles sont couvertes par de la caséine biotinylée, la variation de densité de strep-

tavidine n'a aucune incidence sur la loi cinétique de croissance qui s'exprime comme $\theta(t) \propto t^{2/7}$. Seule une petite fraction des streptavidines présentes dans le film adhérée est fixée effectivement à de la biotine, le reste étant condensé à 2D. Les liens se forment sur le bord du film adhéré et la cinétique de croissance, limitée par la réaction, fait intervenir à la fois un temps de réaction bidimensionnel ($t_R \sim 1500$ s) qui reflète le manque de mobilité des ligands sur le verre, ainsi q'un terme d'efficacité de réaction qui prend en compte la gêne stérique associée à la présence de streptavidine non liée.

## Deuxième partie

# Matériaux et Caractérisation

Nous avons dans la partie précédente de ce manuscrit résumé de manière succincte les principaux résultats obtenus expérimentalement dans le domaine de l'adhésion de particules colloïdales souples et liquides induite par des interactions non spécifiques ou spécifiques.

Les membranes lipidiques fermées sont un matériau de choix dans la modélisation de l'adhésion cellulaire : facilement réalisables en grande quantité, parfaitement liquides vis-à-vis des propriétés de diffusion à la surface, l'essentiel de leurs propriétés mécaniques ont été décrites et mesurées. Ces surfaces sont caractérisées par un module de courbure important lié à la structure de la bicouche, et par une tension de membrane mécanique associée à la différence entre une aire optiquement accessible et l'aire réelle fixée par le nombre de lipides.

Toutefois, l'utilisation de liposomes comporte intrinsèquement deux inconvénients. Le premier concerne la tension : si cette dernière est laissée libre, comme dans les expériences d'adhésion de vésicules sur substrat, la croissance de l'aire de contact la fait augmenter de manière significative. Le second inconvénient tient au fait que la fonctionnalisation des liposomes ne se caractérise pas aisément. Trop fragiles pour être caractérisés en cytométrie de flux, trop polydisperses en taille pour utiliser des méthodes de mesure moyenne, la densité de ligands à leur surface est déduite des proportions de concentrations des différents lipides en volume. Comme peu d'échanges de lipides s'effectuent entre les liposomes d'un même lot, rien n'assure que la densité de ligands entre deux liposomes de même taille soit la même.

À cause de ces deux limitations, il est très difficile d'effectuer des mesures statistiques d'angle de contact dans les expériences où la tension est fixée par le processus d'adhésion, ainsi que d'obtenir des résultats réellement quantitatifs en dehors de cas limites (densité très faible ou très forte) expérimentaux.

Nous avons présenté les expériences de mouillage entre des gouttes d'émulsion provoqué par des changements de solubilité des tensioactifs dans la phase continue. Ces études ont notamment montré, au delà de la physique des films métastables, la possibilité d'effectuer des mesures d'angles de contact sur de nombreuses gouttes simultanément grâce au fait que toutes ont les même propriétés de surface. La tension de surface qui les caractérise est une propriété intrinsèque du film, et sa valeur grande devant les tensions de membranes typiques interdit la présence de fluctuations thermiques telles qu'on peut les observer sur les bicouches. Sans rentrer dans les détails, nous avons dans le tableau suivant consigné les propriétés physiques comparées des

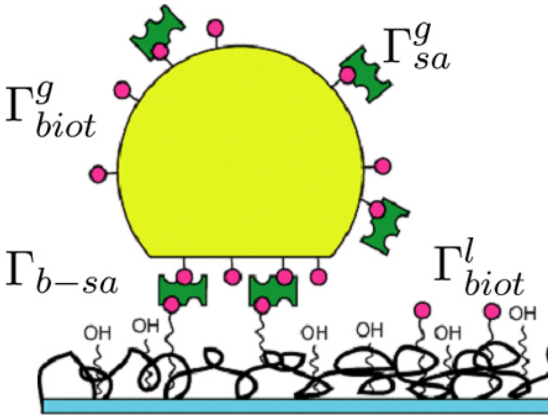
émulsions et des liposomes.

Les expériences que nous allons réaliser nécessitent la mise au point et la caractérisation de deux substrats : les gouttes d'émulsions et les substrat solides complémentaires. Nous avons représenté sur la figure suivante un schéma de principe de la configuration d'expérience :

– les gouttes d'émulsions sont fonctionnalisées par de la biotine dont la densité de surface est notée $\Gamma^g_{biot}$. Sur cette biotine est fixée de la streptavidine, fluorescente notamment, à une concentration $\Gamma^g_{sa}$. Cette streptavidine est mobile dans le plan de l'interface.
– les substrats sont des lamelles de verre sur lesquelles nous avons fixé un mélange de polyéthylène glycol et de polyéthylène glycol -biotine de densité $\Gamma^l_{biot}$.

Le couple ligand-récepteur que nous avons choisi est le couple biotine/streptavidine : la constante d'affinité des deux espèces et leur énergie de liaison associée, ainsi que la grande quantité de littérature s'y rapportant ont guidé notre choix.

| **Propriété Physique** | **Émulsions** | **Vésicules** |
|---|---|---|
| Tension | Fixée ∼mN/m | Variable $= f(A_p)$ $\sim \mu$N/m |
| Courbure | $\kappa$ ∼kT | $\kappa > 10$kT |
| Surface | Variable | Fixée $\pm$ 5% |
| Élasticité | Nulle | $K_a$ |
| Extrapolation | $\lambda$ ∼nm | $\lambda \sim \mu$m |



# Chapitre 1

# Émulsions Fonctionnalisées

La fonctionnalisation est une opération qui consiste à lier deux ou plusieurs entités (molécules ou particules) de manière à former un complexe qui ait les propriétés combinées de tous ses composants. Des composés naturels (protéines, molécules biologiques) ou synthétiques (particules colloïdales, fluorophores) peuvent être chimiquement associés de manière à obtenir des produits uniques aux caractéristiques bien contrôlées.

Le développements des méthodes de fonctionnalisation de surfaces colloïdales par des espèces biologiquement actives comme les anticorps suit de près, depuis une quarantaine d'années, les progrès des techniques de dosage analytique dont le principal champ d'applications commerciales et cliniques concerne l'immunodétection [72] : l'interaction spécifique d'un anticorps libre ou fixé sur une surface avec une espèce chimique en solution permet de détecter et quantifier cette dernière. La grande fiabilité et la sensibilité de certains tests fait que ceux-ci sont aujourd'hui utilisés en routine dans des applications biomédicales courantes (tests de grossesse, dosage d'hormones, VIH, etc.).

Si l'on ne s'intéresse qu'à la fonctionnalisation de particules colloïdales par des espèces biochimiques comme des protéines , il existe *a priori* deux voies distinctes pour y arriver : la première est l'adsorption physique, et la seconde consiste à former une liaison chimique covalente. Sur la comparaison entre adsorption ou greffage covalent et leur efficacité relative, les références ne manquent pas [72, p. 131]. En effet, l'activité d'une protéine, un anticorps par exemple, peut se trouver réduite quand elle se situe proche d'une surface, notamment à cause de dépliements causés par des interactions hydrophobes avec la surface dans le cas de l'adsorption, ou parce

que le greffage covalent oriente dans le mauvais sens la protéine et sa zone réactive. La seule conclusion que l'on peut retenir est qu'aucune généralisation n'est possible. À chaque couple surface/protéine et à chaque application sa règle propre. Toutefois, la durée de vie d'une espèce biochimique à la surface d'une particule (solide) sera en général plus grande dans le cas du greffage que dans le cas de l'adsorption.

Les protocoles de chimie organique (dont beaucoup sont réalisables en phase aqueuse) relatifs à la fixation covalente d'espèces biochimiques diverses et variées sur des surfaces sont très nombreux et maintenant bien établis, y compris commercialement [83]. Ce sont de certains d'entre eux dont nous nous inspirerons pour nos travaux.

La fonctionnalisation de liposomes s'effectue à partir de l'incorporation de lipides, soit déjà porteurs du groupement voulu [158], soit chimiquement modifiés de manière à pouvoir tout d'abord former les vésicules, et ensuite fixer la molécule voulue *in-situ* [94]. Pour les émulsions en revanche, qui sont notamment très utilisées dans l'industrie pharmaceutique comme vecteurs de drogues, la fonctionnalisation s'effectue sur les surfactants qui sont incorporés dans la phase continue ou dispersée avant la fragmentation [157].

La voie de fabrication des émulsions que nous avons choisie nous permet de fabriquer un lot de quelques dizaines de grammes de gouttes calibrées. Dans ces conditions, il nous est impossible d'incorporer avant fragmentation des tensioactifs modifiés par les molécules que nous voulions voir à la surface, notamment en raison du prix des molécules biochimiques. Nous avons donc opté par une voie de greffage covalent *in-situ* à l'interface des gouttes micrométriques déjà fragmentées.

Dans les applications pharmaceutiques qui font intervenir l'injection de gouttes nanométriques d'émulsions par voie intraveineuse, on utilise souvent des huiles végétales, et notamment l'huile de soja [151]. Les raisons sont diverses : une excellente biocompatibilité qui est essentielle, et une composition qui donne des suspensions d'une très grande stabilité. En effet, les huiles de soja sont composées d'un mélange de mono-, di-, et triglycérides à chaînes longues ($C_{16}$, $C_{18}$), de phospholipides (la lécithine) dont la proportion peut atteindre 20% de la masse totale et de résidus acides non estérifiés à l'état de traces. Sans même ajouter de tensioactif, une huile de soja fragmentée dans l'eau forme une émulsion dont la stabilité n'est pas médiocre, à cause de l'action conjointe des lécithines et des triglycérides qui sont des molécules amphiphiles [33].

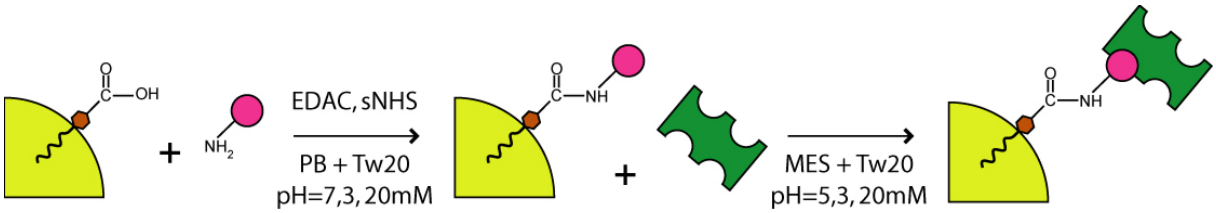



FIG. 1.1 – Schéma de principe de la méthode de fonctionnalisation de la surface des gouttes d'émulsion par de la biotine puis de la streptavidine. La ligation de la biotine s'effectue de manière covalente par la création d'une liaison peptidique en phase aqueuse en utilisant un agent de couplage de type carbodiimide. Le pH est optimisé dans les deux cas de manière à maximiser l'efficacité des réactions en jeu.

Nous avons choisi, pour nos gouttes d'émulsion, de les fonctionnaliser par de la streptavidine fluorescente qui peut librement diffuser à l'interface, afin pour pouvoir observer sa répartition pendant le processus d'adhésion. L'adsorption de la streptavidine à la surface s'étant révélée infructueuse, nous avons choisi une voie de fonctionnalisation en deux étapes faisant intervenir une biotine aminomodifiée (Fig. 1.1). L'huile de soja non raffinée utilisée pour formuler les émulsions contient une petite fraction d'acides gras libres, dérivés polyinsaturés de l'acide oléique $CH_3(CH_2)_7CH{=}CH(CH_2)_7COOH$ dont le pKa est de l'ordre de 5 (Fig. 1.2). Dans des conditions de pH appropriées (neutre ou basique), les groupements carboxyliques sont ionisés et se présentent à l'interface. La première étape consiste donc à former une liaison peptidique par l'intermédiaire d'un agent de couplage de type carbodiimide entre les groupements carboxyliques et l'aminobiotine. Dans un deuxième temps, on ajoute dans la solution de la streptavidine fluorescente qui se fixe à l'interface spontanément grâce à sa forte affinité avec la biotine.

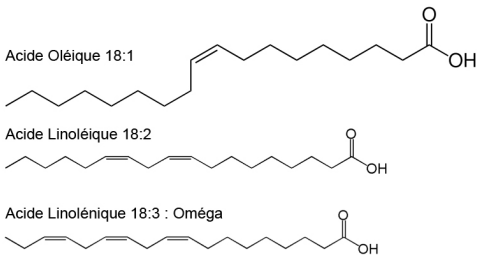



FIG. 1.2 – Les huiles de soja sont composées d'un mélange de triglycérides, d'une fraction de phospholipides et de traces d'acidité dite libre, c'est-à-dire des acides gras, insaturés, qui ne sont pas esterifiés. On trouve de l'acide oléique 18 :1, linoléique 18 :2 et linolénique 18 :3. Ces acides se dégradent au contact de l'oxygène et de la lumière et forment des cétones volatils qui donnent une odeur rance très caractéristique.

## 1.1 Réalisation d'émulsions monodisperses

Toute dispersion liquide métastable résulte d'un processus d'émulsification. L'émulsification est le procédé de préparation des émulsions dont le but est d'obtenir, à partir de deux liquides non miscibles, une dispersion de gouttes fines d'un des liquides dans l'autre. Ceci implique donc la déformation, puis la fragmentation d'une goutte en plusieurs autres gouttes plus petites (Fig. 1.3.

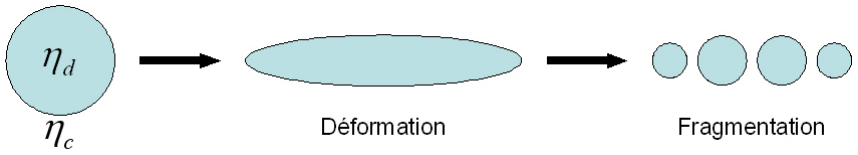



FIG. 1.3 – Une goutte de viscosité interne $\eta_d$ soumise à un gradient de cisaillement dans une phase continue de viscosité $\eta_c$ s'allonge puis se divise en plusieurs gouttes de taille inférieure.

La déformabilité d'une goutte d'émulsion est caractérisée par sa pression de Laplace $P = 2\gamma/R$ où $\gamma$ et $R$ sont respectivement la tension de surface entre les deux liquides et la taille de la goutte à fragmenter. Plus la pression de Laplace est élevée, moins la goutte est déformable. Cette goutte est soumise à la contrainte visqueuse imposée par le cisaillement $\mu = \eta_c\dot{\xi}$ où $\eta_c$ est la viscosité de la phase continue et $\dot{\xi}$ le gradient de cisaillement appliqué. On peut définir une grandeur adimensionnelle, le nombre de Weber (ou nombre capillaire), par :

$$W_e = \frac{\mu}{P} = \frac{\eta_c\dot{\xi}R}{2\gamma} \tag{1.1}$$

$W_e$ quantifie la compétition entre le cisaillement qui tend à déformer la goutte et la pression de Laplace qui tend à préserver sa forme sphérique. Théorie et expérience montrent qu'en régime de cisaillement laminaire, la fragmentation de la goutte à lieu quand $W_e \geq W_e^{\text{critique}}$. On peut donc exprimer le rayon des gouttes les plus petites obtenues pour un cisaillement donné comme

$$R \geq W_e^{\text{critique}} = \frac{\gamma}{\eta_c\dot{\xi}}. \tag{1.2}$$

La terme $W_e^{\text{critique}}$ est un coefficient qui dépend à la fois du ratio entre les viscosités $\frac{\eta_d}{\eta_c}$ et du type de cisaillement appliqué.

De nombreuses techniques d'émulsification ont été développées dans les laboratoires et dans l'industrie, dimensionnées pour des volumes allant du microlitre au litre, et permettant de produire

des gouttes allant de quelques centaines de nanomètres à plusieurs dizaines de microns [14]. Nous avons choisi d'utiliser la méthode développée par Mason *et al.* [105] utilisant un processus de fragmentation en phase concentrée dans une cellule de cisaillement dite de Couette (Fig. 1.4).

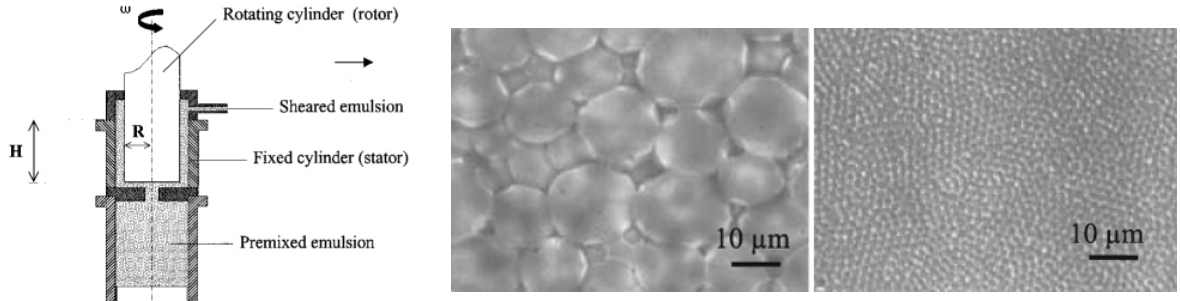



FIG. 1.4 – Schéma de principe de l'appareil de fragmentation par cisaillement dans une cellule de Couette que nous avons utilisé : l'entrefer est de 100 $\mu$m et la vitesse de rotation de 250 rpm. À droite nous présentons la photographie d'un premix et une émulsion fragmentée avec cet appareil. Source [103].

La première étape de la réalisation de l'émulsion consiste à mélanger très grossièrement, à la spatule, l'huile de soja (Sigma-Aldrich Ref : S7381) à une phase continue aqueuse contenant $15\%_{m/m}$ de tensioactif Synperonic PE/F68 (Uniqema) et $2\%_{m/m}$ d'Alginate de Sodium HF120L (Sigma-Aldrich Ref : 180947). Le tensioactif Synperonic est un copolymère tribloc formé de deux branches polyéthylène glycol et d'une branche polypropylène glycol hydrophobe[104]. L'alginate de sodium est incorporé à la phase aqueuse de manière à augmenter sa viscoélasticité pour favoriser la fragmentation ultérieure [103]. L'utilisation de cet appareil de fragmentation oblige à travailler avec un volume total assez important, soit 40g de suspension. La fraction finale en huile est de $75\%_{m/m}$ (soit 30g), donc les gouttes sont toutes au contact comme on peut le voir sur la photographie de gauche de la figure 1.4.

Ce prémélange (*Premix*), dont la taille des gouttes est de l'ordre de la vingtaine de microns, est ensuite cisaillé dans une cellule de Couette (fabriquée par la société TSR) constituée d'un rotor et d'un stator cylindriques et coaxiaux, séparés par un faible entrefer $e = 100\mu$m . Cet entrefer permet d'appliquer un cisaillement spatialement homogène et des contraintes très élevées. En travaillant avec un gradient de cisaillement $\dot{\xi} = \frac{\mathbf{R}\omega}{e} = 5200\ \mathrm{s}^{-1}$, on obtient une émulsion dont le diamètre moyen est de l'ordre de 4 à 5 microns avec une polydispersité (équivalente au coefficient

de variation) de l'ordre de 15%.
Bien souvent, il subsiste une population plus ou moins importante de petites gouttes (diamètre inférieur au micron) après la fragmentation. Ces gouttes ont soit été formées pendant la réalisation du prémélange, soit apparaissent lors de l'étape dans la cellule de Couette comme satellites de fragmentation. Pour les éliminer, nous avons choisi d'utiliser une méthode par décantation en phase diluée : les petites gouttes restent browniennes et ne crèment pas (la densité de l'huile est inférieure à celle de l'eau), à la différence de celles que nous voulons récupérer. L'émulsion en sortie de Couette est diluée de manière à ce que la fraction massique en huile soit de l'ordre de $5\%_{m/m}$ et la fraction massique en tensioactif soit de $1\%_{m/m}$ pour éviter les phénomènes d'agrégation par deplétion [13]. La suspension ainsi diluée est introduite dans une ampoule à décanter, dans l'obscurité, jusqu'à l'obtention d'une crème surnageante que l'on récupère. Cette étape de décantation doit être renouvellée tant que la phase surnageante n'est pas limpide, signifiant qu'il n'y a plus de très petites gouttes dans la suspension. Enfin, la crème, dont la fraction massique est de $60\%_{m/m}$ est aliquotée dans des tubes en verre puis stockée à l'abri de la lumière dans un incubateur à une température de 11°C.

## 1.2 Caractérisation des Gouttes d'Émulsion en FACS

Sans rentrer dans les détails techniques que nous préciserons ultérieurement, nous avons vu que la fonctionnalisation des gouttes par de la streptavidine s'effectue en plusieurs étapes. Toutes les étapes de chimie ou de fixation non covalente nécessitent, au delà de la réaction chimique en elle même, de nombreux changements de phase continue à des pH différents. Les émulsions étant par essence métastables, rien n'indique à priori quelle sera l'évolution de la distribution de taille de l'échantillon au fur et à mesure que le protocole est appliqué.

De plus, la chimie que nous effectuons utilise les traces d'acidité libre que l'on trouve dans les huiles végétales. Or, nous fonctionnalisons la surface sur des molécules dispersées en volume. On pourrait donc s'attendre, puisque les lots sont légèrement polydisperses, à greffer moins de biotine sur les petites gouttes que sur les grosses pour une même réaction. Il faut donc être capable de quantifier la densité de streptavidine sur les gouttes en fonction de leur taille.

Enfin, les lots d'émulsion que nous fonctionnalisons sont de très petit volume (quelques centaines de microlitres pour $10^8$ gouttes à peine), il nous faut trouver une méthode de caractérisation qui consomme le moins de produit possible pour pouvoir pour une même lot greffé effectuer la

description complète des paramètres physico-chimiques à fixer pour optimiser les protocoles.

Nous avons résumé en quelques lignes dans l'annexe A les techniques classiques de mesure de distribution de taille et de dosage biochimique de particules colloïdales. À part la FFF, qui est apte à séparer une population polydisperse de particules en fractions de taille égale, toutes les techniques (diffusion, fluorimétrie, etc.) permettent de remonter au paramètre voulu pour les particules à partir d'une mesure moyenne sur toute une population. Elles sont donc incapables de résoudre notre problématique qui est de caractériser des échantillons qui peuvent être polydisperse, ou du moins qui peuvent le devenir, avec une résolution à l'échelle d'une goutte.

La technique de cytométrie en flux est très utilisée dans les laboratoires de biologie et en recherche clinique hospitalière. Elle est l'achèvement le plus abouti des efforts mis en œuvre depuis plus d'un siècle dans le domaine de la cytologie, science qui étudie les propriétés internes et externes de cellules vivantes provenant d'un extrait corporel (ex. : sang, tissus cancéreux, etc.) et de son automatisation. La cytologie s'intéresse par exemple au dénombrement et à l'étude des différentes cellules portées par le sang, dans le but de diagnostiquer des anémies plus ou moins sévères. La description des différences de métabolisme entre une cellules saine et une cellule malade s'effectue souvent par la comparaison d'expressions protéiques particulières ou par la comparaison entre des paramètres physiques généraux de ces cellules (forme, granulosité, etc...).

Elle a été utilisée pour caractériser le contenu fluorescent d'émulsions doubles au seins desquelles des réactions biochimiques étaient réalisées [79, 11], mais aucune description théorique dans ce cas n'a été réalisée et certaines des interprétations des signaux récupérés sont erronées. Cette technique mesure des paramètres optiques (diffusion et fluorescence) de particule d'un échantillon donné qui circulent une par une dans la chambre de mesure. C'est, nous le verrons, la technique idéale pour nos applications.

### 1.2.1 Généralités sur la cytométrie en flux

#### 1.2.1.1 Présentation du cytomètre en flux

Si l'on s'intéresse uniquement au cas du sang, les techniques classiques de cytologie ont commencé à être mise en œuvre vers la fin du XIXe siècle et font quasiment toutes appel à une observation microscopique manuelle. La méthode la plus courante, encore rencontrée de nos jours dans des salles de culture de cellules, fait apparaître un *hématocytomètre* : il s'agit d'une cellule de micro-

scopie astucieusement quadrillée, dans laquelle on a injecté un échantillon de sang dilué quelques dizaines de fois. Le comptage des différentes espèces cellulaires s'effectue à la main, ce qui nous laisse penser qu'il est difficile de prendre en compte plus de 500 individus semblables. Si avec cette méthode nous voulons maintenant avoir une estimation précise de cellules que l'on trouve en plus faible quantité dans un volume donné, nous voyons que ce nombre est limité par la loi de Poisson, ce qui peut induire un coefficient de variation bien souvent supérieur à 30%. De plus, outre des différences de forme, parfois difficilement visibles suivant la taille de l'objet regardé, certaines anémies on un effet sur la couleur des cellules qui peut être très ardu de détecter et qui augmentent encore l'erreur sur la mesure.

Parallèlement au développement de méthodes microscopiques, l'essor de la chimie organique à la même période a permis le développement des techniques de coloration de cellules, notamment par la synthèse de molécules colorantes ayant une affinité spécifique avec telle ou telle partie d'une cellule donnée (synthèse de la fluoresceine : 1880 ; Pappenheim). Aujourd'hui la coloration des cellules ou de certaines de leurs parties est effectuée par l'utilisation d'anticorps fluorescents dont le principe date d'une soixantaine d'années [34].

Vers le milieu des années 1970, le cytomètre prend sa forme moderne (Fig. 1.5), avec l'avènement et la démocratisation du laser et de l'informatique : les cellules circulent dans une gaine microfluidique et le cytomètre mesure pour chacune d'entre elles deux paramètres de diffusion de lumière et des intensités de fluorescence[1].

#### 1.2.1.2 Fluidique :

Dans un cytomètre en flux, les cellules à étudier sont suspendues dans un liquide et circulent une à une dans une chambre de mesure (Fig. 1.5-a). Pour confiner les particules dans la partie centrale de la chambre et pour être certain de ne considérer que la mesure d'un objet isolé à chaque fois, l'échantillon de départ est dilué *in-situ* par un système de *focalisation hydrodynamique* faisant intervenir un fluide dit *de gaine* de même type mais de vitesse différente (Fig. 1.5-a).
Historiquement, l'idée d'utiliser le couple fluide de gaine-fluide porteur a été mise en oeuvre en 1947 par Gucker *et al.* lors de la création d'un compteur de particules : les bactéries étaient suspendues dans l'air et confinées par l'utilisation d'une gaine d'air filtré.

[1]Le site internet du Département de Cytométrie de l'Université de Purdue (Indiana, USA) distribue des informations exhaustives sur la technique de cytométrie en flux. On y trouve notamment des support de cours, des logiciels, des images... : http ://www.cyto.purdue.edu/

Au sein de la cellule de mesure, l'écoulement n'est pas stationnaire, et ne prend un profil de Poiseuille que quelques centimètres plus loin. Toutefois, on peut considérer que la portion de fluide où sont centrées les cellules à un profil hydrodynamique parabolique.

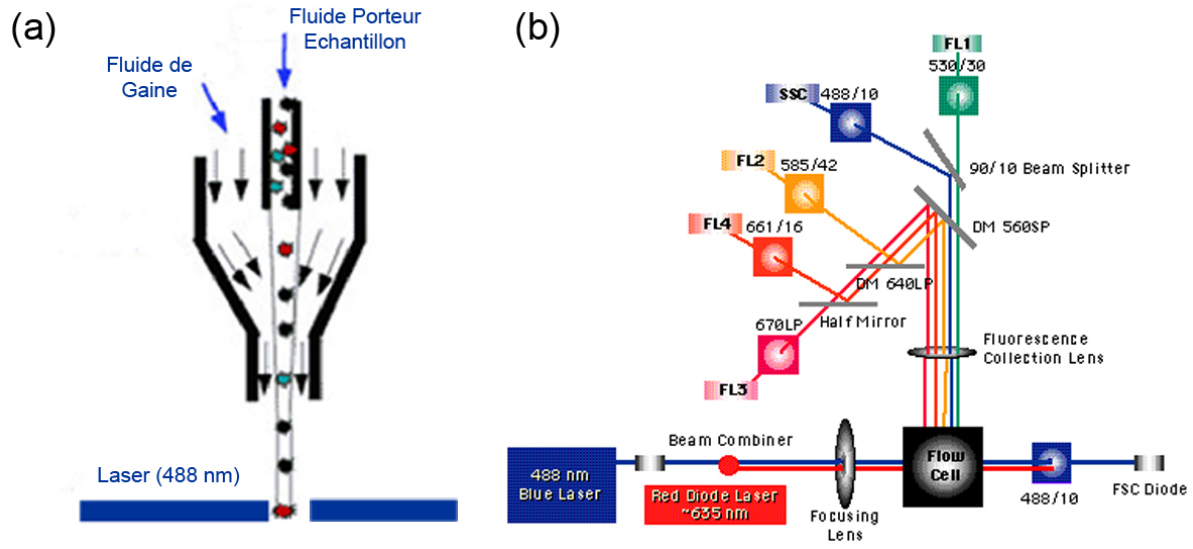



FIG. 1.5 – Représentation schématique (*gauche*) du système de focalisation hydrodynamique qui permet de séparer les objets à étudier et (*droite*) du système optique d'illumination et de mesure des deux paramètres de diffusion ainsi que des intensités de fluorescence.

#### 1.2.1.3 Optique :

Bien avant la démocratisation de la forme stable et commerciale des premiers cytomètres en flux modernes, vers le milieu des années 1970, plusieurs tentatives utilisant des approches différentes ont été menées pour détecter et classer les cellules d'un échantillon donné. Les problèmes qui se sont posés alors étaient essentiellement d'ordre instrumental, puisqu'il fallait des lampes puissantes et homogènes, des détecteurs sensibles et des techniques numériques d'automatisation. Dans ces trois domaines, les progrès de la physique du solide dans les semi-conducteurs à partir des années 1950 ont permis l'utilisation du laser, des détecteurs de type photomultiplicateur ou photodiode, et bien évidement de l'outil informatique. Toutefois, malgré les moyens rudimentaires, plusieurs avancées ont été possible :

Dans les années 1930-1940, Casspersson a déterminé la composition de cellules vivantes en acides nucléiques et en protéines par des mesures d'absorption à 260 nm et 280 nm sans toutefois dis-

criminer ARN et ADN . Monté sur un microscope à grande ouverture numérique (>0.85), un microspectrophotomètre mesurait la lumière absorbée par chaque cellule présente sur une lamelle de microscopie. Dans certains cas, des mesures précises ont été possibles en limitant la lumière diffusée par l'immersion des cellules dans un milieu isoindice. Cette méthode a permis de montrer en 1938 que lors de la mitose, la quantité d'ADN et d'ARN doublait ; respectant la stoechiométrie de la transformation. La preuve que l'ADN est le vecteur de l'information génétique sera apportée en 1944 par Avery *et al.* [8].
Quelques années plus tard, après la deuxième guerre mondiale, l'essor des techniques numériques a permis des développements dans le traitement informatique des données visuelles dans le but de classer et compter les différentes cellules d'un échantillon. Outre des problèmes d'ordre informatique (mémoire, rapidité), ces méthodes se sont heurtées à des problèmes biens moins évidents à résoudre qui tiennent au fait qu'une même cellule passe par un continuité d'états avec le temps, continuité qui ne peut être prise en compte par des descriptifs discrets comme la forme ou le nombre de lobes.

Enfin, en 1953 Crosland-Taylor [35] a repris le système fluide de gaine-fluide porteur mis au point par Gucker, et lui adjoignit un système de microscopie de fond noir. Les cellules du sang étaient comptées en considérant la lumière diffusée lorsqu'elles circulaient devant la lampe. Un peu plus tard, au début des années 60, Louis Kamentsky construisit le *Rapid Cell Spectrophotometer* (RCS) qui mesurait à haute vitesse l'absorption des cellules à différentes longueurs d'onde, et qui était capable de donner une représentation multi-paramètre d'un échantillon donné. Kamentsky avais tiré parti des derniers progrès matériels et logiciels pour un appareil qui était destiné à la classification et à la détection de cellules cervicales anormales.

Ces deux derniers exemples sont les précurseurs de la cytométrie moderne, qui se caractérise par la mesure de plusieurs paramètres de diffusion de lumière et de fluorescence (remplaçant avantageusement la coloration chimique) et la possibilité de représentation et de traitement statistique des données. L'appareil de Kamentsky était de plus capable de trier les cellules suivant un critère donné, ce qu'il est bien évidement possible d'effectuer avec les cytomètres les plus évolués.

L'illumination des particules circulant dans un cytomètre en flux actuel [144] est effectuée par un ou plusieurs faisceaux laser à différentes longueurs d'ondes (Fig. 1.5-b), ce qui permet de travailler avec plusieurs fluorophores avec une sensibilité constante. Les particules diffusent dans toutes les directions de l'espace, et l'appareil mesure et enregistre ces valeurs de diffusion et de

fluorescence à une fréquence allant de quelques centaines d'événements à plusieurs dizaines de milliers par seconde.

L'intensité de la diffusion vers l'avant est mesurée par une photodiode à faible ouverture numérique d'entrée et muni d'un point aveugle pour arrêter le faisceau incident. Pour ne pas être gêné par la lumière de fluorescence émise, on place sur le chemin un filtre passe-bande qui ne conserve que la composante de diffusion quasi-élastique.
La diffusion sur le coté est récupérée par un objectif à huile placé à 90° et doté d'une grande ouverture numérique (n.a.=1.2). Le demi-angle collecteur est donc d'environ 53°.
Le signal de fluorescence est acheminé par une série de miroirs vers chaque canal de fluorescence correspondant à un maximum de longueur d'onde d'émission. Il est possible d'inclure dans le logiciel de traitement des paramètres de compensation intercanaux qui permettent de comparer les valeurs de fluorescence entre elles.

Le canal de récupération de la fluorescence est le même que celui de récupération de l'intensité diffusée sur le coté. Pour un même lot de particules, le besoin en sensibilité concerne surtout la fluorescence. C'est la raison pour laquelle on utilise un objectif de microscope de grande ouverture numérique.

#### 1.2.1.4 Histogrammes et Diagrammes de Points

Les valeurs de diffusion et de fluorescence de chaque particule circulant dans la cellule de détection (un *événement*) sont enregistrées par un logiciel spécifique. Pour des raisons historiques, le format le plus courant (FCS 2.0) distribue les valeurs enregistrées sur 256 niveaux. Des logiciels permettent aujourd'hui de travailler avec des valeurs numérisées sur 1024 niveaux. Ces valeurs enregistrées peuvent être représentées sous différentes manières.

La première et la plus évidente des représentations est la représentation par histogramme de fréquence d'événements. Nous avons représenté sur la figure (Fig. 1.6-*gauche*) l'histogramme de fréquence de diffusion sur la coté d'une population de cellules sanguines. Les trois types de cellules apparaissent à des intensités de diffusion différentes et il est possible d'effectuer des calculs statistiques sur ces populations.

Les autres représentations sont les diagrammes de points (*dotplots*) multiparamètres (en général

deux) qu'il est possible de tracer à partir des multiples données (diffusion, fluorescence) enregistrées pour chaque particule de la population. En effet, sur la figure (Fig. 1.6-*gauche*), il peut être difficile de séparer les populations si les pics des histogrammes se recouvrent. On préférera alors représenter le signal de diffusion sur le coté en fonction du signal de diffusion vers l'avant (Fig. 1.6-*droite*) et les populations de cellules apparaîtront comme des nuages de points bien distincts.

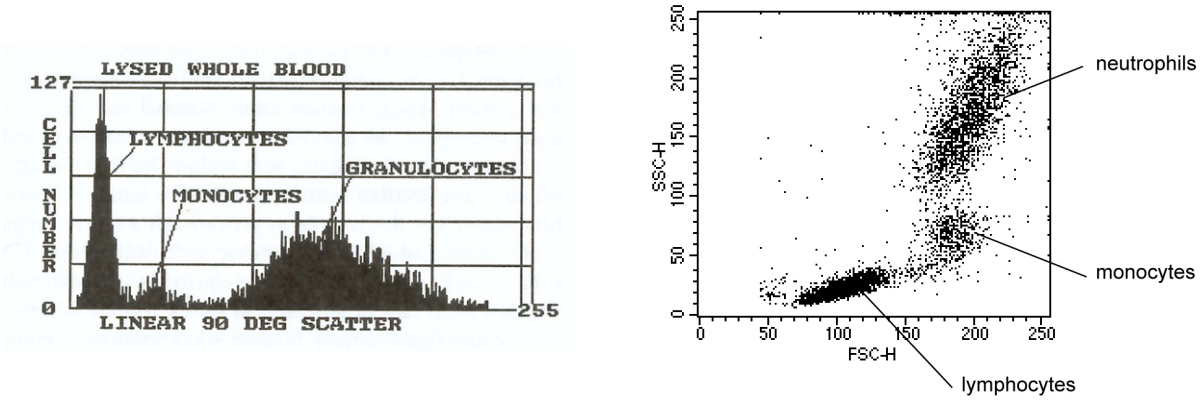



FIG. 1.6 – *Gauche* : Histogramme de diffusion sur le coté pour un échantillon sanguin. On isole trois populations d'intensités de diffusion différentes. – *Droite* : Représentation biparamètre de l'intensité de diffusion sur le coté en fonction de celle vers l'avant. Dans ce cas, les populations de cellules apparaissent comme des nuages homogènes.

### 1.2.2 Caractérisation d'émulsions par cytométrie en flux

#### 1.2.2.1 Introduction

L'aspect des diagrammes de diffusion des cellules sont souvent des nuages de points qui reflètent la relative monodispersité en taille et de forme des populations étudiées. Nous avons représenté sur la figure 1.7-*gauche* deux populations d'émulsion de même formulation (huile de soja d'indice $n_{oil} \sim 1,475$ mais de distribution de taille différente : celle de gauche est le prémélange avant cisaillement au Couette, celle de droite est l'émulsion après cisaillement que nous allons utiliser dans les expériences d'adhésion. Sa taille moyenne est de l'ordre de 4 microns pour une polydispersité mesurée au Malvern MasterSizer de 15%. La première fois que nous avons mesuré le diagramme de diffusion de ces deux populations, nous avons été étonné tout d'abord par le caractère continu des courbes obtenues (Fig. 1.7-*gauche*). Au delà de l'aspect élégant de la forme de la courbe, on voit de plus que le diagramme de diffusion de l'émulsion monodisperse (bleu) suit le diagramme de diffusion de l'émulsion polydisperse (rouge) tout en ayant une extension

plus courte. Notons que le nombre de gouttes utilisées pour réaliser une diagramme est minime : 10000 en tout pour une description statistique correcte. Cela correspond à un volume de 0.1 $\mu$L d'une émulsion à une fraction volumique de 5%.

Les mesures de taille en cytométrie cellulaire ou bactérienne classique ne sont pas aisées, à cause de la variabilité des objets étudiés. On peut en général avoir une mesure relative, mais en aucun cas absolue de la distribution de taille. En revanche, les cytomètres sont très efficaces à la fois pour la mesure de fluorescence, mais aussi pour connaître la fluorescence d'une sous-population déterminée par utilisation des fonctions de *gating*. Les gouttes d'émulsion ont l'avantage d'être parfaitement sphériques et une population donnée, même polydisperse, contient toutes les tailles d'objets. Les montages optiques des cytomètres sont très précis et de bonne qualité, et se prêtent assez bien à une intégration numérique de la lumière diffusée telle que la prédit la théorie de Mie, moyennant la connaissance de certains paramètres géométriques tels les ouvertures numériques des détecteurs [1].

Nous avons donc cherché à exploiter complètement le diagramme de diffusion dont l'extension est représentative de la polydispersité, pour ainsi avoir une méthode de caractérisation des émulsions unique, qui permet à la fois la détermination de la distribution de taille et de fluorescence de la population globale non pas à partir d'une mesure moyenne, mais à partir de la moyenne de la mesure de taille et de fluorescence de chaque objet de la population. C'est à notre connaissance la seule méthode qui permet de résoudre à l'échelle d'une goutte, simultanément, une mesure de taille et une mesure biochimique pour des particules colloïdales.

#### 1.2.2.2 Théorie de Mie et Montage Optique

Pour peu que les objets restent sphériques lorsqu'ils passent devant le laser, la théorie de Mie nous permet de connaître exactement la valeur des signaux élémentaires de la lumière diffusée [17]. Pour obtenir la réponse complète du cytomètre, il faut intégrer ces signaux élémentaires en considérant à la fois les divers éléments optiques sur le chemin de la lumière diffusée, mais aussi les ouvertures numériques des détecteurs (Fig. 1.7-*droite*). Les chemins optiques de détection des signaux de diffusion sont relativement peu complexes, toutefois il a été difficile d'obtenir les informations techniques nécessaires de la part du fabricant.
Nous avons utilisé sur le BD Facscalibur le laser à 488nm qui est une source ponctuelle, dont la polarisation est fixée de manière à être parallèle au flux hydrodynamique de l'échantillon. Cette

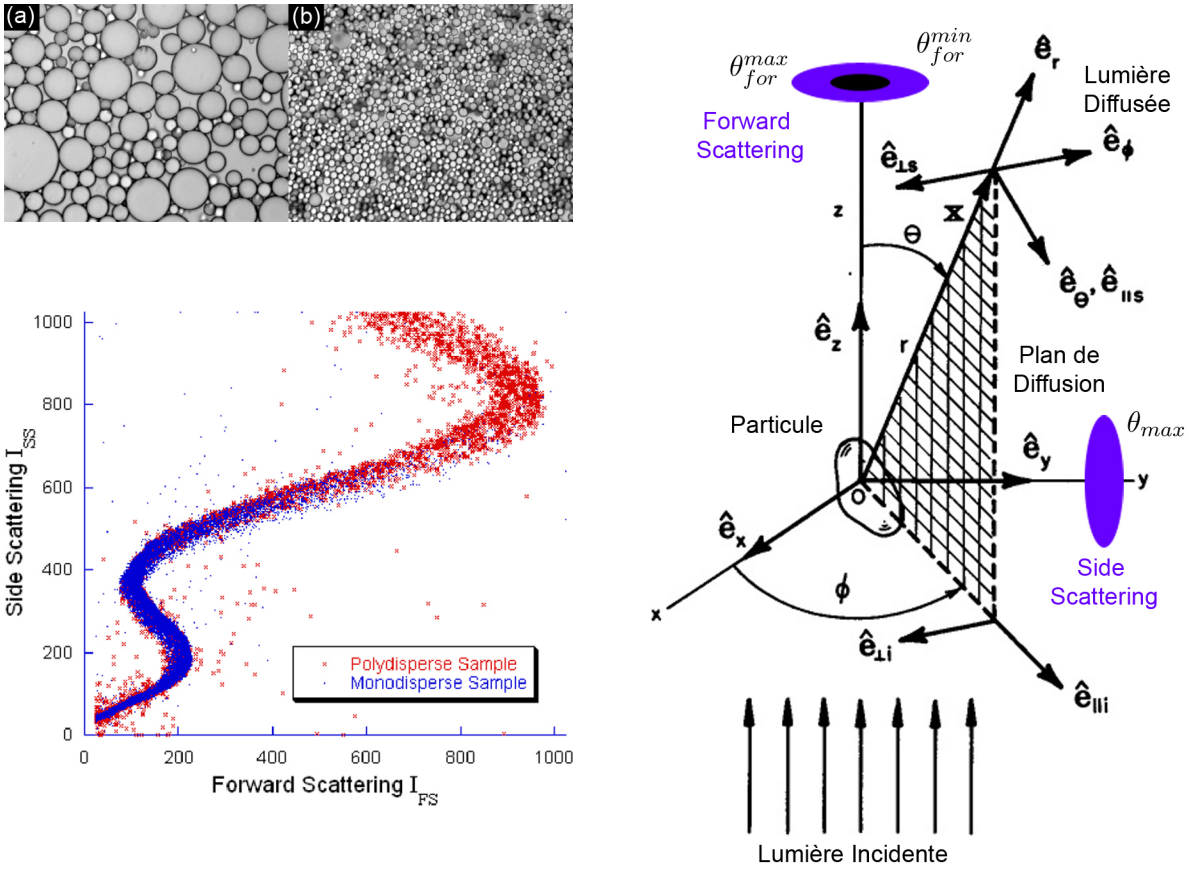



FIG. 1.7 – *Gauche* : Superposition des courbes de cytométrie $I_{SS}(I_{FS})$ un échantillon d'émulsion de soja polydisperse (a) réalisée à la spatule et dont la taille des gouttes d'échelonnent de 1 à 30 microns (rouge), et un échantillon monodisperse (b) dont la taille moyenne est de l'ordre de 5 microns (bleu). On peut remarquer que si les courbes ont le même profil, celle correspondant au lot monodisperse à une étendue plus petite. – *Droite* : Adapté de [17, p. 62]

direction permet d'augmenter la sensibilité de la mesure dans le cadre d'une étude d'objets axisymétriques mais non sphériques (bactéries, etc.) qui s'alignent dans le sens du flux et donc parallèlement à la direction de polarisation.

La lumière diffusée vers l'avant est détectée par une photodiode précédée d'un filtre de manière à ne mesurer que l'intensité à 488 nm. Pour éviter d'être aveuglée par la lumière incidente, un obturateur de faible ouverture numérique est fixé devant la photodiode que l'on sait axisymétrique. On caractérise cette dernière par deux ouvertures numériques : $\theta_{for}^{min} \sim 0,7^{\circ}$ pour l'obturateur

et $\theta_{for}^{max}$ pour le bord externe de la photodiode.

La lumière diffusée sur le coté est récupérée par un objectif à huile dont l'angle d'ouverture est de $\theta_{max} = 52.38^{\circ}$ puis son intensité est mesurée par un photomultiplicateur. Sur le chemin optique en sortie de l'objectif, la lumière est réfléchie par une séparatrice à angle de Brewster 90/10 puis fitrée à 488 nm. Cette lame réfléchit 10% de la lumière diffusée ayant la même composante de polarisation que le faisceau incident. Le reste de la lumière est transmis pour être ensuite filtré et mesuré en tant qu'intensité de fluorescence.

Quand une particule de rayon $r_p$ est éclairée par une onde électromagnétique $\overrightarrow{E}_i e^{kz-\omega t}$ de longueur d'onde $\lambda = 488nm$ et de pulsation $\omega$ se propageant suivant l'axe $z$, la relation entre l'onde diffusée $\overrightarrow{E}_s \begin{pmatrix} E_{\parallel s} \\ E_{\perp s} \end{pmatrix}$ et l'onde incidente $\overrightarrow{E}_i \begin{pmatrix} E_{\parallel i} \\ E_{\perp i} \end{pmatrix}$ peut s'écrire :

$$\begin{pmatrix} E_{\parallel s} \\ E_{\perp s} \end{pmatrix} = \frac{e^{ik(r-z)}}{-ikr} . \begin{pmatrix} S_2 & 0 \\ 0 & S_1 \end{pmatrix} . \begin{pmatrix} E_{\parallel i} \\ E_{\perp i} \end{pmatrix} \tag{1.3}$$

où $E_{\parallel}$ et $E_{\perp}$ sont respectivement les composantes parallèles et perpendiculaires au plan de diffusion. $S_1$ et $S_2$ sont les éléments de la matrice d'amplitude de diffusion. Dans le référentiel attaché au vecteur de diffusion, on peut écrire :

$$\overrightarrow{E}_s = \frac{e^{ik(r-z)}}{-ikr} . \overrightarrow{X} . E_i \text{ avec } \overrightarrow{X} = (S_2 \cos\phi) \overrightarrow{e}_{\parallel s} + (S_1 \sin\phi) \overrightarrow{e}_{\perp s}$$

Dans le cas de la lumière diffusée vers l'avant, l'axe $z$ est un axe de symétrie, donc l'expression de l'intensité s'écrit comme l'intégrale sur le détecteur, défini par les angles $\theta_{for}^{min}$ et $\theta_{for}^{max}$, du module du champ diffusé. Comme nous ne connaissons pas les intensités réelles ni les correspondances de gains des détecteurs, on considère un terme $\alpha_{for}$ homothétique qui tient compte de tous ces termes de proportionnalité.

$$I_{FS} = \frac{2\pi\alpha_{for}}{k^2} \int_{\theta_{for}^{min}}^{\theta_{for}^{max}} \frac{1}{2}(S_1^2 + S_2^2) \sin\theta d\theta \tag{1.4}$$

Les angles d'ouverture de la photodiode $\theta_{for}^{min}$ et $\theta_{for}^{max}$ dépendent des spécifications de chaque instrument, ainsi que des réglages de mise en service et ne nous sont pas accessibles. Nous savons juste que $\theta_{for}^{min} \sim 0,7^{\circ}$ et que $3^{\circ} \leq \theta_{for}^{max} \leq 10^{\circ}$ et nous devrons donc les ajuster numériquement.

Pour calculer la valeur de $I_{SS}$ et puisqu'il n'y a pas dans ce cas d'axe de symétrie, l'intégration doit se faire sur les angles $(\theta, \phi)$. Si on suppose que la section du détecteur est circulaire, alors la relation en $\theta$ et $\phi$ s'exprime comme

$$\phi = \arcsin(\frac{\sin\theta_{max}}{\sin\theta_{min}}) \tag{1.5}$$

L'angle $\theta_{max}$ est donné par l'expression de l'ouverture numérique ($n.a. = n_{glass}\sin\theta_{max}$) de l'objectif collecteur et vaut $\theta_{max} = 52.38^{\circ}$. La lumière diffusée traverse une séparatrice à angle de Brewster, donc seule la composante parallèle au flux de l'échantillon (suivant $\overrightarrow{e}_x$), est réfléchie et mesurée. En considérant là encore un paramètre d'intensité $\alpha_{side}$ :

$$I_{SS} = \frac{\alpha_{side}}{k^2}\int_{\frac{\pi}{2}-\theta_{side}}^{\frac{\pi}{2}+\theta_{side}}\int_{\frac{\pi}{2}-\phi(\theta)}^{\frac{\pi}{2}+\phi(\theta)} |\overrightarrow{X}\overrightarrow{e}_x|^2 \sin\theta d\theta d\phi \tag{1.6}$$

avec

$$|\overrightarrow{X}\overrightarrow{e}_x|^2 = |S_2|^2\cos^4\phi\cos^2\theta + |S_1|^2\sin^4\phi + (S_2S_1^* + S_1^*S_2)\cos^2\phi\sin^2\phi\cos\theta \tag{1.7}$$

Dans les équations précédentes, pour obtenir une simulation correcte de la courbe $I_{SS}(I_{FS})$, plusieurs paramètres doivent être considérés comme des variables à ajuster, du fait qu'ils sont soit totalement inconnus ($\alpha_{for}$ et $\alpha_{side}$), soit grossièrement déterminés ($\theta_{for}^{min}$ et $\theta_{for}^{max}$). Pour obtenir une plus grande précision, nous avons choisi de considérer l'indice des objets $n_{oil}$ comme une cinquième variable d'ajustement. Dans le reste du document, nous ne donnerons pas explicitement les valeurs d'ajustement $\alpha_{for}$ et $\alpha_{side}$, celles-ci dépendant des réglages des détecteurs qui peuvent varier d'une journée d'expérience à l'autre. Nous avons de plus fait le choix de normaliser les intensités diffusées sur 1024 canaux comme le fait un appareil réel.

Nous avons représenté sur la figure 1.8-*gauche* les intensités de diffusion $I_{SS}(r_p)$ et $I_{FS}(r_p)$ pour une population de gouttes dont le rayon varie de 0 à 4000 nm (le diamètre varie de 0 à 8 microns). Les courbes représentées ont été obtenues en prenant pour paramètres ajustables : $\theta_{for}^{min} = 0,716^{\circ}$ , $\theta_{for}^{max} = 3,954^{\circ}$ et $n_{oil} = 1.468$. Les paramètres angulaires sont cohérents à la fois avec les spécifications générales de l'appareil et avec des spécifications plus précises obtenues du constructeur. L'indice ajusté est proche de l'indice réel de l'huile de soja que nous utilisons. La courbe de diffusion vers l'avant $I_{FS}(r_p)$ en rouge est non monotone alors que la courbe $I_{SS}(r_p)$ l'est. Cette non monotonie est liée au fait que la longueur d'onde du laser est petite devant la taille des gouttes.

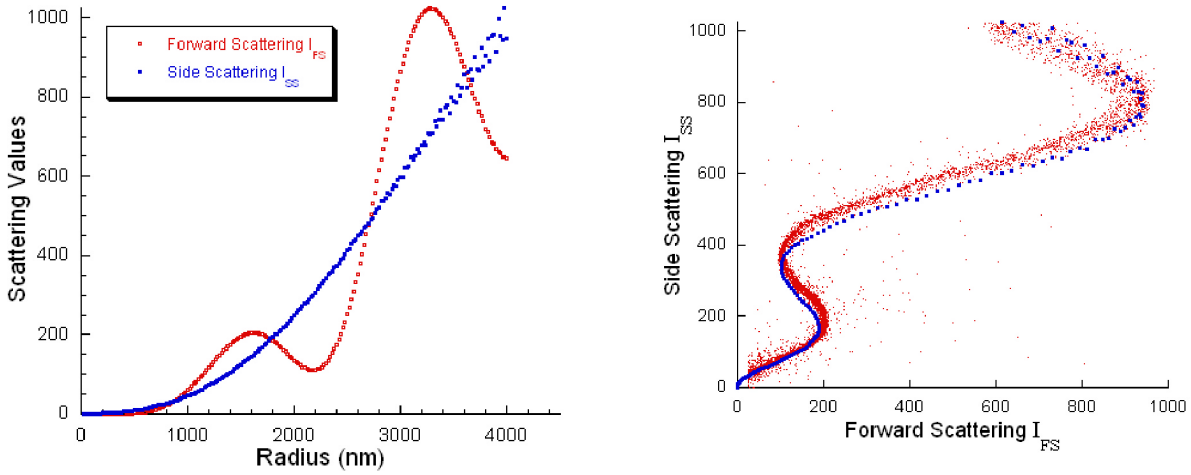



FIG. 1.8 – *Gauche* : Représentation de l'intensité de diffusion vers l'avant (rouge) et sur le coté (bleu) en fonction du rayon des gouttes (nm) calculée à partir de l'intégration de l'intensité élémentaire ssuivant les caractéristiques optiques du cytomètre. La diffusion vers l'avant est clairement non monotone. Les paramètres de calcul de cette courbe sont les paramètres ajustés aux données réelles : $\theta_{for}^{min} = 0,716^\circ$ , $\theta_{for}^{max} = 3,954^\circ$ et $n_{oil} = 1.468$. – *Droite* : Superposition de la courbe $I_{SS}(I_{FS})$ pour les mêmes paramètres d'ajustement avec une courbe de mesure. La courbe est similaire à la courbe expérimentale.

Nous donnons des paramètres ajustables avec une précision de 3 chiffres après la virgule, ce qui peut sembler excessif, notamment pour l'indice de réfraction de l'huile. Dans le cas classique de la diffusion statique de la lumière telle qu'elle est utilisée par des appareils comme le Malvern Mastersizer, une précision de l'indice de deux chiffres après la virgule est largement suffisante. Il faut encore une fois noter que les techniques de diffusion statiques sont des techniques de mesure en moyenne : dans notre cas, un changement de la troisième décimale de l'indice implique une modification substantielle du signal de diffusion. En effet, en cytométrie, nous voulons ajuster une courbe continue pour des gouttes dont la taille varie de moins de un micron à dix microns : cela nécessite une précision plus grande sur les paramètres.

Quand le cytomètre est utilisé avec des particules biologiques, leur ratio d'indice vis-à-vis du milieu de suspension est très proche de 1. Ce sont donc des objets très peu diffusants, malgré leur relative grande taille (une cellule a un diamètre typique de 10-20 microns). L'interprétation communément admise des signaux de diffusion consiste à associer la diffusion vers l'avant à la taille des objets et la diffusion sur le coté à leur "granulosité" ou plus exactement leur forme. Dans notre cas, c'est exactement l'inverse. La diffusion sur le coté est monotone en fonction de

la taille, ce qui n'est pas le cas de la diffusion vers l'avant.

Pour trouver les paramètres qui donnent le meilleur ajustement, nous avons choisi comme variable à minimiser la distance totale de la courbe calculée à la courbe de diffusion mesurée. Pour chaque point de mesure, nous avons considéré le point calculé le plus près, déterminé par la routine de calcul dont l'illustration graphique est donnée par la figure 1.9. Sur la figure 1.8-*droite*, nous avons superposé la courbe simulée $I_{SS}(I_{FS})$ précédente (points bleus) avec une courbe réelle (points rouges) mesurée pour la population de gouttes polydisperses.

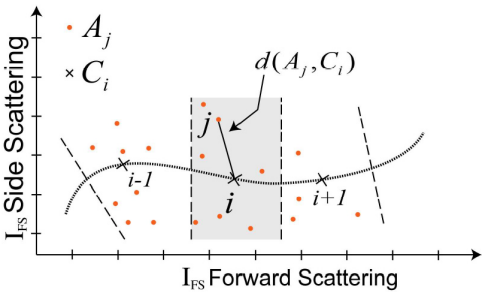



FIG. 1.9 – Représentation schématique du calcul de la distance élémentaire entre chaque point de mesure $A_j$ et les points de la courbe ajustée $C_i$. En gris, nous avons souligné l'ensemble des points de mesure qui sont les plus proches d'une point ajusté dont on connaît le rayon correspondant. La détermination de ces classes statisiques permet de reconstituer la distribution granulométrique de l'échantillon.

En quelques mots, nous pouvons donner aux points de mesure dans le graphe $I_{SS}(I_{FS})$ les coordonnées $\{A_j\,(FS_j^{meas}, SS_j^{meas})\}_{i=1..m}$. Si nous considérons un ensemble de particules de rayons $(r_1, .., r_n)$, nous pouvons calculer d'après le paragraphe 1.2.2.2 les valeurs des points $\{B_i\,(FS_i^{th}, SS_i^{th})\}_{i=1..n}$ du meilleur ajustement numérique de la courbe (bleu). Si l'on se souvient que dans la zone correspondant aux grosses particules, la diffusion sur le coté présente des oscillations, il est judicieux de considérer un ajustement polynômial de l'ensemble des points $\{B_i\}_{i=1..n}$ que l'on notera $\{C_i\,(FS_i^{poly}, SS_i^{poly})\}_{i=1..n}$. La distance totale est donnée par $D = \sum_{j=1}^{m} min(d(A_j, C_i)_{i=1..n}$ et dépend des cinq paramètres ajustables décrits précédemment : $\theta_{for}^{min}$, $\theta_{for}^{max}$, $\alpha_{for}$ et $\alpha_{side}$ et $n_{oil}$. La norme de distance choisie est la distance quadratique élevée au carré, ce qui permet d'augmenter le poids statistique des points éloignés de la courbe calculée. La méthode de minimisation a été effectuée sous Matlab à l'aide d'un algorithme de type Simplex.

### 1.2.3 Exploitation des courbes

#### 1.2.3.1 Analyse granulométrique

Pour une courbe $I_{SS}(I_{FS})$, nous sommes capables d'attribuer à chaque point une taille de goutte grâce aux développements numériques explicités plus hauts. Si l'on compare la courbe obtenue pour un lot d'émulsion monodisperse et un lot polydisperse, on voit très clairement que la courbe

de diffusion du lot monodisperse ne décrit pas le S complètement.

Il est donc possible d'utiliser la densité de points locale pour déduire du diagramme $I_{SS}(I_{FS})$ la distribution de taille exacte de l'échantillon étudié. La méthode retenue est très simple : on attribue à chaque point de la courbe de mesure (rouge) le point de l'ajustement le moins éloigné (bleu) dont on connaît le rayon $r_p$ qui l'a engendré.

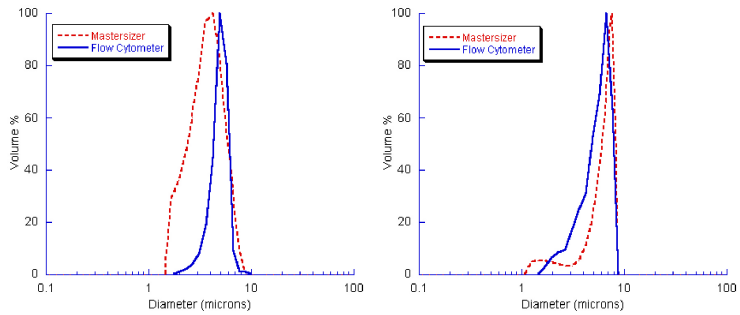



FIG. 1.10 – Comparaison des distributions de taille (en volume) obtenues par notre méthode numérique (bleu) et un Malvern Mastersizer (rouge) pour un lot d'émulsion monodisperse (*gauche*) et un lot polydisperse (*droite*). Les distributions sont en accord entre les deux techniques. Le cytomètre ne permet pas de mesurer des tailles supérieures à 8 microns.

Nous avons représenté sur la figure 1.10 les distributions granulométriques données en pourcentage volumique en fonction du diamètre de l'échantillon d'émulsion monodisperse (*gauche*, bleu) et polydisperse (*droite*, bleu)obtenues à partir de notre technique numérique d'exploitation des courbes de diffusion du FACS. Nous avons superposé à ces courbes les granulométries mesurées à l'aide d'un appareil de mesure de diffusion statique (Malvern MasterSizer).

Concernant les courbes de gauche du lot monodisperse, on voit que les distributions ont la même valeur moyenne, mais une polydispersité différente. Le Mastersizer donne une polydispersité plus importante. À la différence de notre méthode, les appareils de diffusion statique ne donnent pas la distribution réelle (cf. A.2).

Les courbes granulométriques du lot polydisperse ne représentent que les gouttes dont le diamètre est inférieur à 10 microns. Avec les réglages que nous avons utilisés sur le cytomètre, il ne nous est pas possible de visualiser les paramètres de diffusion pour les plus grosses gouttes. Là encore, les distributions coïncident très bien.

Dans le domaine de taille dans lequel nous travaillons pour les mesures d'adhésion, à savoir des gouttes dont la taille moyenne est de l'ordre de 5 microns, la cytométrie est la méthode idéale

pour évaluer la distribution de taille exacte de l'échantillon.

#### 1.2.3.2 Analyse de la fluorescence

Pour valider notre méthode, nous avons étudié en cytométrie un échantillon d'émulsion de soja polydisperse dans lequel nous avons dissous dans l'huile à une concentration proche de $10^{-4}$ M un fluorophore lipophile solvatochromique, le Nile Red, dont les spectres d'excitation et d'émission sont très larges et compatibles avec la longueur d'onde du laser du cytomètre.

À partir de la mesure de fluorescence de chaque goutte et du calcul de son rayon basé sur la mesure des paramètres de diffusion, il est possible d'exprimer la relation entre l'intensité de fluorescence et le rayon (Fig. 1.11-*gauche*). Pour plus de clarté, nous avons représenté sur la figure 1.11-*droite* l'intensité de fluorescence mesurée en fonction du rayon au cube. On constate que la courbe de droite est linéaire, ce qui est en accord avec le fait que le fluorophore est dispersé en volume dans les gouttes. Dans le cas des gouttes colorées par du Nile Red, nous n'avons pas réalisé précisément un étalonnage de la fluorescence car nous voulions juste valider la méthode de mesure.

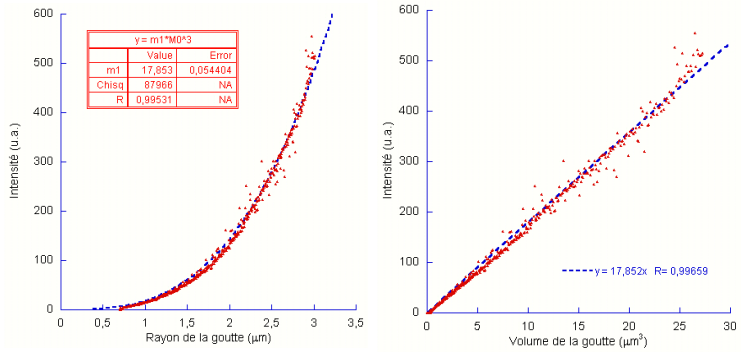



FIG. 1.11 – Représentation de l'intensité de fluorescence de gouttes teintées en volume par du Nile Red en fonction du rayon (*gauche*) et du rayon élevé au cube (*droite*). Ces courbes confirment la validité de l'analyse du rayon des gouttes et sont en accord avec une dispersion du fluorophore en volume dans l'huile.

Nous avons construit une méthode qui permet pour chaque goutte de connaître simultanément sa taille et sa fluorescence. Pour pouvoir maintenant effectuer une mesure absolue de la quantité de protéines à la surface, nous devons pouvoir étalonner le signal de fluorescence par rapport à une référence[2]. Dans le cas qui nous interesse, à savoir la fonctionnalisation en surface des gouttes, nous fixons les concentrations en volume très précisément, mais nous n'avons aucune

[2]On trouve à cette adresse : http ://www.cytometry.be/Cours2002/LAQUANTI.pdf une notice très intéressante résumant de manière claire les différentes méthodes utilisées en biologie pour quantifier une mesure de fluorescence en cytométrie

idée du rendement de la réaction. Nous allons donc, à partir de protéines fluorescentes, comparer l'intensité des gouttes à des particules solides de fluorescence tabulée.
Tous les constructeurs de cytomètres commercialisent des kits de quantification qui sont en fait des lots de billes de polymère (polystyrène dans notre cas) teintées en masse avec des concentrations calibrées en fluorophore, par exemple du FITC. [3].

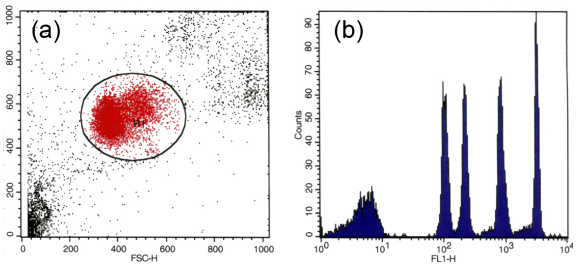



FIG. 1.12 – Diagramme de diffusion (gauche) et histogramme de fluorescence (droite) relatifs au kit de quantification Quantum FITC MESF (Premix) High Level distribué par Bangs Labs. L'histogramme de la population rouge représente la fluorescence des singulets dans le diagramme de gauche. Les cinq distributions de fluorescence correspondent à des quantités de fluorophores différentes et calibrées.

Nous avons représenté sur la figure 1.12-a le diagramme de diffusion du lot de calibration. La tache rouge centrale correspond aux billes qui sont sous la forme de singulets, soit celles qui sont exploitables en fluorescence. Les points en haut à droite correspondent à des agrégats de billes, inévitables avec le temps de stockage, et les points en bas à gauche sont des impuretés qui se sont développées dans le tampon.
Sur le graphe 1.12-b, nous avons représenté l'histogramme de fluorescence de la population rouge en coordonnées logarithmiques, qui fait apparaître 5 distributions de fluorescence distinctes et très fines. Le lot dont la distribution de fluorescence est la plus faible correspond à des billes sans fluorophores, donc totalement *blanches*.
Le fabricant des billes donne les quantités de fluorophores Q correspondant à chaque pic, et nous mesurons la valeur de fluorescence avec notre appareil et nos réglages d'illumination et de détection. Si on trace la quantité Q en fonction de l'intensité mesurée (Figure 1.13, axe de gauche), on obtient une droite de conversion entre les deux valeurs.

La streptavidine fluorescente que nous utilisons est fonctionnalisée par un nombre de FITC compris entre 8 et 12 unités. Nous avons tracé sur la figure (Figure 1.13, axe de gauche) le nombre de streptavidines par objet en fonction de l'intensité mesurée. Avec le kit et ces réglages du cytomètre, il est possible de mesurer jusqu'à 60000 streptavidines par goutte.

[3]Nous avons utilisé le kit **Quantum FITC MESF (Premix) High Level** distribué par Bangs Labs sous la référence 825pA : `http://www.bangslabs.com/flow/catalog.php`

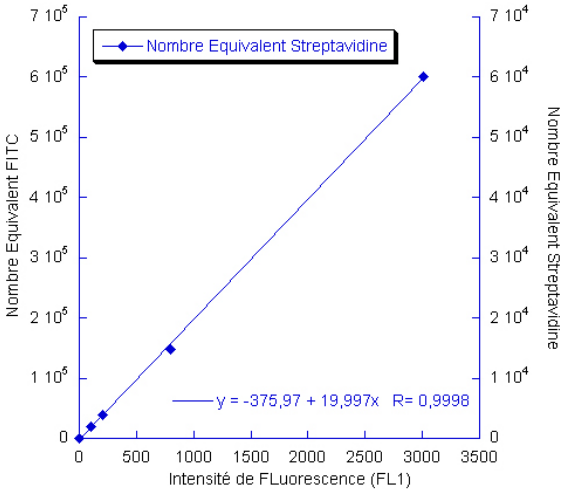



FIG. 1.13 – Droite de calibration entre le nombre d'équivalents en FITC (axe de gauche), le nombre de streptavidines FITC et l'intensité de fluorescence mesurée en cytométrie. Le facteur de conversion entre équivalents FITC et nombre de protéines est fixé par le ratio de fluorophores FITC portés par les streptavidines, et qui se situe aux alentours de 10 unités.

Malgré l'apparente simplicité de la méthode de quantification, les résultats obtenus peuvent légèrement différer de la valeur réelle en protéines, premièrement parce que les billes de polymère sont teintées en masse, et que nous faisons une mesure d'intensité de surface dans le cas des gouttes d'émulsion ; et deuxièmement parce que le nombre de fluorophores par protéine n'est pas connu de manière précise, et peut varier de plus de 30% par rapport à la valeur annoncée.

#### 1.2.3.3 Suivi du vieillissement de l'émulsion

Les émulsions que nous utilisons sont réalisées à partir d'une huile végétale (soja) pour des raisons de praticité et de stabilité. Les huiles végétales sont composées d'un mélange d'acides gras dont certains sont insaturés et peuvent présenter une ou deux doubles liaisons.
La stabilité des émulsions de soja est assurée à la fois par la présence de tensioactifs hydrophiles (F68 et Tween20), par la forte concentration en triglycérides et par l'existence d'une acidité libre qui charge négativement les gouttes.

Les mécanismes de rancissement des huiles végétales sont complexes [82] et font intervenir un nombre d'étapes et de sous produits qui ne sont bien souvent que très peu caractérisés. En revanche, il est connu que la lumière et l'oxygène sont deux facteurs de dégradation très importants. Les réactions des molécules de l'huile avec l'oxygène sont d'autant plus importantes que dans une émulsion, la surface de contact entre l'huile et l'eau est très grande et que l'eau est un très bon milieu pour solubiliser le dioxygène de l'air. Dans ces conditions, avec le temps, les

acides polyinsaturés (en fait, surtout les acides à double insaturation comme l'acide linolénique) ont tendance à se dégrader pour former des cétones qui sont responsable notamment de l'odeur de ranci bien connue de tous.

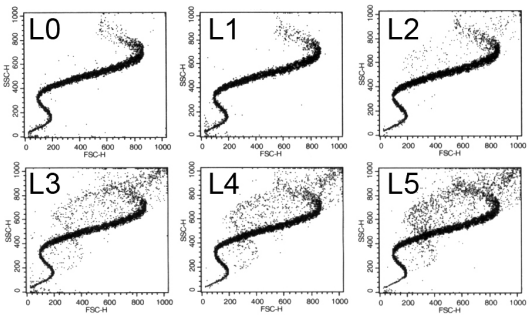



FIG. 1.14 – Évolution de la figure de diffusion SS vs. FS pour une population de gouttes d'émulsions de soja en fonction du nombre de rinçages (de L0 à L5). L'émulsion fait partie d'un lot fabriqué 6 mois avant la mesure et conservé dans le noir à température ambiante. Les rinçages de la phase continue sont effectués avec un tampon phosphate 20mM + 0,2%$_{w/w}$ de Tween20. La figure en S caractéristique que nous avons détaillée est toujours présente, mais on voit apparaître les agrégats en dehors du S.

La cytométrie en flux peut être utilisée comme une méthode de caractérisation de fluorescence et de taille, mais donne aussi des informations sur le vieillissement des lots d'émulsion avec le temps. En effet, la dégradation des espèces polyinsaturées avec le temps et l'exposition à l'oxygène fait diminuer le potentiel de surface des gouttes. Au cours des étapes de fonctionnalisation que nous présenterons dans le chapitre suivant, nos sommes amenés à effectuer des rinçages de la phase continue qui sont responsables de la désorption du peu d'acides libres restant à la surface. Nous avons représenté sur la figure 1.14 l'évolution des diagrammes de diffusion pour un lot d'émulsion vieille de plusieurs mois en fonction du nombre de rinçages de la phase continue. On voit qu'en plus de la courbe en S que nous avons explicité apparaissent des points hors du S sur le diagramme. Ces points correspondent à la formation de multiplets à la suite d'une adhésion non spécifique entre les gouttes.

## 1.3 Fonctionnalisation de la surface

La fonctionnalisation des gouttes d'émulsion s'effectue en deux étapes : la première, à partir d'une concentration en volume $C_{biot}$ en Biotine-$(PEO)_3$-$NH_2$ , permet de fixer une densité $\Gamma^g_{biot}$ de biotine sur la surface. La seconde consiste à laisser incuber les gouttes avec un excès de streptavidine qui permettra d'avoir à l'interface une densité $\Gamma^g_{sa}$ de protéines.

En cytométrie, nous ne pouvons pas mesurer la densité de biotine, mais nous mesurons la densité de streptavidine. Nous avons donc accès, pour une densité $\Gamma^g_{biot}$ donnée, à la densité maximale de streptavidine qu'une goutte peut fixer. En anglais, cette densité est nommée *binding capacity*. Rien n'assure *à priori* que les deux densité $\Gamma^g_{biot}$ et $\Gamma^g_{sa}$ coïncident. Du point de vue de la biochimie des surfaces, c'est en revanche le seul paramètre pertinent à connaître puisqu'il renseigne sur l'activité effective de la surface vis-à-vis de ses capacités adhésives.

### 1.3.1 Matériaux

**Tampons de biotinylation** Les deux étapes de la réaction de biotinylation s'effectuent dans un tampon phosphate 10mM de pH=7,2 (Force ionique : 20 mM) dans lequel nous avons dissous $\Phi_{Tw} = 0,2\%_{m/m}$ de Tween 20, un tensioactif non-ionique (Polyoxyethylenesorbitan monolaurate, Sigma-Aldrich, 93773) dont la CMC dans l'eau est de 0,07 $\%_{m/m}$.

**Tampons de fixation de la streptavidine** La fixation de streptavidine sur les gouttelettes présentant de la biotine à la surface est réalisée dans un tampon MES (pH=5,5 et force ionique : 20 mM) contenant $\Phi_{Tw} = 0,2\%_{m/m}$ de Tween 20. Le pH de 5,5 a été ajusté expérimentalement par rapport à la meilleure efficacité de fixation, qui tient compte du potentiel de surface des gouttes et du point isoelectrique de la streptavidine.

**Agent de couplage** La présence d'acides carboxyliques ne laisse pas beaucoup le choix dans la chimie de couplage. En solution aqueuse, nous utilisons un mélange d'EDAC (Sigma-Aldrich, E6383) et de sNHS ou Sulfo,N-hydroxysuccinimide (Fluka, 56485) comme agent stabilisant de l'espèce activée. La solution d'activation est un mélange de 0,01g de sNHS et de 0,06g d'EDAC dans 100 $\mu$L de tampon Phosphate/Tween20 .

**Biotine fonctionnalisée** Nous avons utilisé de la Biotine-$(POE)_3$-$NH_2$ (MW=374,50 g/mol )fournie par la société Interchim. La taille du bras espaceur $(POE)_3$ (aussi appelé LC pour *Long Chain*) est de l'ordre de 20 Å. La biotine-LC-amine est diluée dans un tampon Phosphate/Tween20 et stockée à -20˚C

**Streptavidine** Nous avons utilisé de la streptavidine non modifiée (Sigma-Aldrich) ainsi que de la streptavidine couplée à différents agents fluorescents (FITC-Interchim, Alexa 555-Invitrogen/MolecularProbes)

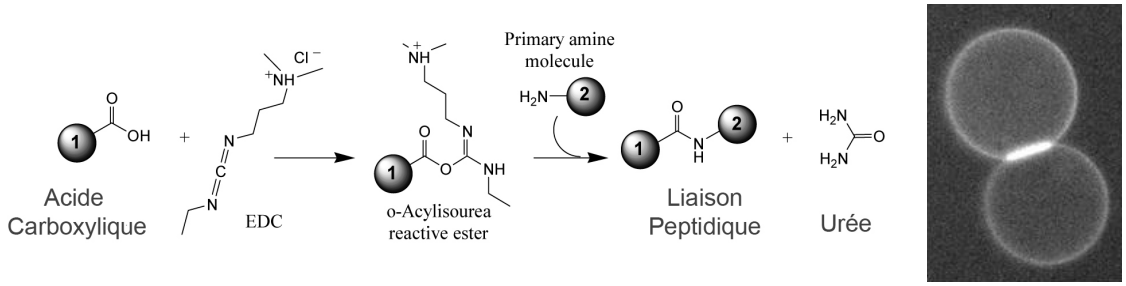



FIG. 1.15 – Schéma réactionnel du protocole de fonctionnalisation en deux étapes que nous avons mis en œuvre. A droite : Image en microscopie de fluorescence de gouttes d'émulsions avec de la streptavidine à leur surface.

### 1.3.2 Étape 1 - Liaison de la biotine : Étape d'activation

Dans un tube *eppendorf* de 500 $\mu$L , on dilue 16 $\mu$L d'émulsion calibrée à $\Phi_{Emulsion} = 60\%_{m/m}$ dans 184 $\mu$L de tampon Phosphate/Tween20 . La fraction massique d'émulsion à fonctionnaliser est donc de $\Phi_{Emulsion} = 5\%_{m/m}$. La concentration initiale en Synperonic PE/F68 était de 1%. Après dilution, elle est d'environ 0,05 %, soit de l'ordre de 0,5 CMC.
On ajoute 50$\mu$L de la solution d'activation, puis on laisse réagir pendant 30 minutes à l'abri de la lumière sur un agitateur rotatif.

Le tube est ensuite centrifugé à environ 2000 $G$ pendant une dizaine de secondes avec une centrifugeuse de paillasse, puis on récupère à l'aide d'une pointe fine de micropipette 220 $\mu$L de la phase sous-nageante qui contient la solution qui n'a pas réagi. On ramène le volume à 200 uL en ajoutant 170 $\mu$L de tampon Phosphate/Tween20 .

| $C_{Biot}$ (mg/mL) | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|---|---|---|---|---|---|
| $C_{Biot}$ Diluée (mol/L x $10^{-3}$) | 2.670 | 5.340 | 8.011 | 10.680 | 13.351 |

TAB. 1.1 – Tableau de correspondance entre les conditions de greffage de la biotine et les concentrations de réaction

### 1.3.3 Étape 2 - Liaison de la biotine : Liaison Covalente

On ajoute ensuite un volume de 50 $\mu$L de solution de Biotine-$(PEO)_3$-$NH_2$ diluée dans du tampon Phosphate/Tween20 à une concentration $C_{Biot}$ comprise entre 1 et 5 mg/mL (le tableau 1.1 donne les correspondances avec les concentrations effectives après dilution). La réaction s'effectue sur un agitateur rotatif pendant 30 minutes à l'abri de la lumière.

La suspension de gouttes est maintenant lavée sept fois, en centrifugeant et en prélevant à chaque lavage 220 $\mu$L de phase sous-nageante et en complétant par 220 $\mu$L de tampon Phosphate/Tween20 . Lors du dernier lavage, on complète en ajoutant uniquement 170 $\mu$L de tampon pour ramener la suspension à une fraction $\Phi_{Emulsion} = 5\%_{m/m}$ et au volume initial de 200 $\mu$L .

### 1.3.4 Étape 3 - Fixation de la streptavidine

L'émulsion biotinylée est lavée plusieurs fois de manière à ramener le pH de la solution à 5,4. A ce pH, les interactions répulsives ioniques entre les gouttes et les protéines, dont le point isoélectrique est de 5, sont minimales, ce qui assure une cinétique de fixation rapide. Nous avons vérifié que la densité fixée atteignait un plateau en un temps toujours inférieur à 15 minutes.

De manière à maximiser le nombre d'échantillons de gouttes portant des densités différentes de streptavidine pour une même lot d'émulsion biotinylée, nous avons toujours prélevé 10 $\mu$L de la dispersion mère de gouttes biotinylées, à laquelle nous ajoutons un certain volume de solution de streptavidine dans du tampon MES/Tween20 afin que le volume total soit de 40 $\mu$L .

A la fin de la réaction, on prélève directement dans le volume réactionnel quelques microlitres d'émulsion, dont on n'a pas rincé la phase continue contenant des streptavidines fluorescentes résiduelles,et on dilue dans 1 mL de PBS. On quantifie la densité de streptavidine en surface à l'aide du cytomètre. Le rinçage de la phase continue après greffage est inutile, puisque les gouttes de la suspension mère sont diluées plus de mille fois avant la mesure, et la dilution de la streptavidine en volume est encore augmentée par l'élongation de la veine liquide par le fluide de gaine de l'appareil.

### 1.3.5 Saturation de l'interface en streptavidine

La densité de streptavidine $\Gamma^g_{sa}$ est fixée par la densité de biotine $\Gamma^g_{biot}$ à partir d'une solution en large excès de protéines dont nous devons déterminer les caractéristiques. Pour cela, nous nous sommes placés dans le cas le moins favorable, c'est-à-dire celui qui correspond à la densité de biotine la plus grande $\Gamma^g_{biot}$, à savoir un lot d'émulsion greffé par de la Biotine-$(PEO)_3$-$NH_2$ à une concentration $C_{Biotine}$=10 mg/mL,
Nous avons ajouté à 10 $\mu$L d'émulsion biotinylée ainsi lavée de 1 à 5 $\mu$L de solution de streptavidine à la concentration 0,1 mg/mL, puis nous avons complété par du tampon MES/Tween20

jusqu'à un volume de 40 $\mu$L . Au bout de 15 minutes d'incubation et l'ajout de 120 $\mu$L de tampon Phosphate/Tween20 de manière à arrêter la réaction, nous avons mesuré la densité de streptavidine que nous avons représentés sur la figure 1.16 pour des gouttes de 5 microns de diamètre à l'aide du cytomètre.

Nous constatons clairement que dans le cas expérimental où la densité de biotine à la surface est la plus grande, il suffit d'un volume de 5 $\mu$L de streptavidine à 0,1 mg/mL pour saturer l'ensemble des biotines. **C'est ce volume et cette concentration en streptavidine que nous utiliserons dans tous les cas de greffage.**

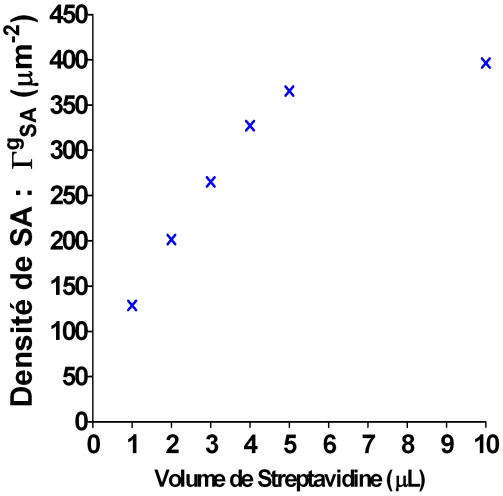



FIG. 1.16 – La représentation densité de streptavidine fixée en fonction de la quantité initiale de streptavidine en volume montre une saturation. Réalisée pour une concentration de greffage en Biotine-$(PEO)_3$-$NH_2$ de 10 mg/mL, cette courbe indique que la quantité maximale de streptavidine à la surface des gouttes, pour une temps d'incubation de 15 min, est atteinte pour un volume de 5 $\mu$L de streptavidine à 0.1 mg/mL

Dans le cas des lots de gouttes avec lesquels nous avons effectué les expériences d'adhésion, nous avons réalisé 3 rinçages de plus, en enlevant 180 $\mu$L de sous-nageant et en ajoutant le même volume de tampon Phosphate/Tween20 puis un dernier rinçage en ôtant 180 $\mu$L de sous-nageant et en ajoutant 330 $\mu$L de tampon Phosphate/F127 .

### 1.3.6 Densité de streptavidine sur les gouttes en fonction de la taille

Dans les même conditions de concentration en streptavidine que précédemment, nous avons étudié à l'aide du cytomètre la dépendance de la densité de streptavidine en fonction de la taille des gouttes. En effet, nous avons vu que le cytomètre pouvait nous donner une mesure absolue (moyennant un étalonnage) du nombre de streptavidines pour chaque goutte de l'échantillon.

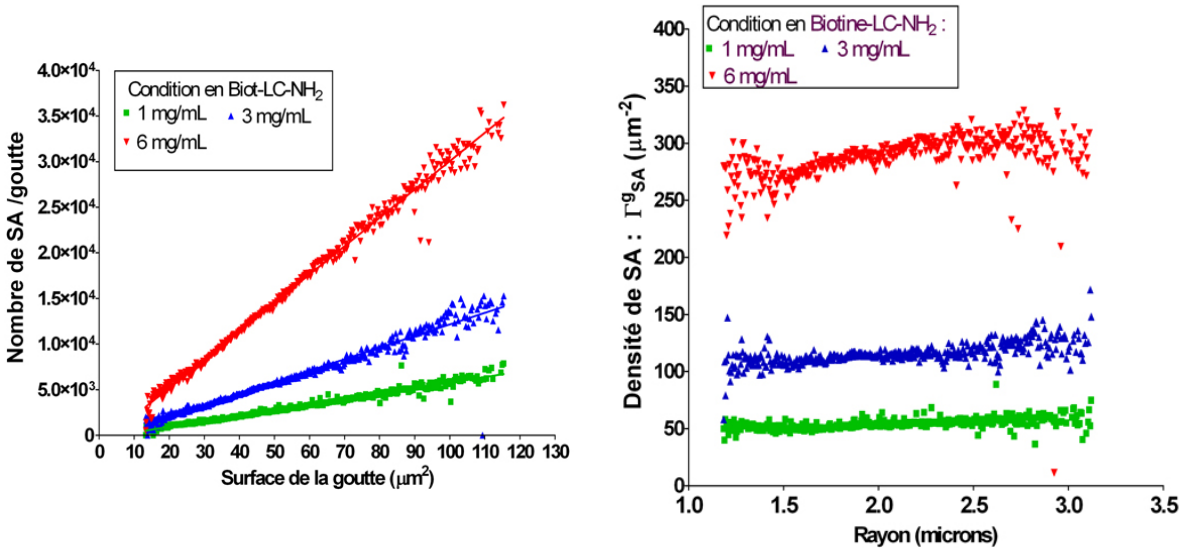



FIG. 1.17 – Dépendance du nombre de streptavidines à la surface des gouttes pour trois conditions de greffage en fonction du rayon des gouttes et de leur surface (*gauche* et *centre*). La répartition des protéines est bien une répartition de surface, attestée par la courbe du centre qui est linéaire. La courbe de droite correspond à l'évolution de la densité de streptavidine à la surface des gouttes en fonction du rayon. Cette densité est constante sur toute la gamme.

Nous avons représenté sur la figure 1.17 pour trois conditions de greffage en Biotine-$(PEO)_3$-$NH_2$ (1, 3 et 6 mg/mL) le nombre de streptavidines par goutte en fonction de la surface des gouttes (*gauche*). Le nombre de protéines varie linéairement avec la surface, indiquant bien une répartition surfacique des streptavidines ainsi qu'un bonne régularité de greffage pour des gouttes de même taille.

Sur la figure 1.17-*droite*, nous avons représenté la densité de streptavidine $\Gamma^g_{sa}$ en fonction de du rayon des gouttes. Dans toutes les conditions de greffage, on voit que la densité est constante sur une gamme de tailles de gouttes allant de 1 à 3 microns de rayon (2 à 6 microns de diamètre). Ainsi, dans la suite, toutes les caractérisations seront données pour des gouttes de rayon égal à la taille moyenne de notre lot d'émulsion, c'est-à-dire 2,5 $\mu$m .

### 1.3.7 Effet des rinçages sur la densité de streptavidine

Nous avons représenté sur la figure 1.18 l'effet du nombre de rinçages au niveau de l'étape 2 de la fixation de biotine sur la densité finale de streptavidine $\Gamma^g_{sa}$. Nous avons appliqué le protocole de streptavidination précédent à des gouttes fonctionnalisées par de la Biotine-$(PEO)_3$-$NH_2$ à 3 mg/mL et 10 mg/mL qui a subi 6, 7 et 8 étapes de rinçages par du Phosphate/Tween20 . On

voit que le nombre de rinçages n'influe pas du tout sur la densité de streptavidine à la surface des gouttes.

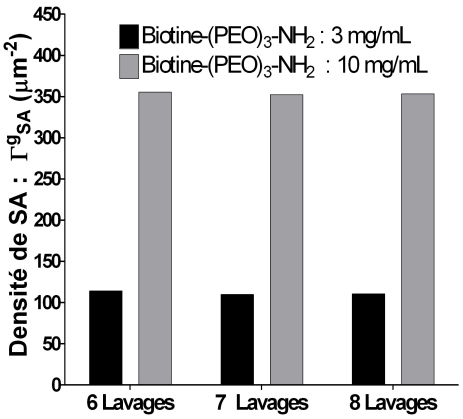



FIG. 1.18 – Pour deux conditions de greffage de Biotine-$(PEO)_3$-$NH_2$ (3 et 10 mg/mL), nous avons mesuré la densité de streptavidine pour évaluer l'influence des rinçages sur la concentration en biotine de surface. Il apparaît clairement que le nombre de rinçages n'influe pas du tout sur la quantité de biotine.

Ceci indique qu'il n'y a pas de désorption des molécules d'acides oléique couplées à de la Biotine-$(PEO)_3$-$NH_2$ due aux changements de phase continue et à la centrifugation . Ce point n'était pas évident à priori, puisque la biotine est liée à une bras espaceur très hydrophile qui aurait pu avoir une influence plus importante sur l'équilibre d'adsorption du complexe tensioactif formé.

### 1.3.8 Désorption de la streptavidine au stockage

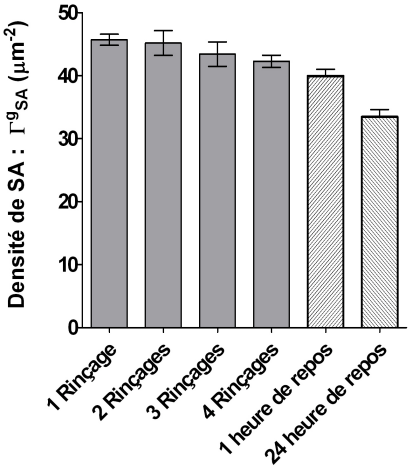



FIG. 1.19 – La mesure de la quantité de streptavidine fixée sur les gouttes montre que les rinçages affectent peu la concentration, mais qu'une diminution de la densité de streptavidine d'environ 30% survient au stockage. On peut en déduire une constante de temps qui est cohérente avec les valeurs de $k_{\text{off}}$ en solution à force nulle pour les couples biotine-streptavidine

Dans le protocole de streptavidination que nous avons consigné dans le paragraphe précédent, nous effectuons avant les expériences d'adhésion un certain nombres de rinçages avec du Phos-

phate/Tween20 puis du Phosphate/F127 de manière à éliminer tout le surplus de streptavidine qui n'aurait pas été fixé par les gouttes, suite à un défaut de biotine.

Nous avons représenté sur la figure 1.19 l'évolution de $\Gamma^g_{sa}$ en fonction du nombres de rinçages des gouttes après l'étape 3. On constate que les rinçages ont très peu d'incidence sur la densité de streptavidine présente sur les gouttes.

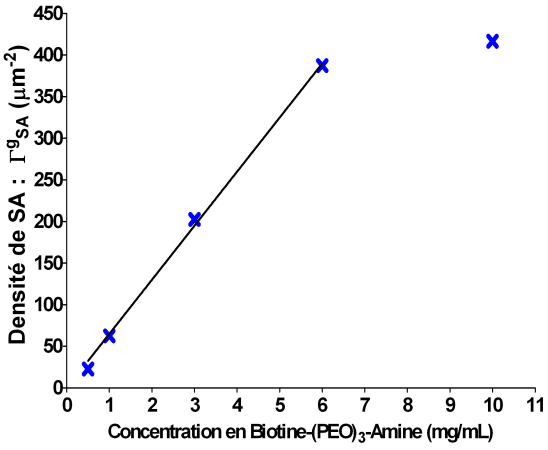
Nous avons aussi regardé comment évoluait cette densité pour des gouttes diluées dans une solution où plus aucune streptavidine ne subsiste, au bout d'une heure et une journée. On remarque dans ce cas une diminution importante de cette densité $\Gamma^g_{sa}$ avec le temps. Nous ne pouvons pas attribuer cette diminution de $\Gamma^g_{sa}$ à de la désorption de l'interface du bloc formé par l'acide oléique, la biotine et la streptavidine puisque nous avons vu que $\Gamma^g_{sa}$ varie peu en fonction du nombre de rinçages.
A partir des valeur de l'histogramme, on peut calculer de manière grossière une constante de temps de désorption en faisant l'hypothèse d'un mécanisme cinétique d'ordre 1. Dans ce cas, on peut écrire :

$$(\Gamma^g_{sa})_{24\text{h}} = (\Gamma^g_{sa})_{\text{initial}} \exp\left(-\frac{24h}{\tau}\right) = (\Gamma^g_{sa})_{4\text{ Lavages}} \exp\left(-\frac{24h}{\tau}\right) \tag{1.8}$$

avec $\tau$ la constante de temps du phénomène de diminution de la densité. Une application numérique nous donne une valeur de $\tau = 88$ heures, qui correspond à l'ordre de grandeur trouvé [53] dans le cas de la dissociation du couple streptavidine/biotine en condition de non compétition (c'est-à-dire lorsque la phase continue ne contient plus de streptavidine libre). En résumé, la diminution de la densité de streptavidine des gouttes lorsque la phase continue ne contient pas du tout de streptavidine est due à la mise à l'équilibre chimique du couple relativement à sa constante d'affinité.

## 1.4 Courbe finale de concentrations

La stratégie de fonctionnalisation de l'interface des gouttes que nous avons choisie consiste, comme nous l'avons détaillé précédemment, à réaliser lors d'une première étape une liaison covalente avec de la Biotine-$(PEO)_3$-$NH_2$ , puis à saturer les groupements biotine à la surface par de la streptavidine en excès en solution.




| $C_{Biot}$ (mg/mL) | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|---|---|---|---|---|---|
| Densité $\Gamma^g_{sa}$ | 65 | 130 | 195 | 260 | 325 |

FIG. 1.20 – Variation de $\Gamma^g_{sa}$ en fonction de $C_{Biot}$. La courbe montre qu'il n'y a pas d'adsorption de la streptavidine sur la surface des gouttes. De plus $\Gamma^g_{sa}$ croît linéairement jusqu'à 400 $\mu m^{-2}$ puis sature au delà de 6 mg/mL.

La densité de streptavidine $\Gamma^g_{sa}$ dépend donc uniquement de la concentration en volume de Biotine-(PEO)$_3$-NH$_2$ lors de l'étape de greffage covalent après réaction d'un agent de couplage en milieu aqueux sur les groupements carboxyliques des acides oléiques présents dans l'huile.

Nous avons représenté sur la figure 1.20 l'évolution de la densité de streptavidine $\Gamma^g_{sa}$ en fonction de $C_{Biotine}$ en Biotine-(PEO)$_3$-NH$_2$ . Il est très important de noter que $\Gamma^g_{sa}$ est nulle quand la densité de biotine à la surface $\Gamma^g_{biot}$ est nulle. Il n'y a pas du tout d'adsorption de la streptavidine à la surface des gouttes dans les conditions dans lesquelles on travaille.
De plus, $\Gamma^g_{sa}$ varie linéairement jusqu'à une concentration $C_{Biotine}$ de 6 mg/mL. Au delà de cette concentration, $\Gamma^g_{sa}$ sature à une valeur de 400 $\mu m^{-2}$ .

Cette saturation s'explique par le fait que la concentration d'acides oléiques disponibles en volume est assez faible dans les huiles de soja commerciales et ne permet donc pas de fonctionnaliser la surface avec beaucoup de biotine. Cette hypothèse est confirmée par le fait que, au delà de $C_{Biotine}$=6 mg/mL, les gouttes adhèrent de manière non spécifique à cause d'une diminution importante de leur charge de surface.

# Chapitre 2

# Lamelles de verre

Les expériences d'adhésion de vésicules ou de cellules faisant intervenir des liaison spécifiques s'effectuent souvent sur des substrats de verre plans dont la transparence permet de faire des mesures de microscopie à la fois en transmission et en réflexion (fluorescence, RICM). Sur ces substrats, les ligands peuvent être rendus mobiles dans le plan de la surface grâce à un dépôt d'une bicouche de lipides supportée. Toutefois, nous avons préféré travailler avec des ligands fixes qui ne bénéficient pas de capacités diffusionnelles, car des substrats de ce type sont plus simples à réaliser en grande quantité.

Nous avons déjà noté que notre choix s'était porté sur une adhésion créée par la formation de couples biotine/streptavidine. Beaucoup de solutions différentes ont été proposées pour fonctionnaliser des lamelles de verre, faisant intervenir soit de l'adsorption, soit un greffage covalent, soit les deux.

Les substrats que nous voulons fabriquer demandent un protocole qui permet de fonctionnaliser une dizaine de lamelles dont la densité de biotine à la surface (qui fixe l'adhésion spécifique) peut être variée indépendamment des interactions ioniques, stériques et de Van der Waals de la lamelle (qui fixent l'adhésion non spécifique).

On trouve commercialement des polyéthylène glycol bifonctionnalisés dont une extrémité peut être de la biotine ou un groupement hydroxyde inerte et l'autre extrémité comporte un groupement permettant de créer une liaison covalente peptidique avec des groupements amino de la surface. Pour pouvoir passer d'une surface de verre propre avec des silanols à une surface de verre

présentant des groupes amino, nous avons préféré adsorber en phase aqueuse un polyélectrolyte positivement chargé, la Poly-L-Lysine, à une fonctionnalisation covalente en milieu alcoolique et acide des silanols par des aminosilanes réactifs.

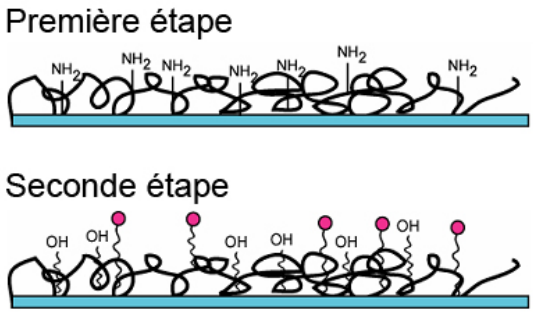



FIG. 2.1 – Représentation schématique du protocole de fonctionnalisation des lamelles de verre. La première étape consiste à adsorber de la Poly-L-Lysine sur le verre pour introduire des groupements amino sur lesquels on peut greffer lors d'une deuxième étape un mélange de PEG-2000 et de PEG-3400-Biotine .

Notre protocole se déroule donc en deux étapes (Fig. 2.1) :

1. Adsorption de la Poly-L-Lysine sur le verre, qui forme une couche homogène et très dense.
2. Fonctionnalisation des groupements amino de la Poly-L-Lysine par un mélange de PEG-2000 et de PEG-3400-Biotine dont on fixe la fraction molaire $x_{biot}$ en PEG-3400-Biotine et la concentration maximale $C_{max}$ en polyéthylène glycol dans le volume réactionnel.

Nous avons fonctionnalisé des lamelles avec deux conditions en $C_{max}$ différentes (100 $\mu$M et 200 $\mu$M ). Toutefois, seule la deuxième condition a été complètement caractérisée, bien que nous ayons réalisé des expériences d'adhésion avec les deux.

## 2.1 Fonctionnalisation des Lamelles par de la biotine

### 2.1.1 Protocole de fonctionnalisation

#### 2.1.1.1 Matériaux

L'ensemble des matériaux utilisés pour réaliser des lamelles fonctionnalisées par un mélange de PEG-2000 et de PEG-3400-Biotine sont commercialisés chez les fournisseurs classiques des laboratoires.

**Les lamelles de verre** sont des lamelles de microscopie carrées 22x22mm de 0,17 mm d'épaisseur, en verre flotté, fournies par Erie Scientific. Ces lamelles sont très propres et couramment utilisées comme support de pousse cellulaire.

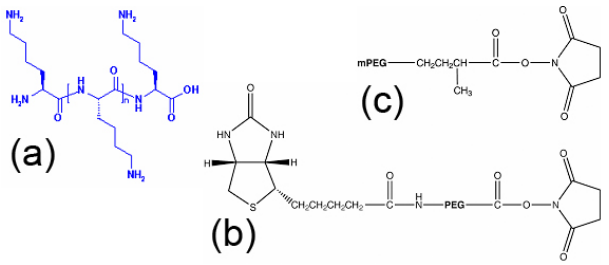



FIG. 2.2 – Formule chimique de la Poly-L-Lysine (a), du PEG-2000 (b) et du PEG-3400-Biotine (c).

**Le tampon** utilisé est du tampon Phosphate Salin (PBS, pH=7,4 300mM) fourni par Delco sous la forme d'une solution dix fois plus concentrée à reconstituer en la diluant avec de l'eau bidistillée.

**Le Mélange *Piranha*** est un mélange de 70 $\%_{v/v}$ d'acide sulfurique concentré $H_2SO_4$ et de 30 $\%_{v/v}$ d'eau oxygénée. La réaction des deux produits est fortement exothermique et la solution est extrêmement oxydante. Elle permet de *nettoyer* le verre et d'activer les groupements Si-O-Si en Si-OH.

**La Poly-L-Lysine** $(\text{-NH-CH}((\text{CH}_2)_4\text{-NH}_2)\text{-CO-})_n$ est un mélange de polymères de différentes longueurs de chaînes : $M_W$ = 30000-70000 g/mol . Elle est vendue sous la forme d'une solution aqueuse à 0,1 $\%_{v/v}$ (Sigma-Aldrich, P8920).

**Les Polyethylèneglycols (PEG) fonctionnels** sont fournis par la société Nektar. On utilise des mélanges de polyethylèneglycols non modifiées et polyethylèneglycols biotinylés. Les PEG présentent à une extrémité un groupement réactionnel (sulfo-N,hydroxysuccinimide ou SBA) dirigé contre les groupements amino libres de la poly-L-Lysine. Les PEG-SBA existent avec des longueurs de 30 unités éthylèneglycol (2000 g/mol ) et 100 unités éthylèneglycol (5000 g/mol ). Les NHS-PEG-Biotine existent avec des longueurs de 30 unités éthylèneglycol (2000 g/mol ) et 50 unités éthylèneglycol (3400 g/mol ). Achetés sous forme de poudre, les polyethylèneglycols sont stockés à l'abri de l'humidité et à -20°C dissous à 25mM dans du DMF ou du DMSO. Le DMF a l'avantage de ne pas solidifier à basse température.

**Le Porte-Lamelle** est un support métallique permettant d'activer jusqu'à 24 lamelles simultanément.

**Les Plaques Multipuits** sont des plaques stériles de culture cellulaire (Corning Costar 6 puits) en polystyrène. Elles assurent une excellente reproductibilité des chambres de fonctionnalisation, ainsi qu'une bonne économie de produits, puisqu'il suffit de 1 mL de liquide

pour recouvrir une lamelle. Le rinçage des puits s'effectue à l'aide d'un système monté à partir d'une trompe à vide, d'un tuyau et d'une pointe de micropipette.

#### 2.1.1.2 Étape 1 : Dépôt de Poly-L-Lysine sur le verre

La porte-lamelle est trempé pendant quelques minutes dans un becher en Pyrex contenant le mélange *Piranha* fraîchement réalisé. La température de la solution dépend de la rapidité de mélange et de la température externe. Aussi, le becher d'acide sulfurique est chauffé jusqu'à une température de 27°C sur une plaque électrique, et l'eau oxygénée est versée très rapidement dans l'acide. Dans ces conditions, la température du mélange s'élève en quelques secondes à 140°C, et au bout d'une certain temps, le mélange se met à bouillir. Nous avons choisi comme fin de réaction ce moment là.
Dans le cas où le porte-lamelle reste plus longtemps dans la solution, cette dernière attaque le métal et la solution prend un couleur verte. Les lamelles sont alors impropres à la fonctionnalisation, même après un rinçage soigneux.

À la fin de l'opération, le porte-lamelle est récupéré dans un becher rempli d'eau bidistillée, puis on effectue une dizaine de rinçages à l'eau distillée en prenant garde de ne jamais laisser les lamelles plus de quelques secondes à l'air libre.

Les lamelles sont alors introduites une à une dans les puits individuels de culture qui contiennent chacun un volume de 2 mL de PBS.
Le PBS est ensuite remplacé par 2 mL d'une solution à 0,01 $\%_{v/v}$ de Poly-L-Lysine dans du PBS.
Les plaques multipuits sont mises à incuber dans un incubateur humide (pour éviter l'évaporation) à 37°C pendant au moins deux heures.

#### 2.1.1.3 Étape 2 : Fixation des polyéthylène oxyde

Au bout de deux heures d'incubation, les lamelles sont rincées 4 fois avec 2 mL de PBS, puis on ajoute dans chaque puits 1 mL d'une solution PEG-2000 /PEG-3400-Biotine dans du PBS, dont la concentration totale en polyéthylène oxyde est fixée à $C_{max}$=200 $\mu$M et la fraction molaire $x_{biot}$ en PEG-3400-Biotine est variable.

La solution à $C_{max}$ est réalisée à partir de deux lots de solutions mère de PEG-2000 et de PEG-

3400-Biotine de concentration égale à 50 mM dans du DMSO anhydre. Les mélanges sont donc effectués en volume, pour éviter les imprécisions liées à l'utilisation d'une balance pour de si faibles quantités de produit.

La solution mère est aliquotée en petits volumes et conservée au congélateur pendant plusieurs semaines. La présence de la partie éthylène-oxyde est la cause d'une importante hygroscopie de la molécule, dont la partie amino-réactive se dégrade très rapidement si on utilise le même aliquot trop souvent à l'air libre.

La réaction est effectuée à 37˚C en atmosphère humide pendant 30 minutes, puis les lamelles sont rincées dix fois avec 2mL de PBS.

Enfin, les plaques multipuits rincées sont alors stockées à 4˚C dans un réfrigérateur en attendant d'effectuer les mesures d'adhésion, ce qui assure que la poly-L-lysine ne se désorbe pas.

### 2.1.2 Caractérisation de la quantité de biotine en surface

Faisons tout d'abord un estimation géométrique (très surévaluée...) de la quantité de PEG-3400-Biotine fixée sur la lamelle : les lamelles que nous utilisons sont de dimension 22x22 mm (Surface$\sim$500 $mm^2$ = $5.10^{14}$ $nm^2$). Si on suppose que chaque PEG-3400-Biotine occupe une surface de 10 $nm^2$, le nombre de molécules fixée est d'environ $5.10^{13}$.
La variation de concentration entre le début et la fin de réaction, en tenant compte d'un volume de 1 mL correspondant à nos récipients de fonctionnalisation, est donc de l'ordre de $10^{-7}$ mol/L .

Les PEG-3400-Biotine n'absorbent pas ou très peu dans le domaine UV-Visible, donc un dosage en retour de la quantité qui n'a pas réagi n'est malheureusement pas possible, bien que le domaine de concentrations soit accessibles à cette technique.
De plus, les méthodes de dosage de la biotine faisant intervenir un analogue de type HABA (voir A.1) ne sont pas assez sensibles si nous voulons doser directement la quantité sur la lamelle, et ne sont pas assez résolues pour détecter en retour une différence en concentration de $10^{-7}$ mol/L .

Nous avons finalement opté par une méthode de caractérisation indirecte, faisant intervenir de la streptavidine fluorescente et utilisant la grande affinité entre biotine et streptavidine : Après la fonctionnalisation des lamelles par les mélange de polyéthylène oxyde , nous introduisons de

la streptavidine en excès dans la chambre de culture et nous dosons la quantité de streptavidine fluorescente fixée sur la lamelles.

Le nombre auquel nous avons accès ne correspond pas à la densité de biotine $\Gamma^l_{biot}$ sur la lamelle, mais à la densité de streptavidine qui peut se déposer sur la lamelle pour une condition de greffage en PEG-3400-Biotine donnée. De la même manière que pour les gouttes d'huile, on mesure la *binding capacity* des lamelles biotine vis-à-vis de la streptavidine.

#### 2.1.2.1 Protocole de dépôt de la streptavidine

Pour fixer la streptavidine, nous avons utilisé une technique courante dans les laboratoires de biologie qui permet de colorer des lamelles de verre couvertes de cellules adhérentes. En effet, il n'était pas possible de laisser les lamelles biotinylées dans les puits de culture pour la streptavidination, car il y a une adsorption très importante des protéines sur le plastique.

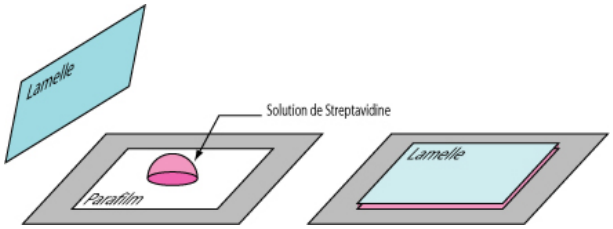



FIG. 2.3 – Représentation schématique de la méthode employée pour fixer la streptavidine sur les lamelles fonctionnalisées par les mélanges polyéthylène glycol et PEG-3400-Biotine à différentes fraction molaires.

Une goutte de streptavidine de concentration $C_i = 0.05$ mol/L et d'un volume de $V = 40$ $\mu$L est déposée délicatement sur une petit morceau de parafilm au fond d'une boîte de Petri. La lamelles sèche est appliquée sur la goutte. La capillarité permet au liquide de s'étaler sous toute la surface du verre, sans déborder puisque le parafilm n'est pas mouillé. Au bout d'un certain temps (dans notre cas 15min), la lamelle est prélevée et remise dans les puits de culture pour rinçage, et la goutte de liquide qui s'est reformée est récupérée.

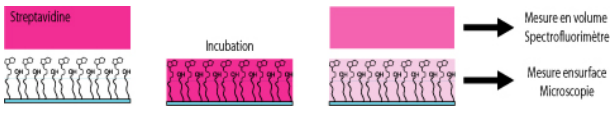



FIG. 2.4 – Après un certain temps laissé pour la fixation de la streptavidine sur les lamelles, on prélève le liquide qui contient la fraction de protéines encore en suspension, que l'on dosera en volume à l'aide d'un spectrofluorimètre. Après rinçage, on mesure l'intensité de fluorescence de la lamelle en microscopie. est

Nous avons mené la caractérisation de la *binding capacity* en streptavidine de deux manières, comme nous l'avons représenté sur la figure 2.4.
La première est une mesure directe de la densité de streptavidine déposée sur la lamelle, effectuée en microscopie de fluorescence. La seconde est un dosage en retour de la quantité de streptavidine qui ne s'est pas fixée, réalisé grâce à une mesure en spectrofluorimétrie. A partir du signal de fluorescence de la solution mère en streptavidine, cette méthode donne une valeur absolue de la densité $\Gamma^l_{sa}$.

#### 2.1.2.2 Mesure en microscopie de fluorescence

Dans notre cas, nous travaillons avec une lampe à arc à mercure sans miroir HBO de puissance 100W. Nous utilisons de la streptavidine Alexa 555, dont le spectre se rapproche de celui de la rhodamine. Travailler à ces longueurs d'ondes nous permet d'utiliser la raie verte du mercure, beaucoup plus énergétique que la raie bleue d'illumination de la fluorescéine. Le microscope est monté avec une caméra Hamamatsu ORCA-ER 12 bits, qui autorise de travailler avec une profondeur de 4096 niveaux. Pour profiter au maximum de cette dynamique (4096 niveaux), nous nous sommes placé à un temps de pose de 80ms avec un *binning* de 2 et un filtre atténuateur plat DN16.

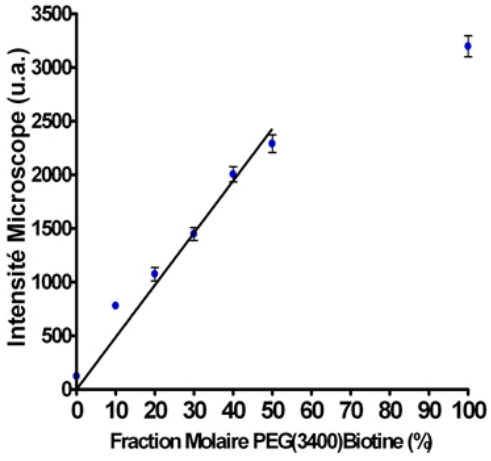



FIG. 2.5 – Variation de l'intensité de fluorescence sur la lamelle mesurée par épifluorescence - Mesure en surface : La courbe est linéaire jusqu'à une fraction molaire en PEG-3400-Biotine de 60% puis l'intensité sature.

Nous avons représenté sur la courbe 2.7 l'évolution de l'intensité de fluorescence sur la lamelle en fonction de la fraction molaire en PEG-3400-Biotine . L'évolution de l'intensité est linéaire jusqu'à une fraction de 60% molaires, l'intensité sature.

À ce stade de l'étude, la saturation peut s'expliquer soit par un effet optique, à savoir du

*quenching* ou de l'absorption due à une densité de surface importante en streptavidine, soit à une saturation effective de la densité. Nous ne pouvons conclure pour l'instant.

#### 2.1.2.3 Mesure au spectrofluorimètre

Dans le protocole de la figure 2.4, nous avons évoqué le fait qu'on récupère après l'incubation le volume de liquide contenant la streptavidine qui ne s'est pas fixée sur la lamelle. Nous pouvons donc réaliser un dosage en retour au spectrofluorimètre de la densité $\Gamma_{sa}^{l}$.

Nous avons représenté sur la figure 2.6 le schéma de principe d'une mesure de fluorescence avec un spectrofluorimètre :
dans une cuve en quartz de volume et de chemin optique fixé, l'échantillon fluorescent est illuminé à la longueur d'onde d'excitation $\lambda_{\text{exc}}$ d'intensité $I_0$. L'intensité de fluorescence $I_{\text{fluo(SA)}}$, émise dans toutes les directions, est mesurée à 90° de la direction d'incidence à la longueur d'onde d'émission $\lambda_{\text{em}}$.

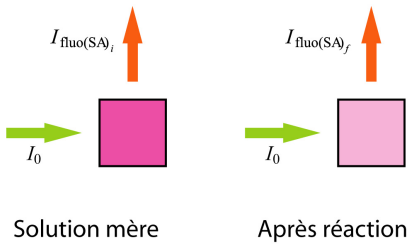



FIG. 2.6 – Schéma de principe de la mesure de fluorescence de la solution de streptavidine Alexa 555 avec le spectrofluorimètre. La mesure relative de l'intensité de fluorescence avant et après fixation des protéines sur les lamelles permet, connaissant la concentration et le volume de la solution de départ, de mesurer la quantité de protéines déposées.

L'intensité de fluorescence est linéaire en fonction de la concentration tant qu'il n'y a pas de *quenching*, donc le ratio relatif d'intensité

$$R = \frac{I_{\text{fluo(SA)}_i} - I_{\text{fluo(SA)}_f}}{I_{\text{fluo(SA)}_i}} = \frac{C_i - C_f}{C_i} = \frac{\text{Nombre de SA sur lame}}{\text{Nombre de SA initial}}$$

entre la solution de départ de concentration $C_i$ et la solution de concentration $C_f$ contenant la streptavidine qui ne se sont pas fixée sur la lamelle est proportionnel à la quantité de protéines qui se sont fixées sur la lamelle.

Sur la figure 2.7, nous avons représenté l'évolution du ratio relatif d'intensité $R$ en fonction de la fraction molaire en PEG-3400-Biotine dans le volume au début de la réaction de fonctionnalisation.

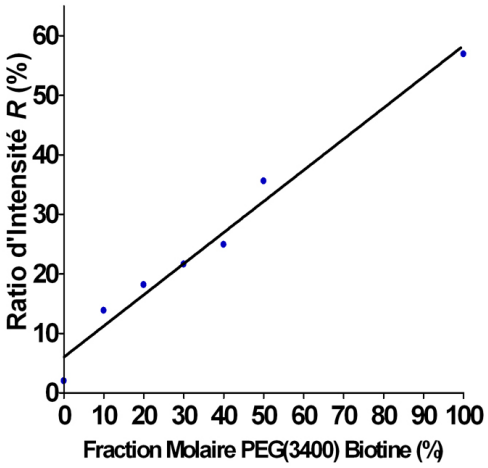



FIG. 2.7 – Variation du ratio d'intensité mesuré au spectrofluorimètre entre la solution de strep fluo avant et après fixation. La mesure est effectuée en volume

On constate que le ratio d'intensité varie linéairement avec la fraction molaire $x_{biot}$ en PEG-3400-Biotine sur toute la gamme. La méthode de dosage indirecte de la *binding capacity* des lamelles est donc valide.

La saturation observée pour les hautes fractions en PEG-3400-Biotine sur la figure 2.5 obtenue en microscopie n'est pas due à un phénomène de gène stérique qui empêcherait les protéines de se fixer sur la lamelle, mais plutôt à un effet de proximité entre les fluorophores qui diminue leur rendement quantique individuel (probablement de l'absorption, mais peut être du *quenching*).

## 2.2 Courbe finale des concentrations

Le ratio d'intensité relatif $R$ est proportionnel à la quantité de streptavidine fixée sur la lamelle. En nombre de moles , et en prenant compte la concentration initiale $C_i$ de streptavidine et son volume $V$, nous pouvons écrire que la quantité de streptavidine fixées est de

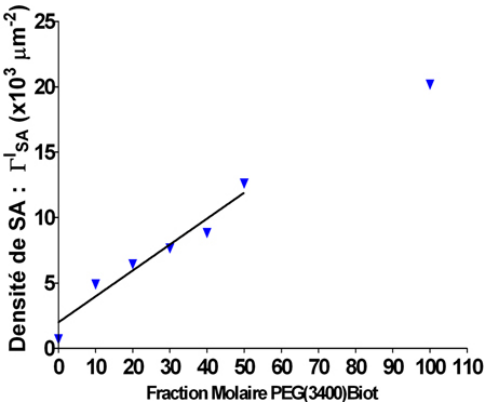
$$n_{\mathrm{SA}} = R.C_i.V \tag{2.1}$$

Nous avons travaillé avec des lamelles carrées de surface égale à S=484 mm$^2$, donc la densité par $\mu$m $^2$ de streptavidine $\Gamma^l_{sa}$ liée à de la biotine est donnée par :

$$\Gamma^l_{sa} = \frac{n_{\mathrm{SA}}.\mathcal{N}_a}{\mathrm{S}} \tag{2.2}$$

avec $\mathcal{N}_a$ est le nombre d'Avogadro.

On a tracé sur la figure 2.8 la *binding capacity* en streptavidine $\Gamma^l_{sa}$ en fonction de la fraction molaire $x_{biot}$ en volume de PEG-3400-Biotine pour une concentration totale $C_{max}$=200 $\mu$M en polyéthylène glycol . $\Gamma^l_{sa}$ varie linéairement en fonction de $x_{biot}$ et la densité maximale est d'environ $2.10^4$ $\mu m^{-2}$ , soit une surface de 50 $nm^2$ par streptavidine sur la lamelle. Cette valeur est cohérente avec celles mesurées par Perret *et al.* sur des billes de verre silanisées.




| $x_{biot}(\%)$ | 0 | 5 | 15 | 25 | 40 | 60 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| $\Gamma^l_{sa}(\mu m^{-2})$ | 0 | 1742 | 3827 | 5912 | 9040 | 13210 |

FIG. 2.8 – $\Gamma^l_{sa}$ varie linéairement en fonction de la fraction molaire $x_{biot}$ en polyéthylène glycol dans la volume. Il' n'y a pas d'adsorption de streptavidine sur les lamelles qui correspondent à $x_{biot}$=0%.

De plus, comme dans le cas des gouttes, la densité de streptavidine est proche de zéro (cela est encore plus clair avec la mesure au microscope) quand la fraction en PEG-3400-Biotine est nulle, indiquant qu'il n'y a pas d'adsorption non spécifique (ou très peu) de la streptavidine sur les lamelles en l'absence de biotine.

Comme nous désirons effectuer en même temps que la mesure d'angle de contact une mesure d'intensité de fluorescence de la zone de contact pour estimer la densité de streptavidine recrutée lors de l'adhésion, nous nous limiterons à des fractions molaires $x_{biot}$ inférieures à 60% pour rester dans le domaine linéaire de la mesure microscopique.

Enfin, la linéarité entre fraction molaire en volume et densité de streptavidine fixée nous permet par abus de confondre la densité de biotine en surface $\Gamma^l_{biot}$ et la densité de streptavidine fixée $\Gamma^l_{sa}$.

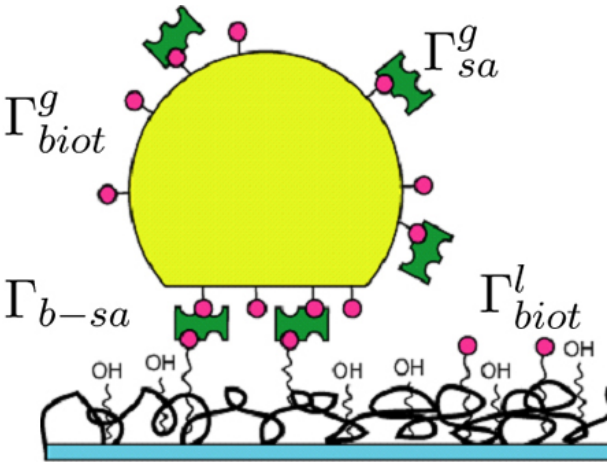
## Troisième partie

# Mouillage spécifique des gouttes d'émulsion

Nous allons présenter dans cette partie tous les résultats relatifs aux expériences de mouillage induit par des interactions spécifiques que nous avons réalisées à partir des matériaux dont nous avons détaillé précédemment les méthodes de caractérisation.

D'une part, nous avons des gouttes portant de la streptavidine mobile à leur interface à une densité $\Gamma^g_{sa}$. De l'autre, nous avons des substrats de verre fonctionnalisés par un mélange de fraction molaire $x_{biot}$ de PEG-2000 /PEG-3400-Biotine . La réaction de fonctionnalisation est effectuée à partir d'une solution de concentration $C_{max}$ en polyéthylène oxyde , et nous avons caractérisé la densité de biotine $\Gamma^l_{biot}$. Nous avons montré que la streptavidine ne s'adsorbe pas sur les surfaces (émulsion et verre) en l'absence de biotine pour la fixer.

Nous avons représenté sur le schéma ci-contre une goutte adhérant sur une lamelle de verre avec une angle de contact $\theta$. Cette adhésion s'accompagne d'un recrutement de la streptavidine mobile dans la zone de contact. On introduit deux nouvelles variables de densité : $\Gamma^p_{sa}$ qui correspond aux streptavidines piégées dans la zone de contact mais libres de biotine et $\Gamma^b_{sa}$ la densité de couples effectivement formés.




Dans un premier temps, nous présenterons la technique expérimentale de mesure en microscopie qui a permis de mesurer à la fois l'angle de contact et la répartition des protéines dans la zone d'adhésion de manière statistique sur plusieurs dizaines de gouttes de taille différente.

Ensuite, nous discuterons de la problématique de la définition de l'expérience témoin qui permet de définir l'énergie d'adhésion non spécifique des gouttes.

Enfin, nous présenterons les résultats d'adhésion spécifique statique et dynamique obtenus pour des substrats fonctionnalisés dans deux conditions de biotinylation différentes : $C_{max}$=200 $\mu$M et $C_{max}$=100$\mu$M .

# Chapitre 1

# Configuration de l'expérience, Matériaux et Mesures

## 1.1 Présentation de l'expérience

### 1.1.1 Chambre de mesure

L'observation d'un phénomène de mouillage nécessite de travailler avec des objets de diamètre assez important pour pouvoir effectuer une mesure optique de l'angle de contact. De plus, notre volonté de faire une mesure statistique en microscopie sur plusieurs objets pour une même condition expérimentale impose que les gouttes soient d'un diamètre moyen inférieur à la dizaine de microns. A cause des contraintes de procédé lors de la formulation et de la mise au point de l'émulsion, les populations de gouttes utilisées ont un diamètre moyen de l'ordre de 5 microns, avec une polydispersité d'environ 15%.

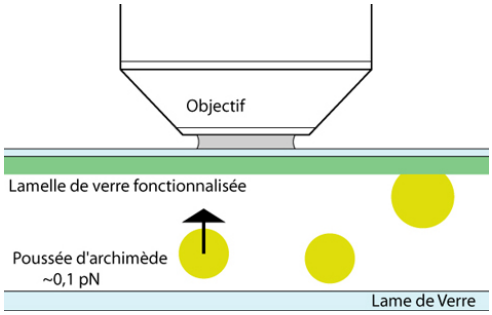



FIG. 1.1 – Représentation schématique de la configuration de l'expérience et du mode d'observation. Le microscope est en géométrie droite. Les gouttes, aidées par la poussée d'Archimède, viennent au contact avec la lamelle de verre dont la face interne a été fonctionnalisée

Les chambres d'observation sont réalisées à partir d'une lame et d'une lamelle en verre col-

lées entre elles par du ruban adhésif double face ce qui permet de fixer son épaisseur à une cinquantaine de microns et son volume 40 $\mu$L .
Le microscope d'observation est en géométrie droite, avec l'objectif au dessus de la lamelle fonctionnalisée. La mise en contact des gouttes streptavidinées avec la face interne de la lamelle placée au-dessus s'effectue très simplement grâce à la poussée d'Archimède. La densité de l'huile entrant dans la composition des gouttes est de 0,92, donc on peut estimer la force qui s'exerce sur les objets en immersion à un dixième de piconewtons. Le temps moyen pour que toutes les gouttes entrent en contact avec la lamelle est inférieur à cinq minutes.

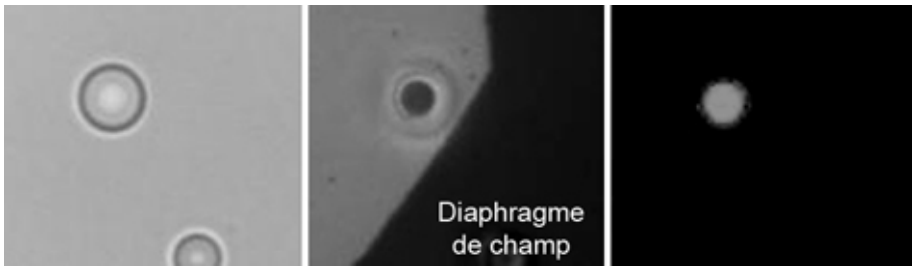



FIG. 1.2 – *Gauche* : Image en microscopie de transmission de l'équateur d'une goutte d'émulsion adhérée. – *Centre* : Image en RICM de la zone d'adhésion de la goutte. On voit le bord du diaphragme de champ qui assure qu'on observe la lamelle. – *Droite* : Image en épifluorescence des protéines fluorescentes dans la zone d'adhésion.

La configuration du montage optique permet donc d'observer la dynamique de formation de la zone de contact des gouttes, puis, en fixant un temps d'incubation assez long, d'avoir accès aux mesures de l'angle de contact en régime stationnaire.

Le montage permet de mesurer pour un nombre de gouttes allant jusqu'à plusieurs centaines trois mesures distinctes que nous avons rappelées sur la figure 1.2.

1. Mesure du rayon des gouttes (*gauche*) à partir d'une image de microscopie de transmission.
2. Mesure (*centre*) du rayon de la zone adhérée sur la lamelle en RICM. On utilise l'image du diaphragme de champ pour situer le plan focal sur la lamelle où se localisent les franges d'interférences. Nous utilisons pour la mesure de RICM une lampe a arc à Mercure HBO montée en épifluorescence. La lumière monochromatique d'illumination est obtenue simplement en enlevant le filtre d'émission sur un cube de fluorescence pour des fluorophores de type TRITC (Longueur d'onde : 535 nm).
3. Mesure de la densité $\Gamma_{sa}^{p}$ et de la répartition des streptavidines dans la zone adhérée (*droite*)

en épifluorescence.

Pour ne pas être génés par les inhomogénéités dues à l'arc de la lampe, la mesure en RICM doit s'effectuer avec un objectif x100, dont l'ouverture numérique (n.a.=$n_{\text{verre}}.\sin\theta_{\text{illumination}}$) est inférieure à 1,25. Nous avons utilisé un objectif Nikon à iris qui permet de faire varier l'ouverture numérique entre 0,7 et 1,3. Le réglage était effectué de manière à avoir le meilleur contraste possible entre la zone d'adhésion (noire) et le fond gris.

### 1.1.2 Angle de contact : Hypothèses et Mesure

Sur la figure 1.3, nous avons représenté un schéma de profil d'une goutte d'émulsion mouillant partiellement un substrat. Nous conserverons la convention introduite dans la partie bibliographique relative au sens de l'angle de contact $\theta$ qui est ici pris comme l'angle d'ouverture extérieur entre le substrat et la goutte et sera donc nul si la goutte n'adhère pas.

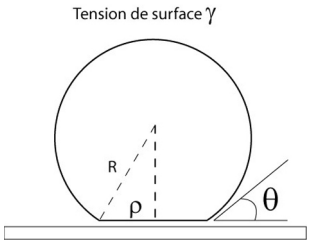



FIG. 1.3 – Représentation schématique d'une goutte de tension $\gamma$ adhérant sur un substrat. Les paramètres de mesure sont $\rho$ le rayon de contact et $R$ le rayon de la goutte

A l'équilibre mécanique des forces sur le bord de la zone d'adhésion, l'angle de contact $\theta$ et les tensions superficielles des interfaces sont liées par la loi de Young-Dupré :

$$\gamma_{adhesion} = \gamma_{goutte} - \varepsilon = \gamma_{tampon/substrat} + \gamma_{goutte}\cos\theta \tag{1.1}$$

Le terme $\gamma_{goutte} = \gamma$ correspond à la tension de surface huile/tampon de la goutte d'émulsion. Sa valeur est de 1 mJ/m$^2$ en présence de tensioactif Tween20 dans un tampon PB à 20mM (Technique de la goutte pendante [2]). Le terme $\gamma_{adhesion}$ est la tension dans le film adhéré. Elle est inférieure à la tension $\gamma$ et peut s'exprimer comme $\gamma - \varepsilon$ où $\varepsilon$ est l'énergie d'adhésion par unité de surface. Enfin, le terme $\gamma_{tampon/substrat}$ représente l'énergie de surface entre le tampon et le substrat de verre fonctionnalisé.

Pour s'affranchir du terme d'énergie de surface tampon/substrat qu'on ne peut négliger, on doit procéder expérimentalement de manière différentielle : la mesure d'angles de contact de gouttes adhérant par des liens spécifiques ajoutés aux interactions non spécifiques (S+NS) doit toujours

être menée en parallèle avec une mesure d'angle de contact de ces mêmes gouttes adhérant uniquement par les interactions non spécifiques (NS) :
Ainsi l'énergie d'adhésion relative à la formation des liens spécifiques $\varepsilon$ s'exprime simplement à partir de la différence des angles de contact :

$$\varepsilon = \varepsilon_{\mathrm{S+NS}} - \varepsilon_{\mathrm{NS}} = \gamma(\cos\theta_{\mathrm{NS}} - \cos\theta_{\mathrm{S+NS}}) \tag{1.2}$$

L'existence d'un tension de surface importante ($\sim$ kT/nm$^2$) et d'un module de courbure faible ($\sim$ kT) nous permet d'approximer la forme de la calotte à une sphère tronquée. Il existe donc deux relations trigonométriques simples lient le rayon de la calotte $R$ au rayon de la zone de contact $\rho$ :

$$\begin{cases} \sin\theta &= \dfrac{\rho}{R} \\ \cos\theta &= \sqrt{1-\left(\dfrac{\rho}{R}\right)^2} \end{cases} \tag{1.3}$$

Pour mesurer l'angle de contact d'une goutte, il suffit de mesurer son rayon $R$ à son équateur en transmission et son rayon $\rho$ de la zone de contact en RICM. On peut noter que si l'angle de contact est inférieur à 30°, le rayon de la goutte adhérée $R$ est égal au rayon de la goutte initial avant qu'elle ne mouille le substrat.

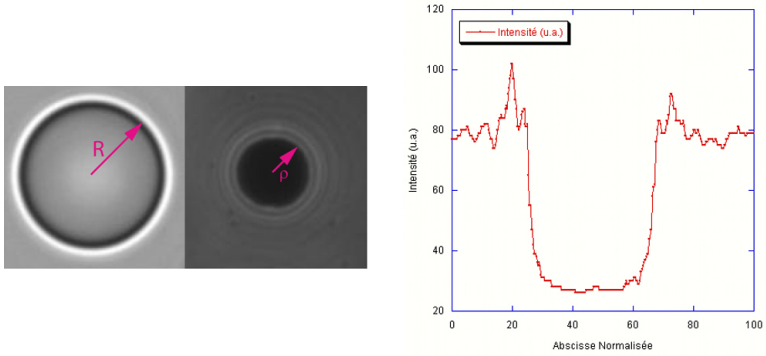



FIG. 1.4 – Sur l'image de gauche, nous avons représenté les paramètres géométriques accessibles qui nous permettent de mesurer l'angle de contact. Sur l'image de droite, nous avons représenté le profil d'intensité de la zone de contact en RICM le long d'un de ses diamètres

Nous avons représenté sur la figure 1.4 le profil d'intensité le long d'un diamètre de l'ordre zéro des franges d'interférences. On remarque que l'intensité est constante dans le film d'adhésion, ce qui exclut la présence de bourrelets/*dimples* tels qu'ils ont pu être observés dans des expériences avec des liposomes géants [20, 43].

Dans le cas des gouttes d'émulsions dont la taille est inférieure à la dizaine de microns, il est difficile d'exploiter les franges d'interférences pour reconstituer le profil de la zone d'adhésion

proche de la ligne de contact. Dès les premiers ordres, les franges ne sont plus résolues par le microscope car le profil de la goutte devient trop pentu. On observe toutefois une modification de l'espacement des premières franges à mesure que l'angle de contact augmente.

## 1.2 Grandeurs Observables

### 1.2.1 Statistique sur le rayon

Le procédé de fabrication des gouttes que nous avons utilisé impose que les lots de gouttes présentent une polydispersité de ±15% sur leur diamètre. Ainsi, pour des gouttes de diamètre moyen égal à 5 $\mu$m , la taille s'échelonne donc entre 3 et 7 microns. Indépendamment de cette polydispersité, les gouttes d'émulsions sont caractérisées précisément à l'aide d'un cytomètre en flux, qui permet de donner la densité en streptavidine pour chaque taille de goutte (cf. Chapitre 1.2).
Nous avons configuré la technique de mesure au microscope de manière à acquérir les angles de contact de plusieurs dizaines voire centaines de gouttes pour une même condition expérimentale. Loin d'être un désavantage, la polydispersité des gouttes peut être utilisée à bon escient pour connaître l'évolution du rayon d'adhésion et donc de l'angle de contact en fonction de leur diamètre.

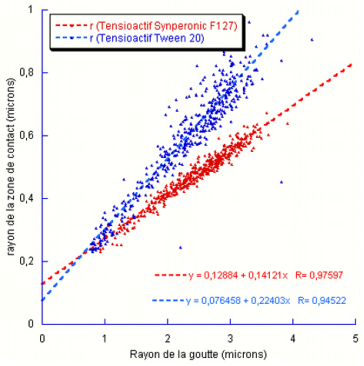



FIG. 1.5 – Représentation du rayon de contact $\rho$ en fonction du rayon de la goutte $R$ pour deux émulsions de soja stabilisées par du Pluronic F127 et du Tween20. Les courbes sont des droites dont les pente sont proportionnelles à l'énergie d'adhésion dont la valeur est de l'ordre de $10^{-5} - 10^{-4}$ J/m$^2$. Cette énergie est supérieure dans le cas du Tween20 à celle du cas Pluronic F127.

Nous avons représenté sur la figure 1.5 les courbes $\rho(R)$ mesurées pour des gouttes d'émulsions de soja mouillant des lamelles de verre fonctionnalisés uniquement par du PEG-2000 . Notons que le lot d'huile de soja que nous avons utilisé dans ce chapitre pour valider notre technique de mesure est différent de celui que nous utiliserons pour les expériences d'adhésion spécifique proprement dites. L'allure générale de chaque courbe est linéaire, ce qui est conforme avec l'expression de $\rho(R)$ donnée par l'équation 1.3. La pente de la droite correspondant aux gouttes stabilisées par

du Tween20 (bleu) est plus grande que celle des gouttes stabilisée par du Pluronic F127 (rouge). L'énergie d'adhésion, qui varie comme la pente, est donc plus grande dans le cas du Tween20 que dans le cas du Pluronic F127 .

### 1.2.2 Précision de la mesure : Tension de ligne

Si l'on observe bien la figure 1.5, on remarque qu'aucune des deux courbes n'a une ordonnée à l'origine nulle comme l'imposerait la loi de Young-Dupré.

Nous avons tracé sur la figure 1.6-a les courbes de variation de $\cos\theta$ en fonction de l'inverse du rayon de contact. Il apparaît clairement, au moins pour la courbe correspondant au cas du Pluronic F127 , que le $\cos\theta$ dépend linéairement de $1/\rho$.

La loi d'Young-Dupré peut être modifiée de manière à intégrer l'influence du périmètre de la zone d'adhésion sur l'angle de contact : il faut prendre en compte un terme de tension de ligne $\tau$ qui s'exprime dans le cosinus de l'angle à l'équilibre (Drehlich) :

$$\cos\theta = \cos\theta_0 \pm \frac{\tau}{\gamma}\frac{1}{\rho} \tag{1.4}$$

Le terme $\theta_0$ correspond à l'angle de contact en l'absence de terme de tension de ligne $\tau$. La tension de ligne $\tau$ s'exprime en J/m et son signe peut être positif ou négatif suivant l'influence mouillante ou démouillante de la ligne de contact sur l'angle.
A partir de l'expression du sinus de l'angle de l'équation 1.3 et de la nouvelle expression du cosinus faisant intervenir $\tau$ (selon l'équation 1.4), on peut exprimer la nouvelle relation liant le rayon d'une goutte $R$ au rayon de la zone de contact $\rho$ :

$$R^2 = \frac{\rho^4}{1 - \rho^2\cos\theta_0 - 2\rho\frac{\tau}{\gamma}\cos\theta_0 - (\frac{\tau}{\gamma})^2} \tag{1.5}$$

Sur la figure 1.6-b, nous avons représenté la courbe $\rho(R)$ dans le cas des gouttes stabilisées par du Pluronic F127 ainsi que la courbe définie selon l'équation 1.5 et les paramètres suivants : $\gamma$=1mN/m et $\tau = -6,8.10^{-12}$ J/m. La tension de surface $\gamma$ a été mesurée par la technique de la goutte pendante et la tension de ligne est l'unique paramètre ajustable. La valeur de la tension de ligne ajustée est conforme aux valeurs théoriques qui s'échelonnent de $10^{-12}$ à $10^{-10}$ J/m.

L'huile de soja n'étant pas un liquide simple comme pourrait être une huile minérale de type dodécane, on ne peut isoler les effets de tel ou tel composant sur la tension de ligne et conclure

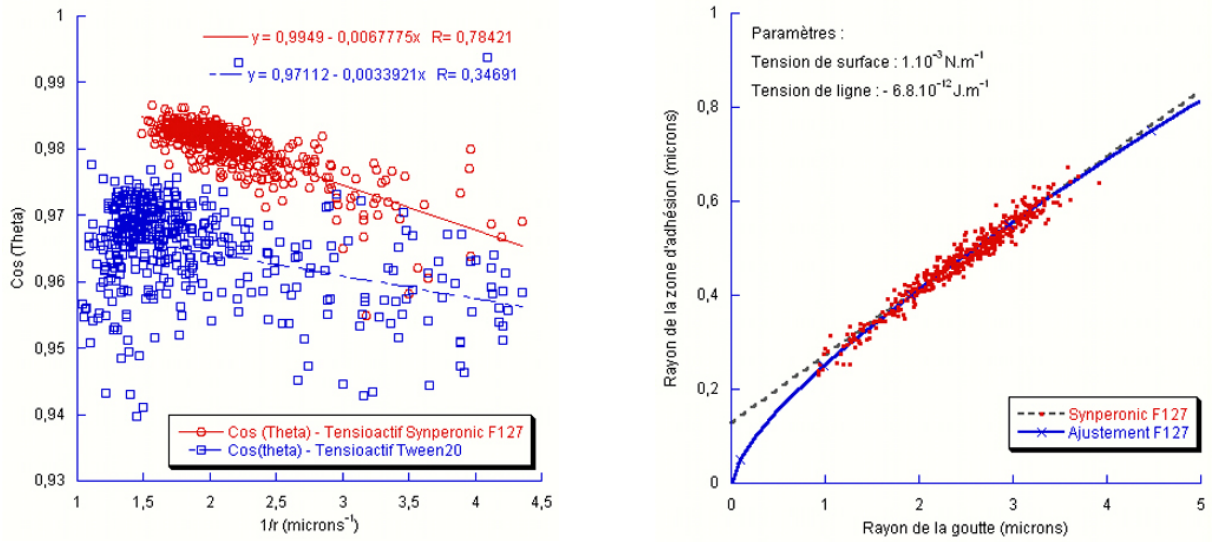



FIG. 1.6 – *Gauche* : Représentation de $\cos\theta(1/\rho)$ pour une émulsion de soja mouillant sur un substrat de verre fonctionnalisé par du PEG-2000 dans un tampon Phosphate/Tween20 (bleu) et un tampon Phosphate/F127 (rouge). – *Droite* : Représentation de $\rho(R)$ du cas Phosphate/F127 . Le cosinus de l'angle de contact varie linéairement avec $1/\rho$, ce qui implique une déviation à la loi d'Young.

quant à son origine microscopique. Toutefois, il est possible de calculer une distance caractéristique $\delta = \mid \tau/\varepsilon \mid > 0$ à partir du ratio entre l'énergie d'adhésion et la tension de ligne. On peut grossièrement estimer $\delta \simeq 100$ nm à partir d'une énergie d'adhésion typique de notre système $\varepsilon \simeq 5.10^{-5}$ J/m$^2$ et de la valeur de la tension de ligne ajustée $\tau \simeq 5.10^{-12}$ J/m. Cette valeur $\delta$ est bien supérieure à la longueur d'extrapolation $\lambda \sim 1$ nm pour notre système, ce qui indique que l'effet de ligne n'est pas lié, au moins directement, à l'existence d'une courbure de l'interface le long de la ligne de contact.

Nous verrons dans les chapitres suivants que le lot d'huile de soja qui nous a servi à fabriquer des émulsions fonctionnalisées et que nous avons utilisé pour toutes les expériences d'adhésion a des propriétés différentes : dans le cas du mouillage non spécifique, et à la différence du cas présent, l'angle de contact ne présente plus de déviation à la loi d'Young qui nécessite la prise en compte d'une tension de ligne. Nous avons préféré travailler avec ce lot qui nous permettra de voir l'effet de la formation de liens spécifiques sur le terme de tension de ligne.

# Chapitre 2

# Mouillage Non Spécifique

Nous avons discuté dans un des paragraphes précédents la nécessité, pour étudier l'effet des interactions spécifiques uniquement, de toujours réaliser des expériences différentielles entre une première qui fait intervenir la somme de toutes les interactions, spécifiques et non spécifiques, et une seconde qui ne fait intervenir que les interactions non spécifiques. Ce problème *a priori* anodin se révèle plus ardu lorsqu'on est confronté à la définition exacte de la bonne expérience témoin.

## 2.1 Définition de l'expérience témoin

L'angle de contact des gouttes dans les expériences témoins doit être minimal pour laisser la plus grande plage de mesure accessible lors de la formation de liens spécifiques. Parmi les diverses possibilités qui s'offraient à nous, nous en avons choisi deux, dont les résultats sont équivalents en terme d'énergie d'adhésion :

1. La première est réalisée à partir de gouttes réactives sur des substrats inertes : les gouttes ont une densité $\Gamma^g_{sa}$ de streptavidine et les surfaces de verre sont uniquement fonctionnalisées par du PEG-2000 ($\Gamma^l_{biot}$=0 $\mu$m$^{-2}$ ).

2. La seconde est réalisée à partir de gouttes inertes sur des surfaces réactives : les gouttes ayant une densité $\Gamma^g_{sa}$ en streptavidine ont été préalablement passivées par une étape d'incubation dans un excès de biotine libre. Les substrats de verre sont fonctionnalisés par un mélange de polyéthylène glycol à une densité de $\Gamma^l_{biot}$ en PEG-3400-Biotine .

Ces deux expériences témoins ont l'avantage, d'être réalisées à potentiel de surface des gouttes et des lamelles constants, puisque la densité en streptavidine $\Gamma^l_{biot}$ est fixée.

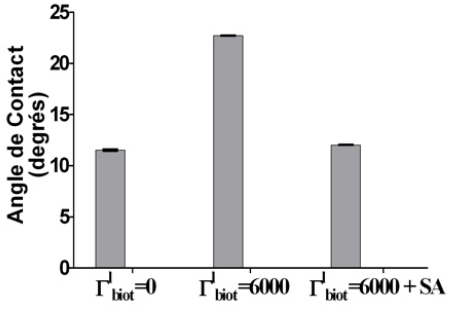



FIG. 2.1 – Comparaison entre les angles de contacts des deux expériences témoins (gauche et droite) avec une expérience laissant se développer des interactions spécifiques (centre). Les expériences témoins font soit intervenir des gouttes réactives sur des substrats inertes (gauche), soit des gouttes inertes sur des substrats réactifs (droite). Les deux expériences témoins sont équivalentes.

Nous avons représenté sur l'histogramme 2.1 les angles de contacts obtenus pour les deux conditions témoins (gauche et droite) et une condition d'adhésion spécifique (centre) pour des gouttes dont la diamètre est de 5 microns. La densité en PEG-3400-Biotine pour les conditions du centre et de droite est fixée à environ $\Gamma^l_{biot}$=6000 $\mu$m$^{-2}$ et la densité de streptavidine est de $\Gamma^g_{sa}$=325 $\mu$m$^{-2}$ .

Les deux conditions témoins sont équivalentes en terme d'angle de contact, celui ci étant de l'ordre de 10°. Alors que dans les expériences faisant intervenir des liposomes, il est possible d'annuler l'angle de contact, avec nos émulsions, il y a toujours une adhésion minimale sur les substrats que nous utilisons.
L'angle de contact lié à l'existence d'interactions spécifiques est de l'ordre de 25°. Cela montre que nos deux expériences témoins sont satisfaisantes, et que dans le cas dit "spécifique" nous mesurons bien l'effet de l'interaction streptavidine/biotine

## 2.2 Effet de la force ionique, du pH et du tensioactif

Nous avons étudié qualitativement l'influence de différents paramètres physico-chimiques (Fig. 2.2) sur l'angle de mouillage non spécifique de gouttes SA ( $\Gamma^g_{sa}$=325 $\mu$m$^{-2}$ ) sur des surfaces de verre PEG-2000 .
La force ionique de la solution tampon n'influe pas sur l'angle de contact non spécifique (*a* et *b*) : nous avons fait varier à pH=7,4 fixé la force ionique de 20mM (PB) à 300mM (PBS) sans observer de différence. Ce résultat démontre que le mouillage non spécifique n'est probablement

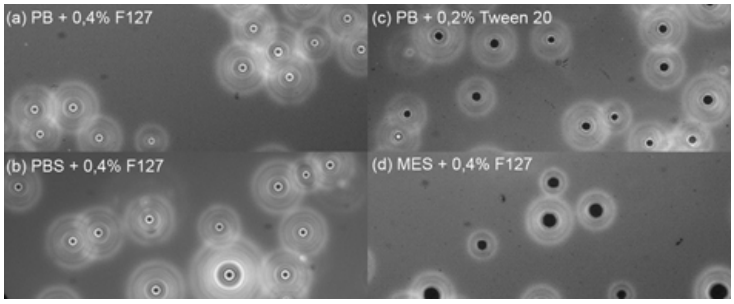



FIG. 2.2 – Images en microscopie de contraste interférences des zones de contacts entre des gouttes nues et des lamelles PEG2000. A pH=7,4 la force ionique n'a aucune influence sur l'angle de mouillage ($a$ et $b$). En revanche l'utilisation d'un tampon MES ($c$) ou l'utilisation de Phosphate/Tween20 ($d$) induit une forte adhésion. Dans le tampon Phosphate/F127 , le mouillage non spécifique n'est pas induit par des interactions ioniques.

pas causé par une interaction de type ionique entre le verre et les gouttes.

De la même manière qu'au paragraphe 1.2.1, la présence de Tween20 dans le tampon de stabilisation induit un mouillage plus important des goutte sur le substrat de verre par comparaison avec le Pluronic F127 ($a$ et $c$). Nous choisirons de toujours travailler avec du Pluronic F127 pour garder la plus grande plage de mesure possible sur les angles de contacts.

Enfin, nous avons diminué le pH du tampon ($d$), en utilisant un tampon MES à pH=5,4, toutes choses égales par ailleurs (force ionique=20mM, Pluronic F127 ). Dans ce cas, on a une adhésion très importante des gouttes, avec des angles de contact dépassant 30°.

**Dans les résultats suivant, les mesures ont toujours été réalisées dans un tampon Phosphate 20mM contenant 0,2$\%_{m/m}$ de Pluronic F127 .**

# Chapitre 3

# Mouillage Spécifique

## 3.1 Rappels des caractéristiques des matériaux

Nous avons mesuré l'énergie d'adhésion de gouttes d'émulsions présentant de la streptavidine à leur surface à densité variable sur des substrats de verre fonctionnalisés par un mélange à fraction molaire variable de PEG-2000 et PEG-3400-Biotine donc la concentration en volume est fixée à $C_{max} = 200$ $\mu$M.

| **Gouttes d'Émulsion** | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Densité $\Gamma^g_{sa}$ ($\mu m^{-2}$ ) | 65 | 130 | 195 | 260 | 325 | — |
| **Lamelles de Verre** | | | | | | |
| $x_{biot}$(%) PEG-3400-Biotine | 0 | 5 | 15 | 25 | 40 | 60 |
| Densité $\Gamma^l_{biot}$ ($\mu m^{-2}$ ) | 0 | 1742 | 3827 | 5912 | 9040 | 13210 |

En ce qui concerne les gouttes, nous avons fait varier la concentration de greffage en Biotine-$(PEO)_3$-$NH_2$ de 1 à 5 mg/mL, ce qui correspond à une densité finale en streptavidine qui s'échelonne de 65 à 325 $\mu m^{-2}$ .

Pour les lamelles, nous avons vu que la caractérisation de la quantité de streptavidine fixée au microscope de fluorescence était linéaire jusqu'à une fraction molaire $x_{biot}$ de 60% en PEG-3400-Biotine . Nous avons donc fait varier $x_{biot}$ de 0% (qui définit l'expérience témoin) à 60%. La densité en biotine $\Gamma^l_{biot}$ varie donc de 0 à 13000 $\mu m^{-2}$ . La densité de biotine $\Gamma^l_{biot}$ est donc de 10 à 100 fois plus importante que la densité de streptavidine $\Gamma^g_{sa}$.

## 3.2 Effet de l'adhésion spécifique sur la tension de ligne

Dans le paragraphe 1.2.1, nous avions montré que notre technique de mesure était assez sensible pour mesurer l'effet de la tension de ligne sur l'angle de contact des gouttes.
Nous avons représenté sur la figure 3.1 les courbes $\rho = f(R)$ et $\cos\theta = f(1/\rho)$ pour l'expérience témoin (*rouge*) pour l'expérience faisant intervenir des interactions spécifiques (*bleu*). Rappelons que le lot d'huile de soja que nous utilisons pour ces expériences (et les prochaines) est différent de celui qui nous a servi à valider la technique au paragraphe 1.2.2

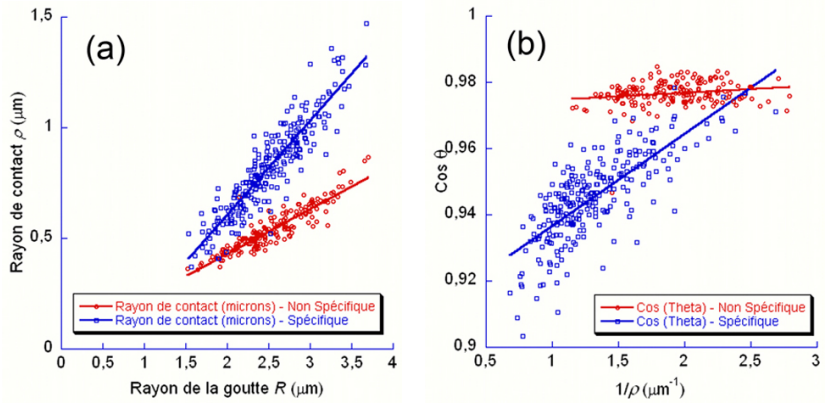



FIG. 3.1 – (a) Comparaison de la relation entre le rayon de contact et le rayon des gouttes pour un mouillage non spécifique et un mouillage spécifique - (b) L'existence d'interactions spécifiques induit une apparition d'une tension de ligne visible sur le tracé du cosinus de l'angle de contact

On remarque tout d'abord en (a) que la formation de liaisons spécifiques augmente l'énergie de contact entre les gouttes et le substrat, puisque la pente de la courbe bleue est plus grande que celle de la courbe rouge. Ceci est en accord avec l'histogramme 2.2 du paragraphe précédent.

Sur le graphe (b), notons tout d'abord qu'avec ce lot d'huile de soja, l'angle de contact dans le cas du mouillage non spécifique (rouge) ne varie pas en fonction du rayon de la zone adhérée. La loi d'Young s'applique donc sans correction par un terme de tension de ligne. En revanche, dans le cas du mouillage spécifique (bleu), on voit que le $\cos\theta$ varie linéairement avec $1/\rho$.

La formation de liens streptavidine/biotine spécifiques s'accompagne donc de l'apparition d'une tension de ligne $\tau$, dont le signe est **négatif**. Cette tension de ligne a un effet démouillant sur l'angle de contact qui se trouve donc minoré. La valeur absolue de $\tau$ varie dans nos expériences entre $10^{-12}$ et $10^{-10}$ J/m suivant les conditions. La tension de ligne varie de la même manière que l'angle de contact à l'équilibre.

Dans toute la suite de ce manuscrit, les valeurs quantitatives de l'angle de contact ou des énergies ne seront pas déduites des courbes $\rho(R)$ et$\cos\theta(1/\rho)$ ajustées, mais d'une moyenne effectuée sur les gouttes dont le diamètre s'échelonne de 4,7 à 5,3 microns, soit plus ou moins 300 nm autour du diamètre moyen de la population.

## 3.3 Mouillage Spécifique : Énergie et Intensité

## 3.4 Energie d'adhésion $\varepsilon$ en fonction de $\Gamma^l_{biot}$

Nous avons mesuré l'énergie d'adhésion $\varepsilon = \gamma(\cos\theta_{\mathrm{NS}} - \cos\theta_{\mathrm{S+NS}})$ relative à la formation de couples streptavidine/biotine en fonction de la densité de biotine sur les lamelles $\Gamma^l_{biot}$ et ce, pour quatre lots de gouttes de densité de streptavidine différentes ($\Gamma^g_{sa}$ = 65, 130, 260, 325 $\mu$m$^{-2}$ ). Les énergies correspondant aux densités $\Gamma^g_{sa}$ = 65 et 260 $\mu$m$^{-2}$ ont été mesurées sur un lot de lamelles fonctionnalisées différent des densités $\Gamma^g_{sa}$ = 130 et 325 $\mu$m$^{-2}$ .

Le graphe 3.2 montre que l'énergie d'adhésion $\varepsilon$ varie linéairement avec $\Gamma^l_{biot}$ et que la pente de ces droites augmente avec la densité de streptavidine $\Gamma^g_{sa}$. L'énergie d'adhésion $\varepsilon$ varie entre 1% et 10% de la tension de surface $\gamma = 2$ mJ/m$^2$ des gouttes.

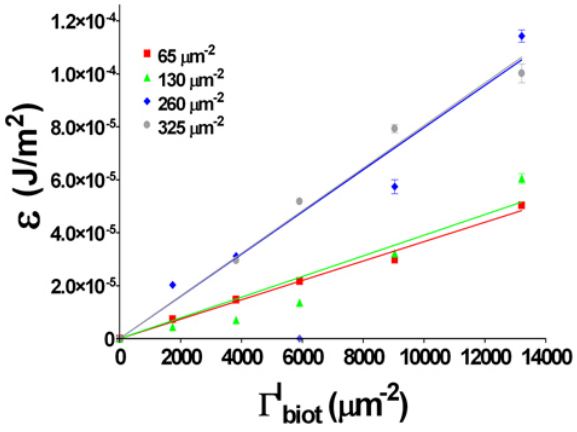



FIG. 3.2 – Variation de l'énergie d'adhésion $\varepsilon$ en fonction de $0 \leq \Gamma^l_{biot} \leq 13000$ $\mu$m$^{-2}$ pour des gouttes de densité $65 \leq \Gamma^g_{sa} \leq 325$ $\mu$m$^{-2}$ . L'énergie spécifique d'adhésion croît linéairement en fonction de la densité de biotine.

Nous avons représenté sur la figure 3.3 les images en épifluorescence de gouttes ($\Gamma^g_{sa}$ =325 $\mu$m$^{-2}$ ) adhérées sur une lamelle de densité $\Gamma^l_{biot}$=0 $\mu$m$^{-2}$ (gauche) et une autre de densité $\Gamma^l_{biot}$=13210 $\mu$m$^{-2}$ (milieu). Nous avons superposé en fausses couleurs une image de l'équateur de la goutte (rouge) et une image de la zone adhérée (vert). Les zones adhérées sont parfaitement circulaires et leur intensité de fluorescence est homogène,autorisant une mesure moyenne de densité de

streptavidine $\Gamma^p_{sa}$.

Nous avons représenté sur l'histogramme de droite la densité de streptavidine $\Gamma^p_{sa}$ en fonction de $\Gamma^l_{biot}$. Tout d'abord, on voit que la densité de streptavidine $\Gamma^p_{sa} \simeq 3300$ $\mu$m$^{-2}$ est de l'ordre de dix fois plus importante que la densité de streptavidine sur les gouttes ($\Gamma^g_{sa}$ =325 $\mu$m$^{-2}$ ). Ceci montre qu'il y a concentration des récepteurs dans la zone adhérée. Cette concentration est rendue possible car les protéines peuvent diffuser librement à la surface de la goutte. On constate de plus que cette densité $\Gamma^p_{sa}$ est indépendante de la présence de biotine sur la surface de verre et reste constante en fonction de la densité de biotine $\Gamma^l_{biot}$.

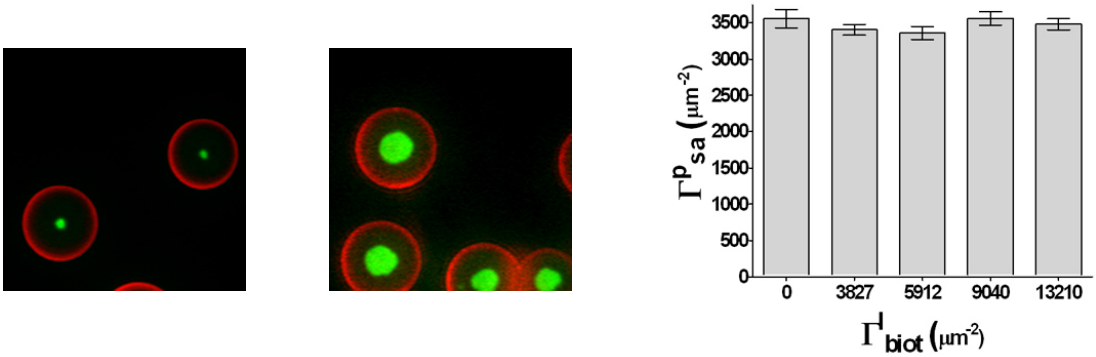



FIG. 3.3 – Superposition en fausses couleurs des images en fluorescence de la zone de contact et de l'équateur d'une goutte d'émulsion de densité $\Gamma^g_{sa}$ = 325 $\mu$m$^{-2}$ pour l'expérience témoin avec $\Gamma^l_{biot}$=0 $\mu$m$^{-2}$ (à gauche) et pour une expérience avec $\Gamma^l_{biot}$=13210 $\mu$m$^{-2}$ (au centre). Les zones d'adhésion sont parfaitement homogènes et il y a une la densité de streptavidine $\Gamma^p_{sa}$ est supérieure à $\Gamma^g_{sa}$. À droite : Histogramme de comparaison de la densité de streptavidine dans la zone de contact $\Gamma^p_{sa}$ mesurée par microscopie en fonction de $\Gamma^l_{biot}$, pour une densité $\Gamma^g_{sa}$=325 $\mu$m$^{-2}$ . Cette densité est constante, et égale à la densité de protéines dans le cas de l'expérience témoin non spécifique.

La densité de streptavidine recrutée dans la zone adhérée $\Gamma^p_{sa}$ diminue en fonction de la densité initiale de streptavidine sur les gouttes $\Gamma^g_{sa}$ comme nous l'avons représenté sur la figure 3.4.

Les ligands PEG-3400-Biotine sur la lamelle sont fixes et ne peuvent diffuser dans le plan. Nous pouvons donc *a priori* convertir très simplement l'énergie d'adhésion $\varepsilon$ en une densité de liens streptavidine/biotine $\Gamma^b_{sa}$ :

$$\Gamma^b_{sa} = \frac{\varepsilon}{U} \tag{3.1}$$

où $U = 35$kT est l'énergie de liaison streptavidine/biotine.

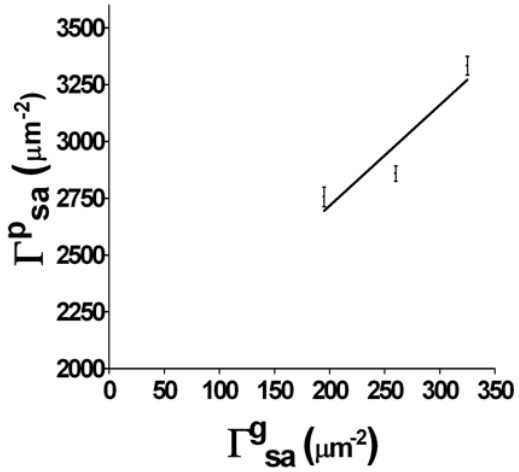



FIG. 3.4 – La densité de streptavidines $\Gamma^p_{sa}$ piégées dans le film adhéré augmente avec la densité de streptavidines sur la goutte $\Gamma^g_{sa}$.

Nous avons tracé sur le graphe 3.5 les droites $\Gamma^b_{sa}$ en fonction de la densité de biotine $\Gamma^l_{biot}$ pour quatre densités $\Gamma^b_{sa}$= 65, 130, 260, 325 $\mu$m$^{-2}$ . On constate que $\Gamma^b_{sa}$ est toujours inférieur à 900 $\mu$m$^{-2}$ et est donc inférieur à $\Gamma^p_{sa}$. On conclut donc que toutes les streptavidines dans la zone adhérée ne sont pas liées à de la biotine, alors que la densité de biotine est largement suffisante pour que toutes le soient. La proportion de streptavidines liées varie de quelques pourcents à environ 20% de la densité $\Gamma^p_{sa}$.

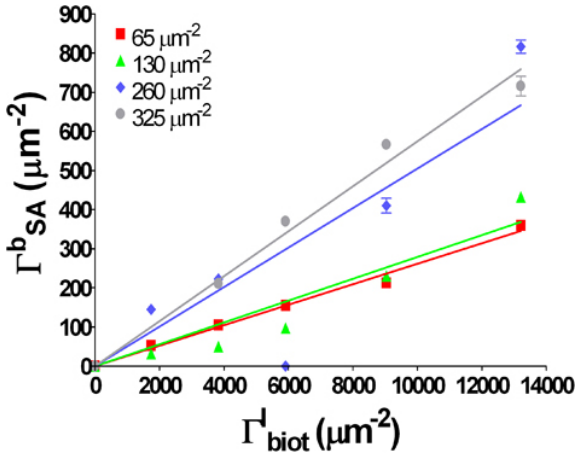



FIG. 3.5 – Variation de la densité de liens streptavidine/biotine $\Gamma^b_{sa}$ formés en fonction de $0 \leq \Gamma^l_{biot} \leq 13000$ $\mu$m$^{-2}$ pour des gouttes de densité $65 \leq \Gamma^g_{sa} \leq 325$ $\mu$m$^{-2}$ . La densité de lien est déduite du rapport entre $\varepsilon$ et l'énergie de liaison streptavidine/biotine.

L'énergie d'adhésion $\varepsilon$ et la densité de streptavidines liées $\Gamma^b_{sa}$ associée varient linéairement avec la densité de biotine sur la lamelle. Toutefois, la densité effective de streptavidines dans la zone adhérée $\Gamma^p_{sa}$ est toujours supérieure à $\Gamma^b_{sa}$.

### 3.4.1 Recrutement des protéines dans la zone adhérée

L'accroissement de densité de streptavidine dans la zone adhérée ne peut pas être attribué à la biotine sur la lamelle, puisque la présence seule de PEG-2000 permet d'observer le phénomène. On peut estimer l'énergie gagnée $\beta$ par une streptavidine à être dans la zone adhérée plutôt qu'en dehors, à partir de l'égalité des potentiels chimiques entre les deux phases :

$$\mu^o_{sa} + \mathrm{kT} \ln \Gamma^{\mathrm{g}}_{\mathrm{sa}} = \mu^{\mathrm{o}}_{\mathrm{sa}} + \mathrm{kT} \ln \Gamma^{\mathrm{p}}_{\mathrm{sa}} + \beta \tag{3.2}$$

Dans le cas d'une expérience témoin ($\Gamma^l_{biot}$=0 $\mu$m$^{-2}$ , $\Gamma^g_{sa}$=325 $\mu$m$^{-2}$ ), le nombre de streptavidines dans la zone adhérée est faible devant le nombre total de streptavidines sur la goutte (Fig. 3.3(centre). Nous pouvons donc écrire :

$$\beta = \mathrm{kT} \ln \frac{\Gamma^{\mathrm{g}}_{\mathrm{sa}}}{\Gamma^{\mathrm{p}}_{\mathrm{sa}}} \sim \mathrm{kT} \ln \frac{325}{3300} = -2,3\mathrm{kT} \tag{3.3}$$

Il est donc énergétiquement favorable pour une streptavidine d'être recrutée dans la zone de contact des gouttes, même si ce gain d'énergie est faible. Les travaux de Leckband *et al.* [87, 145, 146] ont montré qu'une interaction attractive entre une macromolécule de polyéthylène glycol et la streptavidine pouvait exister, sous certaines conditions, et conduisait à une adhésion entre les deux espèces. En effet, le polyéthylène glycol peut adopter une conformation locale qui rend la chaîne partiellement hydrophobe et ainsi apte à se lier aux domaines hydrophobes externes de la streptavidine. À partir d'une extrapolation de leurs résultats à notre densité de greffage en chaînes PEG-2000 , on peut estimer cette interaction à environ 3 kT par streptavidine, estimation en accord avec le résultat du calcul précédent.

### 3.4.2 Gélification des streptavidines dans la zone adhérée

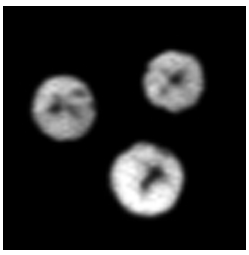
À partir des mesures de densité $\Gamma^p_{sa}$, nous pouvons déduire une distance moyenne entre deux streptavidines dans la zone adhérée. Pour une densité $\Gamma^p_{sa} = 3300$ $\mu$m$^{-2}$ , la surface par protéine est de 300 nm$^2$. La distance moyenne est donc de $d = \sqrt{\frac{300}{\pi}} = 9,80$ nm.

La streptavidine cristallise facilement [139, 40] à l'interface air/eau sur une monocouche de lipides biotinylés en un réseau cristallin bidimensionnel carré dont le pas est de 8,3 nm. La distance entre deux streptavidines centre à centre est donc de 5,6 nm.

Si l'on tient compte du fait que les protéines ne sont probablement pas ordonnées dans le film d'adhésion et que la présence des PEG-2000 , PEG-3400-Biotine et Pluronic F127 augmente

la distance entre elles, la distance $d$ que nous avons mesurée à partir de la densité nous laisse penser que les streptavidines sont dans un état condensé. Sans supposer que les protéines ont effectivement cristallisé, nous pensons qu'elles forment une sorte de gel ou de verre bidimensionnel au sein duquel la diffusion brownienne individuelle est très fortement atténuée.

Notre hypothèse de condensation des streptavidines dans le film adhéré est confortée par l'existence, dans certains cas, de "fractures" au sein de la zone d'adhésion qui ne cicatrisent pas avec le temps (Figure ci-contre).



## 3.5 Modèle descriptif et simulation numérique

Partant du fait que les streptavidines piégées dans le film d'adhésion sont condensées et incapables de diffuser individuellement, nous pouvons proposer un modèle très simple des expériences que nous avons menées : l'adhésion entre la surface de la goutte et la surface du verre s'effectue entre deux réseaux solides vitreux - le réseau de PEG-3400-Biotine et le réseau de streptavidine - dont les distances moyennes entre les molécules et les protéines sont connues par les mesures de densité $\Gamma^l_{biot}$ et $\Gamma^p_{sa}$. La densité de liens formés $\Gamma^b_{sa}$ correspond à la densité de streptavidines qui se trouvent au voisinage proche d'une biotine (Fig. 3.6).

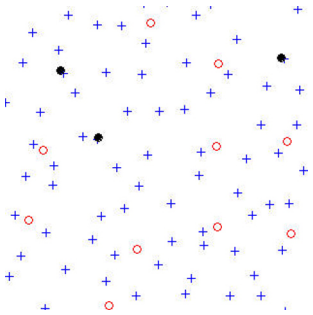


FIG. 3.6 – Schéma de principe du modèle numérique : les streptavidines sont représentées par les crois bleues, les biotines libres par les cercles rouges et les couples biotine-streptavidine par les disques noirs.

Les deux réseaux sont des réseaux carrés auxquels on a ajouté un bruit gaussien de moyenne nulle et d'écart-type égal au quart du pas. Bien que ces réseaux ne soient pas parfaitement aléatoires, ils permettront de valider la tendance de notre modèle. Les streptavidines sont considérées comme ponctuelles et les biotines sont en modélisées par un disque de capture de rayon

$r_c$ qui constitue le paramètre ajustable du modèle.

Après avoir formé les deux réseaux, on tire aléatoirement une position et un angle relatif entre eux et on dénombre les liens formés. Si une streptavidine tombe dans un disque de rayon $r_c$, alors nous considérons qu'un lien se forme, et dans le cas contraire, biotine et streptavidine sont considérées comme non liées (Fig. 3.6). Les densités $\Gamma^b_{sa}$ sont très robustes vis-à-vis des positions relatives des deux réseaux.

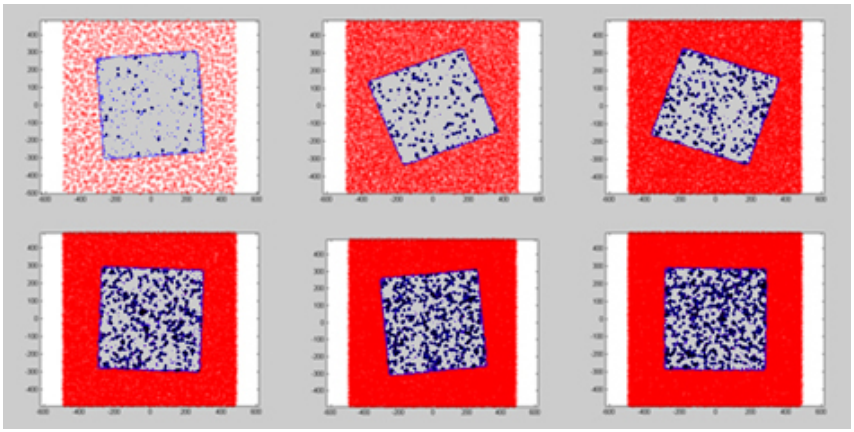


FIG. 3.7 – Représentation schématique de la méthode employée pour fixer la streptavidine sur les lamelles fonctionnalisées par les mélanges polyéthylène glycol et PEG-3400-Biotine à différentes fraction molaires.

Nous avons représenté sur la figure 3.7 l'évolution, à $\Gamma^p_{sa}$ constante , de la densité $\Gamma^b_{sa}$ pour six densités croissantes de PEG-3400-Biotine sur la lamelles. On voit que l'augmentation de la densité de biotine induit une augmentation de la densité de streptavidines liées, symbolisées par des points noirs.

Dans un premier temps, nous avons calculé l'évolution de $\Gamma^b_{sa}$ en fonction de $\Gamma^l_{biot}$ et du rayon de capture $0 \leq r_c \leq 2$ nm, pour une densité dans le film d'adhésion $\Gamma^p_{sa}$= 3333 protéines par $\mu$m $^2$. Pour diminuer les temps de calculs, nous nous avons limité le nombre de points des réseaux et nous avons calculé $\Gamma^b_{sa}$ pour une dizaines de densités $\Gamma^l_{biot}$. Sur la figure 3.8, les points correspondent aux résultats du modèle que nous avons ajustés par des droites. Nous constatons que le modèle prédit une évolution linéaire de $\Gamma^b_{sa}$ en fonction de $\Gamma^l_{biot}$ , quelle que soit la valeur du rayon de capture $r_c$, ce qui est conforme à nos résultats expérimentaux. Pour une densité de biotine donnée, plus $r_c$ augmente et plus $\Gamma^b_{sa}$ augmente.

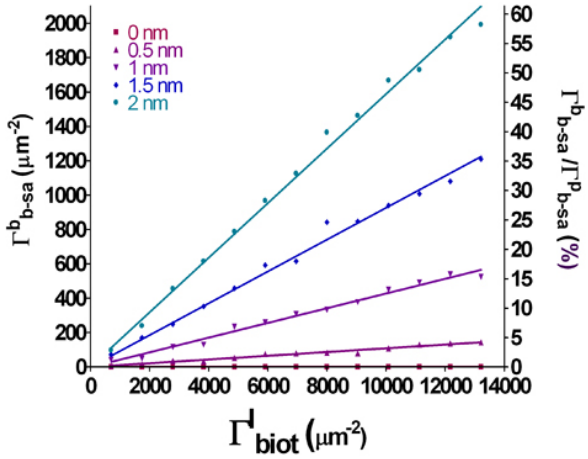



FIG. 3.8 – Évolution linéaire de la densité $\Gamma^b_{sa}$ (*axe de gauche*) et du rapport $\frac{\Gamma^b_{sa}}{\Gamma^p_{sa}}$ (*axe de droite*) en fonction de $\Gamma^l_{biot}$, pour une densité $\Gamma^p_{sa}$= 3333 $\mu$m$^{-2}$ . Le paramètre que l'on fait varier est le rayon de capture de $0 \leq r_c \leq 2$ nm.

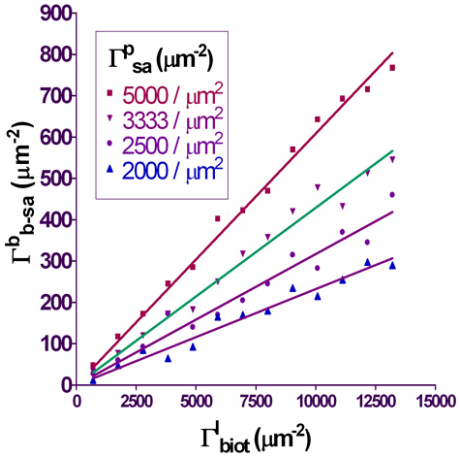



FIG. 3.9 – Évolution de la densité $\Gamma^b_{sa}$ en fonction de $\Gamma^l_{biot}$ pour un rayon de capture $r_c$= 1 nm et une densité $\Gamma^p_{sa}$ allant de 2000 à 5000 $\mu$m$^{-2}$ . La densité de streptavidine capturée est moins sensible à $\Gamma^p_{sa}$ qu'elle ne l'est à $r_c$.

Dans un second temps, nous avons fixé le rayon de capture à une valeur intermédiaire de $r_c$=1 nm, et nous avons tracé l'évolution de $\Gamma^b_{sa}$ en fonction de $\Gamma^l_{biot}$, le paramètre étant cette fois-ci la densité $2000 \leq \Gamma^p_{sa} \leq 5000$ $\mu$m$^{-2}$ . Le modèle est moins sensible (Fig. 3.9) au paramètre $\Gamma^p_{sa}$ qu'à $r_c$.

## 3.6 Comparaison entre le modèle et les expériences

Pour confronter le modèle numérique que nous avons développé dans le paragraphe précédent à nos données expérimentales, nous avons choisi parmi les mesures de la figure 3.2, deux conditions de densité $\Gamma^g_{sa}$ égales à 130 et 325 $\mu$m$^{-2}$ . Les densité $\Gamma^p_{sa}$ correspondantes sont respectivement égales à 2400 et 3330 $\mu$m$^{-2}$ (Fig. 3.4)

Nous avons représenté sur la figure 3.10 la superposition des données expérimentales et des ajustements réalisés à partir de notre modèle numérique dont seul le rayon de capture $r_c$ est un paramètre ajustable. L'ajustement des données s'effectue pour un rayon de capture $1,05 \leq r_c \leq 1,15$ nm.

Le rayon de gyration d'un PEG-3400-Biotine fixé à une surface par une de ses extrémités est de

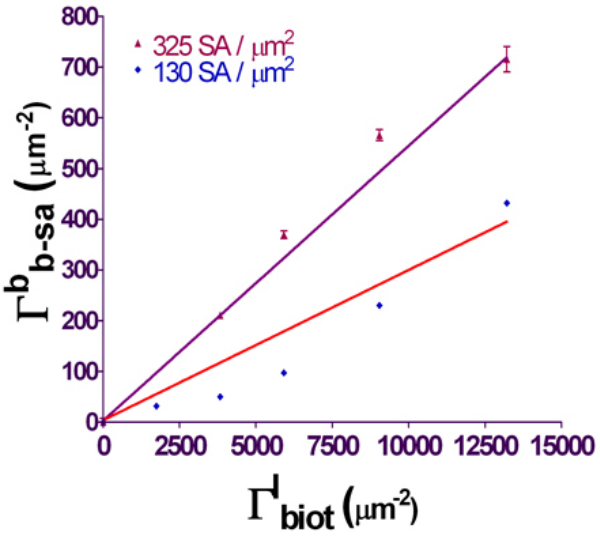



FIG. 3.10 – Comparaison entre les mesures d'énergie en unités de couples Biotine.Streptavidine équivalents et les simulation pour des densités initiales en streptavidine de 130 et 325 $\mu m^{-2}$ .

| $\Gamma^g_{sa}$ | $\Gamma^p_{sa}$ | $r_c$ |
|---|---|---|
| 130 | 2400 | 1,05 nm |
| 235 | 3330 | 1,15 nm |

3,5 nm (cf. B.1). Nous avons fait l'hypothèse que l'espace entre la goutte et le substrat était une phase condensée de polymère et de protéine adhérées. La valeur du rayon de capture que nous trouvons est valide vis-à-vis de cette interprétation.

## 3.7 Cinétique de croissance du rayon de contact

Nous avons mesuré dans un des cas les plus favorables ($\Gamma^g_{sa}$=325 $/\mu$m $^2$, $\Gamma^l_{biot}$=13200 $/\mu$m $^2$) la cinétique de croissance du rayon de contact d'une goutte sur le substrat (3.11).

Le temps de pose de chaque acquisition est de 20ms, et l'incrément de temps entre deux acquisitions est de 70ms. Le début de la cinétique est détermine visuellement : dès que la goutte commence à adhérer, sa position dans le plan est fixe.

La courbe du rayon est ajustable par une loi exponentielle de type $\rho(t) = \rho_o(1 - \exp\left(\frac{t}{t_c}\right))$ avec une valeur de $t_c \simeq$ 28secondes.
D'après nos expériences décrites dans les paragraphes précédents, la cinétique de croissance ne peut faire appel à des mécanismes de diffusion individuelle des streptavidines, puisque dans ce cas, toutes les streptavidines seraient aptes à trouver une biotine complémentaire sur la lamelle. Parmi tous les modèles publiés, un seul fait apparaître une croissance exponentielle du rayon de contact, tous les autres sont basés sur des lois de puissance [20, 38]. Si nous reprenons le modèle exponentiel de Cuvelier *et al.* , le temps caractéristique de la loi cinétique est liée à une

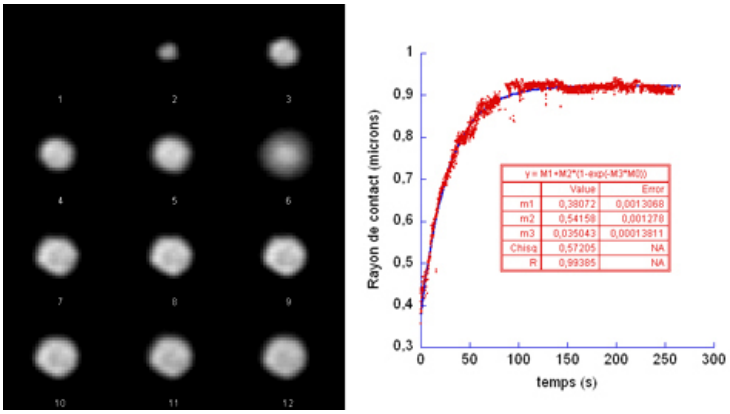



FIG. 3.11 – Cinétique de croissance du rayon de contact en fonction du temps. Un ajustement exponentiel $\rho(t) = \rho_o(1 - \exp\left(\frac{t}{t_c}\right))$ convient, et la constante de temps $t_c = 28$ s.

compétition entre une dissipation visqueuse dans le film de liquide adhéré et la loi d'Young. Dans ce cas, le temps caractéristique peut s'exprimer comme :

$$t_c = \frac{3l\eta R}{\gamma\theta_e^2} \tag{3.4}$$

où $l \sim 10$ est une facteur numérique ; $\eta$ est la viscosité su solvant dans le coin de liquide ; $\gamma$ le tension de surface de la goutte, $R$ son rayon et $\theta_e$ l'angle de contact à l'équilibre.

Avec nos valeurs numériques ($\gamma = 10^{-3}$ mN/m, $R = 3\mu$m , $\theta_e$=0,45, $t_c$=30 s) on a :

$$\eta \simeq 60\text{Pa.s} \tag{3.5}$$

En considérant cette valeur de viscosité du film qui est entre 4 et 5 ordres de grandeurs plus grande que celle de l'eau, on peut estimer à partir de [92] une épaisseur de film comprise entre 1 et 5 nm, ce qui rend le mécanisme précédent plausible.

## 3.8 Et si nous diminuons le taux de couverture en polyéthylène oxyde sur les lamelles...

Les résultats suivants ont été obtenus avec une concentration totale $C_{max} = 100$ $\mu$M en mélange PEG-2000 /PEG-3400-Biotine . Les résultats que nous présentons ici sont donc très qualitatifs, toutefois, il permettent de tracer une tendance du phénomène d'adhésion qui présentent des différences notables avec le cas précédent.

Nous n'avons pas caractérisé de manière aussi exhaustive les substrats de verre que nous avons utilisés ici. Aussi, nous ne connaissons pas les correspondances entre la fraction molaire en volume de PEG-3400-Biotine ($0\% \leq x_{biot} \leq 60\%$) et sa densité surfacique, hormis le fait que le taux de couverture en polyéthylène oxyde est plus faible que précédemment.

### 3.8.1 Effet de la densité de PEG-3400-Biotine

Nous avons mesuré l'énergie d'adhésion spécifique $\varepsilon$ en fonction de $x_{biot}$ (Fig.3.12) pour un lot de gouttes ayant une densité de streptavidine $\Gamma^g_{sa} = 400\ \mu\text{m}^{-2}$ . Ces mesures ont été réalisées dans un tampon Phosphate/Tween20 .

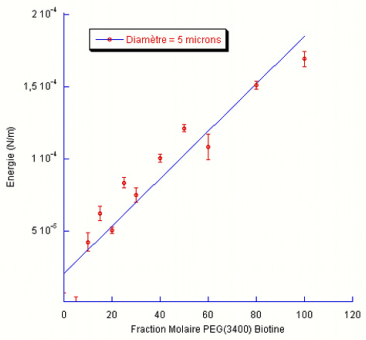



FIG. 3.12 – L'énergie d'adhésion spécifique $\varepsilon$ ($\Gamma^g_{sa} = 400\ \mu\text{m}^{-2}$ , $0 \leq x_{biot} \leq 69\%$, Phosphate/Tween20 ) varie linéairement avec la densité de biotine sur la lamelle.

L'énergie d'adhésion $\varepsilon$ croît linéairement avec la densité de biotine, comme dans le cas précédent et les ordres de grandeurs sont comparables. Nous avons vérifié qu'avec un tampon Phosphate/F127 le comportement de $\varepsilon$ était similaire en fonction de $x_{biot}$.

### 3.8.2 Structure de la zone de contact en couronne

Nous avons, de la même manière que dans le chapitre précédent, observé en épifluorescence la répartition des streptavidines fluorescentes dans la zone de contact (Fig. 3.13 et 3.14).

Sans tout de suite entrer dans les détails, on voit sur trois des quatre images des figures 3.13 et 3.14 que la répartition des streptavidines dans la zone de contact n'est plus du tout homogène, mais à une forme en couronne parfaitement définie.

Cette existence de couronne fluorescente ne s'accompagne pas d'une variation d'épaisseur du film. Le profil d'intensité suivant un diamètre de la zone d'adhésion en RICM est similaire à celui présenté sur la figure 1.4.

Pour nous assurer que l'effet de couronne n'était pas lié à une diminution du rendement quantique des fluorophores dans la région centrale (causée par du *quenching* ou de l'absorption), nous avons effectué un expérience avec des gouttes fonctionnalisées par un mélange de streptavidine non fluorescente et de streptavidine fluorescente dans un rapport 90/10. Dans ce cas, les observations sont identiques, la couronne existe.

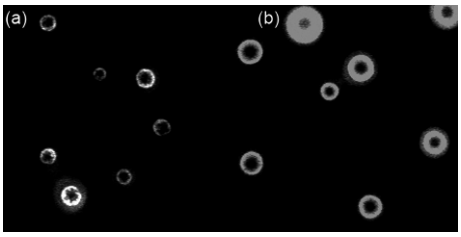



FIG. 3.13 – Images en fluorescence de la zone d'adhésion pour des gouttes de densité $\Gamma^g_{sa}$=65 $\mu$m$^{-2}$ (PBT). Dans les deux cas, (a) $x_{biot} = 5\%$ et (b) $x_{biot}$=60%, la répartition est en forme de couronne

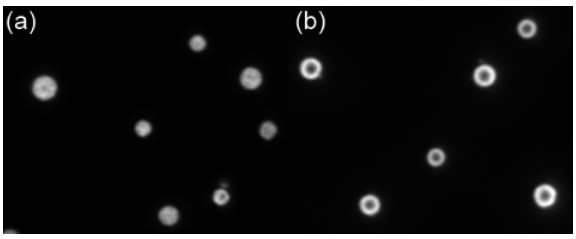
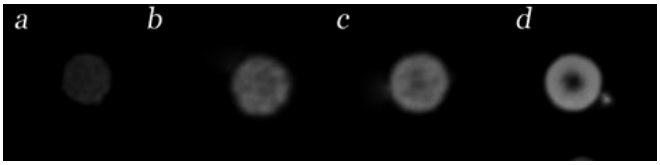



FIG. 3.14 – Gouttes avec une densité $\Gamma^g_{sa}$=65 $\mu$m$^{-2}$ diluées dans Phosphate/F127 . (a) $x_{biot} = 5\%$ : la répartition des protéines est homogène ; (b) $x_{biot}$=60% : la répartition des protéines est en forme de couronne.

Les images de la figure 3.13 et 3.14 ont été réalisées avec un lot d'émulsion de densité en streptavidine $\Gamma^g_{sa} = 65$ $\mu$m$^{-2}$ . Le cas (a) correspond à des lamelles avec une fraction molaire $x_{biot}$=5%, et le cas (b) à $x_{biot} = 60\%$. Les gouttes de la figure 3.13 étaient suspendues dans un milieu Phosphate/Tween20 , alors que celles de la figure 3.14 étaient dans un tampon Phosphate/F127 .

Sur la figure 3.13, on voit que la structure en couronne existe quelle que soit la quantité de biotine sur la lamelle. En fait, même dans le cas de l'expérience témoin, cette répartition en couronne existe. Les trous ont souvent des formes légèrement irrégulières.

En revanche, la figure 3.14 montre que la répartition en couronne n'est visible que pour $x_{biot} = 60\%$. Pour une fraction $x_{biot} = 5\%$, les zones d'adhésion sont homogènes. Les trous sont plus resserrés que dans le cas précédent, et la forme de la couronne est beaucoup plus régulière.
Nous nous sommes intéressés à l'évolution de la répartition des protéines en fonction de $0 \leq x_{biot} \leq 60\%$ (Fig. 3.15 de *a* à *d*) pour des gouttes de densité $\Gamma^g_{sa} = 65$ $\mu$m$^{-2}$ dans du Phosphate/F127 . On passe d'une répartition en disque plein parfaitement homogène à une répartition en couronne. Sur les images *b* et *c* commence à apparaître une structuration des protéines. Nous pouvons constater sur la courbe d'intensité radiale du cas *d* qu'au centre de la couronne,



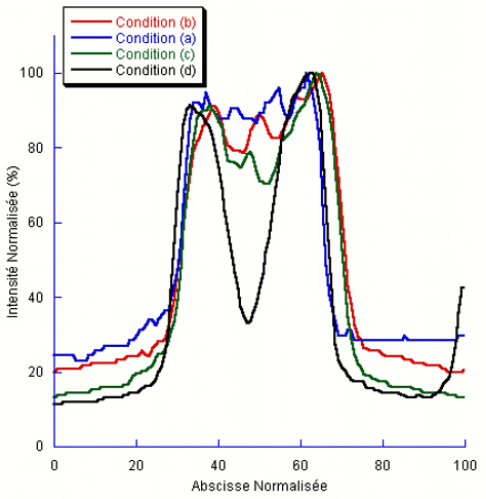




FIG. 3.15 – Évolution de la répartition des protéines dans la zone d'adhésion ($\Gamma^g_{sa} = 65\ \mu\text{m}^{-2}$ ,Phosphate/F127 ) en fonction de $x_{biot}$ . – *Droite* : nous avons représenté une coupe radiale de l'intensité des images. Au centre de la couronne, l'intensité n'est pas nulle. Pour les cas intermédiaires (b) et (c), un début de structuration apparait. *n.b.* : le contraste des images a été modifié.

l'intensité reste supérieure au signal de noir, indiquant que des protéines sont présentes.

### 3.8.3 Cinétique de formation de la zone de contact

Nous avons filmé en épifluorescence (Fig. 3.16) la formation d'une zone d'adhésion dans un cas similaire au cas *d* de la figure 3.15 ($x_{biot} = 60\%$, $\Gamma^g_{sa} = 65\ \mu\text{m}^{-2}$ , Phosphate/F127 ) avec une résolution temporelle de l'ordre de la centaine de millisecondes.

Un observation attentive des premiers instants montre que la zone deplétée au centre de la zone de contact existe dès le début de la croissance. Ce résulta contraste avec la cinétique de croissance de la figure 3.11, où les zones d'adhésion croissaient de manière extrêmement homogène.

Bien que nous n'ayons pas de film à présenter pour le cas *a* de la figure 3.15, nous avons observé que le scénario de formation d'adhésion est dans les premiers instants similaires au cas *d*, et l'homogénéisation de la répartition s'effectue dans un second temps, par diffusion des protéines dans la zone deplétée. Dans ce cas encore, le scénario de formation de la zone d'adhésion, bien que celle-ci soit au final très homogène, est différent de celui de la figure 3.11.

Ces zones d'adhésion en couronne ont été observées par Cuvelier *et al.* [37, p. 109] dans le cas de l'adhésion de vésicules fonctionnalisées par de la streptavidine sur des substrats de verre sur lesquels on a préalablement adsorbé de la caséine biotinylée. L'interprétation donnée prend en compte une compression des molécules de polyéthylène oxyde de la lamelle et de la vésicule lors

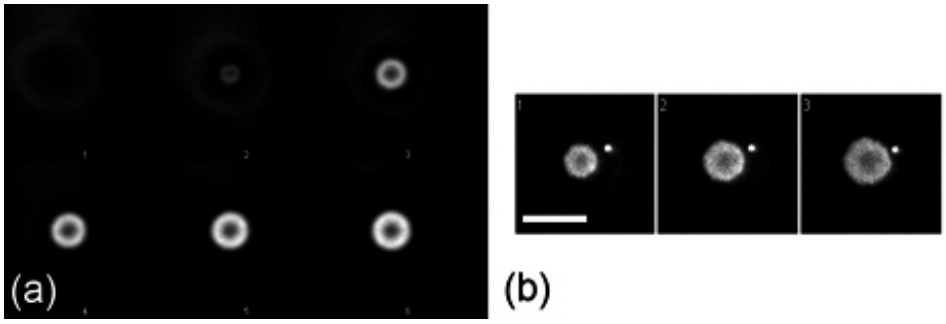



FIG. 3.16 – *Gauche* : Cinétique de croissance de la zone d'adhésion en épifluorescence pour nos gouttes d'émulsion ($x_{biot} = 60\%$, $\Gamma^g_{sa} = 65$ $\mu$m$^{-2}$ , Phosphate/F127 ). La zone deplétée apparaît dès les premiers instants. – *Droite* : Images en fluorescence de croissance de la zone d'adhésion pour des vésicules lipidiques. Adapté de [37, p. 109]

de l'approche des surfaces qui expulserait la streptavidine avant qu'elle n'est pu se lier.

Nous proposons une interprétation différente basée sur nos observations : nous avons la démonstration qu'il existe deux régimes, un régime où un recrutement spontané non spécifique des protéines a lieu (lié à une transition de phase) et un second régime où le recrutement spontané n'intervient pas et qui est tel qu'au contraire, le drainage du film entraîne une expulsion des protéines avant qu'elles aient le temps de rediffuser. Ce second régime met en évidence une topologie finale de la zone adhérée très différente. Nous faisons l'hypothèse que cette stucturation est entièrement gouvernée par des phénomènes d'obstruction moléculaire intrinsèques au confinement à 2D. Plus précisément, c'est la compétition entre la diffusion passive et la capture sur la surface qui orientera vers une obstruction précoce ou plus retardée, autorisant dans ce dernier cas une cicatrisation total du film.

Avec l'aide de Jean-François Muzy[1], nous avons effectué une simulation numérique (Monte-Carlo) de la cinétique de répartition des streptavidines dans la zone adhérée (Fig. 3.17). La simulation considère un nombre fixe de streptavidines $N$ diffusant avec un coefficient $D$ sur un disque de rayon $R$ fixé. Une protéine, à chaque pas de la simulation, a une probabilité $p$ de se fixer de manière irréversible sur la surface.
La simulation ainsi construite fait apparaître deux temps caractéristiques $t_1 = p^{-1}$ et $t_2 = R^2/D$ dont le ratio $\beta = t_1/t_2$ est notre paramètre. Physiquement, $\beta$ représente la compétition entre la réaction et la diffusion de la streptavidine dans la zone adhérée. Si $\beta \ll 1$, une protéine a le

[1]CNRS UMR 6134, Université de Corse, 20250 Corti, France muzy@univ-corse.fr

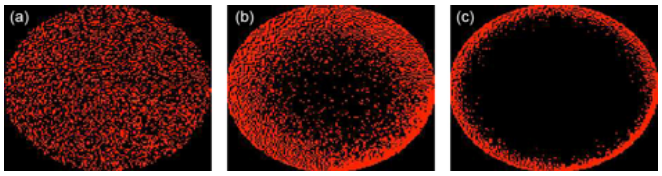



FIG. 3.17 – Évolution de la répartition des streptavidines dans la zone adhérée en fonction du ratio $\beta = pR^2/D$ associé la compétition entre la réaction et la diffusion d'une protéine. On remarque que plus $\beta$ augmente et plus le trou s'agrandit.

temps d'atteindre le centre du disque et la répartition dans la zone de contact est homogène (Fig. 3.17-gauche). Si $\beta \gg 1$, les protéines réagissent sur le bord, empêchant les autres de diffuser vers le centre 3.17-droite). Avec ces deux paramètres, la simulation permet notamment de retrouver la transition entre les zones d'adhésion non trouées (Fig. 3.15-a) et les zones en couronne (Fig. 3.15-b)

# Quatrième partie

# Conclusion

Le travail de cette thèse a consisté à réaliser et à caractériser des émulsions fonctionnalisées observables en microscope optique, puis à étudier leur adhésion sur des substrat biomimétiques par la mesure de leur angle de contact en fonction des liens spécifiques formés. L'ensemble constitue une première étape vers la fabrication d'émulsions doubles fonctionnalisées capable d'adhérer à des cellules tel que le projet avait été défini au tout début. Ce travail a montré notamment que les émulsions constituent une nouvelle surface modèle aux propriétés originales pour l'étude biophysique de l'adhésion cellulaire.

Pour obtenir nos émulsions, nous avons développé une méthode de greffage covalent *in-situ* d'une biotine amino modifiée à l'interface des gouttes en solution aqueuse. Les émulsions réalisées à base d'huile de soja contiennent des traces d'acides libres dont on peut utiliser les groupements carboxyliques pour former des liaisons peptidiques avec les ligands en utilisant un agent de couplage. Nous avons montré que malgré leur métastabilité, des émulsions formulées à partir d'huiles végétales pouvaient subir plusieurs étapes de chimie ainsi que de nombreux lavages sans être dégradées. Ces protocoles adaptés avec succès à d'autre émulsions par Mathieu Goutayer, doctorant au laboratoire, notamment dans le cadre de fabrication d'agents de contraste cibles nanométriques à partir d'huiles fortement dopées en lecithine de soja et sur des huiles cristallisables.

Nous avons mis au point une méthode de caractérisation des gouttes utilisant un cytomètre en flux, qui permet de mesurer à la fois la fluorescence (donc la densité de protéines à la surface) et la taille de chaque goutte de l'échantillon. Pour ce faire, nous avons appliqué la théorie de Mie au montage optique du cytomètre et nous avons exploité numériquement les signaux de diffusion vers l'avant et sur le coté pour mesurer la taille de chaque goutte passant devant le détecteur. Le cytomètre permet de mesurer des tailles de gouttes dont le diamètre s'échelonne entre 1 et 10 microns et permet de s'affranchir du problème de la polydispersité des échantillons qui limite les techniques classiques de mesure comme la diffusion statique de la lumière. Le cytomètre permet bien évidement de connaître la distribution de taille d'une émulsion à partir des valeurs individuelles des tailles de gouttes, mais aussi la loi de variation de l'intensité de fluorescence en fonction de la taille qui permet de suivre la chimie des greffages que nous avons réalisés.

Ainsi, les émulsions que nous avons réalisés ont pu atteindre, grâce à l'utilisation du cytomètre, un niveau de précision inégalé dans la caractérisation de la fonctionnalisation, par comparaison avec les objets souples communément utilisés dans les expériences modèles d'adhésion cellulaire.

Pour pouvoir mesurer les valeurs des angles de contacts en fonction des conditions de fonctionnalisation des substrats de verre et des gouttes, nous avons développé une méthode de microscopie qui permet, statistiquement sur plusieurs dizaines de gouttes, de mesurer le diamètre de la zone d'adhésion en RICM, la répartition quantifiée des protéines qu'elle contient et la taille de la goutte en transmission. On peut ainsi, en utilisant à bon escient la légère polydispersité des gouttes, obtenir la courbe de variation du rayon de la zone de contact en fonction du rayon des gouttes et mesurer très précisément les écarts de l'énergie d'adhésion à la loi d'Young-Dupré que l'on a attribué à l'existence d'une tension de ligne. Il serait judicieux, dans le cas de l'adhésion non spécifique de paragraphe 1.2.2, de refaire des mesures de tension de ligne avec des émulsions formulées à partir d'huiles mieux caractérisées et chimiquement plus simples qu'une huile végétale.

Une des conclusions essentielles de ce travail concerne l'existence d'un recrutement non spécifique spontané des protéines. Ce recrutement intervient lorsque la densité de greffage en polyéthylène glycol atteint un certain seuil. En dessous de ce seuil le scénario apparaît comme plus classique : le drainage induit une expulsion des protéines qui diffusent ensuite vers la zone d'adhésion depuis les bords. Ces deux régimes conditionnent la structure de la zone adhésive, ainsi que le nombre maximum de couples ligand-récepteur recrutés.

Nous avons montré que dans les deux cas, la formation de liens streptavidine/biotine s'accompagne de l'apparition d'une tension de ligne dont la valeur varie comme l'énergie d'adhésion et l'angle de contact. L'origine microscopique de cette tension de ligne est encore obscure, néanmoins les liens spécifiques sont directement impliqués. On peut donc raisonnablement évoquer l'apparition d'hétérogénéités à des échelles de quelques nanomètres comme origine probable. De plus, nous avons démontré que l'énergie d'adhésion relative aux interactions spécifiques variait linéairement en fonction de la densité de biotine sur les lamelles.

Dans le régime de recrutement spontané, les mesures d'intensité de fluorescence ont montré que la densité de streptavidine dans la zone de contact était constante et toujours très supérieure à la densité de streptavidines liés à de la biotine. Alors que l'enrichissement en couples ligand-récepteur a été observé dans le cas de surfaces liquides en présence d'interactions spécifiques [111], l'existence d'un pré-recrutement rapide des streptavidines, que nous avons associé à une faible énergie d'adhésion non spécifique ($\sim 2,3\mathrm{kT}$) des protéines avec les polyéthylène oxyde du verre, n'a a notre connaissance jamais été observé. Les streptavidines piégées dans la zone

d'adhésion ne peuvent plus diffuser individuellement et sont donc incapables de toutes réagir avec les biotines de la lamelle, pourtant en large excès. Nous avons réalisé un modèle très simple de superposition de deux réseaux solides aléatoires avec un seul et unique paramètre ajustable qui est le rayon de capture des PEG-3400-Biotine sur la lamelle. Ce modèle permet de prédire les données expérimentales en prenant un rayon de capture de l'ordre du nanomètre, valeur qui est compatible avec l'interprétation que nous avons donnée d'une phase condensée dans le film d'adhésion.

En résumé, ces travaux expriment deux aspects nouveaux concernant la formation de zones adhésives spécifiques. Ils sont certes obtenus à partir de systèmes modèles, mais permettent d'exprimer deux lois empiriques fondamentales :

1. Le confinement peut créer des conditions thermodynamiques brutalement très différentes des conditions en volume, dictées par les surfaces et ainsi conduire à des recrutements spontanés des protéines.
2. Dans une situation de confinement, l'obstruction moléculaire est une conséquence qui est démontrée par nos expériences. En effet, la formation de couronnes induite par cette obstruction démontre que la localisation des ligands conduit à une structuration.

Nous terminons en évoquant les conséquences éventuelle de ces deux nouvelles lois sur la formation de synapse immune chez le lymphocyte B [86] : La loi 1 peut conduire à un effet catalytique extrêmement efficace. La loi 2 démontre que si on considère cette fois des surfaces liquides telles que la diffusion passive est rendue possible, alors le phénomène d'obstruction précédent se traduira par un phénomène d'exclusion. Ceci autorisera les ligands réactifs à se localiser tout en expulsant ceux qui ne le sont pas. Ceci est en parfait accord avec les résultats observés.

# Cinquième partie

# Annexes

# Annexe A

# Techniques de mesure de particules colloïdales : taille et dosage biochimique

## A.1 Techniques de dosage biochimique de particules

Pour mesurer la concentration en molécules à la surface de particules colloïdales, il est possible d'utiliser des techniques colorimétriques ou spectrofluorométriques. Des méthodes basées sur la mesure de la radioactivité existent, mais nécessitent très souvent un appareillage et des conditions particulières de mise en œuvre, c'est pourquoi nous n'en parlerons pas dans ce chapitre.

Pour doser une concentration de protéines, la première méthode existante consiste à mesurer l'absorbance à deux longueurs d'ondes : une située dans le proche ultraviolet (280nm) et l'autre dans le lointain (205 nm). L'absorbance d'une espèce chimique A est reliée à sa concentration par la loi de Beer-Lambert par la connaissance du coefficient d'extinction molaire à la longueur d'onde d'étude et à la longueur du chemin optique de la cuve exprimée en centimètre :

$$A_\lambda = \varepsilon_\lambda . c . l \tag{A.1}$$

**Absorbance dans l'UV lointain :** L'absorbance des protéines dans le lointain UV provient de la présence des liaisons peptidiques [70, 141], notamment celles qui sont liées à des groupements Trp, pHe, Tyr, Cys, Met et Arg. Il y a peu de variations d'absorption entre deux protéines différentes, donc il est possible par cette méthode d'obtenir une mesure

absolue de la concentration. La principale difficulté de mise en œuvre tient au fait que les spectrophotomètres classiques n'ont pas un très bon rendement dans l'UV lointain. De plus, à cette longueur d'onde, l'absorbance du dioxygène et des tampons est non négligeable et contribue à fausser les mesures.

**Absorbance dans l'UV proche :** L'absorbance à 280 nm d'une protéines est causée par la présence dans sa structure primaire d'acides aminés Trp, Tyr et Phe et de l'existence de ponts disulfures dans sa structure tridimensionnelle [68, 90]. Ces caractéristiques étant très variables d'une classe de protéine à l'autre, l'absorbance à 280nm varie de 1 à 4 (pour les protéines de laine, riches en Trp). En général, elle varie de 0,5 à 1,5. Il n'est donc pas possible d'avoir une mesure absolue à partir de cette méthode. En revanche, il est possible de calibrer un appareil à partir de l'absorbance de l'albumine bovine qui a été définie comme standard (à 1 mg/mL, $A_{280}$=0,66). Il est possible d'estimer le coefficient d'extinction molaire d'une protéine à 280 nm à partir des coefficients d'extinction molaire et de la répartition molaire des acides aminés Trp, Tyr et Cys au sein de la protéine :

$$A_{280} = \frac{5690 n_{\mathrm{Trp}} + 1280 n_{\mathrm{Tyr}} + 120 n_{\mathrm{Cys}}}{\text{Masse Molaire}}$$

La deuxième grande famille de méthodes de dosages de protéines consiste à mesurer la variation d'absorbance à une longueur d'onde donnée d'une espèce chimique qui se fixe sur la protéine (Bradford) ou qui réagit avec un des produits de la réaction des liaisons peptidiques avec le cuivre dans des conditions basiques (Lowry, BCA)

**Méthode de Lowry :** En milieu basique, les liaisons peptidiques, essentiellement celles liées au Trp et à la Tyr, réagissent avec le cuivre suivant la réaction de Biuret. Le $Cu^+$ réagit avec le réactif de Folin [102], ce qui produit une intense couleur bleue. Cette méthode est une des plus anciennes méthodes colorimétriques. Bien que la sensibilité à la présence de Trp et de Tyr rende impossible un dosage absolu, il est possible de se référer aux nombreux dosages publiés pour obtenir des valeurs standard. Les principaux inconvénients liés à cette méthode concernent le fait qu'il faut chauffer assez fortement pour hydrolyser les liaisons en présence de cuivre et que le résultat obtenu est sensible aux surfactants.

**Méthode BCA (BiCinchoninic Acid) :** Cette méthode est basée sur le même schéma que la méthode de Lowry, mais dans ce cas, on détecte la présence de $Cu^+$ en conditions basiques par sa réaction avec l'acide Bicinchroninique [149]. La réaction se manifeste par la présence d'une couleur violette, dont on mesure l'absorbance à $\lambda$=562 nm. Contrairement

à la méthode de Lowry, cette méthode s'effectue en une étape. En revanche le résultat obtenu dépend à la fois de la quantité de protéines et du temps d'incubation.

**Méthode de Bradford :** Cette méthode est plus simple que les deux précédentes. On utilise un colorant, le Coomassie Blue 250 qui a la propriété de s'attacher à la protéine que l'on veut doser [21]. Le colorant présente quatre formes acido-basiques dont trois prédominent à pH acide (les pKa des couples sont de $1,15$ ; $1,82$ et $12,4$). Ces trois formes prédominantes absorbent respectivement à $\lambda$=470 nm (rouge), $\lambda$=650 nm (vert) et $\lambda$=590 nm (bleu). La forme bleue se fixe sur les protéines. On mesure donc la concentration en protéines en mesurant l'absorbance à 590 nm. Le colorant se fixe préférentiellement sur les résidus Arg et Lys, donc la quantification absolue n'est pas possible avec cette méthode.

**Cas Particulier de la Biotine** Pour doser de la biotine en solution ou liée à une protéine, on utilise une méthode de dosage compétitif faisant intervenir de l'avidine et un analogue de la biotine, la molécule HABA, qui se lie à l'avidine avec une constante d'affinité beaucoup plus faible que la biotine [75] : dans une solution de HABA/Avidine on ajoute la solution à doser en biotine et à chaque fois qu'une biotine se lie à de l'avidine, une molécule HABA repart en solution. La spectre d'absorption du HABA change suivant si la molécule est liée ou non à de l'avidine ce qui permet de mesurer la quantité de biotine dans la solution. Cette méthode est très bien documentée, notamment sous la forme de fiches techniques de tous les fabricants (Pierce, Interchim). Elle est particulièrement bien adaptée pour doser les rendements de biotinylation de protéines mais ne permet que difficilement de doser des concentrations inférieures à $10^{-6}$ mol/L .

## A.2 Techniques de mesure de taille

Dans le domaine des émulsions, les techniques faisant appel à une analyse de la diffusion de lumière [28] sont très utilisées, notamment pour leur relative facilité d'utilisation et l'existence d'appareils commerciaux considérés comme classiques (Malvern Mastersizer). Toutes les techniques de mesure de taille (diffusion, ultrasons, etc.) ont un point commun : leur mesure est effectuée en moyenne sur l'ensemble de la population de gouttes. Aussi leur justesse de mesure diminue à mesure que la distribution de taille devient très polydisperse puisque le paramètre mesuré ne varie pas de manière monotone en fonction de la taille des objets. Nous présenterons toutefois une technique inspirées des méthodes de séparation chromatographiques, la FFF, qui

permet de séparer une population en fractions de taille égales et de réaliser une mesure sur les tailles ainsi séparées.

### A.2.1 Diffusion de la lumière : mesure moyenne

Lorsqu'un élément de matière est soumis à un rayonnement lumineux, certains rayons interagissent avec le moment dipolaire des molécules. Ces molécules sont alors excitées et répondent au champ électro-magnétique par une oscillation de leur densité électronique. Chaque molécule se comporte alors comme un petit dipôle oscillant qui rayonne dans tout l'espace un champ électro-magnétique diffusé : c'est le phénomène de diffusion de rayonnement.

Pour un système donné de particules colloïdales de même taille assez dilué, soumise à une agitation brownienne, la lumière diffusée présente des variations temporelles rapides liées aux mouvements des particules. La récupération de ce signal et le calcul de la fonction de corrélation temporelle associée permet de déduire, moyennant la connaissance de la viscosité du milieu, le rayon hydrodynamique moyen des particules à partir de la mesure du coefficient de diffusion et de la relation d'Einstein. Cette technique de mesure de Diffusion Dynamique de la Lumière est utilisée pour des particules colloïdales petites dont le diamètre ne dépasse pas quelques microns.

Pour des particules dont les tailles sont supérieures au micron, on lui préfère la technique de Diffusion Statique de la Lumière qui mesure (ou interpole) le facteur de forme des particules à des angles différents à partir de la mesure de l'intensité moyenne diffusée. Dans le cas de sphères, le calcul exact de la relation entre l'intensité diffusée, la fraction volumique des gouttes et le facteur de forme existe (Théorie de Mie) et permet de faire coïncider le facteur expérimental avec le facteur théorique.

Les choses sont moins simples dans le cas de la mesure de l'intensité diffusée d'une population polydisperse. En effet l'intensité diffusée sera la somme, pondérée par les fractions volumiques, des facteurs de formes relatifs à chaque taille de particules. La déconvolution nécessaire du signal pour construire la distribution est complexe et les logiciels l'effectuent de manière itérative : partant d'une distribution dont on choisit les caractéristiques principales (bimodale, monomodale, etc.), l'algorithme modifie pas à pas les fractions volumiques, les tailles moyennes et les écart-types de manière à trouver UNE distribution dont le signal de diffusion calculé est similaire au signal mesuré [24]. Cette méthode n'est donc pas bijective et il n'est pas rare de voir apparaître

des sous populations parasites qui n'ont aucune réalité physique.

Suivant le type d'application que l'on cherche, on exprimera la distribution de taille en fonction du nombre, du rayon, de la surface et du volume. Ces distributions modifient le poids relatif des gouttes de grosses tailles par rapport aux autres au fur et à mesure que le moment augmente.

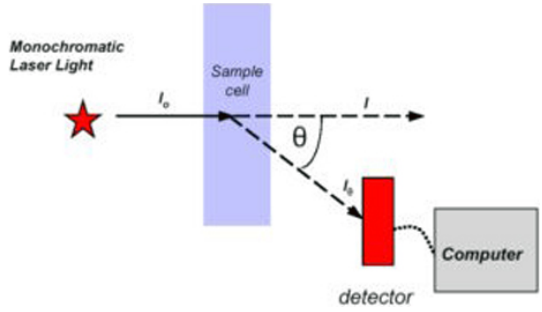



FIG. A.1 – Schéma de principe de la technique de mesure de diffusion de la lumière. Dans le cas de la diffusion dynamique, un corrélateur temporel est intercalé entre le détecteur et le système d'analyse.

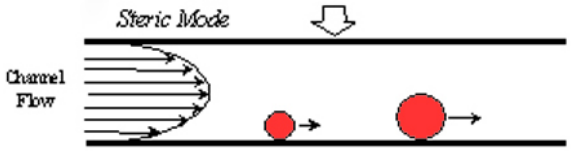



FIG. A.2 – Schéma de principe de la FFF en mode stérique. Dans ce mode, les objets les plus gros ont un temps de transit plus court que les objets petits.

### A.2.2 Field Flow Fractionation : mesure séparative

La technique de FFF [67] s'inspire de la chromatographie en phase liquide dans des colonnes capillaires : la population de particules à séparer par taille ou poids moléculaire est introduite dans un canal où circule une phase continue avec un profil hydrodynamique stationnaire de Poiseuille. Pour la chromatographie, la séparation s'effectue entre les espèces à partir d'un temps de rétention induit par une affinité différente des molécules avec la surface de la colonne. Pour la FFF, on introduit un champ de force qui sera responsable de la séparation et qui est dirigé perpendiculairement à la direction du flux. Ce champ peut être thermique, électrique, gravitationnel ou stérique. Cette techniques permet de séparer des particules de taille allant de quelques nanomètres à plusieurs dizaines de microns suivant le champ choisi. La taille est déduite d'une temps d'élution relatif à l'utilisation d'étalons ou à une mesure de diffusion de lumière effectuée en ligne.

Nous avons présenté sur la figure A.2 le mode de séparation stérique qui induit un temps d'élution plus court pour les gros objets. En effet, c'est derniers ont une vitesse moyenne plus grande que les petits puisqu'ils interceptent un plus grand nombre de lignes de courant dans le canal. Pour

d'autres modes, notamment le mode gravitationnel, les temps d'élution sont inversés par rapport à celui-ci.

# Annexe B

# Polyethylèneglycols

Le polyéthylène glycol (PEG) et le polyéthylène oxyde (PEO) sont des polymères synthétiques de même structure chimique, à l'exception de leur taille et de leur groupes terminaux : ce sont les membres de la familles des polyethers les plus importants commercialement.
On parle plus généralement de polyéthylène glycol pour les macromolécules oligomériques liquides et de polyéthylène oxyde pour des macromolécules de grand poids moléculaire dont le point de fusion est relativement bas

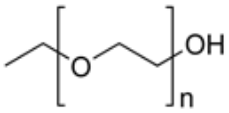



FIG. B.1 – Structure chimique d'une macromolécule de polyéthylène glycol

Les polyéthylène oxyde sont connus pour leur excellente hydrophilie et leur totale innocuité biologique, bien que n'appartenant pas à la classe des biopolymères (chitosan, alginate, dextran, collagène, etc.). Ils entrent dans la composition de produits aussi divers que des solutions injectables anti-vieillissement du bois, les lubrifiants aqueux et les produits pharmaceutiques ou cosmétiques. Depuis une trentaine d'année, les PEO sont couramment utilisés dans le domaine des biotechnologies, soit sous forme de solution aqueuse en volume, pour la cristallisation de protéines par exemple, soit greffés sur des surfaces de nanoparticules ou d'implants artificiels de manière à accroître leur tolérance vis-à-vis de l'organisme hôte.

Les oligomères de PEO entrent couramment dans la composition de la partie hydrophile des tensioactifs non ioniques (Tween, Myrj, Brij). L'utilisation du PEO permet de réaliser des séries homologues de HLB variable, en attachant à une partie hydrophobe des oligomères de différentes longueurs. La série des tensioactifs Poloxamer (commercialement vendus sous le nom de

Pluronic ou Synperonic) sont des copolymères triblocs composés de deux chaînes PEO de même longueur et d'un chaîne de jonction hydrophobe formée à partir d'un polypropylène oxyde. C'est un membre de cette famille, le Poloxamer 188 ou Synperonic PE/F68 que nous utilisons dans la formulation de nos émulsions.

D'un point de vue biologique, les PEO, et dans une moindre mesure les Poloxamer, ont la propriété de sceller les défauts des membranes cellulaires [104], permettant de protéger les cellules vivantes des chocs mécaniques, notamment lors du transport. Cette effet, bien que mal compris, a permis d'obtenir *in-vivo* des résultats très spectaculaires sur le taux et la rapidité de rémission d'animaux de laboratoire atteints d'une paralysie des quatre membres provoquée par des lésions spinales profondes [96].

## B.1 Modèle statistique des PEO en solution aqueuse

Dans la famille des polyethers linéaires, le polyéthylène oxyde est le seul membre à la fois parfaitement soluble dans l'eau et dans les solvants organiques, indépendamment de sa concentration et de sa masse moléculaire, alors que le polyméthylène oxyde -(O-$CH_2$)$_n$- et le polypropylène oxyde -(O-$CH_2$-$CH_2$-$CH_2$)$_n$- sont totalement insolubles dans l'eau, exception faite des PMO de bas poids moléculaire. Cette particularité s'explique par la distance entre les deux oxygènes des groupements éther consécutifs (2,85 A), très proche de celle entre deux oxygènes (2,88 A) de molécules d'eau liquides [91]. Si l'on ajoute à cela la possibilité de créer des liaisons hydrogène avec le solvant, différentes études [22, 23] ont montré qu'une chaîne de PEO est de géométrie hélicoïdale, et qu'une couche de molécules d'eau est condensée tout au long du squelette, ces molécules étant au nombre de 2 à 4 par monomère. L'existence de cette première couche d'hydratation a été déduite du fait que le coefficient de diffusion des molécules d'eau situées proche du squelette est plus faible que celui de l'eau dans le volume et des valeurs fortement négatives de l'entropie de mélange et de dilution du PEO dans l'eau [91], témoins d'une plus grande structuration du solvant en présence des chaînes de polymère.
Les mesures de spectroscopie Raman indiquent que le squelette d'une chaîne de PEO peut adopter une conformation hydrophile *trans-gauche-trans* suivant les liaisons covalentes -O-$CH_2$-$CH_2$, qui provoque la structure en hélice. Mais il peut aussi adopter une conformation *gauche-trans-gauche-gauche* suivant les liaisons OCH−2-CH−2-O-CH−2-CH−2O dont le caractère est plutôt hydrophobe.

Une série d'études physiques [22, 23, 152, 89] effectuées par différents groupes ces vingt dernières années ont permis de préciser le comportement du PEO dans l'eau. La longueur de persistance des PEO est très petite ($L_p$=3,5 Å), de l'ordre de la taille d'un monomère, faisant des PEO des polymères extrêmement flexibles. A température ambiante, en solution homogène, le comportement des PEO est celui d'une chaîne de polymère en bon solvant, confirmé par la loi de variation du rayon de gyration sur plusieurs ordres de masse molaire (de 3400 à plusieurs millions de grammes par mole) et par la valeur du ratio entre le rayon hydrodynamique et le rayon de gyration, qui s'ajuste parfaitement avec les modèles de chaînes gaussiennes ou pseudo-gaussiennes. Le rayon de gyration s'exprime, pour des chaînes de plus de 6000 g/mol comme

$$R_g^2 = 4,08.10^{-18} M_w^{1,16} \text{ cm}^2$$

| MW | Rg (nm) | Rg (nm) | Rg (nm) | Rg (nm) | Rg (nm) |
|---|---|---|---|---|---|
| Source | [22] | [152] | [23] | [48] | [89] |
| 2000 | | >1,20 | 3,57 | 3,5 | 1,66 |
| 3400 | 1,28 | >1,40 | >3,57 | 4,74 | 2,25 |
| 5000 | | | | 5,96 | 2,82 |
| Obtention | Mesure (DLS) | Mesure (SANS) | Mesure (DLS) | Rayon de Flory | Extrapolation |
| Solvant | H2O | D2O | H2O | H2O | H2O |

TAB. B.1 – Rayons de gyration des PEO de 2000, 3400 et 5000 g/mol extraits des sources citées en haut de chaque colonne

De manière surprenante, les différentes sources donnent des rayons de gyration pour des PEO de même longueur qui varient du simple au double. Le calcul effectué par Leckband *et al.* est un calcul classique du rayon de Flory : $R_g = a.n^{3/5}$ où $a$ est la longueur d'un monomère et $n$ le degré de polymérisation. Nous avons dit un peu plus haut dans le paragraphe que le longueur de persistance était égale à la taille du monomère, décomposable en trois liaisons covalentes de longueur égale à 15 Å. Si on considère que la taille du monomère est inférieure à la longueur de persistance parce que les liaisons adoptent une conformation tridimensionnelle, on obtient par exemple pour le PEO 2000 un rayon de gyration de l'ordre de 2,5 nm, plus compatible avec les différentes valeurs des autres sources.

## B.2 Modèle statistique des PEO à une interface

Dans la problématique de la délivrance vectorisée de principes actifs, le PEO joue un rôle central, puisque lorsqu'il se trouve à la surface du vecteur, celui-ci augmente à la fois son temps de résidence de plusieurs ordres de grandeurs ainsi que la pharmacocinétique des composés qu'il transporte [113]. La présence de PEO à la surface permet de masquer la particule (protéine, nanoparticule lipidique, liposome) vis-à-vis des principales barrières immunitaires de l'hôte. La raison de cette furtivité est encore mal comprise, toutefois il est admis que quel que soit le mécanisme, la présence de PEO empêche l'adsorption d'anticorps à la surface de la particule, limitant le processus d'opsonisation [48].

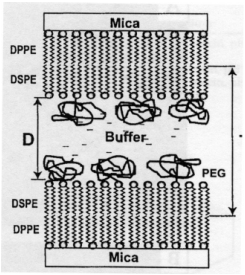



FIG. B.2 – Schéma représentatif de l'expérience en SFA menée par Efremova *et al.* entre deux surfaces de mica portant des bicouches lipidiques et des chaînes polyéthylène oxyde . Source [48].

Outre les différents modèles numériques traitant de la répartition des monomères de PEO à proximité d'une surface [15, 101], les études expérimentales de l'effet de la présence de chaînes de PEO greffées à une interface ont été réalisé au départ par Needham *et al.* en diffraction de rayons X sur des multicouches lipidiques, puis par Kuhl *et al.* avec des bicouches négativement chargées et Leckband *et al.* avec des bicouches de lipides neutres [48], à l'aide d'un SFA, qui permet d'exploiter des mesures directes de force en fonction de la distance.
La figure B.2 présente la configuration de l'expérience de Efremova *et al.* [48] : deux surfaces de mica fraîchement clivé sont recouvertes d'une bicouche lipidique composée de DPPE coté mica et d'un mélange DSPE / DSPE -PEG 2000 coté solution. Les concentrations molaires de lipides pegylés sont de 1,3%, 4,5% et 9%, correspondant respectivement à un régime "champignon", de recouvrement partiel et de brosse. Les bicouches sont réalisées à l'aide d'une balance de Langmuir, ce qui permet de connaître finement la distance entre les lipides (43 Å) ainsi que l'aire $\sigma$ occupée par les chaînes de PEG et la distance $s$ entre les sites de greffage. Ces paramètres sont importants, puisqu'ils permettent de déduire l'épaisseur $L$ de la couche de PEG à partir de la valeur du rayon de gyration :

$$L = s(R_F/s)^{3/5}$$

Nous avons rapporté les valeurs données par Leckband *et al.* à titre indicatif dans le tableau B.2

| % PEG<br>% mol | Aire / lipide | Aire / PEG<br>$\sigma$ (Å) | Régime | Distance interchaîne<br>$s$ (Å) | Epaisseur<br>$L$ (Å) |
|---|---|---|---|---|---|
| 1,3 | 43 | 3300 | Champignon | 65 | 35 |
| 4,5 | 43 | 960 | Recouvrement Faible | 35 | 35 |
| 10 | 43 | 430 | Brosse | 23 | 45 |

TAB. B.2 – Résumé des valeurs de l'extension des polyéthylène oxyde en fonction de leur distance latérale sur des bicouches supportées par du mica. Source [48].

Suivant la concentration surfacique en PEO, la répulsion d'origine stérique entre les deux surfaces peut être décrite par des modèles de polymères aux interfaces en bon solvant (Dolan-Edwards aux faibles concentrations, MWC ou Alexander-De Gennes en régime de recouvrement faible ou de brosse).

Des mesures d'adsorption de protéines modèles (fibrinogène, albumine, BPTI) on été réalisées par la technique de SPR : l'adsorption décroît en fonction de la concentration de surface en PEO. Plus exactement, au moins pour l'albumine, le paramètre pertinent en l'absence d'interactions électrostatiques ou de Van der Waals est le ratio entre la taille de la protéine et la distance $s$ entre les chaînes en surface. Ce modèle trouve ses limites dans le cas de protéines cylindriques comme le fibrinogène, ou des protéines plus complexes comme la streptavidine [146].

De manière surprenante, le PEO, réputé pour sa parfaite hydrophilie, peut adopter des comportements que les théories de polymères en bon solvant n'expliquent pas. A partir d'une certaine masse moléculaire (20000 g/mol ), Rupert *et al.* a montré qu'il peut stabiliser des solutions de vésicules lipidiques en s'adsorbant à leur surface [136], introduisant une interaction répulsive stérique empêchant la coalescence. Leckband *et al.* on montré qu'il existait une interaction attractive mesurable entre le PEO-2000 et une surface de mica recouverte d'alcanes méthylés [145] et plus récemment qu'il existe un potentiel attractif important lié à l'adhésion des chaînes de PEO avec de la streptavidine et de la mucine [146]. Bien que pour amorcer l'adhésion avec la streptavidine, il faille fournir une énergie de compression de quelques dizaines de kT par protéine, cette adhésion se révèle durable, et après détachement, induit un temps de retour à l'équilibre du polymère de plusieurs dizaines de minutes. Tous ces résultats tendent à montrer qu'en présence de certaines interfaces, le PEO est capable d'adhérer moyennant un changement de conformation de certains de ses enchaînements de monomères de *tgt* hydrophile à *tggt* hydro-

phobe [87].

En conclusion de ce paragraphe, le comportement majoritaire du PEO en milieu aqueux est celui d'un polymère très flexible et capable de générer une répulsion stérique entre deux interfaces ou une interface et des macromolécules en suspension. Ces résultats sont très bien décrits par les modèles de polymères en bon solvant en volume ou à proximité d'une surface. Toutefois, les monomères peuvent adopter des conformations qui confèrent un comportement de chaîne hydrophobe, dont les conséquences commencent tout juste à être prises en compte dans les modèles.

# Bibliographie


[1] S. G. Ackleson et R. W. Spinrad : Size and refractive-index of individual marine particulatesa flow cytometric approach. *App. Opt.*, 27(7):1270–1277, avril 1988. 61

[2] A.W. Adamson et A.P. Gast : *Physical Chemistry of Surfaces*. John Wiley and Sons, 1997. 97

[3] A. Albersdörfer, T. Feder et E. Sackmann : Adhesion-induced domain formation by interplay of long-range repulsion and short-range attraction force : A model membrane study. *Biophys. J.*, 73(1):245–257, juillet 1997. 31, 32, 33, 40

[4] B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts et P. Walter : *Molecular Biology of the Cell*. Garland Science, 2002. 3, 4, 6, 7, 9, 13, 15

[5] P. Andre, A. M. Benoliel, C. Capo, C. Foa, M. Buferne, C. Boyer, A. M. Schmitt-verhulst et P. Bongrand : Use of conjugates made between a cytolytic t-cell clone and target-cells to study the redistribution of membrane molecules in cell contact areas. *J. Cell Sci.*, 97:335–347, octobre 1990. 15

[6] B. Ardman, M. A. Sikorski et D. E. Staunton : Cd43 interferes with lymphocyte-t adhesion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 89(11):5001–5005, juin 1992. 13

[7] M. P. Aronson et H. M. Princen : Contact angles associated with thin liquid-films in emulsions. *Nature*, 286(5771):370–372, 1980. 21

[8] McLeod C.M. & McCarthy M. Avery, O.T. : Induction of transformation by a desoxy-ribonucleic acid fraction isolated from pneumococcus type iii. *J. Exp. Med.*, 79:137–158, 1944. 58

[9] G. I. Bell, M. Dembo et P. Bongrand : Cell-adhesion competition between nonspecific repulsion and specific bonding. *Biophys. J.*, 45(6):1051–1064, 1984. 11, 13, 39

[10] A. L. Bernard, M. A. Guedeau-Boudeville, L. Jullien et J. M. di Meglio : Imaging vesicle adhesion by evanescent wave-induced fluorescence. *Europhys. Lett.*, 46(1):101–106, avril 1999. 34

[11] H. Bernath, M Hai, E. Mastrobattista, A.D. Griffiths, S. Magdassi et D.S. Tawfik : In vitro compartmentalization by double emulsions : sorting and gene enrichment by fluorescence activated cell sorting. *Anal. Biochem.*, 325(1):151–157, Feb 2004. 55

[12] M. P. Bevilacqua et R. M. Nelson : Selectins. *J. Clin. Invest.*, 91(2):379–387, février 1993. 6

[13] J. Bibette : Depletion interactions and fractionated crystallization for polydisperse emulsion purification. *J. Colloid Interface Sci.*, 147(2):474–478, décembre 1991. 54

[14] J. Bibette, F. Leal-Calderon, V. Schmitt et P. Poulin : *Emulsion science : Basic principles.* Springer-Verlag Berlin, 2002. 53

[15] M. Bjorling, P. Linse et G. Karlstrom : Distribution of segments for terminally attached poly(ethylene oxide) chains. *J. Phys. Chem.*, 94(1):471–481, 1990. 140

[16] D. Boal : *Mechanics of the Cell.* Cambridge University Press, 2002. 16, 24

[17] C.F. Bohren et D.R. Huffman : *Absorption and Scattering of Light by Small Particles.* Wiley-Interscience, 1983. 61, 62

[18] P. Bongrand : Specific and nonspecific interactions in cell biology. *J. Dispersion Sci. Technol.*, 19(6-7):963–978, 1998. 3

[19] P. Bongrand : Ligand-receptor interactions. *Rep. Prog. Phys.*, 62(6):921–968, juin 1999. 9, 11

[20] A. Boulbitch, Z. Guttenberg et E. Sackmann : Kinetics of membrane adhesion mediated by ligand-receptor interaction studied with a biomimetic system. *Biophys. J.*, 81(5):2743–2751, Nov 2001. 11, 42, 43, 98, 116

[21] M. M. Bradford : A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72:248–254, May 1976. 133

[22] C. Branca, A. Faraone, S. Magazu, G. Maisano, P. Migliardo et V. Villari : Polyethylene oxide : a review of experimental findings by spectroscopic techniques. *J. Mol. Liq.*, 87(1):21–68, 2000. 138, 139

[23] C. Branca, S. Magazu, G. Maisano, F. Migliardo, P. Migliardo et G. Romeo : Hydration study of peg/water mixtures by quasi elastic light scattering,acoustic and rheological measurements. *J. Phys. Chem. B*, 106(39):10272–10276, 2002. 138, 139

[24] W. Brown : *Dynamic Light Scattering : The Method and Some Applications*. Oxford Science Publications, 1992. 134

[25] R. Bruinsma, A. Behrisch et E. Sackmann : Adhesive switching of membranes : experiment and theory. *Phys. Rev. E*, 61(4 Pt B):4253–4267, Apr 2000. 40, 41

[26] R. Bruinsma et E. Sackmann : Bioadhesion and the dewetting transition. *C. R. Acad. Sci. Paris Série IV*, 2(6):803–815, août 2001. 40, 41, 42

[27] P. B. Canham : Minimum energy of bending as a possible explanation of biconcave shape of human red blood cell. *J. Theor. Biol.*, 26(1):61, 1970. 18

[28] A. Cao : Light scattering. recent applications. *Analytical Letters*, 36(15):3185–3225, 2003. Review. 133

[29] C. Capo, F. Garrouste, A. M. Benoliel, P. Bongrand et R. Depieds : Nonspecific-binding by macrophagesevaluation of the influence of medium-range electrostatic repulsion and short-range hydrophobic interaction. *Immun. Comm.*, 10(1):35–43, 1981. 13, 15

[30] P. Y. Chan et T. A. Springer : Effect of lengthening lymphocyte function-associated antigen-3 on adhesion to cd2. *Mol. Biol. Cell*, 3(2):157–166, février 1992. 13

[31] S. E. Chesla, P. Selvaraj et C. Zhu : Measuring two-dimensional receptor-ligand binding kinetics by micropipette. *Biophys. J.*, 75(3):1553–1572, septembre 1998. 10

[32] Yeh-Shiu Chu, Sylvie Dufour, Jean Paul Thiery, Eric Perez et Frederic Pincet : Johnson-kendall-roberts theory applied to living cells. *Phys. Rev. Lett.*, 94(2):028102, Jan 2005. 16

[33] H. Chung, T. W. Kim, M. Kwon, I. C. Kwon et S. Y. Jeong : Oil components modulate physical characteristics and function of the natural oil emulsions as drug or gene delivery system. *J. Controlled Release*, 71(3):339–350, avril 2001. 50

[34] A.H. Coons, H.J. Creech et N.R. Jones : Immunological properties of an antibody containing a fluorescent group. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 47:200–202, 1941. 56

[35] P.J. Crosland-Taylor : A device for counting small particles suspended in fluid through a tube. *Nature*, 171:37–38, 1953. 58

[36] A. S. Curtis : The mechanism of adhesion of cells to glass. a study by interference reflection microscopy. *J. Cell Biol.*, 20:199–215, Feb 1964. 31

[37] D. Cuvelier : *Adhésion Cellulaire et tubes de membrane : Quelques aspects dynamiques, mécaniques et rhéologiques.* Thèse de doctorat, Université Paris VI - Pierre et Marie Curie, 2005. 33, 120, 121

[38] Damien Cuvelier et Pierre Nassoy : Hidden dynamics of vesicle adhesion induced by specific stickers. *Phys. Rev. Lett.*, 93(22):228101, Nov 2004. 43, 116

[39] Damien Cuvelier, Olivier Rossier, Patricia Bassereau et Pierre Nassoy : Micropatterned "adherent/repellent" glass surfaces for studying the spreading kinetics of individual red blood cells onto protein-decorated substrates. *Eur. Biophys. J.*, 32(4):342–354, Jul 2003. 11

[40] S. A. Darst, M. Ahlers, P. H. Meller, E. W. Kubalek, R. Blankenburg, H. O. Ribi, H. Ringsdorf et R. D. Kornberg : Two-dimensional crystals of streptavidin on biotinylated lipid layers and their interactions with biotinylated macromolecules. *Biophys. J.*, 59(2):387–396, Feb 1991. 112

[41] Daniel M Davis et Michael L Dustin : What is the importance of the immunological synapse ? *Trends Immunol.*, 25(6):323–327, Jun 2004. 7

[42] P. G. De Gennes : Wetting : Statics and dynamics. *Rev. Mod. Phys.*, 57(3):827–863, 1985. 17

[43] P. G. De Gennes, P. H. Puech et F. Brochard-Wyart : Adhesion induced by mobile stickers : A list of scenarios. *Langmuir*, 19(17):7112–7119, août 2003. 39, 98

[44] P.G. De Gennes, F. Brochard-Wyart et D. Quéré : *Gouttes, Bulles, Perles et Ondes.* Belin, 2002. 17, 19

[45] R. Dimova, U. Seifert, B. Pouligny, S. Forster et H. G. Dobereiner : Hyperviscous diblock copolymer vesicles. *Eur. Phys. J. E*, 7(3):241–250, mars 2002. 25, 26

[46] B. M. Discher, Y. Y. Won, D. S. Ege, J. C. Lee, F. S. Bates, D. E. Discher et D. A. Hammer : Polymersomes : tough vesicles made from diblock copolymers. *Science*, 284(5417):1143–1146, May 1999. 25

[47] J. Drelich : The significance and magnitude of the line tension in three-phase (solid-liquid-fluid) systems. *Coll. Surf. A*, 116(1-2):43–54, septembre 1996. 23

[48] N. V. Efremova, B. Bondurant, D. F. O'Brien et D. E. Leckband : Measurements of interbilayer forces and protein adsorption on unchargedlipid bilayers displaying poly(ethylene glycol) chains. *Biochemistry*, 39(12):3441–3451, 2000. 139, 140, 141

[49] Wafa Essafi, Kenneth Wong, Jérôme Bibette et Philippe Poulin : Oil coating of hydrophobic surfaces from aqueous media : formation and kinetic study. *J. Colloid Interface Sci.*, 286(2):730–738, Jun 2005. 20

[50] Evans et Rawicz : Entropy-driven tension and bending elasticity in condensed-fluid membranes. *Phys. Rev. Lett.*, 64(17):2094–2097, Apr 1990. 25, 27, 29

[51] E. Evans : Adhesion of surfactant membrane covered dropletsspecial features and curvature elasticity effects. *Coll. Surf.*, 43(2-4):327–347, février 1990. 30, 38

[52] E. Evans : Energy landscapes of biomolecular adhesion and receptor anchoring at interfaces explored with dynamic force spectroscopy. *Faraday Discuss.*, (111):1–16, 1998. 11, 12, 39

[53] E. Evans : Probing the relation between force–lifetime–and chemistry in single molecular bonds. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 30:105–128, 2001. 78

[54] E. Evans, D. Berk et A. Leung : Detachment of agglutinin-bonded red-blood-cells .1. forces to rupture molecular-point attachments. *Biophys. J.*, 59(4):838–848, avril 1991. 11

[55] E. Evans et M. Metcalfe : Free energy potential for aggregation of giant, neutral lipid bilayer vesicles by van der waals attraction. *Biophys. J.*, 46(3):423–426, Sep 1984. 30, 38

[56] E. Evans et M. Metcalfe : Free energy potential for aggregation of mixed phosphatidylcholine/phosphatidylserine lipid vesicles in glucose polymer (dextran) solutions. *Biophys. J.*, 45(4):715–720, Apr 1984. 30, 38

[57] E. A. Evans : A new material concept for the red cell membrane. *Biophys. J.*, 13(9):926–940, Sep 1973. 18

[58] E. A. Evans : New membrane concept applied to the analysis of fluid shear- and micropipette-deformed red blood cells. *Biophys. J.*, 13(9):941–954, Sep 1973. 28

[59] E. A. Evans : Analysis of adhesion of large vesicles to surfaces. *Biophys. J.*, 31(3):425–431, Sep 1980. 29, 38

[60] E. A. Evans : Detailed mechanics of membrane-membrane adhesion and separation. i. continuum of molecular cross-bridges. *Biophys. J.*, 48(1):175–183, Jul 1985. 39

[61] E. A. Evans : Detailed mechanics of membrane-membrane adhesion and separation. ii. discrete kinetically trapped molecular cross-bridges. *Biophys. J.*, 48(1):185–192, Jul 1985. 39

[62] E. A. Evans et V. A. Parsegian : Thermal-mechanical fluctuations enhance repulsion between bimolecular layers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 83(19):7132–7136, Oct 1986. 30

[63] P. F. Fahey, D. E. Koppel, L. S. Barak, D. E. Wolf, E. L. Elson et W. W. Webb : Lateral diffusion in planar lipid bilayers. *Science*, 195(4275):305–306, Jan 1977. 24

[64] E. L. Florin, V. T. Moy et H. E. Gaub : Adhesion forces between individual ligand-receptor pairs. *Science*, 264(5157):415–417, avril 1994. 11

[65] J. B. Fournier, A. Ajdari et L. Peliti : Effective area elasticity and tension of micromanipulated membranes. *Phys. Rev. Lett.*, 86(21):4970–4973, mai 2001. 27

[66] A. Gabizon et D. Papahadjopoulos : Liiposome formulations with prolonged circulation time in blood and enhanced uptake by tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 85(18): 6949–6953, Sep 1988. 23

[67] J. C. Giddings : Field-flow fractionation : analysis of macromolecular, colloidal, and particulate materials. *Science*, 260(5113):1456–1465, Jun 1993. 135

[68] S. C. Gill et P. H. Vonhippel : Calculation of protein extinction coefficients from amino-acid sequence data. *Anal. Biochem.*, 182(2):319–326, novembre 1989. 132

[69] Philippe Girard : *Membranes hors d'équilibre : échanges et transport actif.* Thèse de doctorat, Université Paris 7 - Denis Diderot, 2004. 19

[70] A. R. Goldfarb et L. J. Saidel : Ultraviolet absorption spectra of proteins. *Science*, 114(2954):156–157, Aug 1951. 131

[71] M. González, C. E. Argaraña et G. D. Fidelio : Extremely high thermal stability of streptavidin and avidin upon biotin binding. *Biomol. Eng.*, 16(1-4):67–72, Dec 1999. 12

[72] J.P. et al. Gosling : *Immunoassays : A Practical Approach*. Oxford University Press, 2000. 49

[73] A. Grakoui, S. K. Bromley, C. Sumen, M. M. Davis, A. S. Shaw, P. M. Allen et M. L. Dustin : The immunological synapse : a molecular machine controlling t cell activation. *Science*, 285(5425):221–227, Jul 1999. 7

[74] N. M. Green : Avidin. 4. stability at extremes of ph and dissociation into sub-units by guanidine hydrochloride. *Biochem. J.*, 89:609–620, Dec 1963. 12

[75] N. M. Green : A spectrophotometric assay for avidin and biotin based on binding of dyes by avidin. *Biochem. J.*, 94:23C–24C, Mar 1965. 133

[76] N. M. Green : Thermodynamics of binding of biotin and some analogues by avidin. *Biochem. J.*, 101(3):774–780, 1966. 38

[77] N. M. Green : Avidin and streptavidin. *Methods Enzymol.*, 184:51–67, 1990. 9, 11

[78] N.M. Green : Thermodynamics of the binding of biotin and some analogues by avidin. *Biochem. J.*, 101(3):774–780, Dec 1966. 12

[79] M. Hai, K. Bernath, D. Tawfik et S. Magdassi : Flow cytometry : A new method to investigate the properties of water-in-oil-in-water emulsions. *Langmuir*, 20(6):2081–2085, mars 2004. 55

[80] W. Helfrich : Elastic properties of lipid bilayerstheory and possible experiments. *Zeitschrift Fur Naturforschung C*, C 28(11-1):693–703, 1973. 18

[81] W. Helfrich et R. M. Servuss : Undulations, steric interaction and cohesion of fluid membranes. *Nuovo Cimento*, 3(1):137–151, 1984. 27

[82] J.P. Helme : Soybean oil refining. Rapport technique, American Soybean Association, 1984. 70

[83] G.T. Hermanson : *Bioconjugate Techniques*. Academic Press, 1st edition édition, 1996. 50

[84] P. Hinterdorfer, W. Baumgartner, H. J. Gruber, K. Schilcher et H. Schindler : Detection and localization of individual antibody-antigen recognition events by atomic force microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 93(8):3477–3481, avril 1996. 10

[85] Johannes B Huppa et Mark M Davis : T-cell-antigen recognition and the immunological synapse. *Nat. Rev. Immunol.*, 3(12):973–983, Dec 2003. 7

[86] D. Iber : Formation of the b cell synapse : retention or recruitment ? *Cell. Mol. Life Sci.*, 62(2):206–213, Jan 2005. 8, 127

[87] J. Israelachvili : The different faces of poly(ethylene glycol). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 94(16):8378–8379, 1997. 112, 142

[88] K. L. Johnson, K. Kendall et A. D. Roberts : Surface energy and contact of elastic solids. *Proc. R. Soc. Lond. Ser. A*, 324(1558):301–&, 1971. 37

[89] S. Kawaguchi, G. Imai, J. Suzuki, A. Miyahara et T. Kitano : Aqueous solution properties of oligo- and poly(ethylene oxide) by staticlight scattering and intrinsic viscosity. *Polymer*, 38(12):2885–2891, 1997. 139

[90] D. M. Kirschenbaum : Molar absorptivity and a 1 per cent 1 cm values for proteins at selected wavelengths of the ultraviolet and visible regions. xi. *Anal. Biochem.*, 68(2):465–484, Oct 1975. 132

[91] R. Kjellander et E. Florin : Water-structure and changes in thermal-stability of the system poly(ethyleneoxide)-water. *J. Chem. Soc. - Faraday Trans. I*, 77:2053–2077, 1981. Part 9. 138

[92] J. Klein, Y. Kamiyama, H. Yoshizawa, J. N. Israelachvili, G. H. Fredrickson, P. Pincus et L. J. Fetters : Lubrication forces between surfaces bearing polymer brushes. *Macromolecules*, 26(21):5552–5560, octobre 1993. 117

[93] L. A. Klumb, V. Chu et P. S. Stayton : Energetic roles of hydrogen bonds at the ureido oxygen binding pocket in the streptavidin-biotin complex. *Biochemistry*, 37(21):7657–7663, May 1998. 12

[94] V. T. Kung et C. T. Redemann : Synthesis of carboxyacyl derivatives of phosphatidylethanolamine and use as an efficient method for conjugation of protein to liposomes. *Biochim. Biophys. Acta*, 862(2):435–439, Nov 1986. 50

[95] R. Kwok et E. Evans : Thermoelasticity of large lecithin bilayer vesicles. *Biophys. J.*, 35(3):637–652, Sep 1981. 26

[96] P. H. Laverty, A. Leskovar, G. J. Breur, J. R. Coates, R. L. Bergman, W. R. Widmer, J. P. Toombs, S. Shapiro et R. B. Borgens : A preliminary study of intravenous surfactants in paraplegic dogs : Polymertherapy in canine clinical sci. *J. Neurotrauma*, 21(12):1767–1777, 2004. 138

[97] M. B. Lawrence et T. A. Springer : Leukocytes roll on a selectin at physiological flow-ratesdistinction from and prerequisite for adhesion through integrins. *Cell*, 65(5):859–873, mai 1991. 6

[98] Deborah Leckband et Anil Prakasam : Mechanism and dynamics of cadherin adhesion. *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, Mar 2006. 5

[99] G. U. Lee, D. A. Kidwell et R. J. Colton : Sensing discrete streptavidin biotin interactions with atomic-force microscopy. *Langmuir*, 10(2):354–357, février 1994. 11

[100] C. T. Lim, E. H. Zhou et S. T. Quek : Mechanical models for living cells–a review. *J. Biomech.*, 39(2):195–216, 2006. 15, 16

[101] E. Lindberg et C. Elvingson : Monte carlo simulation of polymer brushes attached to a spherical surface. *J. Chem. Phys.*, 114(14):6343–6352, 2001. 140

[102] O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr et R. J. Randall : Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193(1):265–275, Nov 1951. 132

[103] C. Mabille, V. Schmitt, P. Gorria, F. L. Calderon, V. Faye, B. Deminiere et J. Bibette : Rheological and shearing conditions for the preparation of monodisperse emulsions. *Langmuir*, 16(2):422–429, janvier 2000. 53

[104] S. A. Maskarinec, J. Hannig, R. C. Lee et K. Y. C. Lee : Direct observation of poloxamer 188 insertion into lipid monolayers. *Biophys. J.*, 82(3):1453–1459, 2002. 53, 138

[105] T. G. Mason et J. Bibette : Emulsification in viscoelastic media. *Phys. Rev. Lett.*, 77(16):3481–3484, octobre 1996. 53

[106] R. Merkel, P. Nassoy, A. Leung, K. Ritchie et E. Evans : Energy landscapes of receptor-ligand bonds explored with dynamic force spectroscopy. *Nature*, 397(6714):50–53, janvier 1999. 12

[107] N. Mohandas et E. Evans : Mechanical properties of the red cell membrane in relation to molecular structure and genetic defects. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 23:787–818, 1994. 25

[108] V. T. Moy, Y. K. Jiao, T. Hillmann, H. Lehmann et T. Sano : Adhesion energy of receptor-mediated interaction measured by elastic deformation. *Biophys. J.*, 76(3):1632–1638, mars 1999. 37, 38

[109] J. Nardi, R. Bruinsma et E. Sackmann : Adhesion-induced reorganization of charged fluid membranes. *Phys. Rev. E*, 58(5):6340–6354, novembre 1998. 33

[110] J. Nardi, T. Feder, R. Bruinsma et E. Sackmann : Electrostatic adhesion between fluid membranes : Phase separation and blistering. *Europhys. Lett.*, 37(5):371–376, février 1997. 33, 34

[111] D. A. Noppl-Simson et D. Needham : Avidin-biotin interactions at vesicle surfaces : adsorption and binding, cross-bridge formation, and lateral interactions. *Biophys. J.*, 70(3):1391–1401, Mar 1996. 14, 39, 126

[112] K. Olbrich, W. Rawicz, D. Needham et E. Evans : Water permeability and mechanical strength of polyunsaturated lipid bilayers. *Biophys. J.*, 79(1):321–327, Jul 2000. 25

[113] D. Papahadjopoulos, T. M. Allen, A. Gabizon, K. Mayhew, E. andMatthay, S. K. Huang, K. D. Lee, M. C. Woodle, D. D. Lasic, C. Redemann et F. J. Martin : Sterically stabilized liposomes - improvements in pharmacokinetics and antitumortherapeutic efficacy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 88(24):11460–11464, 1991. 140

[114] V. A. Parsegian, N. Fuller et R. P. Rand : Measured work of deformation and repulsion of lecithin bilayers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 76(6):2750–2754, Jun 1979. 30

[115] C. Pasternak et E. L. Elson : Lymphocyte mechanical response triggered by cross-linking surface-receptors. *J. Cell Biol.*, 100(3):860–872, 1985. 15

[116] K. D. Patel, M. U. Nollert et R. P. McEver : P-selectin must extend a sufficient length from the plasma membrane to mediate rolling of neutrophils. *J. Cell Biol.*, 131(6):1893–1902, décembre 1995. 13

[117] J. Pécréaux, H-G. Döbereiner, J. Prost, J-F. Joanny et P. Bassereau : Refined contour analysis of giant unilamellar vesicles. *Eur. Phys. J. E*, 13(3):277–290, Mar 2004. 26

[118] A. Pierres, A. M. Benoliel et P. Bongrand : Interactions between biological surfaces. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, 3(5):525–533, octobre 1998. 3

[119] A. Pierres, A. M. Benoliel et P. Bongrand : Studying receptor-mediated cell adhesion at the single molecule level. *Cell Adhesion and Communication*, 5(5):375–395, 1998. 9

[120] A. Pierres, A. M. Benoliel, P. Bongrand et P. A. VanderMerwe : Determination of the lifetime and force dependence of interactions of single bonds between surface-attached cd2 and cd48 adhesion molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 93(26):15114–15118, décembre 1996. 11

[121] A. Pierres, A. M. Benoliel, P. Bongrand et P. A. vanderMerwe : The dependence of the association rate of surface-attached adhesion molecules cd2 and cd48 on separation distance. *FEBS Letters*, 403(3):239–244, février 1997. 10

[122] A. Pierres, P. Eymeric, E. Baloche, D. Touchard, A. M. Benoliel et P. Bongrand : Cell membrane alignment along adhesive surfaces : Contribution of active and passive cell processes. *Biophys. J.*, 84(3):2058–2070, mars 2003. 15

[123] F. Pincet, T. Le Bouar, Y. Zhang, J. Esnault, J. M. Mallet, E. Perez et P. Sinaÿ : Ultraweak sugar-sugar interactions for transient cell adhesion. *Biophys. J.*, 80(3):1354–1358, Mar 2001. 4, 9, 30

[124] F. Pincet, E. Perez, J. C. Loudet et L. Lebeau : From macroscopic adhesion energy to molecular bonds : a test of the theory. *Phys. Rev. Lett.*, 87(17):178101, Oct 2001. 39, 40

[125] Frédéric Pincet et Julien Husson : The solution to the streptavidin-biotin paradox : the influence of history on the strength of single molecular bonds. *Biophys. J.*, 89(6):4374–4381, Dec 2005. 12

[126] Poulin, Nallet, Cabane et Bibette : Evidence for newton black films between adhesive emulsion droplets. *Phys. Rev. Lett.*, 77(15):3248–3251, Oct 1996. 21

[127] P. Poulin et J. Bibette : Adhesion between pure and mixed surfactant layers. *Langmuir*, 15(14):4731–4739, juillet 1999. 21

[128] P. H. Puech et F. Brochard-Wyart : Membrane tensiometer for heavy giant vesicles. *Eur. Phys. J. E*, 15(2):127–132, octobre 2004. 27, 28

[129] P.H. Puech : *Vésicules géantes décorées : adhésion et transport.* Thèse de doctorat, Université Paris 6 - Pierre et Marie Curie, 2003. 27

[130] S. Y. Qi, J. T. Groves et A. K. Chakraborty : Synaptic pattern formation during cellular recognition. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 98(12):6548–6553, Jun 2001. 7, 8

[131] R. P. Rand et A. C. Burton : Mechanical properties of red cell membrane .i. membrane stiffness + intracellular pressure. *Biophys. J.*, 4(2):115–135, 1964. 28, 29

[132] J. Rädler et E. Sackmann : On the measurement of weak repulsive and frictional colloidal forces by reflection interference contrast microscopy. *Langmuir*, 8(3):848–853, mars 1992. 31

[133] J. Rädler et E. Sackmann : Imaging optical thicknesses and separation distances of phospholipid-vesicles at solid-surfaces. *Journal De Physique II*, 3(5):727–748, mai 1993. 31, 32

[134] J. O. Rädler, T. J. Feder, H. H. Strey et E. Sackmann : Fluctuation analysis of tension-controlled undulation forces between giant vesicles and solid substrates. *Phys. Rev. E*, 51(5):4526–4536, mai 1995. 33

[135] E. Ruoslahti : Rgd and other recognition sequences for integrins. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 12:697–715, 1996. 4

[136] L. A. M. Rupert, Jbfn Engberts et D. Hoekstra : Effect of poly(ethylene glycol) on the ca-2+-induced fusion of didodecylphosphate vesicles. *Biochemistry*, 27(21):8232–8239, 1988. 141

[137] S. Sabri, A. Pierres, A. M. Benoliel et P. Bongrand : Influence of surface charges on cell adhesion : Difference between static and dynamic conditions. *Biochemistry And Cell Biology - Biochimie Et Biologie Cellulaire*, 73(7-8):411–420, 1995. 13

[138] O. Sandre, L. Moreaux et F. Brochard-Wyart : Dynamics of transient pores in stretched vesicles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 96(19):10591–10596, septembre 1999. 25

[139] S. Scheuring, D. J Muller, P. Ringler, J. B Heymann et A. Engel : Imaging streptavidin 2d crystals on biotinylated lipid monolayers at high resolution with the atomic force microscope. *Journal of Microscopy*, 193(1):28–35, Jan 1999. 112

[140] J. Schilling, K. Sengupta, S. Goennenwein, A.R. Bausch et E. Sackmann : Absolute interfacial distance measurements by dual-wavelength reflection interference contrast microscopy. *Phys. Rev. E*, 69(2 Pt 1):021901, Feb 2004. 32

[141] R. K. Scopes : Measurement of protein by spectrophotometry at 205 nm. *Anal. Biochem.*, 59(1):277–282, May 1974. 131

[142] Seifert et Lipowsky : Adhesion of vesicles. *Phys. Rev. A*, 42(8):4768–4771, Oct 1990. 33

[143] R. M. Servuss et W. Helfrich : Mutual adhesion of lecithin membranes at ultralow tensions. *Journal De Physique*, 50(7):809–827, avril 1989. 30

[144] H.M. Shapiro : *Practical Flow Cytometry.* Wiley-Liss, 2003, 4th Edition. 58

[145] S. R. Sheth, N. Efremova et D. E. Leckband : Interactions of poly(ethylene oxide) brushes with chemically selective surfaces. *J. Phys. Chem. B*, 104(32):7652–7662, 2000. 112, 141

[146] S. R. Sheth et D. Leckband : Measurements of attractive forces between proteins and end-grafted poly(ethyleneglycol) chains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 94(16):8399–8404, 1997. 112, 141

[147] R. Simson, E. Wallraff, J. Faix, J. Niewöhner, G. Gerisch et E. Sackmann : Membrane bending modulus and adhesion energy of wild-type and mutant cells of dictyostelium lacking talin or cortexillins. *Biophys. J.*, 74(1):514–522, Jan 1998. 26

[148] Ana-Suncana Smith et Udo Seifert : Effective adhesion strength of specifically bound vesicles. *Phys. Rev. E*, 71(6 Pt 1):061902, Jun 2005. 42

[149] P. K. Smith, R. I. Krohn, G. T. Hermanson, A. K. Mallia, F. H. Gartner, M. D. Provenzano, E. K. Fujimoto, N. M. Goeke, B. J. Olson et D. C. Klenk : Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.*, 150(1):76–85, 1985. 132

[150] P. S. Stayton, S. Freitag, L. A. Klumb, A. Chilkoti, V. Chu, J. E. Penzotti, R. To, D. Hyre, I. Le Trong, T. P. Lybrand et R. E. Stenkamp : Streptavidin-biotin binding energetics. *Biomol. Eng.*, 16(1-4):39–44, Dec 1999. 12

[151] T. Takino, K. Konishi, Y. Takakura et M. Hashida : Long circulating emulsion carrier systems for highly lipophilic drugs. *Biol. Pharm. Bull.*, 17(1):121–125, Jan 1994. 50

[152] P. Thiyagarajan, D. J. Chaiko et R. P. Hjelm : A neutron-scattering study of poly(ethylene glycol) in electrolyte-solutions. *Macromolecules*, 28(23):7730–7736, 1995. 139

[153] C. Tordeux, J-B. Fournier et P. Galatola : Analytical characterization of adhering vesicles. *Phys. Rev. E*, 65(4 Pt 1):041912, Apr 2002. 33

[154] B. V. Toshev, D. Platikanov et A. Scheludko : Line tension in 3-phase equilibrium systems. *Langmuir*, 4(3):489–499, 1988. 22

[155] M. A. Tsai, R. S. Frank et R. E. Waugh : Passive mechanical behavior of human neutrophils : power-law fluid. *Biophys. J.*, 65(5):2078–2088, Nov 1993. 16

[156] E. W. Voss : Kinetic measurements of molecular interactions by spectrofluorometry. *J. Mol. Recognit.*, 6(2):51–58, Jun 1993. 9

[157] Patrick M Winter, Shelton D Caruthers, Andrea Kassner, Thomas D Harris, Lori K Chinen, John S Allen, Elizabeth K Lacy, Huiying Zhang, J. David Robertson, Samuel A Wickline et Gregory M Lanza : Molecular imaging of angiogenesis in nascent vx-2 rabbit tumors using a novel alpha(nu)beta3-targeted nanoparticle and 1.5 tesla magnetic resonance imaging. *Cancer Res.*, 63(18):5838–5843, Sep 2003. 50

[158] S. E. Wright et L. Huang : Bilayer stabilization of phosphatidylethanolamine by n-biotinylphosphatidylethanolamine. *Biochim. Biophys. Acta*, 1103(1):172–178, Jan 1992. 50

RÉSUMÉ

Nous avons exploré la capacité des émulsions à adhérer de manière spécifique à des surfaces modèles solides et notamment la relation entre la composition des gouttes à leur interface et la formation d'un angle de contact macroscopique. Nous avons développé une méthode de fonctionnalisation covalente in-situ de l'interface liquide de gouttes d'émulsion H/E par de la biotine puis par de la streptavidine. La distribution de taille et la densité de streptavidine à la surface des gouttes sont caractérisées à l'aide d'une technique originale utilisant un cytomètre à flux. Nous avons montré que l'angle de contact et l'énergie d'adhésion croissent linéairement en fonction de la densité de biotine sur la lamelle et nous avons observé une répartition spatiale différente (disque, couronne) de la streptavidine dans la zone de contact suivant la densité totale en PEG, suggérant une transition de phase à 2D contrôlée par les interactions non spécifiques.

ABSTRACT

We explored the ability of emulsion droplets to bind specifically solid model substrates and we study the relationship between drop composition and the contact angle. We developed a in-sisu method to graft covalently biotin and streptavidin on the O/W emulsion interface. We characterized the size distribution and the surface density of the streptavidine by flow cytometry. We showed that the contact angle and the adhesion energy grow linearly with the biotin density on the glass coverslip, and we observed a different patterning (disk, ring) of the streptavidin within the adhesion patch, depending on the PEG density on the surface. This result suggest a 2D phase transition of the proteins driven by the non spécific interactions.