



**HAL**  
open science

## Projet de Matière Molle Vésicules Magnétiques

Marguerite d'Olce, Lea Trichet

► **To cite this version:**

Marguerite d'Olce, Lea Trichet. Projet de Matière Molle Vésicules Magnétiques : Projet de Matière Molle (stage bibliographique en maîtrise de Physique). [Rapport de recherche] Université Denis Diderot (Paris 7). 2003, 11 p. hal-02933556

**HAL Id: hal-02933556**

**<https://hal.science/hal-02933556>**

Submitted on 8 Sep 2020

**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.



Distributed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License

# Projet de Matière Molle

## Vésicules Magnétiques

Marguerite d'OLCE, Léa TRICHET  
(30 avril 2003)

### I. INTRODUCTION

Les vésicules magnétiques sont le produit de l'utilisation concomitante de deux vecteurs différents : les vésicules, qui résultent de l'auto-assemblage de molécules tensio-actives, et les ferrofluides, colloïdes magnétiques formés de particules nanométriques dans un solvant aqueux. Dans cette étude, nous nous attacherons à montrer l'utilisation des vésicules magnétiques en tant qu'outil de mesure de la constante d'élasticité de courbure membranaire. Auparavant, la présentation des différents constituants des vésicules magnétiques, ainsi que celle de diverses techniques d'observation sera faite au cours d'une première partie. Nous nous intéresserons ensuite à la synthèse des vésicules magnétiques en tant que telles. Pour finir, nous montrerons l'utilité et l'exploitation de la connaissance des propriétés élastiques des membranes dans des exemples d'application en biologie.

### II. COMPOSANTS

#### A. Vésicules

##### 1. Description

Les vésicules résultent de l'auto-assemblage de molécules tensioactives, qui forment une bicouche lipidique. Elles peuvent ainsi être utilisées en tant que modèle biologique très simple des cellules vivantes, dont elles imitent la forme et reproduisent les changements de morphologie, observés dans les phénomènes de fusion, d'endo- et d'exocytose, d'adhésion à une surface ou encore de tubulation en présence de micro-tubules protéiques [3]. Par ailleurs, les liposomes, qui sont des vésicules exclusivement composées de lipides d'origine biologique, trouvent des applications dans le domaine médical : de taille relativement réduite, ils permettent de délivrer à l'intérieur même des cellules, après fusion, des médicaments ou des fragments d'ADN, ou encore de rétablir l'activité de la membrane cellulaire.

##### 2. Composition et dimensions

Les vésicules sont des bicouches d'amphiphiles fermées sur elles-mêmes, les amphiphiles étant des molécules ayant une tête hydrophile et deux queues hydrophobes. Aussi, pour certaines d'entre elles, au-delà



FIG. 1: Structure en double couche ou "bicouche"

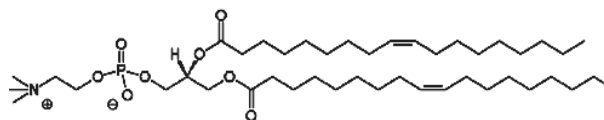


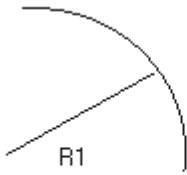
FIG. 2: 1,2-dioléoyl-sn-glycéro-3-phospholipides (DOPC)

d'une certaine concentration critique faible ( $10^{-12} \text{ mol/L}$  pour les phospholipides), elles ne sont plus solubles en milieu aqueux et résolvent leurs affinités contraires en formant des bicouches épaisses de 3 à 4 nm (Fig. 1). Le phospholipide utilisé ici est du DOPC (1,2-dioléoyl-sn-glycéro-3-phosphocoline) (Fig. 2). Elles peuvent être unilamellaires (une bicouche) ou multilamellaires (plusieurs bicouches). Nous étudierons les unilamellaires.

Elles sont classées selon leurs diamètres : environ 50 nm pour les smalls, 100 à 500 nm pour les larges, et de 1 à 100  $\mu\text{m}$  pour les géantes. Les deux premières doivent être observées sous microscope électronique. Pour les dernières, un microscope optique suffit, ce qui facilite leur étude. De plus leurs tailles se rapprochent de celles des cellules vivantes (10 à 50  $\mu\text{m}$ ). Aussi ici, les vésicules étudiées sont géantes.

##### 3. Propriétés

Une de leurs propriétés, utilisée d'ailleurs dans les cellules biologiques, est leur imperméabilité. Il faut toutefois faire attention que les milieux extérieur et intérieur ne soient pas trop différents en concentration totale de soluté pour éviter un choc osmotique. Les vésicules peuvent prendre plusieurs formes. Tout dépend du rapport entre l'aire de sa paroi et son volume. Le cas ici étudié est celui de la sphère, qui contient le plus grand volume pour une aire donnée. Il y a deux paramètres caractérisant les propriétés élastiques de la membrane :  $K_s$ , l'élasticité d'étirement, et  $K_b$ , le module d'élasticité de courbure :

FIG. 3: Définition des rayons de courbure  $R_1$  et  $R_2$ 

$$\frac{1}{K_b} = \left( \frac{\partial c}{\partial M} \right)_T \quad (1)$$

où  $c$  est la courbure locale (soit  $\frac{1}{R}$ ) et  $M$  le moment appliqué.

$$\frac{1}{K_s} = \frac{1}{A} \left( \frac{\partial A}{\partial T_e} \right)_T \quad (2)$$

où  $A$  est l'aire et  $T_e$  la tension appliquée.

On définit la dilatation de surface  $\alpha$  par :

$$\alpha = \frac{A - A_0}{A_0} = \frac{\Delta A}{A} \quad (3)$$

On définit une énergie de courbure :

$$g_b = \frac{1}{2} K_b H^2 + \bar{K}_b G \quad (4)$$

où  $H = \frac{1}{R_1} + \frac{1}{R_2}$  la courbure moyenne et  $G = \frac{1}{R_1 R_2}$ , la courbure gaussienne.  $R_1$  et  $R_2$  sont les rayons de courbure principaux d'un point de la vésicule. En effet, en chaque point de l'espace, on peut définir deux rayons de courbure (voir Fig. 3).

$K_b$  est le module élastique de courbure relié à  $H$  et  $\bar{K}_b$  celui relié à  $G$ . Le second terme dans l'expression de l'énergie de courbure est du aux nombres de poignées et d'anses et est toujours ignoré.  $K_b$  est égal à environ  $10^{-19}$  J pour les phospholipides, ce qui donne une énergie de courbure par unité de surface d'environ  $2.107 \frac{N}{m}$  pour une vésicule d'un rayon de  $1 \mu m$ . Si la bicouche est asymétrique, par exemple quand les solutions intérieures et extérieures, comme ici, sont différentes, il faut ajouter l'effet de la courbure instantanée  $c_0$  dans l'énergie de courbure qui est alors égale à :

$$g_b = \frac{1}{2} K_b (H - c_0)^2 \quad (5)$$

Dans le cas où la membrane est en phase liquide (pour  $T > T_c$ , où  $T_c$  est la température dite de "fusion des

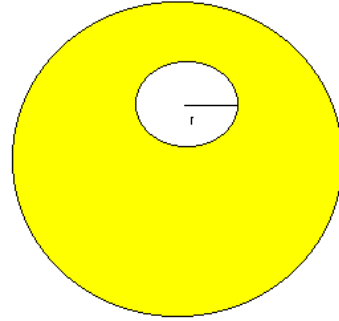


FIG. 4: Pore dans une vésicule

chaînes"), la tension de surface est quasiment nulle, ce qui permet des ondulations de la paroi qui sont seulement limitées par l'énergie de courbure. L'amplitude des fluctuations est telle que :  $\sqrt{\langle u \rangle^2} = \frac{k_B T}{K_b} R$  où  $k_B$  est la constante de Boltzmann,  $R$  le rayon de la vésicule et  $T$  la température. On a donc un excès de surface, d'origine entropique :

$$\frac{A_p - A_p^0}{A_p^0} = \frac{k_B T}{8\pi K_b} \ln \left( 1 + \frac{A_p^0}{c\pi K_b} \sigma \right) \quad (6)$$

où  $A_p^0$  est la surface moyenne projetée,  $A_p$  la surface de la vésicule en dépliant les fluctuations,  $c$  un facteur numérique dépendant de la forme de la vésicule et  $\sigma$  la tension de surface (dérivée de l'énergie libre par l'aire totale de la vésicule),  $k_B$  la constante de Boltzmann et  $T$  la température. En théorie une vésicule peut être déformée par un champ magnétique à cause de la susceptibilité magnétique du lipide différente de celle de l'eau, mais ce n'est pas décelable expérimentalement, donc cet effet ne peut pas gêner les mesures quand elle sera remplie d'un ferrofluide.

#### Tension de ligne et pores

Du fait d'opérations extérieures (par exemple, contact avec une micropipette), des pores peuvent se former dans les membranes :

Leurs créations demandent une certaine énergie, l'énergie de ligne :  $L2\pi r$ ,  $r$  le rayon du pore et  $L$  la tension de ligne. Dans le même temps, l'énergie due à la tension de surface diminue de  $\delta\pi r^2$ . Or  $\delta$  n'est pas constant selon le rayon du pore. Ce qui donne une courbe d'énergie en fonction du rayon du pore (Fig. 5). Il y a donc un rayon critique  $r_1$  [15] à partir duquel la nucléation du pore est possible. Le pore aura alors un rayon  $r_2$ . Il est possible d'augmenter la tension de ligne avec du cholestérol par exemple (cellules biologiques). Le pore n'est que transitoire. En effet, en son absence, la solution dans la vésicule est en surpression par rapport à l'extérieur (loi de Laplace). Le pore va donc laisser passer du fluide et la vésicule va se dégonfler. Ceci va refermer le pore.

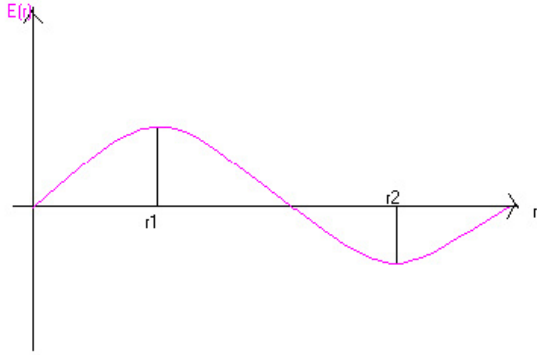


FIG. 5: Énergie en fonction du rayon du pore

#### 4. Techniques d'observation des vésicules

##### a. Microscopie optique

Les vésicules, transparentes du fait de la très faible absorption de la lumière visible par les lipides, ne sont observables en transmission que du fait de la réfraction des rayons lumineux entre des milieux d'indices différents : l'intérieur et l'extérieur de la vésicule, ou la membrane elle-même vis-à-vis des deux compartiments interne et externe. L'image obtenue est assez grossière et ne permet de détecter que les plus grosses vésicules. L'observation en réflexion en utilisant le contraste interférentiel permet d'obtenir une image plus précise.

##### b. Microscopie de fluorescence

La technique de fluorescence consiste à observer, sur un fond noir, les vésicules marquées spécifiquement par des molécules fluorescentes hydrophiles qui se placent dans le compartiment interne de la vésicule, ou par des molécules hydrophobes qui s'insèrent dans la membrane. C'est alors la technique de choix pour l'étude de la fusion membranaire, du fait de la possibilité de marquer chacune des vésicules par des fluorophores différents, dont l'interaction conduit à un changement de la fluorescence observée. Deux des fluorophores utilisés, le Pérylène-PC et NBD-PC, sont représentés fig. 6. Il s'agit de véritables phospholipides marqués par ces fluorophores, qui peuvent donc être insérés à hauteur de 1 à 10% de la quantité totale de lipides sans venir perturber les propriétés de la bicouche.

Le phénomène de fluorescence apparaît lorsqu'un composé contenant des doubles liaisons conjuguées est excité après absorption de lumière à une certaine énergie, et se désexcite en émettant de la lumière à une autre énergie donnée (Fig. 8). L'absorption est rendue possible par l'excitation d'un électron vers un état électronique comportant des énergies de vibration et de rotation plus importantes. Si l'absorption ne se traduit pas par un changement d'orientation du spin de l'électron, la transi-

tion entre l'état excité et l'état fondamental est dite permise, et l'émission est appelée fluorescence. Si par contre l'électron parvient à un état triplet après excitation, la transition est interdite. Sous certaines conditions on peut toutefois observer un phénomène d'émission, qu'on appelle alors phosphorescence.

La détection des images de fluorescence nécessite parfois une caméra très sensible, mais la possibilité d'éclairer de manière très intense les vésicules permet l'utilisation d'une caméra CCD (type vidéo-surveillance), reliée à un magnétoscope VHS classique. L'intensité de l'éclairage est toutefois limitée par le phénomène de photo-blanchiment. Il s'agit de diverses réactions photo-chimiques conduisant à la diminution du flux lumineux émis à la suite de la dégradation des fluorophores. De plus, il faut éviter la saturation de la sonde utilisée, qui a lieu en présence d'un éclairage trop important.

Le fait de travailler en régime non saturé permet de conserver une réponse linéaire en intensité, et donc de pouvoir obtenir des résultats quantitatifs de fluorescence. Ceux-ci sont également conditionnés par le réglage de la caméra. On doit donc éviter toute saturation des pixels, et assurer un bon rapport signal sur bruit. L'utilisation d'une échelle en fausses couleurs (Fig. 9) permet alors l'exploitation de résultats quantitatifs.

#### B. Ferrofluides

Un ferrofluide est une suspension de nanoparticules (diamètre de 6-15 nm) dans une solution. Comme les particules dans de l'eau pure et de pH égal à 7 ont tendance à s'agglutiner et à tomber, à cause des forces de Van der Waals, de la gravitation et de leurs dipôles magnétiques, on rajoute du citrate à la solution afin de la stabiliser (méthode Massart). En effet les ions négatifs du citrate entourent les nanoparticules et la répulsion entre les particules stabilisent la solution. Leur concentration est de 1% en volume. Le pH est de 7. Nous utilisons de l'oxyde de fer magnétique, de formule chimique  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ .  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  est un ferrofluide superparamagnétique, c'est-à-dire que la magnétisation due à des champs faibles à modérés est plus grande que pour un ferrofluide paramagnétique. Une propriété est que les ferrofluides sont colorés et se voient bien en microscopie optique.

### III. FORMATION DES VÉSICULES MAGNÉTIQUES

#### A. Introduction

Les membranes lipidiques se forment de manière spontanée en présence d'eau, la difficulté technique ne concerne pas tant l'assemblage des lipides que le fait de conférer à la vésicule les caractéristiques attendues : taille, structure (uni ou plurilamellaire, uni ou multivésiculaire), taux d'encapsulation du matériel ferro-

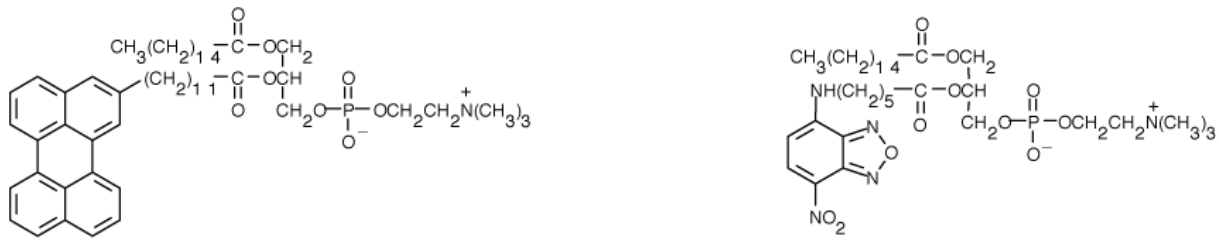


FIG. 6: Molécules de Pérylène-PC et de NBD-C6HPC [1, p69]

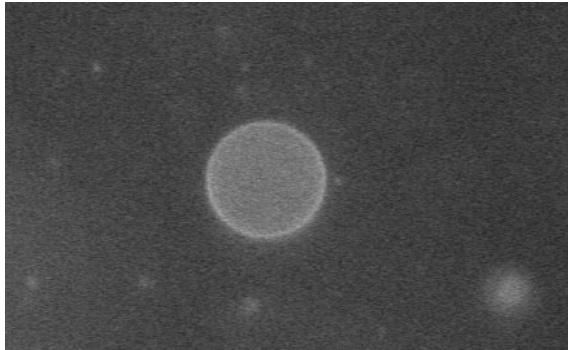


FIG. 7: Vésicule géante dont la membrane est constitué de 95% de DOPC et 5% de lipide fluorescent (NBD) préparée par électroformation dans 0,4 mol/L de citrate de sodium.

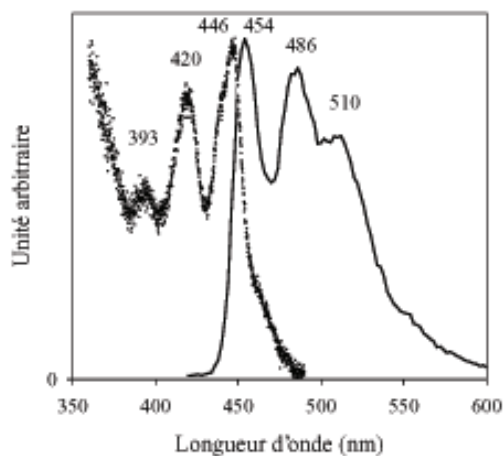


FIG. 8: Spectres d'absorption (points) et d'émission (ligne continue) du pérylène-PC [1, p69]

magnétique, et absence de relargage de celui-ci après formation. Il faut également être très vigilant quant à la dilution de la préparation obtenue et éviter, au cours de la resuspension dans une solution différente de celle du milieu de fabrication, le choc osmotique qui provoquerait la rupture des membranes.

Le principe commun aux méthodes de formation des vésicules est l'hydratation progressive de lipides. Ceux-ci

sont conservés par lyophilisation sous forme de poudre ou en solution dans un solvant organique à  $-20^{\circ}\text{C}$  environ. Afin d'éviter l'oxydation des lipides on les conditionne sous Argon. Les lipides destinés à constituer une même membrane, et initialement conservés de manière séparée (ex : lipides fluorescents) sont solubilisés, en proportion adéquate, dans le même solvant au début de la procédure.

Le solvant le plus utilisé est le chloroforme, auquel on ajoute de l'éthanol afin d'éviter la formation de phosgènes, produits de dégradation qui peuvent dénaturer les lipides. La température d'ébullition des solvants doit être supérieure à la température de fusion des chaînes, puisque la préparation des membranes s'effectue à une température supérieure à  $T_c$ .

## B. Gonflement spontané

### 1. Classique

La solution organique de lipides est évaporée sous un flux de gaz inerte, puis sous vide, ce qui provoque la formation d'un film multilamellaire sec sur les parois du récipient. On introduit alors la solution aqueuse de gonflement, ici le ferrofluide, et le tout est placé au bain-marie. Le processus de gonflement est assuré par l'action de la pression osmotique qui est liée à la présence des ions citrate.

Les vésicules obtenues sont très nombreuses et de tailles très diverses. Le taux d'encapsulation est relativement faible (5 à 10 %), et l'on obtient environ 90% de vésicules plurilamellaires. Afin d'augmenter la proportion de *GUV*, on peut déposer le film lipidique sur un substrat de téflon au lieu du verre, et l'on peut également préhydrater le lipide sous un flux d'argon humide juste avant le gonflement.

### 2. Modifié pour obtenir plus de vésicules magnétiques unilamellaires

La méthode modifiée [14] consiste à introduire  $10\ \mu\text{L}$  de ferrofluide concentré sur du lipide sec en poudre. Un film multilamellaire avec des particules emprisonnées entre les

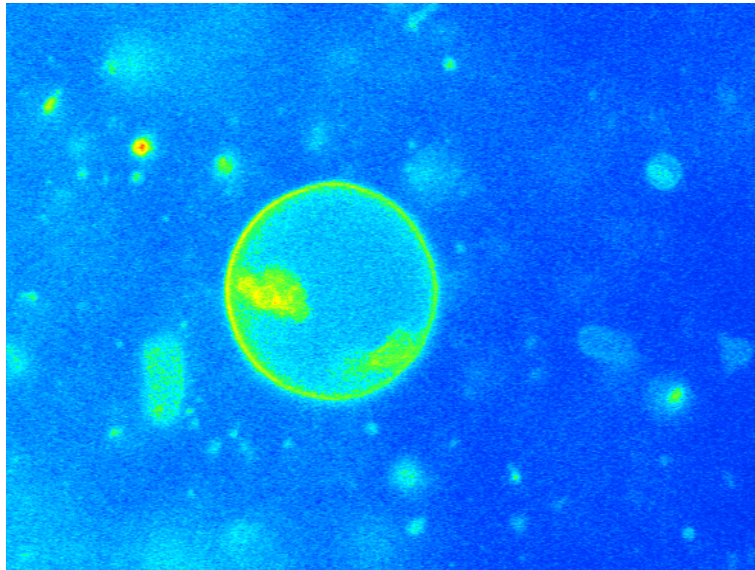


FIG. 9: Vésicule géante dont la membrane est constitué de 95% de DOPC et 5% de lipide fluorescent (NBD) préparée par électroformation dans  $0,4 \text{ mol/L}$  de citrate de sodium, visualisée en fausses couleurs.

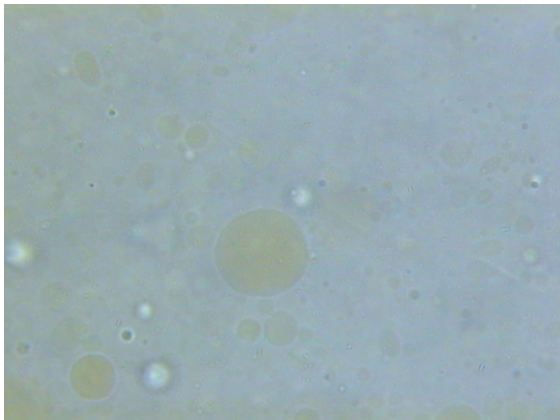


FIG. 10: Vésicules obtenues par la méthode de gonflement spontané

bicouches est alors obtenu. En ajoutant  $1 \text{ mL}$  d'eau ou de citrate on obtient alors les vésicules magnétiques.

### C. Electroformation

Cette technique, mise au point par M. Angelova en 1992, consiste à appliquer un champ oscillant (5 à 20  $\text{Hz}$ , fonction de la viscosité de la solution de gonflement) perpendiculairement au film lipidique. Elle permet d'augmenter la proportion de GUV unilamellaires. Son utilisation est très délicate pour les milieux trop salins comme les ferrofluides, du fait de la présence d'ions en grande quantité qui peuvent perturber le champ électrique.

La technique d'électroformation consiste à étaler des

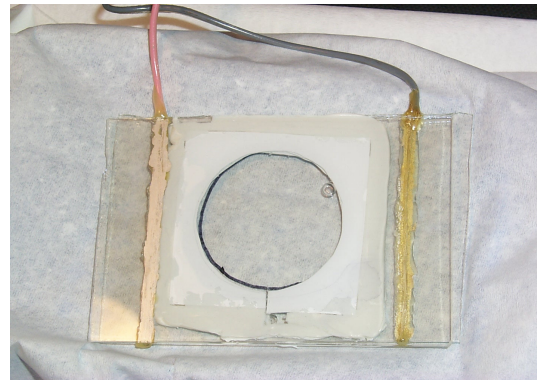


FIG. 11: Chambre d'électroformation

lipides en solution sur les deux plaques de verre recouvertes d'ITO (oxyde d'indium dopé à l'étain, composé transparent), qui constituent les parois de la chambre de préparation [1, p36]. Les deux plaques sont séparées par un espaceur en téflon que l'on a découpé de manière à former un puits circulaire en téflon, d'un diamètre de 40 mm, qui délimite la zone d'étalement des lipides. Le contact électrique est réalisée sur chaque face à l'aide d'un fil en cuivre multibrin.

Le film de lipides est initialement multilamellaire. Le champ oscillant permet un effeuillage des bicouches, une à une, du film soumis à une solution de gonflement possédant une force ionique déterminée. Le substrat auquel les vésicules sont liées avant de se détacher de la surface joue le rôle de réservoir de molécules de lipides : les vésicules obtenues sont alors dites partielles, puisque non entièrement refermées sur elles-mêmes. La répartition des tailles des vésicules est étagée, des plus petites aux



FIG. 12: Étalement des lipides sur les plaques de verre recouvertes d'ETO

plus grandes en partant de l'électrode .

Les lipides de la solution mère sont prélevés à l'aide d'une microsiringue Hamilton et dilués dans un mélange de méthanol et de chloroforme (1/3 - 2/3 respectivement, proportions qui permettent de ralentir l'évaporation du solvant et donc d'empêcher la formation d'auréoles sur la lame de verre). La solution obtenue, qui a une concentration de  $1 \text{ mg/mL}$  environ, est ensuite homogénéisée. On dépose  $75 \mu\text{L}$  de cette solution sur chacune des faces de la cellule d'électroformation. Le dépôt se fait goutte après goutte à l'aide de la microsiringue Hamilton. On raie avec l'aiguille chacune des gouttes à la surface des plaques, de manière à obtenir un film homogène (Fig. 12). Le fait de rayer ainsi la surface favorise la nucléation des vésicules. Le film obtenu présente une irisation, ce qui correspond alors au dépôt d'environ 100 bicouches.

On procède ensuite à la dessiccation des plaques, sous vide, pendant environ deux heures. Cette dessiccation doit permettre l'évaporation du solvant ainsi que l'assemblage du lipide en une phase lamellaire, parfaitement déshydratée. La cellule d'électroformation est ensuite entièrement reconstituée, l'espaceur en téflon étant placé entre les plaques. L'étanchéité de la cellule est obtenue grâce à un boudin de pâte à sceller, que l'on écrase bien afin de garder constante la distance entre les électrodes. La cellule d'électroformation est ensuite remplie avec  $1 \text{ mL}$  d'une solution de citrate à  $0,4 \text{ mM}$ , en évitant la formation de bulles. La cellule est ensuite scellée et soumise à une petite tension alternative de  $0.3 \text{ V}$ , que l'on augmente par paliers de  $0.3 \text{ V}$  toutes les deux minutes environ, jusqu'à une valeur de  $1.2 \text{ V}$ . La durée de l'électroformation est ensuite de deux heures environ. Les conditions de la mise sous tension sont en fait adaptées à l'osmolarité, la conductivité, et la viscosité de la solution à encapsuler.

Après la coupure du champ électrique, la chambre est mise au repos à  $4^\circ\text{C}$ , afin que les vésicules encore tendues se détachent complètement et puissent devenir fluctuantes. Le prélèvement s'effectue ensuite à la seringue, en tirant tout doucement le piston pour ne pas cisailier

les vésicules et risquer de rompre les plus grosses.

La technique a récemment été utilisée afin d'obtenir des vésicules magnétiques, sans succès. De nouvelles expériences vont être réalisées, dans lesquelles la concentration en citrates au sein du ferrofluide sera diminuée, afin d'éviter toute interférence avec le champ électrique. De plus l'utilisation de lipides polymères, tels le PEG, devrait permettre d'augmenter la répulsion stérique entre les bicouches et de ce fait faciliter l'effeuillage de celles-ci au cours du processus d'électroformation.

#### D. Emulsion multiple

Cette technique de formation des liposomes magnétiques, plus ancienne [6], consiste à encapsuler le ferrofluide grâce à une émulsion multiple eau/huile/eau, qui est ensuite évaporée. Elle permet d'obtenir des vésicules ayant une taille moyenne variant entre  $10$  et  $40 \mu\text{m}$ .

Le ferrofluide est tout d'abord dispersé dans une solution de solvant organique, de faible température d'ébullition, dans laquelle les lipides ont été préalablement dissous. L'agitation nécessaire à la dispersion est réalisée grâce à des ultrasons, et l'on obtient une émulsion eau/huile, le compartiment aqueux étant encapsulé dans une monocouche de tensioactifs. Cette émulsion est ensuite introduite doucement dans un excès d'eau pure. On obtient alors l'émulsion multiple : l'eau pure reste dans le compartiment externe, tandis que le solvant organique initial est emprisonné entre deux couches de phospholipides. Ce solvant est ensuite évaporé (bain-marie) sous un flux d'azote, ce qui permet d'obtenir les vésicules magnétiques. Celles-ci sont soumises à un champ magnétique au cours du chauffage et restent donc en suspension.

#### E. Injection

Cette technique permet l'obtention d'une vésicule unique, dont on peut contrôler entièrement la taille et le contenu. Cette technique mise au point pour la microinjection de vésicules avec divers solutés peut être utilisée pour injecter un ferrofluide directement dans la vésicule qui est reliée à un réservoir de lipide et que l'on doit ensuite couper afin de le détacher de celui-ci. Des expériences avec cette technique sont actuellement en cours.

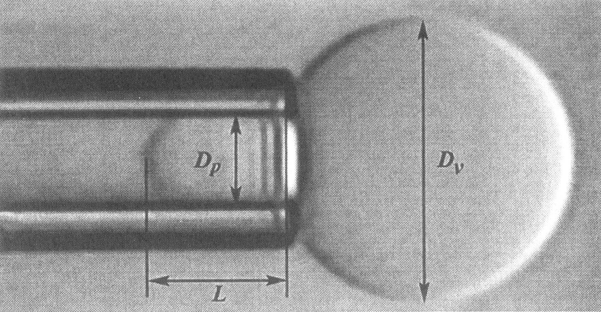


FIG. 13: Aspiration d'une partie de la vésicule dans une micropipette [1, p22]

#### IV. MANIPULATION DES VÉSICULES ET MESURE DE $K_b$

##### A. Comparaison avec d'autres méthodes de détermination de la tension de courbure

Il existe plusieurs méthodes pour la déterminer comme l'application d'un champ électrique alternatif. Cette méthode donne une tension de courbure de 1 à  $2.5 \cdot 10^{-20} J$  selon les phospholipides utilisés, avec 20% d'erreur, Nous allons en détailler une autre :

*Méthode d'Evan Evans et W. Rawicz [9]*

Il s'agit de l'aspiration par une micropipette de la vésicule (Fig. 13) Quand on applique une légère dépression les fluctuations de la vésicule se déplient. On a alors une nouvelle surface :  $S' = D_v^2 + L\pi r_p$  On utilise alors la loi de Laplace. Dans la sphère, la différence de pression avec l'extérieur est :  $\Delta P = P_{ves} - P_{ext} = \frac{\sigma}{D_v}$ .

La partie de la vésicule dans la micropipette peut être assimilée à un cylindre. La différence entre la pression de la vésicule dans la pipette et la pression appliquée (étant donné que l'on utilise une colonne d'eau la pression appliquée est égale à  $mgh$ , avec  $m$  la masse de l'eau,  $g$  la pesanteur et  $h$  la hauteur de la colonne d'eau) est :

$$F_{ves} - F_{appl} = \frac{2\sigma}{D_p} \quad (7)$$

Or la vésicule étant à l'état liquide, les tensions de surface sont égales. On a donc :

$$P_{pip} - P_{ext} = \left( \frac{2}{D_p} - \frac{1}{D_v} \right) \sigma \quad (8)$$

De là, on peut déduire la tension de surface à partir de la pression appliquée. La tension de surface change de  $10^{-8} N/m$ , pour une différence de pression nulle à  $10^{-5} N/m$  pour une différence de pression de  $1 Pa$ . Pour une différence de pression forte,  $\sigma$  n'est plus négligeable devant le module  $K_s$  d'étirement des têtes polaires et il faut utiliser l'élasticité classique de Hook :

$$\frac{A_p - A_p^0}{A_p^0} = \frac{k_B T}{8\pi K_b} \ln \left( 1 + \frac{A_p^0}{24\pi K_b} \sigma \right) + \frac{\sigma}{K_s} \quad (9)$$

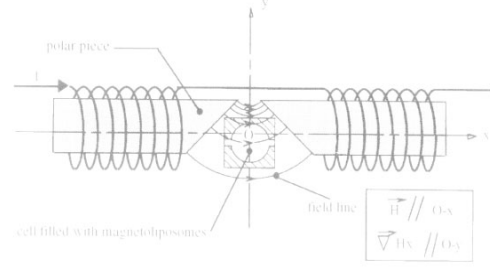


FIG. 14: Dispositif permettant le contrôle du gradient de champ magnétique [4]

Ainsi on peut contrôler la tension de surface.

Cette méthode permet de mesurer  $K_b$ . En effet, on mesure l'excès d'aire de la vésicule contenue dans la micropipette par rapport à l'aire projetée de la vésicule sous tension nulle. Elle est égale à l'augmentation de l'aire due à la diminution des fluctuations et à l'extension de l'aire par molécule. Par l'équation d'équipartition de l'énergie

$$\alpha \simeq (k_B T / 8\pi K_b) \ln(1 + c\delta A) + \delta / K_s, \quad (10)$$

où  $k_B$  la constante de Boltzmann,  $T$  la température,  $K_b$  et  $K_a$  sont les modules de courbure et d'extension respectivement,  $c$  un coefficient dépendant de la forme de la vésicule [9].

Nous obtenons des résultats analogues à ceux obtenus en champ électrique.

##### B. Manipulation et mesure de $K_b$ avec des champs magnétiques

###### 1. Mesure des paramètres

La susceptibilité magnétique et la concentration en sels constituent les deux paramètres importants pour l'étude de la déformation des vésicules soumises à un champ magnétique.

La susceptibilité magnétique est directement reliée à la concentration en ferrofluides au sein de la vésicule : cette concentration étant fonction du taux d'encapsulation, qui est variable, la susceptibilité magnétique doit être mesurée avant toute manipulation pour chacune des vésicules qui sera étudiée.

Cette mesure est rendue possible par la technique de la magnétophorèse, dans laquelle la vésicule est soumise à un gradient de champ magnétique. Celui-ci est réalisé perpendiculairement au champ magnétique à l'aide du dispositif présenté (Fig. 14). L'échantillon est placé entre deux bobines en série dont les lignes de champ magnétique sont déviées par l'orientation à  $45^\circ$  des pièces polaires et deviennent plus denses à mesure que la distance entre celles-ci diminuent.



Sur le liposome s'exercent alors la force magnétique induite  $F_m$  et la force visqueuse  $F_v$  due au milieu. La vésicule atteint la vitesse constante  $\vec{v}$  quand  $F_m = F_v$ . On a donc :

$$\begin{aligned}\vec{F}_v &= 6\pi\eta R\vec{v} \\ F_m &= M\nabla BV \\ \nabla B &= \mu_0\nabla H_x \\ M &= \chi H_x \\ \chi &= \frac{9}{2} \frac{\eta v}{\mu_0 R^2 (\frac{1}{2}\nabla H^2)}\end{aligned}\quad (11)$$

La mesure de la vitesse peut s'effectuer à l'aide d'une caméra en temps réel (Fig. 15) si l'on connaît le grossissement du microscope. La valeur de  $\chi$  permet ensuite de déterminer celle de la concentration  $C_p$  des nanoparticules en utilisant la loi de Langevin du superparamagnétisme [4] :

$$\chi = \frac{C_p V_p^2 m_s^2}{3k_B T} \quad (12)$$

où  $m_s$  est la magnétisation et  $V_p$  le volume d'une nanoparticule.

La concentration en sels, qui peut varier de 5 à 85 mM, est estimée grâce à la conductivité du ferrofluide.

### 2. Effet d'un champ magnétique sur un magnétoliposome

Sous un champ magnétique constant, la membrane de la vésicule va d'abord s'allonger en dépliant ses fluctuations, puis va s'étirer selon la direction du champ. Comme le champ utilisé ici est petit ( $H < 500Oe$ ), nous considérerons que la membrane ne peut pas s'étirer. Comme nous l'avons vu auparavant, la membrane a un excès de surface dû à ses fluctuations. On peut considérer que cet excès de surface est égal à  $\frac{\Delta S}{S} = \frac{2e^4}{45}$ . D'où [8],

$$(k_B T / 8\pi K_c) \ln(\delta/\delta_0) = 2e^4/45, \quad (13)$$

$\delta_0$  étant la tension initiale. La force magnétique est normale à la surface, et donnée par  $(2\pi\vec{M} \cdot \vec{n})^2 \vec{n}$ , elle sera donc plus importante dans la direction du champ. Ce champ va créer une différence de pression entre l'extérieur de la vésicule et l'intérieur :

$$p_i - p_e = 2\delta H - 2K_b \Delta_B H - 2K_b H(2H^2 - 2K) - 2\pi(\vec{M} \cdot \vec{n})^2 \quad (14)$$

où  $\Delta_B$  est l'opérateur Laplace-Beltrani. En nous plaçant en coordonnées sphériques et au premier ordre, nous obtenons

$$e^2 = (9/16\pi)((\mu - 1)/(\mu + 2))^2 H^2 R_0/\delta, \quad (15)$$

$R_0$  étant le rayon moyen d'une forme sphérique. Pour résoudre les deux équations non-linéaires (13) et (15) (la

tension de surface  $\delta$  dépend de la forme de la vésicule), il faut introduire un paramètre  $H^*$  (homogène à un champ magnétique) tel que  $H^{*2} = \sqrt{45k_B T / 32\pi K_b} (16\pi/9)(\mu + 2/\mu - 1)^2 (\delta_0/H_0)$ . On obtient alors deux régimes :

Si  $H \ll H^*$  alors on peut considérer que la tension est égale à celle sans champ. On a alors :

$$e^2 \simeq (H/H^*)^2 (45k_B T / 32\pi K_b)^{1/2} \quad (16)$$

Si  $H \gg H^*$ , on a :

$$e^4 \simeq (45k_B T / 32\pi K_b) \ln(H/H^*)^4 \quad (17)$$

Les résultats expérimentaux sont présentés sur la figure 16.

On trouve à peu près  $K_b/k_B T = 21 \pm 2$ , ce qui est du même ordre de grandeur que les autres mesures.

### 3. Transition oblate/prolate

Théoriquement, les magnétoliposomes sous un champ magnétique devraient toujours prendre une forme prolate (une forme prolate est telle que l'excentricité ellipsoïdale  $e^2 = 1 - \frac{b^2}{a^2}$  est positive, le liposome est alors allongé (voir fig. 17). Pourtant, on peut observer dans certaines conditions : vésicules petites, remplies d'un ferrofluide peu ionique et peu magnétique des formes oblates ( $e^2$  négative, forme compressée) (Fig. 18).

On peut aussi observer un cas intermédiaire (voir fig. 19).

On peut l'expliquer par les interactions électrostatiques entre les particules et la bicouche : les nanoparticules et la bicouche étant chargées négativement, ils se repoussent. Il y a alors une compétition entre l'énergie magnétique, qui favorise la forme prolate et l'énergie de courbure qui peut stabiliser la déformation oblate (Fig. 20). Si on considère la longueur d'écrantage du potentiel électrique  $K_{in}^{-1}$  dans le liposome et  $K_{out}^{-1}$  à l'extérieur, nous avons la courbure spontanée telle que :

$$C_0 = \frac{K_0^5}{3} \left( \frac{1}{K_0^2} - \frac{1}{K_i^2} \right) \quad (18)$$

La réduction en nanoparticules est diminuée aux pôles magnétiques à cause de l'attraction magnétique.  $K_i$  dépend donc de l'angle  $\theta$  entre la direction du champ et la normale à la bicouche.

$$K_i^2(\theta) = K_0^2 \left( 1 + \frac{d}{1 + \frac{4\pi\chi^2 H_0^2 \cos^2(\theta)}{C_p k_B T}} \right) \quad (19)$$

où  $d = \frac{Z^2 C_p}{12C_s}$ ,  $C_p$  la concentration en nanoparticules,  $C_s$  celle de l'électrolyte,  $\chi$  la susceptibilité magnétique du ferrofluide,  $H_0$  le champ appliqué,  $k_B$  la constante de Boltzmann,  $Z$  la charge nette par nanoparticule. Cette

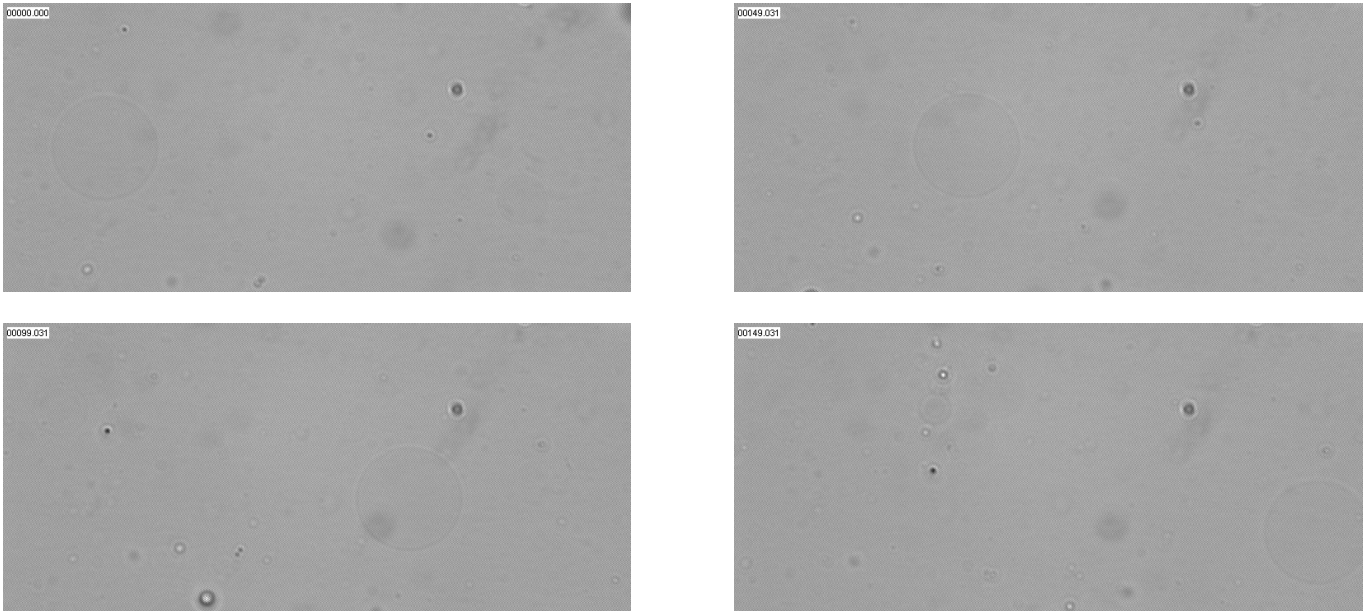


FIG. 15: Magnetophorèse : images extraites à intervalles réguliers du film

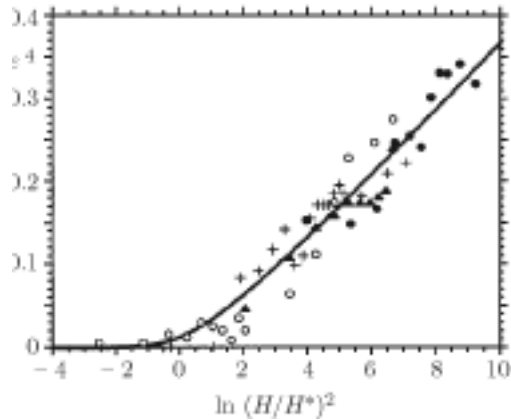


FIG. 16: Courbe théorique déduite de la résolution des équations non-linéaires, et montrant les deux régimes avec  $K_b = 21k_B T$ . Ces valeurs expérimentales pour différentes vésicules magnétiques sont tracées avec un paramètre ajustable  $H^*$  [8].

méthode a pour intérêt de pouvoir mesurer la constante de courbure alors que la vésicule n'a pas de contact avec le matériel de l'expérience. C'est une méthode de détermination à distance, contrairement à celle d'E. Evans et W. Rawicz, pour laquelle la membrane doit glisser sur la surface en verre à l'intérieur de la pipette (c'est pourquoi on doit souvent appliquer un traitement répulsif au verre pour que le lipide ne colle pas dessus). Par contre, on n'a pas encore pu atteindre le régime où  $K_s$  intervient (pour les contraintes fortes) contrairement à la méthode d'E. Evans et de W. Rawicz.

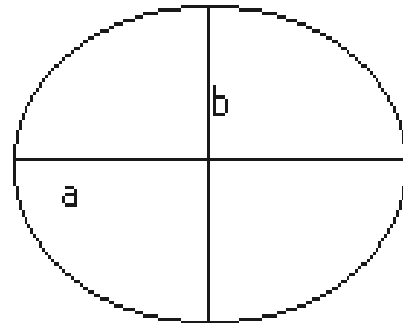


FIG. 17: Paramètres déterminant l'excentricité d'une ellipse.

## V. QUELQUES APPLICATIONS EN BIOLOGIE

Les membranes biologiques ne sont pas de simples bicouches lipidiques telles que celles que l'on a étudiées, mais représentent un mélange complexe des différentes sortes de lipides et de protéines qui interagissent avec le cytosquelette et la matrice extracellulaire.

Ainsi, la forme des cellules biologiques est déterminée par trois facteurs : outre l'élasticité membranaire, interviennent les propriétés mécaniques du cytosquelette qui sous-tend la bicouche lipidique et l'adhésion de la cellule au substrat. Les deux premiers paramètres déterminent la tension membranaire dite apparente. L'étude de la dynamique de tubes membranaires soumis à un agent de

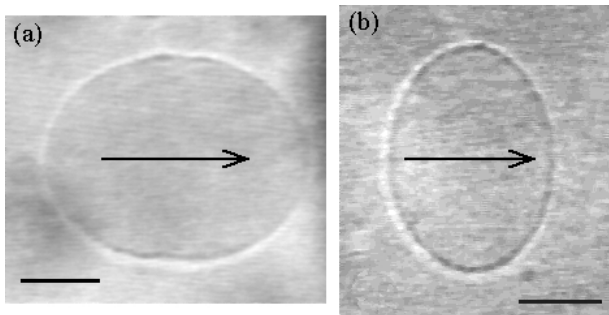


FIG. 18: Magnétoliposome dans les formes oblate et prolate

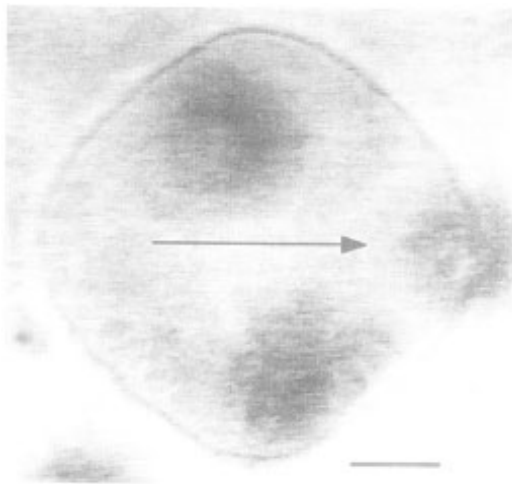


FIG. 19: Magnétoliposome dans lequel la concentration en citrate est intermédiaire.

dépolymérisation de l'actine [11] a montré qu' au niveau des points d'adhésion il y a compétition entre la rigidité du cytosquelette et la tension créée au sein de la membrane.

Par ailleurs, des études portant sur de véritables cellules, telles les fibroblastes, ont été menées. Des tubes membranaires ont été soumis à des pinces optiques qui fonctionnent par la pression radiative exercée par des faisceaux lasers [13]. L'irradiation par des faisceaux lasers augmente la tension membranaire du fait de la diminution de l'aire dont peut disposer chacune des têtes polaires au sein de la membrane ce qui permet de tirer sur la membrane. L'observation de l'indépendance entre la longueur des tubes obtenues et la force exercée sur ceux-ci démontre le fait que des réservoirs présents au sein de la cellule fournissent les lipides nécessaires à la formation des tubes. La tension membranaire jouerait donc un rôle très important dans le trafic intra-cellulaire et l'incorporation de matériel membranaire.

La description complète des membranes biologiques nécessite par ailleurs d'envisager leur comportement

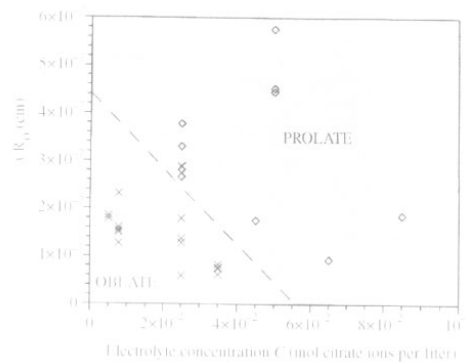


FIG. 20: Diagramme de phase topologique des magnétoliposomes soumis à un champ magnétique [4]

hors-équilibre, qui peut être dû à la translocation ou au flux actif d'ions à travers la membrane. Ces phénomènes correspondent à l'exercice d'une force localisée sur la membrane. Pour ce faire, on insère au sein des membranes des GUV de la bactériorhodopsine [16], protéine transmembranaire qui est une pompe à protons et dont l'activité peut être réglée en fonction de l'intensité avec laquelle on l'éclaire. On étudie les fluctuations de la vésicules par la techniques de la micropipette [9], pour mesurer l'excès de surface lié à ces fluctuations. La valeur de  $1/K_b$ , qui est donnée par la pente du logarithme de la tension de surface en fonction de l'excès de surface, est réduite dans le cas de la membrane dite active, la membrane est plus molle quand on l'éclaire. Cette étude montre donc l'effet de l'activité des protéines sur les fluctuations des membranes lipidiques.

## VI. CONCLUSION

L'étude des vésicules est un modèle plus simple que la cellule vivante pour étudier les propriétés des membranes, mais aussi pour étudier les vecteurs qui peuvent transporter du matériel (ADN, médicament) dans les cellules. Il est donc important d'étudier ses propriétés, notamment sa constante de courbure qui intervient dans de nombreuses applications en biologie (interaction entre la membrane et les protéines, variation de  $K_b$  sous l'effet de certaines drogues ou de certains lipides). Nous avons exposé l'une des méthodes de détermination de  $K_b$ , l'étude par des vésicules magnétiques. Le résultat obtenu par cette méthode est sensiblement le même que pour les autres, ce qui prouve la validité de ce procédé et rajoute un autre moyen d'étude des vésicules, qui peut se faire à distance. Il reste maintenant à étudier la vésicule contenant un ferrofluide plus concentré, afin de pouvoir mesurer l'étirement de la membrane et déterminer  $K_s$ .

### Remerciements

Nous remercions beaucoup Olivier Sandre (du laboratoire LI2C) pour le temps qu'il nous a consacré, sa dis-

ponibilité, ses explications et ses conseils ainsi que Dihya Guemghar pour ses encouragements et pour nous avoir montré ses expériences, notamment l'électroformation à laquelle l'une d'entre nous a pu participer.

- 
- [1] O. Sandre, Thèse de Doctorat, Université Paris VI Pierre et Marie Curie (2000).
- [2] J.-C. Bacri, V. Cabuil, A. Cebers, C. Ménager, R. Perzynski, *Materials Science and Engineering C* 2, 197-203 (1995).
- [3] Aurélien Roux, Giovanni Cappello, Jean Cartaud, Jacques Prost, Bruno Goud, and Patricia Bassereau, *PNAS* 99, 5394-5399 (2002).
- [4] Olivier Sandre, Christine Ménager, Jérôme Prost, Valérie Cabuil, Jean-Claude Bacri and Andrejs Cebers, *Giant Vesicles* (eds. Luisi, P.L. & Walde, P.) 169-180 (John Wiley & Sons, Chichester, 2000).
- [5] D. Kushnir Fygenson, M. Elbaum, B. Shraiman, and A. Libchaber, *Physical Review E* 55, 850-859 (1997).
- [6] C. Ménager, V. Cabuil, *Journal of Colloids and Interface science* 169, 251-253 (1995).
- [7] O. Sandre, C. Ménager, J. Prost, V. Cabuil, J.-C. Bacri, and A. Cebers, *Physical Review E* 62, 3865-3870 (2000).
- [8] J.-C. Bacri, V. Cabuil, A. Cebers, C. Ménager and A. Perzynski, *Europhys. Lett.* 33 (3), 235-240 (1996).
- [9] E. Evans and W. Rawicz, *Physical Review E* 64, 2094-2097 (1990).
- [10] M. Kummrow and W. Helfrich, *Physical Review A* 44, 8356-8360 (1991).
- [11] Roy Bar-Ziv, Tsvi Tlusty, Elisha Moses, Samuel A. Safran, and Alexander Bershadsky, *PNAS* 96, 10140-10145 (1999).
- [12] Jianwu Dai and Michael P. Sheetz, *Biophysical Journal* 77, 3363-3370 (1999).
- [13] Drazen Raucher and Michael P. Sheetz, *Biophysical Journal* 77, 1992-2002 (1999).
- [14] C. Menager and V. Cabuil, *J. Phys. Chem. B* 106, 7913-7918 (2002).
- [15] Erdem Karatekin, Olivier Sandre, Hicham Guitoni, Nicolas Borghi, Pierre-Henri Puech, and Françoise Brochard-Wyart, *Biophysical Journal* 84, 1734-1749 (2003).
- [16] J.-B. Manneville, P. Bassereau, D. Lévy, and J. Prost, *Phys. Rev. Lett.* 82, 4356-4359 (1999).