

THÈSE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ PARIS 6

ÉCOLE DOCTORALE : **Chimie**

SPÉCIALITÉ : **Matière Condensée**

Présentée par Mlle Stéphanie GUYON

Pour obtenir le grade de DOCTEUR de l'UNIVERSITÉ PARIS 6

EXTRUSION DE VÉSICULES À TRAVERS DES MEMBRANES
POREUSES CALIBRÉES



Soutenue le 12 Novembre 2002, devant le Jury composé de :

M. Jean-Marc DI MEGLIO

Rapporteur

Mme Annie VIALLAT

Rapporteur

M. Loïc AUVRAY

Mme Françoise BROCHARD-WYART

Mme Dominique BARTHES-BIESEL

M. Jean-Baptiste FOURNIER

M. Didier ROUX

à Anne et Bertrand,

Remerciements

Ce travail a été effectué au Laboratoire Léon Brillouin du Centre d'Etudes Atomiques de Saclay.

Je tiens à exprimer ma plus profonde gratitude à Loïc Auvray qui a dirigé cette thèse pour ses précieux conseils, son enthousiasme contagieux et sa gentillesse.

Charles-Henri de Novion et José Teixeira m'ont accueillie au Laboratoire Léon Brillouin, puis Pierre Monceau et Michel Alba leur ont succédé. Je les remercie tous.

Je tiens à remercier mesdames Françoise Brochard et Dominique Barthès-Biesel, ainsi que messieurs Didier Roux et Jean-Baptiste Fournier de m'avoir fait l'honneur de juger cette thèse. Annie Viallat et Jean-Marc di Mèglio ont accepté d'être les rapporteurs, ce dont je leur sais gré.

Les mesures de fluorescence ont été effectuées au Laboratoire CNRS de Recherche sur les Polymères à Thiais grâce à la compétence et à la gentillesse de Véronique Witgens. Les expériences de microscopie optique n'auraient pas été possibles sans la mobilisation de l'équipe de Françoise Brochard au Laboratoire Physique Chimie de l'Institut Curie, et en particulier Olivier Rossier, Andréa Fery et Pierre-Henry Puech.

L'élaboration de cette thèse doit énormément aux résultats des expériences de diffusion de lumière, qui ont été réalisées sur le spectromètre de Didier Lairez. Ses conseils avisés m'ont été d'un grand secours pour l'utilisation et le réglage de l'appareil. J'ai également eu de grandes facilités à employer les appareils de diffusion de neutrons au L.L.B, spécialement ceux du groupe « petits angles » dirigé par François Boué. Merci enfin à la joyeuse bande de thésards et de post-docs du LLB qui me laisseront de ces trois ans un excellent souvenir.

Table des matières des chapitres

1	CHAPITRE 1 : INTRODUCTION	9
2	CHAPITRE 2 : MEMBRANES CALIBREES ET EXTRUSION DE VESICULES	11
3	CHAPITRE 3 : PROCEDES ET SYSTEMES	45
4	CHAPITRE 4 : EXTRUSION DE VESICULES – ETUDE RHEOLOGIQUE	79
5	CHAPITRE 5 : STRUCTURE DES VESICULES AVANT ET APRES EXTRUSION	113
6	CHAPITRE 6 :PASSAGE DE VESICULES GEANTES A TRAVERS DES CANAUX DE PDMS : VISION DIRECTE AU MICROSCOPE	151
7	CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	167
	REFERENCES	171
	ANNEXES	177

1 Introduction

Découvertes à l'état artificiel par Bangham dans les années 60 (1), les vésicules sont dans la nature des capsules biologiques nécessaires au transport de molécules entre les différents milieux membranaires (cellules, mitochondries, appareil de Golgi,..). Elles sont maintenant utilisées pour de multiples applications, comme vecteurs de principes actifs dans les industries pharmaceutique et cosmétique (2), ou comme modèle très simplifié des cellules vivantes au laboratoire. Généralement représentées comme des coquilles fluctuantes en suspension dans l'eau, leur taille peut varier de quelques dizaines de nanomètres à quelques centaines de micromètres. Dans la nature, elles sont constituées de molécules biologiques, les lipides, mais pour les physiciens elles peuvent aussi être formées à partir de tensioactifs ou de molécules polymérisables (3), ce qui modifie considérablement leurs propriétés mécaniques. Objets bidimensionnels sans tension de surface, leurs propriétés physiques sont fixées par trois grandeurs : le module de cisaillement, d'élasticité et de courbure.

Alors que les techniques de microscopie optique facilitent l'étude des déformations des **vésicules unilamellaires géantes** (de 10 à 100 μm de diamètre), les mesures des propriétés mécaniques des **petites vésicules** unilamellaires (de 10 à 100nm) sont moins répandues, en particulier pour les vésicules de lipides. L'expérimentateur est en effet confronté à deux problèmes principaux. Le premier réside dans la difficulté quasiment insurmontable d'étudier de tels objets individuellement. Les mesures doivent donc être moyennées sur des quantités très importantes de vésicules, ce qui nécessite que la population soit monodisperse. Heureusement les méthodes de préparation permettent d'obtenir assez rapidement et facilement des vésicules relativement monodisperses. Le deuxième problème est plus gênant : les petites vésicules sont très peu déformables et les outils de rhéologie standards se révèlent impuissants pour l'étude de ces objets. Le rhéomètre de Couette peut déformer et rompre des vésicules de tensioactifs (4) mais pas les vésicules de lipides. D'autres techniques ont été développées : mesures viscoélastiques dans une gamme de fréquence très large (72Hz à 235kHz) (5), déformation et rupture de liposomes par application d'un champ électrique (6), (7), mais n'ont pas fourni d'informations décisives.

L'extrusion à travers des pores cylindriques sub-micrométriques est un moyen simple de rompre les petites vésicules, puisqu'il s'agit d'une méthode pour contrôler leur taille par énergie mécanique (8). Quelques travaux ont été menés pour déterminer les paramètres permettant de contrôler la taille et la polydispersité des vésicules préparées par extrusion (9) (10). Récemment quelques expériences ont été réalisées pour comprendre plus fondamentalement les mécanismes de formation de petites vésicules monodisperses par extrusion à partir de vésicules multilamellaires et polydisperses (11) (12). Les expérimentateurs mesurent le débit du fluide en fonction de la pression pendant l'extrusion, et

comparent leurs valeurs aux rares modèles théoriques prédits pour ce type d'écoulement (13). La tension de lyse des bicouches peut être déduite de la mesure de la pression minimale d'extrusion.

Dans la continuité des travaux de B. Frisken, notre but est d'utiliser l'extrusion à travers des membranes poreuses, dont les pores sont bien calibrés et de taille nanométrique, pour courber, étirer et rompre des petites vésicules, et ainsi tester leurs propriétés élastiques. Cela a été fait pour de nombreux objets déformables : bulles d'air (14), polymères (15), capsules élastiques (16), et globules rouges (17). Grâce à un montage original nous déterminons les mécanismes d'entrée des vésicules dans les pores, et nous mesurons le module de courbure et la tension de lyse des bicouches étudiées. Ces mesures sont complétées par une analyse structurale qui nous permet de mesurer précisément les changements de taille des vésicules avant et après extrusion. Pour cela nous utilisons des systèmes initiaux monodisperses, faciles à caractériser, et la taille initiale des vésicules est donc un paramètre variable du système. La diminution de taille des vésicules, significative lorsque les rayons de pores sont suffisamment petits, est corrélée à leur rupture. Ce phénomène de rupture est d'ailleurs prouvé directement en étudiant le relargage, après extrusion, de marqueurs fluorescents initialement encapsulés dans les vésicules. Les effets de confinement et de pressions sont prédominants sur les effets de cisaillement pour initier la rupture. Enfin, le cas des petites vésicules est comparé à l'écoulement de vésicules géantes dans des canaux microscopiques, visualisé par microscopie de fluorescence.

Ce mémoire commence par passer en revue quelques éléments bibliographiques sur la physique des pores et celle des vésicules. Après une présentation des systèmes étudiés et des principales techniques qui ont permis de les caractériser, nous aborderons la partie expérimentale divisée en trois chapitres. Le premier est consacré aux mesures rhéologiques, alors que le deuxième analyse les résultats obtenus par les méthodes spectroscopiques. Enfin nous présenterons l'ébauche d'une étude comparative sur les vésicules géantes, où les déformations sont directement visualisées au microscope.

N. B. Dans un souci de clarté nous appellerons dans la suite de ce manuscrit les membranes poreuses de polycarbonate "membranes", et les membranes des vésicules "bicouches".

2 Chapitre 2 : Membranes calibrées et extrusion de vésicules

2 CHAPITRE 2 : MEMBRANES CALIBREES ET EXTRUSION DE VESICULES 11

<u>2.1 INTRODUCTION</u>	15
<u>2.2 MILIEUX POREUX MODELES</u>	15
<u>2.3 CONFINEMENT ET ECOULEMENT DANS DES PORES MODELES</u>	17
2.3.1 <u>STATIQUE ET DYNAMIQUE DU CONFINEMENT. EXEMPLES</u>	18
.213..a a) <u>Le cas des sphères dures</u>	18
.213..b b) <u>Le cas des chaînes de polymères flexibles</u>	18
2.3.2 <u>EFFETS D'ECOULEMENT</u>	19
.223..a a) <u>Ecoulement dans et à l'entrée d'un pore</u>	20
.223..b b) <u>Ecoulement de polymères dans un pore</u>	21
<u>2.4 LES VESICULES</u>	22
2.4.1 <u>STABILITE ET ELASTICITE DES VESICULES</u>	23
.214..a a) <u>Elasticité d'une bicouche</u>	23
.214..b b) <u>Les fluctuations thermiques</u>	24
2.4.2 <u>DEFORMATIONS DES VESICULES. QUELQUES EXPERIENCES</u>	26
.224..a a) <u>Aspiration de vésicules par une micro-pipette</u>	26
.224..b b) <u>Effet de cisaillement sur les vésicules « libres »</u>	27
.224..c c) <u>Effet d'adhésion</u>	29
2.4.3 <u>PERMEABILITE ET RUPTURE DES BICOUCHES DE LIPIDES</u>	29
.234..a a) <u>Perméabilité des bicouches au repos</u>	30
.234..b b) <u>Création de pores transitoires sous l'effet d'une tension</u>	30
<u>2.5 EXTRUSION DE VESICULES DANS DES PORES</u>	33
2.5.1 <u>UN PROCEDE DE FABRICATION</u>	34
.215..a a) <u>Présentation</u>	34
.215..b b) <u>Etude expérimentale</u>	36
2.5.2 <u>ETUDES THEORIQUES DU PASSAGE D'UNE VESICULE DANS UN PORE</u>	37
.225..a a) <u>Déformation avant le pore</u>	38
.225..b b) <u>Effets d'entrée</u>	39
.225..c c) <u>Transport de la vésicule dans le pore</u>	40
.225..d d) <u>Instabilités hydrodynamiques</u>	43

2.1 Introduction

La plupart des milieux poreux, filtres, membranes, colonnes, utilisés dans les applications de filtration, séparation, purification sont désordonnés. Les procédés de fabrication, par exemple le frittage de particules, les procédés sol-gel, la précipitation contrôlée de polymères ou la séparation de phase dans des verres, conduisent souvent à des variations assez grandes de la forme, de la taille, de la direction et de la topologie des pores au sein du milieu. Cela est parfois intéressant pour des raisons de coût ou de contrôle du débit mais est en général une gêne pour les études fondamentales. Il existe cependant des milieux poreux modèles à la géométrie bien définie. Le but de ce chapitre est de présenter brièvement ces milieux et les expériences de confinement et d'écoulement qui présentent une analogie avec celles que nous voulons effectuer sur les vésicules, de rappeler certains éléments de base de la physique des vésicules et enfin de discuter le processus d'extrusion de vésicules dans des pores à la fois comme moyen de fabrication des vésicules et comme moyen de déformation. Peu d'expériences quantitatives ont été faites dans ce domaine aux échelles sub-microniques, mais il existe un certain nombre de résultats expérimentaux et de calculs théoriques sur le comportement de vésicules en milieu confiné et dans un écoulement que nous décrivons.

2.2 Milieux poreux modèles

Pendant longtemps les seules membranes poreuses possédant les caractéristiques correspondant aux modèles théoriques les plus simples, pores cylindriques parallèles de même rayon, ont été les membranes dites « Nucléopore » utilisées au cours de cette thèse. Plus récemment sont apparues sur le marché des membranes d'alumine présentant elles aussi des caractéristiques intéressantes. Dans l'avenir, on peut espérer disposer également de membranes fabriquées par polymérisation de matrices mésophasiques (à base de copolymères ou de cristaux colloïdaux) à la géométrie bien définie, et de pores calibrés fabriqués directement par des techniques de nanogravure.

Membranes « Nucléopore »

En 1962, Price et Walker, ingénieurs à General Electric, découvrent en étudiant des traces fossiles d'irradiation dans certains échantillons de mica, qu'on peut révéler et agrandir les traces latentes laissées par le passage d'ions lourds de haute énergie à travers le mica en le trempant dans un bain d'acide fluorhydrique (18). Si le faisceau d'ions est bien collimaté, on obtient des pores cylindriques (ou hexagonaux) parallèles de taille identique, dont le diamètre est fixé par les conditions de révélation (durée, concentration d'acide,...) et peut être varié entre 10nm et 10 μ m. Ce procédé (schématisé sur la Figure 2-1) de révélation de traces latentes d'irradiation par attaque chimique est rapidement étendu à

d'autres matériaux, en particulier aux films de polycarbonate qui se révèlent très bien adaptés à la fabrication industrielle de membranes poreuses minces (d'épaisseur typique 10µm) souples et résistantes, commercialisées sous le nom de membranes «Nucléopore». Le révélateur est dans ce dernier cas une solution aqueuse de soude. La densité des pores est éventuellement limitée par la condition de non chevauchement de traces et la résistance mécanique finale de la membrane. Dans les membranes commerciales, elle est en général de 10^8 pores par cm^2 , ce qui est relativement petit (la distance moyenne entre pores est alors de 1 µm). Ces membranes sont généralement peu perméables et réservées à des usages particuliers comme la fixation et le comptage de cellules biologiques. Notons que la faible densité de pores (qu'on peut encore diminuer en diminuant la dose d'irradiation) permet d'envisager des expériences à l'échelle d'un pore unique, comme C.P. Bean et R.C. Blois l'ont proposé et réalisé dès 1975 (19), (20).

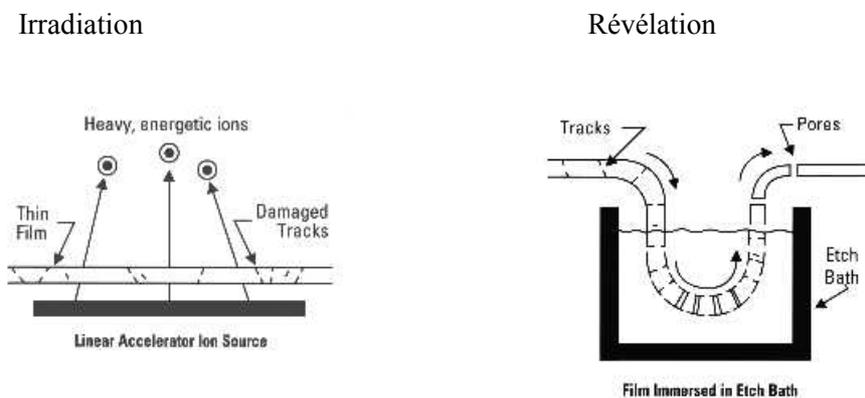


Figure 2-1 : Procédé de fabrication des membranes de polycarbonate dites « Nucléopore ». *Catalogue de produits Corning.*

Membranes d'alumine (21)

On sait depuis longtemps que l'anodisation de l'aluminium (oxydation électrochimique de l'aluminium en alumine) peut conduire à une instabilité de digitation. On obtient des pores réguliers, en nid d'abeilles, perpendiculairement à la surface de l'électrode d'aluminium. Le contrôle du courant électrique permet de faire varier la taille des pores et de détacher la membrane d'alumine poreuse une fois formée. Ces membranes sont commercialisées depuis le début des années 1990, elles présentent l'intérêt d'être résistantes aux solvants organiques et très perméables car la densité de pores est maximale. Trois tailles de pores sont disponibles : 0.02, 0.1 et 0.2 µm.

Autres pores modèles

Les mésophases cylindriques hexagonales de tensioactifs ou de copolymères peuvent être utilisées comme matrice pour polymériser des précurseurs organiques de la silice ou d'autres oxydes et obtenir un moule de la structure initiale après pyrolyse de la matrice organique (22). Ce procédé de fabrication, qui suscite un grand intérêt, produit des pores cylindriques et monodispersés à l'échelle de la dizaine de nanomètres. De nombreuses recherches sont menées actuellement pour orienter les pores, par exemple en cisillant au préalable les mésophases.

Un autre moyen de fabriquer des structures poreuses idéales, utiles par exemple en opto-électronique, est de sculpter la matière à l'aide de faisceaux abrasifs d'ions lourds (23). La maîtrise actuelle des faisceaux d'ions permet d'obtenir des structures nanométriques à l'échelle d'un pore ou d'un « cristal » de pores.

2.3 Confinement et écoulement dans des pores modèles

Les membranes « Nucléopore » se sont révélées être d'excellents outils pour étudier les processus de filtration, séparation et transport dans les milieux poreux. Elles ont aussi servi de moules pour fabriquer des objets nanoscopiques, fils ou tubes (24). Nous décrivons dans cette partie les expériences et les modèles les plus simples, impliquant les sphères dures et les chaînes de polymères (représentatif du cas où les objets confinés sont déformables).

Une molécule de soluté ou un objet de taille R en suspension dans un solvant ne peut pénétrer dans un pore cylindrique de diamètre D que si R est inférieur à D ou si l'objet est déformable. Dans les deux cas les parois du pore restreignent les degrés de liberté de l'objet et ses mouvements. Cela se traduit par des effets d'exclusion et de partage. On appelle le coefficient de partage K le rapport des concentrations en objet dans le pore et à l'extérieur du pore, à l'équilibre thermodynamique. Si on se trouve en dehors de l'équilibre thermodynamique, en présence d'un gradient de concentration (cas d'une expérience de diffusion) et/ou d'un gradient de pression (cas d'une expérience de filtration) de part et d'autre d'une membrane poreuse, il faut décrire le couplage entre le flux de solvant, le flux de soluté et les deux gradients. Cela fait intervenir en général trois coefficients de transport. Le lecteur pourra trouver une description thermodynamique générale de ce cas dans le livre d'A. Katchalsky (25) exposée aussi dans la thèse de G. Guillot. Deux quantités utiles sont le coefficient de diffusion effectif du soluté dans un pore, noté D_{eff} et le facteur de réjection σ (26) qui exprime la fraction de soluté qui ne passe pas à travers la membrane poreuse quand il est entraîné par un flux de solvant ($\sigma = 0$ pour une membrane totalement perméable et $\sigma = 1$ pour une membrane totalement imperméable au soluté).

2.3.1 Statique et dynamique du confinement. Exemples

a) *Le cas des sphères dures*

On s'intéresse au cas le plus simple du transport de sphères rigides de rayon R dans un pore cylindrique de rayon R_p , les sphères étant en suspension, diluées dans un solvant. Le calcul du coefficient de partage K est très simple si l'interaction entre une sphère et la paroi du pore est uniquement stérique. Sachant qu'une sphère ne peut s'approcher de la paroi d'une distance inférieure à son rayon R , on trouve (27) :

$$\text{Eq 2-1} \quad K = \left(1 - R/R_p\right)^2$$

Le calcul (28) (29) (30) (31) du coefficient de diffusion effectif D_{eff} d'une sphère dans le pore suppose qu'on sache décrire l'écoulement du solvant autour d'une sphère confinée, ce qui n'est pas le cas en général. On obtient une expression approchée en supposant la sphère maintenue au centre du pore, c'est l'équation de Renkin (28):

$$\text{Eq 2-2} \quad D_{eff}/D_0 = (1 - R/R_p)^2 \times \left[1 - 2,1R/R_p + 2,09(R/R_p)^3 - 0,95(R/R_p)^5\right]$$

qui se met sous la forme : $D_{eff} = D_0 K f$, où D_0 est le coefficient de diffusion de ce même soluté en solution et dilution infinie, K le coefficient de partage statique, et f le facteur de friction hydrodynamique. L'expression de f est une bonne approximation pour une sphère centrée sur l'axe du pore et pour $R/R_p \leq 0,4$ (30).

De nombreuses expériences de diffusion de solutés rigides (32) ou de pelotes de polymères (33), (34), (27) (35) ont été réalisées, à travers des verres poreux ou des membranes de mica et de polymère. Et beaucoup d'entre elles ont montré un assez bon accord avec la relation de Renkin (32), (34), (27).

b) *Le cas des chaînes de polymères flexibles*

Les propriétés statiques et dynamiques des polymères confinés en milieu poreux sont importantes dans de nombreuses applications en particulier en chromatographie. Leur description est aussi un test important de la théorie des polymères. Ces objets présentent l'intérêt d'être très fluctuants et donc très déformables sous l'effet d'une contrainte.

Le coefficient de partition K est alors le rapport des configurations occupées par la chaîne dans le pore sur toutes les configurations possibles en solution, il est directement relié à la différence d'entropie entre une chaîne confinée et une chaîne libre. Cassasa (36) le premier l'a calculé pour des chaînes idéales. Daoud et de Gennes (37) ont ensuite étendu la théorie au cas plus réaliste des chaînes en bon solvant. Leur prédiction se met sous la forme :

Eq 2-3

$$K = \exp[-k(R_G/R)^{1/\nu}]$$

où k est un facteur d'ordre unité, R_G est le rayon de giration, et ν est l'exposant critique de volume exclu ($\nu = 3/5$ pour une chaîne gonflée).

La dynamique d'une chaîne en bon solvant dans un milieu confiné est bien décrite par le modèle de Zimm qui inclut les interactions hydrodynamiques : le déplacement d'un maillon provoque un contre-courant de solvant qui modifie lui-même le mouvement des autres maillons. Il faut toutefois tenir compte du fait que les interactions hydrodynamiques dans un pore sont écrantées à des distances supérieures à R_p . A partir de cette description, Brochard et de Gennes (38) ont calculé le coefficient de diffusion de la chaîne dans un pore cylindrique comme le produit du coefficient de partage par un facteur de freinage. :

Eq 2-4

$$D_{eff}/D_0 = \exp[-k(R_G/R_p)^{1/\nu}] \times k'(R_G/R_p)^{1-1/\nu}$$

Plusieurs travaux ont permis de vérifier expérimentalement ces prédictions théoriques (34) et (27). En particulier les très récents travaux de Movileanu sont les premiers à retrouver précisément cette loi (39).

2.3.2 Effets d'écoulement

Le transport d'un soluté par un écoulement de solvant à travers une membrane est un phénomène complexe qui fait intervenir trois effets différents :

- un effet de convection du soluté le long des lignes de courant du solvant, qui favorise généralement le passage du soluté dans le pore.
- un effet de diffusion, associé au mouvement brownien du soluté, qui peut restreindre l'accès au pore.
- et enfin, pour des solutés déformables, un effet de cisaillement qui se manifeste aux extrémités du pore et à l'intérieur de celui-ci. Cet effet est susceptible d'étirer les objets transportés et de favoriser la pénétration et le transport dans le pore.

L'influence du mouvement brownien est dominante aux faibles débits lorsque la vitesse ν moyenne de l'écoulement du solvant dans le pore est suffisamment petite ($\nu \ll D_0/R_p$). Dans cette limite on peut relier explicitement le coefficient de réjection σ d'un système de sphères dures au coefficient de partage (40) (41) :

Eq 2-5

$$\sigma = (1 - K)^2$$

Le cas des polymères dans un écoulement fort est plus complexe et nous le discutons un peu plus en détail pour sa valeur d'exemple. Nous rappelons d'abord quelques caractéristiques de l'écoulement d'un fluide simple dans un pore cylindrique fin.

a) Ecoulement dans et à l'entrée d'un pore

Si le pore est suffisamment long (de longueur $L_p \gg R_p$) on peut distinguer nettement l'écoulement dans le pore de l'écoulement à l'entrée du pore. L'écoulement dans le pore est décrit classiquement par la loi de Poiseuille illustrée sur la Figure 2-2 a). Le profil de vitesse est parabolique. D'après l'équation de Stokes, la vitesse moyenne du fluide dans le pore v est proportionnelle au gradient de pression appliqué entre les extrémités du tube $\Delta P/L_p$:

$$\text{Eq 2-6} \quad \eta \frac{v}{R_p^2} \approx \frac{\Delta P}{L_p}$$

et le débit volumique $q = \pi R_p^2 v$ obéit à la loi de Darcy :

$$\text{Eq 2-7} \quad q = \frac{K_p}{\eta} \frac{\Delta P}{L_p}$$

où K_p est le coefficient de perméabilité du pore, ici $K_p = \pi R_p^4 / 8$.

Notons au passage que l'ordre de grandeur du taux de cisaillement moyen dans le pore est donné par :

$$\text{Eq 2-8} \quad \dot{\gamma} \approx \frac{v}{R_p} = \frac{q}{\pi R_p^3}$$

Il n'existe pas d'expression exacte de l'écoulement à l'entrée du pore mais on peut en donner une description approchée, simple, fondée sur la loi de conservation de la matière. Loin du pore et des parois de la membrane poreuse, l'écoulement est radial. La conservation du flux à une distance r de l'entrée du pore impose la relation :

$$\text{Eq 2-9} \quad \dot{\gamma} = \frac{\partial v}{\partial r} = \frac{q}{2\pi r^3}$$

Ce taux de cisaillement devient maximal à l'entrée du pore $r = R_p$, et est alors égal à :

$$\text{Eq 2-10} \quad \dot{\gamma}_{\max} = \frac{q}{2\pi R_p^3}$$

On obtient en ordre de grandeur la même relation que dans le pore. Il existe donc une échelle de cisaillement unique, fixée par l'équation Eq 2-8, que nous utiliserons pour nos évaluations numériques. La dépendance $\dot{\gamma}$ en R_p^{-3} indique une dépendance très forte avec la taille du pore. Pour fixer les idées, calculons le taux de cisaillement associé à un débit de 0,5mL/mn dans une membrane dont le diamètre moyen des pores est de 10nm et la densité de pores 10^8cm^{-2} . On trouve un ordre de grandeur gigantesque de 6.10^6s^{-1} , qui est environ 1000 fois supérieur à ce qu'on engendre habituellement dans un rhéomètre de Couette. Les contraintes appliquées et les déformations induites sur des objets colloïdaux ou des macromolécules transportés dans le pore peuvent donc être très grandes.

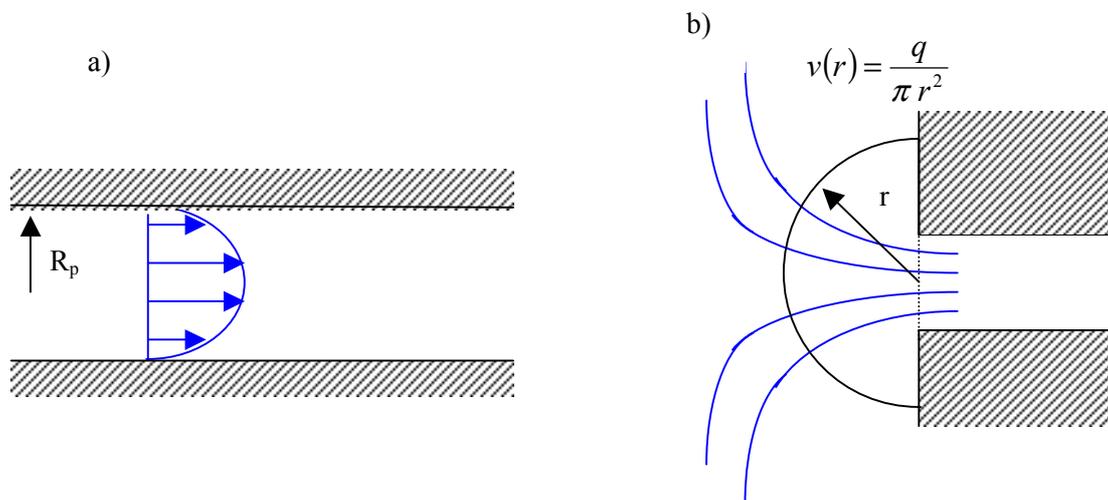


Figure 2-2 : a) Ecoulement de Poiseuille à l'intérieur du pore et b) écoulement élongationnel à l'entrée et à la sortie du pore.

b) Ecoulement de polymères dans un pore

L'entrée forcée par écoulement d'une grosse chaîne de polymère flexible dans un pore cylindrique étroit a été étudiée par Brochard, Daoudi et de Gennes (38), (42), (15). Ces auteurs montrent que si le débit est suffisamment fort, le temps de transit d'une chaîne à l'entrée du pore devient du même ordre de grandeur que le temps de relaxation de la chaîne. On s'attend dans ce cas à un allongement significatif du polymère dans l'écoulement. Cet allongement s'accompagne d'une réduction des dimensions transversales qui peut être suffisamment importante pour que la chaîne puisse finalement se faufiler dans le pore.

Si la chaîne est entraînée à la vitesse du solvant, le temps de transit τ_e dans l'écoulement convergent, décrit au paragraphe précédent, est simplement $\tau_e = 1/\dot{\gamma}$, où $\dot{\gamma}$ est le cisaillement à l'entrée du pore. Le temps de relaxation moléculaire d'une chaîne flexible est le temps de Zimm

$\tau_z = \eta R_G^3 / k_B T$, et la condition de déformation est $\dot{\gamma} \tau_z \gg 1$. En fait, la condition plus précise $\dot{\gamma} \tau_z = 1$ définit une certaine distance d'approche r_c en dessous de laquelle la chaîne se déforme de façon affine, en suivant la déformation d'un élément de volume du solvant. La dimension transversale du polymère arrivant à l'entrée du pore est alors $R_{\perp} = R_G \frac{R_p}{r_c}$, qui doit être inférieure au rayon du pore R_p . On en déduit que le débit du solvant dans le pore q doit être supérieur à un débit seuil $q_c = k_B T / \eta$, qui de façon surprenante est indépendant de la taille du pore et de la masse moléculaire du polymère.

Pour ce qui est des effets d'entrée, G. Guillot a bien observé un débit seuil pour les grandes chaînes flexibles. Au cours d'expériences de filtration continue sur des systèmes Nucléopore-polyacrylamide (43) et mica-polystyrène (44) Munch et Long montrent aussi des effets de débit et de concentration en amont en accord avec les prédictions du modèle de déformation affine de Daoudi et Brochard. Toutefois ils observent une décroissance continue de σ lorsque le taux de cisaillement augmente, alors que la théorie suggère une transition brutale à $\dot{\gamma} \tau_z = 1$.

Peu d'expériences ont été réalisées sur d'autres systèmes. L'étude d'objets différents des polymères pourrait cependant donner des résultats similaires et offrirait une analogie intéressante. Par exemple, la filtration d'une phase éponge a été étudiée une seule fois, à notre connaissance. Pour une phase éponge de maille inférieure à celle du pore Vinches, C. Coulon et D. Roux (45) ont mis en évidence la transition entre un régime d'obstruction (très grande viscosité) pour des taux de cisaillements inférieurs à une valeur critique $\dot{\gamma}_c$, et un régime de déformation au-delà de cette valeur (viscosité proche de celle en solution). Au-delà de la taille critique, les expériences suggèrent l'existence d'une pression seuil.

2.4 Les vésicules

Les vésicules peuvent être schématisées par des coquilles molles plus ou moins sphériques, en suspension dans une solution aqueuse. Ces coquilles sont constituées par des lipides ou d'autres molécules amphiphiles associées en bicouche. Les vésicules unilamellaires présentent une seule bicouche, alors que les vésicules plurilamellaires (les « oignons ») sont formées de plusieurs coquilles emboîtées les unes dans les autres. On s'intéressera uniquement aux vésicules unilamellaires. Les vésicules ont des tailles extraordinairement variées entre 10nm et 100nm. Les plus grosses, les vésicules dites géantes, et désignées dans la littérature sous le sigle GUV (Giant Unilamellar Vesicles), ont des rayons compris entre 1 μ m et 100 μ m, comparables aux dimensions cellulaires. Les vésicules « industrielles » utilisées comme vecteurs ont des diamètres compris entre 50 et 200nm environ et sont comparables aux vésicules du métabolisme cellulaire. La nomenclature les subdivise encore en deux

parties, les **LUV** (Large Unilamellar Vesicles) et les **SUV** (Small Unilamellar Vesicles), mais nous les appellerons communément les petites vésicules sans tenir compte de cette notation. Les expériences qui seront présentées concernent principalement ce dernier type de vésicules, mais il est intéressant d'étudier en parallèle les vésicules géantes qui présentent l'intérêt d'être facilement observables au microscope.

La physique des vésicules a été beaucoup étudiée (46), (47), (48), (49), (2), nous nous contenterons de présenter les éléments de base permettant de comprendre leur stabilité et leur élasticité. Nous insisterons davantage sur les propriétés de déformations des vésicules et les expériences qui permettent de les étudier, à l'exception des méthodes d'extrusion, discutées dans la section suivante.

2.4.1 Stabilité et élasticité des vésicules

Si la formation de bicouches de lipides et de tensioactifs est relativement bien comprise à partir d'arguments sur les conditions d'assemblage de molécules (50), la formation des vésicules et les conditions de leur stabilité restent encore mystérieuses. Dans la plupart des cas, en particulier celui des vésicules de lipides, l'état thermodynamique des bicouches est la structure smectique des lamelles empilées. Les vésicules doivent alors être considérées comme des structures métastables hors d'équilibre qui nécessitent des modes de préparation particuliers et une dépense d'énergie. On prédit et on connaît cependant l'existence des phases de vésicules à l'équilibre thermodynamique (51). Dans les différents cas, l'ingrédient essentiel de la description microscopique des vésicules à l'échelle supramoléculaire est l'énergie élastique de la membrane, introduite par Helfrich (52).

a) Elasticité d'une bicouche

Nous proposons de décrire l'énergie élastique d'une membrane initialement plane, contenant un nombre fixé de molécules. Son aire A_0 est donc une grandeur d'équilibre qui minimise l'énergie interfaciale membrane/eau : la tension de surface est donc nulle. Suivant Helfrich on doit alors considérer que l'énergie élastique E_{elas} d'une bicouche fluide est la somme de deux termes, chacun des deux étant associé à une déformation élémentaire d'extension ou de courbure. La membrane étant fluide, il n'y a pas d'élasticité associée à une déformation de cisaillement.

Déformation d'extension et de compression

On peut imaginer comprimer ou étirer une membrane de lipide plane. L'énergie élastique associée à cette déformation s'écrit à l'ordre le plus bas :

Eq 2-11

$$E_{ext} = \frac{1}{2} \mu_{ext} A_0 \left(\frac{A - A_0}{A_0} \right)^2$$

A est l'aire réelle de la membrane, μ_{ext} est le module de compressibilité de la bicouche. Pour les phospholipides μ_{ext} est de l'ordre de 100 mJ/m^2 . Nous ne connaissons pas des valeurs de coefficient de compressibilité pour les bicouches de tensioactifs, mais dans la mesure où les films de tensioactifs sont denses et compacts, et les molécules ont des longueurs comparables aux molécules de lipides, il est possible qu'elles soient du même ordre de grandeur.

Déformation de courbure.

On peut déformer une membrane en la courbant à aire constante. L'énergie de courbure introduite par Helfrich (52) s'écrit :

$$\text{Eq 2-12} \quad E_{courb} = \int_A \left[\frac{1}{2} \kappa_c (C_1 + C_2 - 2C_0)^2 + \bar{\kappa} C_1 C_2 \right] dS$$

κ_c est le module de courbure moyenne (>0), $\bar{\kappa}$ le module de courbure gaussienne, C_1 et C_2 sont les courbures principales en chaque point, et C_0 est la courbure spontanée, non nulle si la membrane présente une dissymétrie entre les deux feuilletts. Le signe de κ_c est toujours positif pour des raisons de stabilité, mais celui de $\bar{\kappa}$ n'est pas imposé.

Le théorème de Gauss-Bonnet montre que l'intégrale de la courbure gaussienne sur toute la surface est un invariant topologique qui ne dépend que du nombre de poignées et d'anses de la surface. C'est pourquoi seul le module de courbure moyenne κ_c joue un rôle dans les petites déformations des vésicules. Par contre l'énergie de formation d'une vésicule sphérique dépend de $\bar{\kappa}$: on calcule (avec $C_0 = 0$) $E_{elas} = 4\pi(2\kappa_c + \bar{\kappa})$. On peut noter qu'une valeur négative de $\bar{\kappa}$ favorise la formation de vésicules. Cette énergie de courbure est indépendante de la taille des vésicules (53), ce qui explique en partie le grand domaine de variation de ce paramètre. La rigidité de courbure des vésicules lipidiques est de l'ordre de 10^{-19} J , alors que celle des vésicules de tensioactifs est dix fois plus faibles (54).

b) Les fluctuations thermiques

Si elles sont suffisamment flexibles, les bicouches peuvent onduler fortement sous l'effet des fluctuations thermiques. L'amplitude quadratique moyenne des déformations d'une lamelle plane de rigidité κ_c de longueur L et d'aire L^2 est en ordre de grandeur (55) :

$$\text{Eq 2-13} \quad \langle u^2 \rangle \approx \left(\frac{k_B T}{\kappa_c} \right) \frac{L^2}{\Sigma}$$

où Σ est la surface par tête polaire d'une molécule. C'est d'ailleurs l'observation de fluctuations sur des globules rouges et des vésicules géantes qui a permis les premières mesures de la rigidité κ_c .

Remarque : on observe que les membranes de tensioactifs sont plus sensibles aux fluctuations thermiques que les membranes lipidiques dites rigides puisque pour les mêmes dimensions, leurs ondulations thermiques sont $(\kappa_c^{lipides} / \kappa_c^{tensioactifs})^{1/2} \approx 3$ fois plus grandes. Cependant malgré leur qualificatif de « rigides » les ondulations thermiques des membranes lipidiques sont loin d'être négligeables, et pour des vésicules de quelque 10 μm de rayon, leur amplitude peut atteindre plusieurs μm .

Les fluctuations d'ondulation divergent avec la taille du système et modifient complètement les propriétés de courbure d'une membrane à grande échelle. La rigidité d'une membrane dépend en fait de l'échelle d'observation. On peut ainsi montrer qu'il est nécessaire de renormaliser les constantes de courbure en fonction de l'échelle ξ . On obtient les relations (56) :

$$\text{Eq 2-14} \quad \kappa_c(\xi) = \kappa_c - \frac{3}{4\pi} k_B T \ln(\xi/s)$$

$$\text{Eq 2-15} \quad \bar{\kappa}(\xi) = \bar{\kappa} - \frac{5}{6\pi} k_B T \ln(\xi/s)$$

La rigidité $\kappa_c(\xi)$ décroît avec ξ et s'annule pour une longueur caractéristique appelée longueur de persistance et notée ξ_x , introduite par de Gennes et Taupin (57) et en-dessous de laquelle la membrane peut-être considérée comme plane.

Les vésicules flexibles de tensioactifs

Les membranes de tensioactifs sont dites flexibles car leurs modules de courbure κ_c et $\bar{\kappa}$ sont de l'ordre de quelques $k_B T$. Leur valeurs renormalisées par les fluctuations thermiques peuvent alors être radicalement modifiées, et l'énergie de formation d'une vésicule à partir d'une membrane plane $E_{ves} = 4\pi(\kappa_c(\xi) - \frac{1}{2}\bar{\kappa}(\xi))$ peut devenir très faible ou même négative.

➤ Vésicules stabilisées énergétiquement : c'est le cas où E_{ves} est négative. Oberdisse et col. (58) ont donné un exemple de ces vésicules thermodynamiquement stables en ajoutant des tensioactifs ioniques à des membranes neutres dans de l'eau non salée.

➤ Vésicules stabilisées entropiquement : la phase lamellaire reste la phase d'énergie enthalpique la plus faible ($E_{ves} > 0$), mais son énergie entropique est aussi la plus faible. C'est la distance inter-membranaire qui favorise tour à tour l'évolution par minimisation de l'énergie élastique ou par augmentation de l'entropie. Grossièrement, lorsque cette période dépasse la longueur de persistance ξ_x l'entropie l'emporte, et la phase lamellaire est déstabilisée par dilution au profit de la formation des vésicules.

Les vésicules rigides de lipides : un état métastable

Nous avons déjà vu que pour les membranes lipidiques κ_c et $\bar{\kappa}$ sont de l'ordre de quelques dizaines de $k_B T$ et sont donc peu sensibles aux fluctuations thermiques. Dans la plupart des cas connus les vésicules ne sont pas stables thermodynamiquement. Leur formation par effet de dilution n'a lieu que pour des fractions volumiques en eau très importantes (>99.9%). Toutefois il est possible de former des vésicules lipidiques métastables, par des méthodes de préparation nécessitant un apport énergétique (sonication, extrusion, ...).

2.4.2 Déformations des vésicules. Quelques expériences

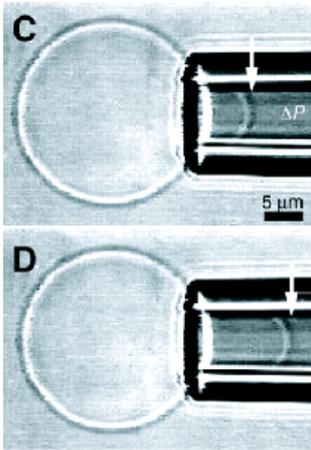
Depuis plusieurs années il est devenu possible d'étudier l'élasticité des vésicules et des systèmes analogues comme les globules rouges et les cellules biologiques par d'autres techniques que l'observation des fluctuations thermiques au microscope optique, en imposant directement des perturbations extérieures comme des champs, écoulements, micromanipulations diverses (pinces optiques, micro-pipettes...) à un objet unique. Cela complète les études mécaniques, électriques ou rhéologiques macroscopiques (59) nécessairement faites sur une grande population d'objets, et qui ne permettent pas toujours de remonter aux origines microscopiques des effets observés. Ces techniques d'objet unique autorisent aussi une bonne confrontation entre les modèles théoriques et l'expérience. Evidemment la déformation des petites vésicules est plus difficile à étudier par ces méthodes et il existe peu de résultats les concernant. Gardant à l'esprit nos expériences sur des pores cylindriques, nous ne décrirons en détail que les calculs et les expériences de micro-pipette et d'écoulement. Une conséquence de la mise sous tension mécanique des bicouches de lipides par aspiration ou écoulement est la possibilité de changer la perméabilité de membrane et d'y créer des pores transitoires, conduisant éventuellement à la rupture des vésicules. Ces effets sont décrits au paragraphe 2.4.3 a).

a) Aspiration de vésicules par une micro-pipette

Les micro-pipettes de verre, dont le diamètre peut varier entre $0.1\mu\text{m}$ et quelques μm , se révèlent être d'excellents outils pour manipuler les vésicules géantes ou les globules rouges et mesurer leurs propriétés mécaniques ou d'adhésion. La méthode a été particulièrement développée par E. Evans. Le principe de cette méthode pour l'étude des propriétés élastiques de la bicouche d'une vésicule géante est le suivant. A l'entrée d'un tube - ici une micro-pipette - une vésicule de rayon supérieur à celui de la micro-pipette reste immobile tant que la pression d'aspiration ne dépasse pas une certaine valeur. L'existence de cette pression seuil ΔP_s est démontrée à la fois par la théorie (60), les expériences (61) et les simulations (62). Cette pression s'oppose à l'énergie de courbure, elle est donc de la forme :

$$\text{Eq 2-16} \quad \Delta P_s \propto \frac{\kappa_c}{R_p^3}$$

Pour des pressions supérieures à ΔP_s , une extension tubulaire de la vésicule se forme et entre dans le pore. Au fur et à mesure que la pression augmente, les ondulations de la membrane se déplient, et la langue avance dans le tube. La déformation de la vésicule et son entrée dans le tube sont décrites par une relation impliquant la dilatation relative de surface projetée $\Delta A_p / A_p$ et la tension imposée à la membrane σ . En mesurant la longueur de la langue par microscopie on obtient $\Delta A_p / A_p$, alors que σ est déduite simplement de la loi de Laplace et de la pression d'aspiration. L'augmentation de la surface projetée par la tension latérale présente deux régimes : d'abord une élasticité entropique à très faible σ , puis une élasticité classique de Hooke, lorsque σ n'est plus négligeable devant le module d'extension μ_{ext} :



$$\text{Eq 2-17} \quad \frac{\Delta A_p}{A_p} = \frac{k_B T}{8\pi \kappa_c} \ln \left(1 + \frac{A_p}{24\pi \kappa_c} \sigma \right) + \frac{\sigma}{\mu_{ext}}$$

Par cette méthode, on peut sonder l'élasticité de la membrane sur quatre ordres de grandeur de tension, de 10^{-6} à 10^{-2} N.m⁻¹. La limite supérieure est la tension de lyse σ_L de la bicouche, c'est la tension maximale que peut supporter la vésicule avant de se rompre dans la micro-pipette.

Figure 2-3 : aspiration d'une vésicule géante dans une micro-pipette (3)

b) Effet de cisaillement sur les vésicules « libres »

On peut évaluer la capacité à se déformer d'une vésicule soumise à un taux de cisaillement $\dot{\gamma}$ en comparant la contrainte de cisaillement $\varepsilon_{cis} = \eta \dot{\gamma}$ à la contrainte de courbure $\sigma_c = \kappa_c / R^2$. La condition $C = \eta \dot{\gamma} R^3 / \kappa_c \approx 1$ nous permet de trouver la valeur du taux de cisaillement nécessaire pour déformer une vésicule de taille R . Pour des vésicules géantes de 20μm de diamètre, un taux de cisaillement de 1s⁻¹ est suffisant alors que pour une vésicule de 50nm de rayon $\dot{\gamma} = 320000\text{s}^{-1}$ est nécessaire. Comme les rhéomètres classiques atteignent au mieux des taux de cisaillement de 10000s⁻¹, les études sur la déformation par écoulement des vésicules de taille inférieure à 100nm sont très rares.

Vésicules géantes

Une vésicule lipidique géante est facilement déformée dans un rhéomètre de Couette. Quelques expériences ont été faites (63) selon que (i) la vésicule est initialement sphérique et (ii) la vésicule est non sphérique, mais ondulante. Dans le premier cas (i) elle prend tout de suite une forme ellipsoïdale

stationnaire de paramètre de déformation $D = \frac{a-b}{a+b}$ (a et b sont les longueurs de grand et du petit axe de l'ellipsoïde), le grand axe faisant un angle θ avec le plan de cisaillement. D et θ augmentent avec le taux de cisaillement. Dans le deuxième cas (ii), au fur et à mesure que $\dot{\gamma}$ augmente, la vésicule transite d'un mouvement oscillant (« flipping ») à une forme ellipsoïdale stationnaire d'orientation θ fixe. Dans ces deux cas la membrane tourne sur elle-même autour de sa forme stationnaire (« mouvement de chenilles de char »).

De Haas et col. expliquent bien les résultats expérimentaux de (i) par un modèle simple qui couple la théorie de la déformation d'une goutte de liquide élastique avec le modèle des ondulations thermiques. En reliant l'augmentation de la surface apparente due à la forme ellipsoïdale, à la déformation induite par le cisaillement, ils trouvent ainsi une relation analytique entre $\dot{\gamma}$ et D :

Eq 2-18

$$\dot{\gamma} = \frac{4\sigma_s D}{5R_o \eta} \exp\left(\frac{64\pi \kappa_c}{15k_B T} D^2\right)$$

σ_s est la tension de surface de la vésicule au repos. Ce modèle semble rendre compte correctement des valeurs de κ_c observées. Cependant il est incomplet, il part d'une forme initialement ellipsoïdale, et ne permet pas d'expliquer les mouvements en chenilles de char. Il existe un modèle décrivant la déformation d'une vésicule à partir d'une forme initiale arbitraire (64). A partir du formalisme du tenseur d'Oseen, ce modèle retrouve la forme ellipsoïdale stationnaire ainsi que le mouvement de « chenilles de char », avec une vitesse angulaire proportionnelle à $\dot{\gamma}$. En revanche, les paramètres θ et D de l'ellipsoïde dépendent uniquement du volume réduit de la vésicule et non du taux de cisaillement, et le mouvement oscillant transitoire n'est pas prévu.

D'autres expériences effectuées sur des vésicules géantes de tensioactifs donnent des résultats très différents. N. Shahidzadeh (65) a couplé des mesures rhéologiques à la visualisation par microscopie de vésicules géantes de AOT (sodium bis octyl sulfosuccinate) dans de l'eau salée. A faible cisaillement $\dot{\gamma} = 0,5s^{-1}$, les vésicules se déforment très fortement ($D > 100$), puis la solution devient très inhomogène. Les vésicules initialement quasi-sphériques forment des tubules qui s'interconnectent. Les mesures rhéologiques montrent alors un comportement similaire à celui des micelles cylindriques. Ce comportement original pourrait être relié à la grande solubilité des molécules d'AOT dans l'eau. Cette solubilité des tensioactifs permet une reconstitution permanente de la surface et une dilatation considérable.

Petites vésicules

Comme nous l'avons vu au début de ce chapitre, il est impossible de déformer des petites vésicules avec un rhéomètre de Couette. En revanche Smeulders et col. (66) (5) disposent d'un rhéomètre pouvant effectuer des mesures viscoélastiques en fréquence jusqu'à 235kHz. Pour des vésicules dont les rayons moyens varient entre 36nm et 106nm, ils observent deux transitions. La première transition mesurée vers 1-10kHz correspond au temps de relaxation de la diffusion de sphères rigides. La deuxième transition qui n'est observée que partiellement aux plus hautes fréquences (vers 10^5 Hz), est attribuée à la déformation des vésicules. Le module d'extension étant très élevé, seuls la tension de surface σ_s , le module de cisaillement μ_{cis} et la tension de courbure $\sigma_b = \kappa_c / R_0^2$ interviendraient dans cette transition. σ_s et σ_b , évaluées par d'autres techniques complémentaires, sont du même ordre de grandeur 10^{-5} N/m. Les auteurs attribuent alors cette transition à la déformation de cisaillement et trouvent une valeur $\mu_{cis} = (3.0 \pm 0.7) 10^{-3}$ N/m très supérieure aux valeurs trouvées par les techniques de micro-pipettes, pour des vésicules de DMPC à l'état solide, environ égale à 5μ N/m (61).

O. Diat et col. ont mis en évidence une phase de vésicules multilamellaires monodisperses, induite par le cisaillement d'une phase lamellaire pour un système ternaire de tensioactifs (eau / SDS / pentanol / dodécane) (4). Ces travaux ont été le point de départ de nombreuses études sur la déformation des phases lamellaires sous cisaillement, menant à l'observation de phases de vésicules unilamellaires induites par cisaillement (67) ou sur la déformation et l'orientation de vésicules multilamellaires (68), pour ne citer que deux exemples. Le phénomène qui nous intéresse le plus ici est la dépendance de la taille des oignons en fonction du taux de cisaillement (69). Un premier modèle basé sur l'équilibre entre la contrainte visqueuse et la contrainte élastique, similaire au raisonnement de Taylor pour expliquer la taille de gouttes d'émulsion formées sous cisaillement, a permis de retrouver la variation de la taille des sphérulites en $\dot{\gamma}^{-1/2}$. Mais ce modèle est incomplet et ne prend pas en compte la dépendance de la taille des sphérulites avec la dilution. Prost et Leibler ont suggéré un mécanisme qui dépend de la perméation des bicouches : les oignons diminueraient leur taille par « pelage » lorsque la perméation est faible et par diffusion de matière lorsqu'elle est forte (70). Mais pour l'instant, aucune théorie complète ne décrit les nombreux phénomènes observés.

c) Effet d'adhésion

Afin de comprendre totalement les mécanismes de roulement et de glissement des cellules, il est nécessaire d'aborder le cisaillement de vésicules adhérant à un substrat. Les différents calculs rendent compte des observations au microscope (71), (72), (73) : la vésicule se déforme tout d'abord de façon asymétrique avant de décoller du substrat sous l'action d'une force de levier. Cette force est d'origine visqueuse et s'oppose à la fois à la force gravitationnelle et à l'énergie d'adhésion, mais est

indépendante de l'élasticité de la vésicule. Ensuite, si la vésicule est toujours entraînée par l'écoulement, elle roule ou glisse à une distance fixe du substrat (74).

2.4.3 Perméabilité et rupture des bicouches de lipides

Au repos, les vésicules sont plus ou moins perméables à l'eau et aux solutés. Nous introduirons brièvement la notion de perméabilité d'une bicouche lipidique en rappelant quelques valeurs de la grandeur associée. La perméabilité à l'eau peut être modulée par la modification chimique de la bicouche car elle est basée sur son caractère hydrophile/hydrophobe, mais elle peut aussi être modifiée mécaniquement par l'action d'une tension. Nous verrons en effet comment l'application d'une tension sur une vésicule peut rompre irréversiblement la bicouche ou encore créer des pores transitoires qui conduisent à une augmentation de la perméabilité et ainsi à son dégonflement.

a) Perméabilité des bicouches au repos

Au repos, la perméabilité d'une bicouche à une molécule est définie par la diffusion passive de cette molécule à travers la bicouche. Le transport passif d'un soluté à travers cette barrière est piloté par le gradient de concentration et caractérisé par le coefficient de perméabilité P_0 . Pour un soluté i ce coefficient de perméabilité est défini par la relation :

Eq 2-19
$$J_i = P_0^i \Delta c_i$$

J_i représente le flux du soluté et Δc_i est l'écart de concentration de part et d'autre de la membrane.

Le coefficient de perméabilité dépend à la fois de la membrane et du soluté. Pour une membrane donnée la perméabilité des solutés dépend de leur taille et surtout de leur polarité. La surface négativement chargée et hydratée constitue un obstacle pour les molécules anioniques ou hydrophobes, en revanche le cœur hydrophobe de la membrane freine le passage de toutes les molécules polaires. A titre d'exemple citons les valeurs de perméabilité, de 10^{-12} - 10^{-11} cm/s pour le glucose, ou 10^{-3} cm/s pour l'eau (75). De la même façon pour le même soluté, P_0 dépend de la longueur des chaînes, de l'état de la bicouche ou de sa composition. Ainsi pour l'eau P_0 varie de $4.2 \cdot 10^{-6}$ cm/s à $2.4 \cdot 10^{-3}$ cm/s lorsque la température augmente de 26.5 à 46°C et que la membrane de DPPC passe de l'état solide à l'état liquide. L'ajout de cholestérol augmente la perméabilité d'une membrane solide car il diminue son ordre cristallin, et diminue celle d'une bicouche fluide en la rendant localement plus compacte (75).

A notre connaissance la perméabilité des bicouches de tensioactifs n'a jamais été mesurée précisément. Composées de molécules très solubles dans l'eau, elles se cassent et se reconstituent très facilement, ces bicouches sont donc très perméables.

b) Création de pores transitoires sous l'effet d'une tension

Une façon d'augmenter la perméabilité d'une bicouche est de créer des pores transitoires ou stationnaires par application d'une tension. En effet si on tend une bicouche au-delà du dépliement des ondulations thermiques, la surface par molécule commence à augmenter. Si la distance entre les molécules devient trop grande la vésicule va créer un pore pour relaxer la tension. La durée de vie du pore, sa potentialité à s'agrandir de manière irréversible ou à se refermer, dépend de la compétition entre la tension de ligne du pore γ et la tension de surface σ de la vésicule. La tension de ligne γ représente l'énergie que coûte la création d'un pore par unité de longueur. Pour la phosphatidylcholine γ est de l'ordre de 10^{-11} N (76), et elle peut être augmentée par l'ajout de cholestérol dans la membrane (77).

Pour une bicouche plane tendue ou BLM (Black Lipid Membrane) le diagramme énergétique d'un pore est très simple. La tension de ligne compense exactement la tension de surface pour un rayon de pore r_c et si un pore est créé avec un rayon inférieur à r_c il se rétracte aussitôt, alors que pour un rayon supérieur il s'étend à l'infini. Dans une vésicule le comportement d'un pore est plus compliqué car la tension de surface diminue au fur et à mesure que le pore s'étend. O. Sandre a écrit l'équation de l'énergie d'un pore dans une vésicule isolée (78) :

Eq 2-20
$$E_p(r) = \gamma 2\pi r - \sigma_0 \pi r^2 \left(1 - r^2/r_0^2\right)$$

σ_0 est la tension mécanique qui a préalablement lissé les ondulations de la membrane dues aux fluctuations thermiques et r_0 est le rayon du pore pour lequel la tension de la membrane est complètement relaxée. Les travaux expérimentaux de O. Sandre montrent que pour une vésicule de rayon $20\mu\text{m}$, un pore de rayon maximal de l'ordre de $10\mu\text{m}$ est créé pour une tension initiale de $\sigma_0 = 2.2 \cdot 10^{-5}$ N/m (79). Un autre modèle, utilisant une expression logarithmique l'élasticité entropique de la bicouche, prédit un rayon de pore minimal de $3\mu\text{m}$ à la surface d'une vésicule de rayon $20\mu\text{m}$, pour une tension de $\sigma_0 = 8 \cdot 10^{-6}$ N/m (80). O. Sandre a observé la fermeture de ces pores après un certain temps dit de fuite. Pendant le temps d'ouverture du pore une partie du solvant interne s'échappe, la vésicule se dégonfle et la tension effective diminue. A chaque instant le rayon d'équilibre du pore, proportionnel à cette tension, décroît un peu plus. On parle alors de pores transitoires.

Ce modèle théorique ne prévoit donc pas d'ouverture irréversible de pore, et théoriquement une vésicule isolée n'éclate pas sous l'action d'une tension. Mais, lorsque la vésicule est maintenue à l'entrée d'une micro-pipette, le tube de bicouche introduit dans la micro-pipette se rompt lorsque la déformation atteint une valeur limite. Cette rupture a été beaucoup étudiée pour les globules rouges, R. P. Rand en particulier a montré son caractère viscoélastique (81). Dans le cas des vésicules géantes

l'aspiration par une micro-pipette constitue précisément un outil de mesure de la tension maximale supportée par la bicouche avant rupture. Cette tension appelée tension de lyse σ_L est typiquement de l'ordre de 5mN/m pour les bicouches de lipides.

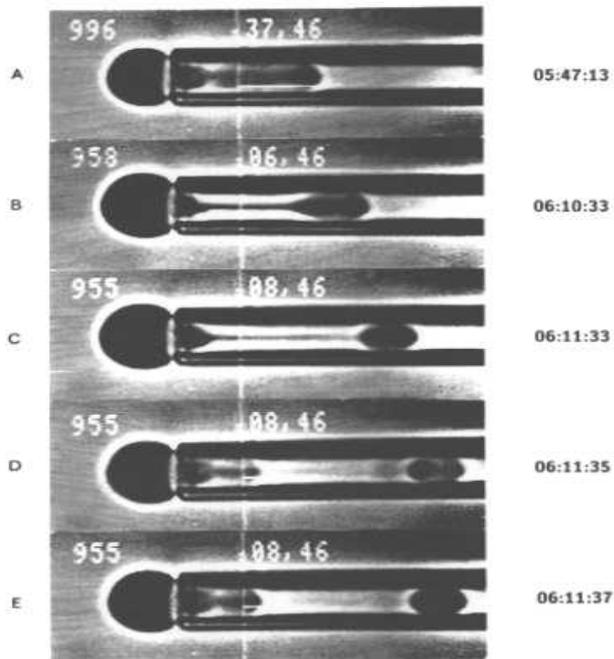


Figure 2-4 : Rupture d'un globule rouge pendant une expérience d'aspiration par une micro-pipette (82)

Augmentation de la perméabilité suite à la formation de pores transitoires

Pour les pores transitoires, il est possible de suivre la fuite de solution interne par mesure du relargage de marqueurs encapsulés, et d'en déduire une augmentation de la perméabilité de la bicouche pour ces marqueurs. C. Taupin a proposé un calcul cinétique qui décrit les courbes expérimentales de taux de relargage de solutés hydrophiles en fonction du temps pour des petites vésicules de DPPC et de EPC (83) . Un modèle basé sur un mécanisme de nucléation de pores statistiques relie le temps de demi-relargage aux tensions de surface et de ligne du système :

Eq 2-21
$$\log(t/t_0) = 2\pi\gamma^2 / (k_B T)^2 R \Delta c$$

Dans le cas de la formation de pores aux durée de vie très courte, un second régime de relargage beaucoup plus lent est observé.

Eq 2-22
$$t/t_0 = \frac{1}{2} (k_B T / \gamma)^2 R \Delta c$$

Dans ce dernier cas l'accroissement relatif de la perméabilité est donné par :

Eq 2-23
$$\frac{P - P_0}{P_0} \approx \frac{3}{\pi} \left(\frac{k_B T \sigma}{\gamma^2} \right)$$

Quelques exemples

Choc osmotique et adhésion de la vésicule sur un substrat sont deux causes possibles de la formation de pores dans la bicouche. Rappelons en deux mots les principaux résultats expérimentaux pour chacun de ces cas. La pression osmotique est proportionnelle au gradient de concentration en soluté et inversement proportionnelle au rayon de la vésicule. Ainsi un écart de 10mM suffit à générer des pores transitoires à la surface d'une vésicule géante de 10 μ m de diamètre (79), alors qu'une vésicule de 100nm de diamètre ne se lysera que si la concentration interne en sel est égale à 1M de plus que celle de la solution externe (84). Lorsqu'une vésicule adhère sur un substrat, la ligne de contact agit comme une ligne de défaut et fragilise considérablement la vésicule, si bien qu'il n'est pas nécessaire que l'énergie d'adhésion soit égale à l'énergie de création de pore pour que la bicouche soit rompue localement (85). Cette analogie avec une fracture solide est peu courante car les vésicules sont plutôt assimilées à des liquides, mais c'est pourtant avec ce raisonnement que Zhdanov et Kasemo (86) ont récemment calculé la cinétique de rupture d'une vésicule géante en adhésion avec un substrat, et ont montré que la vitesse de rupture augmente exponentiellement avec l'interaction membrane-substrat.

2.5 Extrusion de vésicules dans des pores

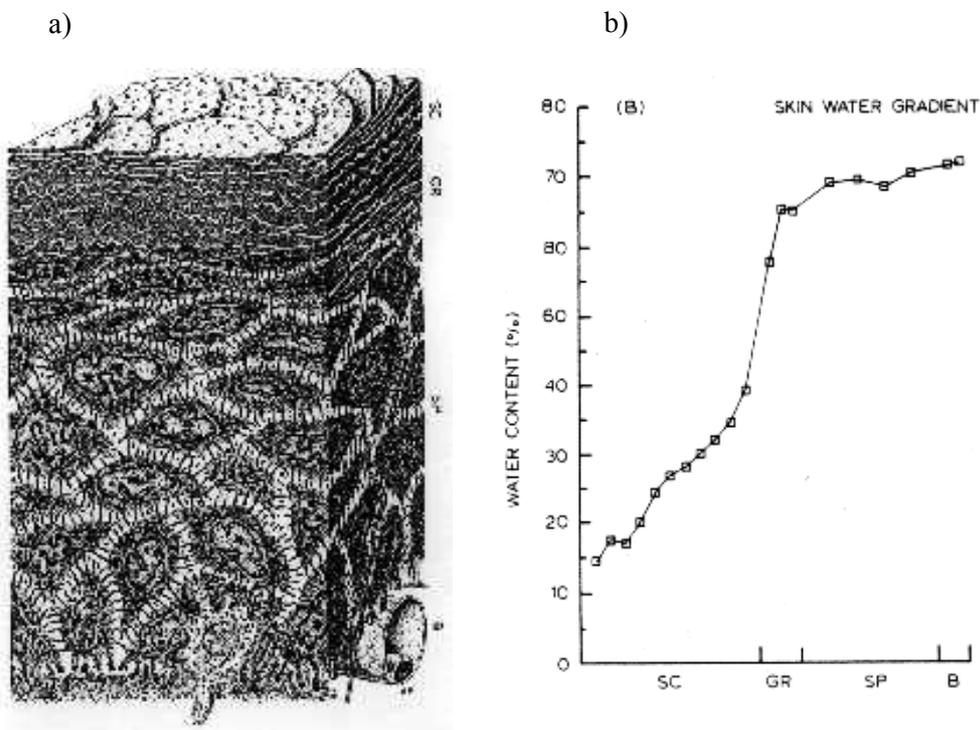


Figure 2-5 : a) Schéma de l'épiderme et du derme b) Concentration en eau dans les différentes parties de la peau, Stratum Corneum (SC), Stratum Germinosum (GR), Stratum Basale (SP), vaisseaux sanguins (B).

Une des applications possibles de l'étude du passage de vésicules dans des pores cylindriques de même taille, est de modéliser l'absorption de liposomes par les pores de la peau. En effet, le gradient de concentration en eau dans l'épiderme et le derme peut engendrer une force poussant des vésicules lipidiques (chargées d'insuline par exemple) à pénétrer jusqu'aux vaisseaux sanguins du derme (87). Si cette méthode de pénétration par la peau se révèle efficace, elle pourrait remplacer avantageusement les thérapies par injection (88). Pour atteindre ces capillaires, les vésicules doivent passer par des espaces inter-cellulaires de $0.1\mu\text{m}$ de largeur dans le *stratum corneum* (cf. Figure 2.5).

Nous évoquons cette application surtout pour illustrer de manière plus imagée le principe de l'extrusion. Le but réel de cette thèse est plutôt de comprendre les effets physiques (déformation, rupture...) de l'extrusion à travers des pores cylindriques, sur des vésicules de taille comparable à celles des pores, et surtout de connaître l'influence des propriétés élastiques de ces vésicules sur ces effets.

L'extrusion d'une suspension lipidique à travers des pores cylindriques calibrés est surtout connue comme procédé de préparation de vésicules unilamellaires et monodisperses. Quelques travaux ont été réalisés pour comprendre le mécanisme de la formation de ces vésicules par extrusion, dans le but principal d'améliorer cette méthode. Mais les résultats n'ont été reliés à des modèles théoriques que dans très peu de cas. Il n'existe d'ailleurs pas de théorie modélisant complètement l'extrusion de vésicules à travers des pores calibrés depuis leur entrée jusqu'à leur sortie des pores, en revanche certains calculs traitent de chaque étape individuellement.

2.5.1 Un procédé de fabrication

a) Présentation

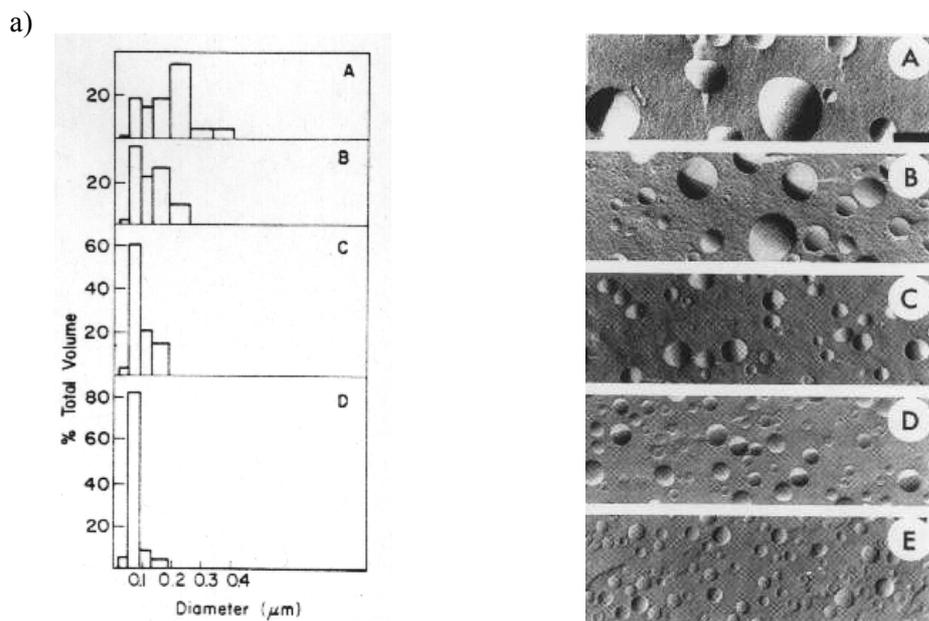
L'utilisation des petites vésicules s'est considérablement développée dans l'industrie depuis ces dernières années. Dans le milieu médical elles servent de vecteurs de médicaments, et leur taille joue un rôle crucial dans la vitesse de délivrance de leur contenu (89), (90), (91). Pour cette raison il est crucial de savoir préparer des vésicules petites (de diamètre inférieur à 100nm), monodisperses, dotées d'une capacité d'encapsulation maximale et par conséquent unilamellaires. Il existe plusieurs techniques de fabrication de ce type de vésicules, mais beaucoup d'entre elles présentent des défauts gênants (92) Les vésicules obtenues par sonication sont très petites ($R < 25\text{nm}$) mais peu stables, et les procédés de fabrication utilisant des détergents ou des solvants organiques (éthanol, éther) présentent un risque de contamination important. Ces problèmes peuvent être évités en utilisant la presse de French (93) et l'extrusion à travers des membranes de polycarbonate (8). Ces techniques utilisent une énergie mécanique très importante pour préparer simplement, et en quelques minutes, des petites

vésicules unilamellaires ($R \cong 100\text{nm}$) à partir d'une suspension de lipides fortement concentrée (200mg/mL).

Le principe de la presse de French est simple. Une suspension de lipide est comprimée par une pression très forte (plusieurs milliers de bars) dans un cylindre creux en acier inoxydable très résistant. Elle est ensuite évacuée à faible débit par un petit orifice. Pendant cette étape, les bicouches sont soumises à des cisaillements considérables au niveau de l'orifice de sortie. Les forces visqueuses engendrées permettent de découper les grandes bicouches en petits fragments. Ces petits fragments se referment sur eux-mêmes immédiatement après leur formation sous la poussée de la tension de ligne. La taille des vésicules en sortie est inversement proportionnelle à la pression appliquée. Le procédé est propre, simple et rapide mais il nécessite des pressions très élevées.

L'extrusion à travers des membranes poreuses calibrées (8), (9), (10), (94) permet d'obtenir les mêmes vésicules avec des pressions cent fois plus faibles. La suspension de départ, obtenue après une courte sonication, quelques cycles de chauffage/congélation, ou encore la technique d'évaporation en phase inverse (95) contient de grosses vésicules multilamellaires (des oignons) de taille micrométrique et polydisperses. Cette suspension est placée dans un compartiment cylindrique sur deux membranes « Nucléopore » superposées, et poussée par pression d'azote à travers ces filtres.

Figure 2-6: a) Distribution de taille déterminée par microscopie électronique de vésicules PG/PC (1 : 4) préparées par la technique d'évaporation de phase inversée, et après une extrusion successive à travers des membranes de polycarbonate de différents diamètres : A : non extrudées ; B : 200nm ; C : 100nm ; D : 80nm. (8). b) Cliché de microscopie électronique, par cryo fracture de vésicules de lécithine après 20 extrusions à travers des membranes de polycarbonate. A : 400nm ; B : 200nm ; C : 100nm ; D : 50nm ; E : 30nm (10), barre=150nm.



Après quelques extrusions successives, la lamellarité et la taille des oignons initiaux sont considérablement réduits. Le diamètre moyen des pores fixe approximativement la taille des vésicules finales comme le montre la Figure 2-6. Pour les grosses tailles de pores (0.4 et 0.2 μm), 80% des vésicules sont unilamellaires et 20% possèdent deux bicouches ; leur diamètre moyen est inférieur à celui des pores. Pour les petits pores (0.1, 0.05 et 0.03 μm) toutes les vésicules sont unilamellaires et de diamètre moyen est supérieur à celui des pores.

b) Etude expérimentale

Simple et rapide, moins coûteuse en énergie que la presse de French, l'extrusion à travers des membranes poreuses est très couramment utilisée. Pourtant ce procédé est très mal compris. Aucune théorie complète ne peut expliquer à ce jour la formation de vésicules par extrusion, et le rayon des vésicules finales n'est contrôlé que de manière empirique. On sait que pour diminuer le rayon des vésicules il faut diminuer celui des pores, mais bien des questions restent sans réponses. Pourquoi dans certains cas les vésicules sont-elles plus grosses que les pores, et dans d'autres cas plus petites ? Les vésicules sont-elles obtenues par fragmentation des bicouches comme dans la presse de French ? Et si oui, cette fragmentation est-elle seulement due aux contraintes de cisaillement ou bien au confinement ? Les vésicules sont-elles déformées puis fragmentées dans les pores, ou bien sont-elles fragmentées par l'écoulement élongationnel avant d'entrer dans les pores ?

Pour mieux comprendre les mécanismes impliqués dans l'extrusion, B. Frisken et col. (11), (12) ont étudié l'influence des paramètres de l'extrusion (pression, débit) et de la nature des lipides sur la distribution en taille des vésicules finales. Ils ont trouvé que la taille des vésicules diminue lorsque la pression augmente (Figure 2-7 a)) et qu'elle est indépendante du débit. La polydispersité des vésicules diminue avec le nombre d'extrusions et avec le diamètre des pores. Le résultat le plus original a été mis en évidence grâce à des mesures du débit pour des pressions d'extrusion données. L'extrapolation des courbes débit-pression à débit nul donne la valeur d'une pression minimale d'extrusion (Figure 2-7 b)). Cette pression minimale est associée à la tension de lyse des membranes lipidiques. Ainsi ces mesures hydrodynamiques assez simples, réalisées sur une suspension de sphérulites faciles à préparer pourrait être une nouvelle méthode de mesure de la tension de lyse de bicouche lipidique.

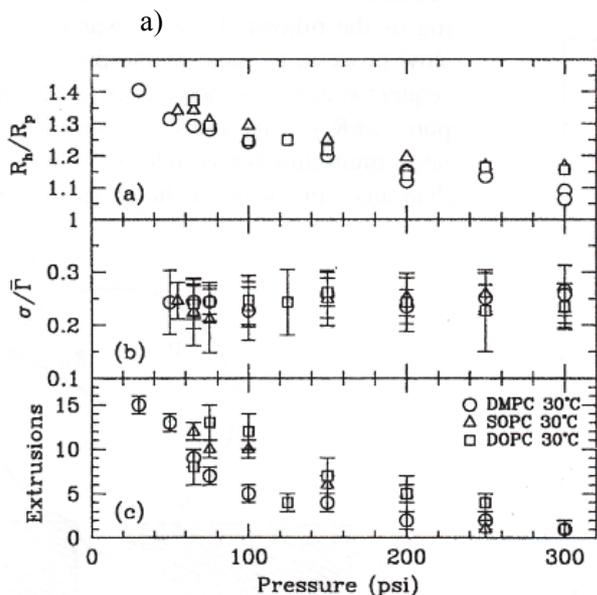
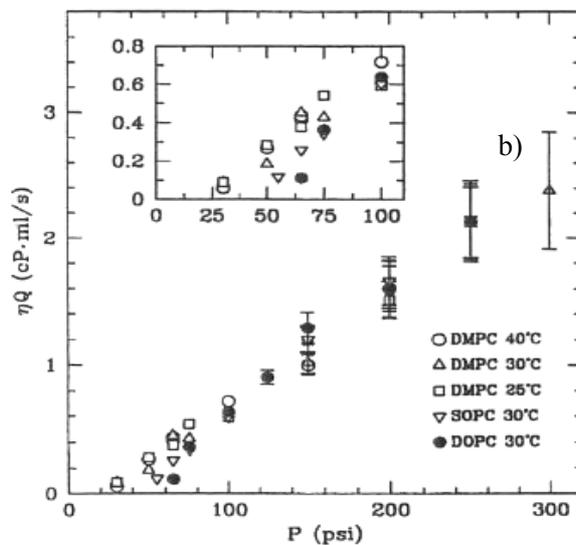


Figure 2-7: b) Courbes débit-pression pour des extrusions de suspensions de lipides de natures différentes à travers des pores de rayon $R_p=50\text{nm}$ (11)

Figure 2-7: a) Figure extrait de (11), montrant en particulier la diminution du rayon hydrodynamique des vésicules en sortie de pore R_h en fonction de la pression d'extrusion.



2.5.2 Etudes théoriques du passage d'une vésicule dans un pore

A ce jour aucun calcul ne permet de décrire complètement l'extrusion d'une suspension de vésicules à travers une membrane poreuse. Il existe cependant quelques théories modélisant certaines étapes du passage d'une vésicule dans un pore étroit. Nous présentons ici quelques unes de ces théories qui nous permettront de discuter et d'interpréter certains résultats du chapitre 4.

Nous commençons par un raisonnement très simple sur la déformation éventuelle des vésicules avant le pore par l'écoulement élongationnel. L'entrée de la vésicule dans le pore en régime statique, soit par courbure soit par rupture de la bicouche, est ensuite abordée. Enfin nous présentons le transport et les transitions de formes des vésicules à l'intérieur du pore, sujet le plus souvent traité par les théoriciens, avant de finir sur l'hypothèse d'une rupture des vésicules dans le pore initiée par des instabilités de Rayleigh.

a) Déformation avant le pore

Avant d'entrer dans le pore, la vésicule est soumise à un écoulement élongationnel caractérisé par un taux de cisaillement $\dot{\gamma}$. Nous nous proposons ici de faire une analogie avec la déformation des polymères dans un écoulement similaire. Nous avons vu au Chapitre 2.3.2 b) qu'un polymère flexible se déforme jusqu'à ce que sa taille transversale soit inférieure au diamètre du pore lorsque le taux de cisaillement est supérieur à l'inverse de son temps de relaxation (15) $\dot{\gamma}\tau > 1$. On peut supposer que la vésicule subisse une déformation équivalente dès que le taux de cisaillement devient supérieur à son propre temps de relaxation. A faible déformation, les effets de courbure sont prédominants, et le temps de relaxation dépend donc du module de courbure $\frac{1}{\tau} = \frac{\kappa_c}{\eta R^3}$. On peut donc en déduire que pour un rayon typiquement de 100nm, un taux de cisaillement de l'ordre de 10^5 s^{-1} est nécessaire pour déformer la vésicule. Or nous avons vu que les taux de cisaillement engendrés pendant l'extrusion d'une solution aqueuse pouvaient atteindre de telles valeurs (chap 2.1.2).

Mais même si le taux de cisaillement est suffisant pour déformer la vésicule, celle-ci doit disposer d'un temps suffisant pour diminuer son rayon transversal R_{\perp} à la taille du pore. Ce temps est limité par la diffusion de l'eau à travers la bicouche. Prenons l'exemple d'une vésicule de 100nm de rayon qui doit rentrer dans un pore de rayon 50nm. La surface des bicouches lipidiques étant très peu extensible, la vésicule se déforme à surface constante en évacuant de l'eau à l'extérieur. Le passage de l'eau à travers la bicouche est limité par son facteur de perméabilité à l'eau : $P = 10^{-3} \text{ cm/s}$. On en déduit que le temps minimal pour que le volume interne de la vésicule diminue de celui d'une sphère de rayon 100nm à celui d'un sphérocyindre de rayon 50nm et de longueur 300nm (déduite de la conservation de surface), est de 1ms. Ce temps est très supérieur au temps caractéristique de l'écoulement, de l'ordre de $1/\dot{\gamma} = 0.01 \text{ ms}$. Pour que la diminution de volume se fasse en 0.01ms, il faudrait que la perméabilité de sa bicouche à l'eau soit égale à 0.1 cm/s. Nous avons vu que la perméabilité d'une bicouche à un solvant peut être augmentée par l'action d'une tension de surface qui entraînerait la formation de pores transitoires. Mais en se référant aux prédictions théoriques de C. Taupin (Eq 2-20), la tension nécessaire à un tel accroissement de perméabilité serait de 1 N.m^{-1} , ce qui est très supérieur à la tension due à la contrainte visqueuse : $R\eta\dot{\gamma} \approx 10^{-5} \text{ N.m}^{-1}$.

En conclusion les ordres de grandeur semblent montrer que l'écoulement élongationnel seul ne permet pas de déformer suffisamment les vésicules lipidiques avant l'entrée des pores. Lorsqu'une vésicule arrive à l'entrée d'un pore étroit son diamètre est toujours supérieur à celui du pore. Elle y est alors bloquée pendant un certain temps, à l'issue duquel elle doit soit se déformer, soit se casser pour pénétrer dans le pore. C'est ce que nous allons aborder dans la suite.

b) Effets d'entrée

Nous considérons maintenant le cas où la vésicule est proche du pore étroit. Pour pouvoir se déformer et entrer dans le pore, la vésicule doit y être entraînée par un champ extérieur qui dépend de la rigidité de courbure et de la surface initiale de la vésicule ainsi que du rayon du pore (62). Pour une vésicule donnée, les calculs analytiques de Gompper et Kroll montrent que cette force externe est proportionnelle à $\kappa_c/R_p^{3.1}$, alors que les simulations de Monte Carlo donnent un comportement en $\kappa_c^{0.2}/R_p^{4.8}$. Ces simulations permettent aussi de représenter graphiquement la pénétration de la vésicule dans le pore lorsque le champ de forces est suffisant (Figure 2.8).

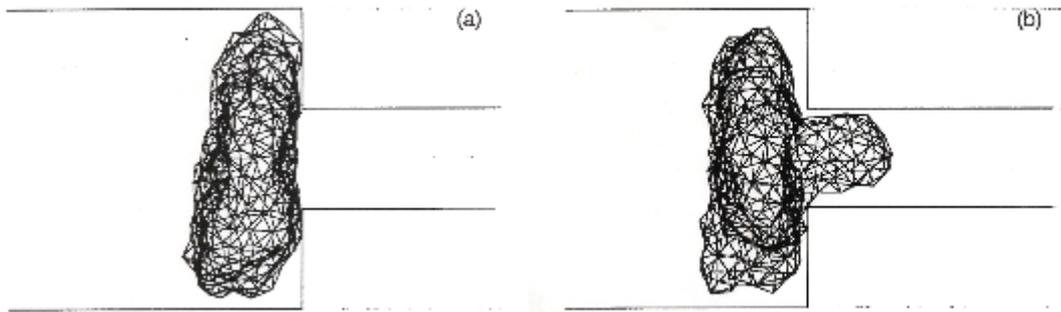


Figure 2-8 : Simulation d'une vésicule entraînée dans un pore étroit.

Les résultats analytiques de Gompper et Kroll confirment les calculs d'Evans (60). D'après ses travaux théoriques, une vésicule géante courbe sa bicouche pour entrer partiellement dans l'orifice de la micro-pipette lorsque la pression d'aspiration ΔP devient supérieure à une pression dite de courbure ΔP_c et proportionnelle à κ_c/R_p^3 :

$$\text{Eq 2-24} \quad \Delta P_c = F \frac{\kappa_c}{R_p^3}.$$

Le facteur de proportionnalité F varie entre 8 et plus de 135 en fonction du rapport du rayon de la vésicule sur le rayon du pore. Pour ces valeurs de F , en prenant $\kappa_c = 10^{-19}$ J, et un rayon de pore de 50nm la pression de courbure varie entre 0.1 et 1 bar environ.

Une autre possibilité est la rupture de la bicouche. Si la vésicule est rompue, elle devient alors un objet purement bidimensionnelle et peut rentrer instantanément dans le pore. Nous avons vu que pour casser sa bicouche, la vésicule doit être soumise à une tension dite de lyse σ_L environ égale à 5mN/m.

D'après la loi de Laplace on en déduit la pression minimale qu'il faut appliquer à l'entrée du pore, la pression de rupture :

Eq 2-25
$$\Delta P_r = 2 \frac{\sigma_L}{R_p}$$

Pour un rayon de pore de 50nm et une tension de lyse de 5mN/m la pression de rupture est égale à 2 bar.

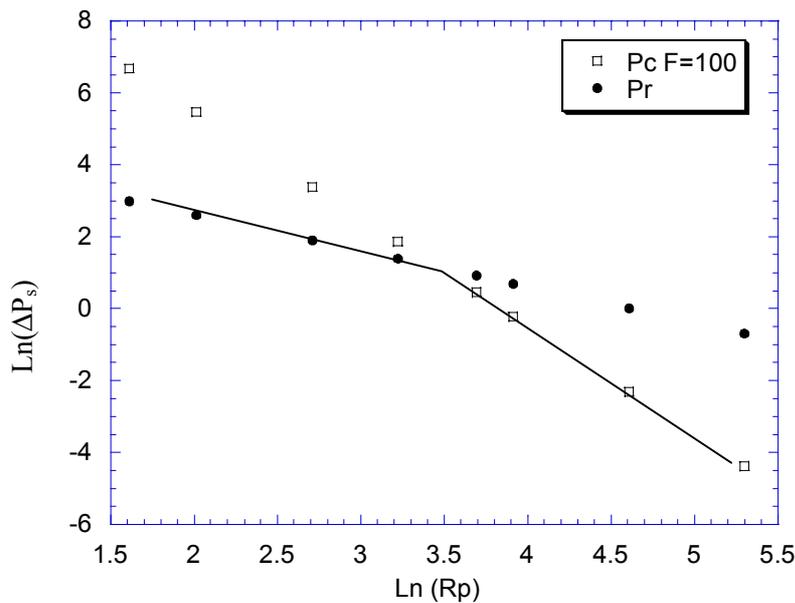


Figure 2-9 : Logarithme de la pression d'entrée de la vésicule en fonction de Ln(R_p).

Lorsqu'une vésicule est aspirée (ou poussée) vers un pore étroit, la probabilité qu'a la vésicule de rompre ou de courber sa bicouche pour rentrer dans le pore est déterminée par le rapport $\Delta P_r / \Delta P_c$. Sur la Figure 2-9 nous avons représenté la pression de courbure ΔP_c pour un facteur multiplicatif égal à 100, et la pression de rupture ΔP_r pour une tension de lyse égale à 5mN/m. Lorsque la pression appliquée à l'entrée est supérieure à l'une ou l'autre de ces deux pressions seuil la vésicule rentre dans le pore. L'allure de la pression minimale à appliquer a alors l'allure de la courbe représentée par la ligne pleine.

c) Transport de la vésicule dans le pore

Les théoriciens s'intéressent depuis bientôt vingt ans à l'écoulement de globules rouges dans de pores étroits pour en tirer un modèle microscopique de la rhéologie du sang. Ainsi Secomb et col. (17) ont étudié la déformation de globules rouges dans des capillaires de quelques micromètres de

diamètre. Pour calculer les formes théoriques des cellules, ils supposent ces formes axisymétriques et ils se placent dans les conditions de lubrification (l'espace entre la membrane des cellules et les parois de capillaire est très faible). Cette théorie de lubrification est la même que celle développée par Bretherton pour étudier l'écoulement de bulles d'air dans un tube étroit (14). Ces deux suppositions fortes sont utilisées dans presque tous les modèles théoriques qui ont été développés jusqu'alors. Récemment, Quéguiner et Barthès-Biesel (16) ont calculé la forme de capsules dont la membrane est élastique ou incompressible, lorsqu'elles sont entraînées à travers un tube. Cette étude présente la particularité de donner des résultats aussi bien pour l'entrée et la sortie de la capsule dans le tube, que pour son transport à l'intérieur du pore en régime stationnaire. Les formes successives prises par une capsule élastique, pendant sa progression à travers le pore, sont représentées sur la Figure 2.10.

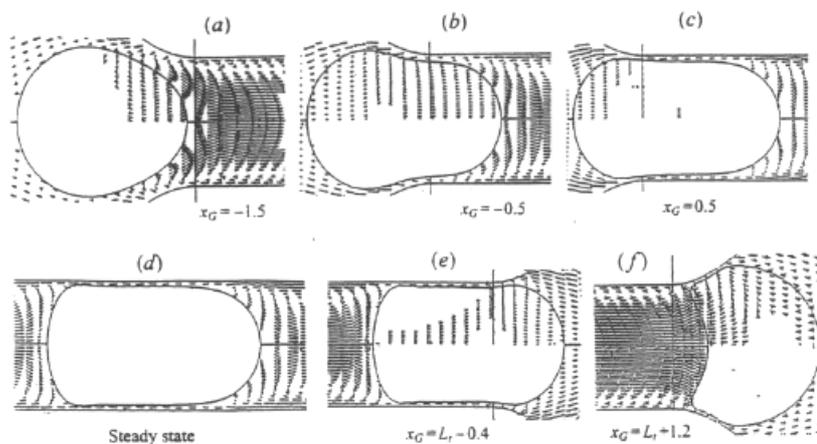


Figure 2-10 : Profils successifs d'une capsule entraînée dans un pore étroit avec les champs d'écoulement (16).

Bruinsma (13) reprend ces hypothèses de formes axisymétriques et de lubrification pour étudier l'écoulement de vésicules dans les pores. Il suppose que les vésicules sont initialement présentes dans les pores sous la forme de sphérocyindres (Figure 2-11), dont la surface est décrite mécaniquement par l'énergie de courbure d'Helfrich. Il distingue deux cas suivant que les vésicules sont initialement tendues par pression osmotique ou non. Le sphérocyindre de longueur L^* est séparé de la paroi du pore par une couche de lubrification h^* .

La vésicule est entraînée par le fluide avec une vitesse V , et cet écoulement est à l'origine d'une surpression de part et d'autre de la bicouche de la vésicule ΔP^* , répartie de façon non uniforme à la surface de la vésicule. En écrivant la conservation d'énergie entre la puissance engendrée par cette perte de charge ΔP^* le long de la vésicule, et l'énergie dissipée dans la couche de lubrification, Bruinsma trouve une relation entre ΔP^* , V , et les deux inconnues L^* et h^* . En réalité on connaît L^* si on suppose que l'épaisseur de la couche de lubrification est négligeable, L^* est alors fixé par la surface supposée constante de la vésicule. En utilisant une théorie de lubrification développée par

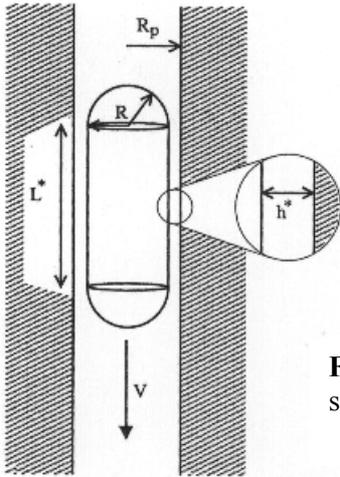


Figure 2-11 : Dimensions de la vésicules à l'intérieur du pore, déformée sous la forme d'un sphérocyindre.

Bretherton pour décrire le transport de gouttelettes dans des pores, il en déduit une relation entre ΔP^* , h^* et la tension dynamique de surface non uniforme, résultant des contraintes visqueuses développées à la surface de la vésicule, $\chi(z)$. Enfin, l'équilibre entre ces contraintes visqueuses et le gradient de pression lui permet d'éliminer $\chi(z)$ et h^* des équations. En additionnant les pertes de charge de toutes les vésicules comprises dans un pore, il en déduit la relation finale entre $\Delta P/L_p$, le gradient de pression le long du pore, V , le rayon du pore R_p , le nombre de vésicules par unité de longueur n , et L^* . La représentation graphique de cette relation, de V en fonction de ΔP , est tracée sur la Figure 2.12

On distingue deux régimes rhéologiques Aux basses pressions la vésicule bouge très lentement et la loi de Darcy n'est pas vérifiée. Au-delà d'une pression critique ΔP_c^* on entre dans le régime où la loi de Darcy est vérifiée. La perméabilité effective K_{eff} du pore pour les vésicules dépend alors de la concentration et des dimensions des vésicules dans le pore, mais est indépendante de leur rigidité de courbure. Son expression est donnée par l'Eq 2.26. Le point singulier où la pression critique ΔP_c^* est atteinte correspond au moment où la tension de la partie arrière de la vésicule devient nulle. La forme de la vésicule n'est alors plus symétrique et subit toute une succession de transitions pour évoluer vers une forme de cloche, similaire à celles reportées par la littérature pour les globules rouges (Figure 2.13). L'augmentation de la pression est responsable de la diminution du volume de la vésicule, et le volume réduit est le paramètre des transitions de forme de la vésicule comme cela est illustré sur la Figure 2.13. Cette pression critique ΔP_c^* est reliée à la pression osmotique initiale de la vésicule, ou, si

la vésicule ne contient pas de solutés, est égale à la pression de courbure $\Delta P_c = F \frac{\kappa_c}{R_p^3}$.

Eq 2-26

$$K_{eff} = \frac{n_p \pi R^2 \times \pi R_p^4}{8 + 0.233 \times (nL^*)(L^{*2} / R_p^2)}$$

$n_p \pi R^2$ est la surface efficace des pores de la membrane.

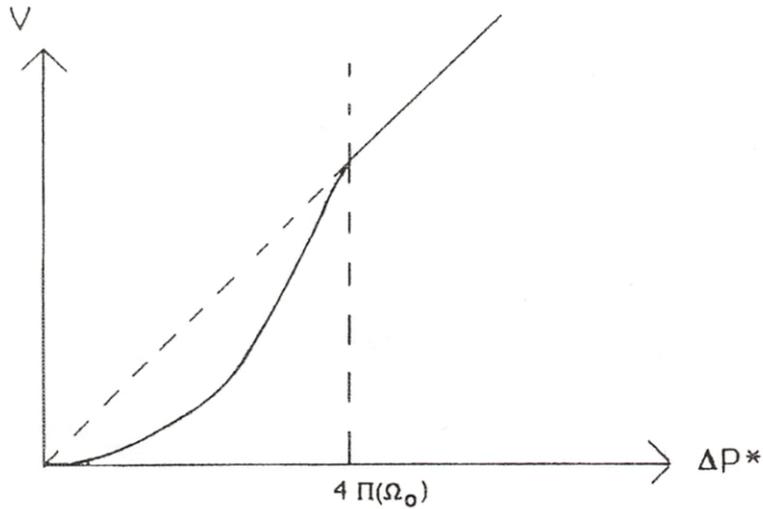


Figure 2-12 : Vitesse du fluide en fonction de la perte de charge de part et d'autre du pore.

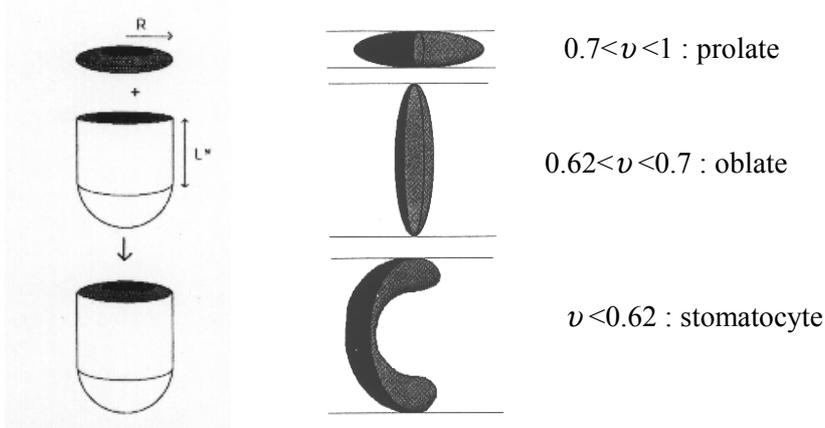


Figure 2-13: Transitions de forme de la partie arrière du sphérocyindre en fonction de son volume réduit (rapport du volume de la vésicule sur le volume d'une sphère de même surface que la vésicule) (13).

d) Instabilités hydrodynamiques

Les calculs précédents ont été faits en régime stationnaire. Les instabilités hydrodynamiques ne sont pas envisagées. Pourtant des vésicules géantes étirées sous la forme de tubules très longs sont

facilement déstabilisées. L'application de faibles déformations induites par une pince optique suffisent à créer une instabilité péristaltique (96), (97) : les fluctuations de la membrane disparaissent et des gouttelettes se forment et se propagent le long du tube. Dans le cas des émulsions, ces instabilités sont bien connues sous le nom d'instabilités de Rayleigh. Elles ont pour origine la tension de surface. En effet pour un cylindre de rayon r , ces perturbations oscillantes de longueur d'onde $2\pi r$, minimisent la surface tout en conservant le volume du cylindre. Pour une vésicule beaucoup plus grande que le rayon du pore $R \gg R_p$, on peut supposer qu'elle prendra dans le pore la forme d'un sphéro-cylindre très long et de rayon r , proche de R_p d'après la théorie de lubrification (13). La contrainte visqueuse le long de la membrane tubulaire est prédominante et introduit une tension de surface dynamique. L'apparition d'instabilités est donc théoriquement possible. Ces instabilités pourraient être à l'origine de la rupture des membranes en vésicules de taille comparable à celle du pore (98). Le rapport du rayon de la nouvelle sphère par rapport à r est égal à 1.77 si il y a conservation de surface, ou à 1.68 si le volume reste constant. Ce rapport est à peu près vérifié pour les rayons de pore inférieurs à 50nm, mais pour $R_p > 50\text{nm}$, on mesure un rayon final des vésicules plus petit que celui du pore.

3 Chapitre 3 : Procédés et systèmes

3 CHAPITRE 3 : PROCÉDES ET SYSTÈMES 45

3.1 CARACTERISATION DE L'ÉCOULEMENT D'UN FLUIDE LORSQU'IL EST EXTRUDÉ À TRAVERS UN MILIEU POREUX CALIBRE.	49
3.1.1 MESURE DE PERMEABILITÉ D'UNE MEMBRANE. COURBES DÉBIT-PRESSION	49
3.1.2 PROBLÈMES ET AMÉLIORATIONS DU MONTAGE	52
a) Du pousse-seringue à la pompe de chromatographie	52
b) Comparaison des deux porte-filtres Avestin/Millipore	54
c) Bulles d'air	56
d) Bouchage des pores	56
3.2 LES MEMBRANES	57
3.2.1 DESCRIPTION	57
3.2.2 CARACTERISATION	58
a) Dimension et densité des pores	58
b) Mesure de la perméabilité de la membrane à l'eau	61
3.3 LES VÉSICULES	62
3.3.1 DESCRIPTION ET PRÉPARATION	63
a) Vésicules lipidiques	63
b) Les vésicules de tensioactifs	64
3.3.2 DÉTERMINATION DE LA STRUCTURE	65
a) Diffusion de neutrons aux petits angles	66
b) Diffusion de lumière	68
3.3.3 CARACTERISATION DES VÉSICULES INITIALES	70
a) Les vésicules lipidiques	70
b) Les vésicules de tensioactifs	73

Les systèmes que nous avons étudiés sont des suspensions aqueuses de vésicules sub-micrométriques et unilamellaires, dont la bicouche est constituée de lipides ou de tensioactifs. Les vésicules de lipides sont préparées par extrusion à travers des membranes calibrées, aussi nous commencerons ce chapitre en présentant ce procédé et ses dispositifs. Nous expliquerons en particulier comment nous avons utilisé cette méthode de préparation pour caractériser l'écoulement de suspensions vésiculaires en milieu confiné, par des mesures de pression et de débit. Les membranes Nucléopore, les matériaux principaux de l'extrusion, seront ensuite décrites, et nous terminerons sur la présentation des vésicules ainsi que les techniques qui permettent de déterminer leur structure.

3.1 Caractérisation de l'écoulement d'un fluide lorsqu'il est extrudé à travers un milieu poreux calibré.

L'étude de l'écoulement des suspensions de vésicules par des mesures de pression à débit imposé sera l'objet du Chapitre 4. Après une brève présentation générale de la technique, nous décrivons les différents montages que nous avons utilisés, leurs faiblesses et leurs avantages, ainsi que les améliorations qui leur ont été apportées.

3.1.1 Mesure de perméabilité d'une membrane. Courbes débit-pression

Pour caractériser l'écoulement de MLV à travers des pores calibrés, Frisken et col. utilisent le dispositif d'extrusion le plus couramment employé pour la préparation de LUV (8), (9), (10). La suspension est placée dans un dispositif d'extrusion de marque Lipex (Figure 3-1), thermostaté à la température désirée. Elle est poussée à travers deux membranes Nucléopore superposées, par pression d'azote. Les courbes expérimentales représentent le débit de la suspension lipidique (Figure 2-7 b)), mesuré à la sortie avec une caméra et un bécher gradué, en fonction de la pression contrôlée grâce à un manomètre. Le manomètre détermine la gamme de pression accessible – ici 21 bars – et la sensibilité – environ 0,5 bars. La méthode de mesure du débit ne permet qu'une mesure statique. Il faut attendre un certain temps pour que le débit se stabilise, et il n'y a pas de mesure correspondant à ce régime transitoire.

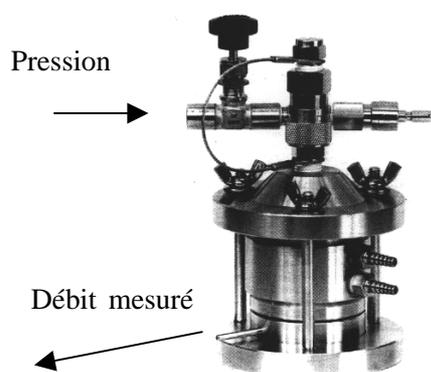


Figure 3-1 : Extrudeur Lipex Biomembranes

Pour l'étude de l'écoulement d'une phase éponge de tensioactifs à travers des membranes calibrées, constituées d'un mélange d'ester de cellulose, Vinches et col (45) ont eux aussi choisi d'appliquer une pression et de mesurer le débit dans une gamme beaucoup plus faible. Les pressions ne dépassent pas quelques pascal, et les débits, obtenus par la mesure du temps d'écoulement d'un volume donné, sont de l'ordre de quelques $\mu\text{L/s}$. Là aussi les courbes débit-pression comptent une dizaine de points.

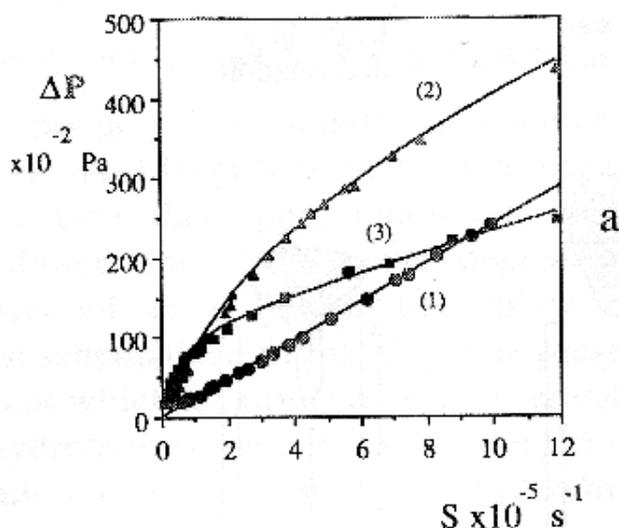


Figure 3-2: Pression en fonction du taux de cisaillement pendant l'écoulement d'une phase éponge à travers une membrane poreuse dont les rayons de pores sont de l'ordre de 300nm.

Pour obtenir des courbes plus précises, nous avons choisi de mesurer la pression et d'imposer le débit. La précision est apportée par le capteur de pression. Notre choix s'est porté sur quatre capteurs Entran en acier inoxydable et donc utilisables dans l'eau, sensibles à 0.01-0.05bar près, et miniaturisés de façon à générer un très faible volume mort. La gamme de pression est limitée par le choix du capteur parmi les quatre dont nous disposons : 0.7 bar, 7 bar, 15 bar, 35 bar. Dans cette gamme de pression, nous pouvons utiliser une seule membrane, au lieu de deux membranes superposées, car elles résistent à des pressions de 100 bar. En ce qui concerne le contrôle du débit, l'appareil répondant à nos exigences doit pouvoir imposer des débits dans une gamme assez large (sur trois ordres de grandeur au moins), mais aussi des rampes de débits, et doit supporter des pressions de 35bar au minimum. Notre choix s'est porté successivement sur un pousse-seringue de marque KdScientific, capable de supporter une force de 20kg, et sur une pompe Shimadzu. Ces deux appareils disposent de programmation de rampes de débits. La Figure 3-3 nous montre comment ce type d'appareillage permet d'obtenir des courbes très précises.

Les précédentes expériences de filtration de polymères à travers des membranes poreuses calibrées ont mis en évidence deux types de problèmes importants. Le premier est le bouchage des pores par des poussières, et le deuxième est la présence d'une couche de polarisation en amont de la membrane qui augmente considérablement la résistance à l'écoulement. D'ailleurs au cours de sa thèse, G. Guillot (27) a soulevé le problème posé par la couche d'accumulation en amont de la membrane sur

l'interprétation du taux de réjection σ . On peut éviter ce dernier problème en agitant la solution en amont de la membrane, mais alors les solutés sont soumis à deux écoulements contradictoires, l'un de convection rejetant les particules en amont, et l'autre d'entraînement les poussant à travers les pores. Une autre méthode appelée méthode de filtration bouchon sans agitation, consiste à déplacer un volume de solution par du solvant pur, en amont de la membrane. Dans notre cas les montages ne nous permettent pas d'agiter la solution en amont. La méthode de filtration bouchon était possible en utilisant la boucle d'injection sur la pompe de chromatographie (3.1.2 a)) mais nous n'avons pas disposé de temps suffisant pour réaliser ces expériences. Dans toutes les expériences d'extrusion que nous avons réalisées la suspension de vésicules (de concentration fixée) est entraînée à travers les pores continûment à un débit constant, ou variant de 0 à une valeur maximale en mL/mn en un temps donnée. Nous verrons qu'avec ce systèmes le bouchage des pores pose de gros problèmes, en particulier pour les vésicules de lipides (Chapitre 4.4.3).

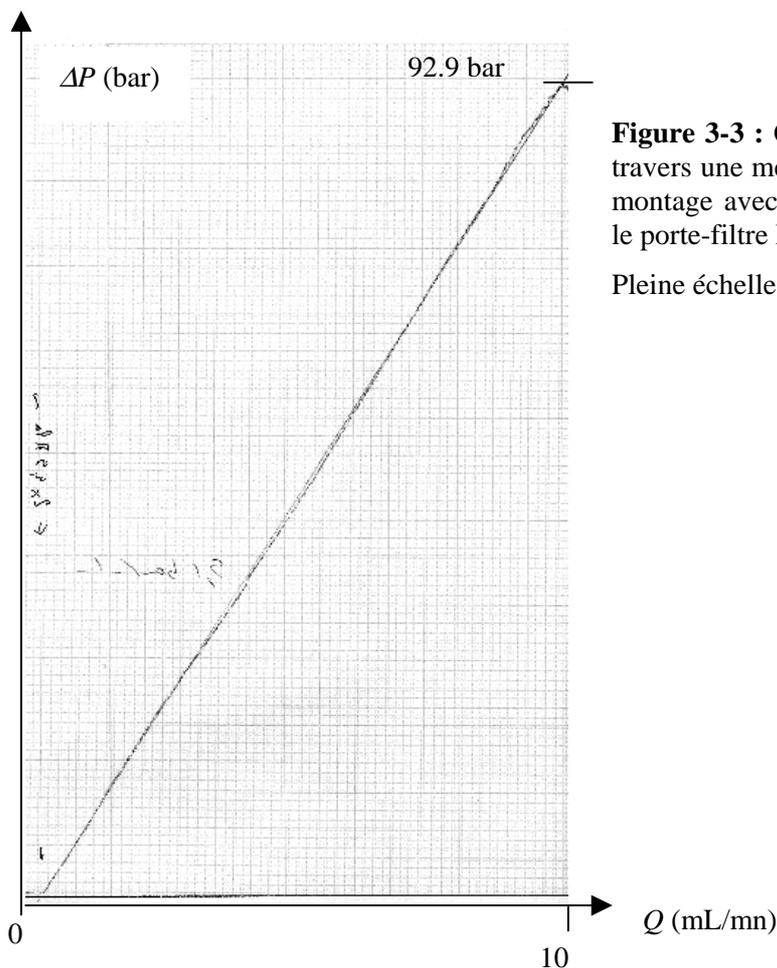


Figure 3-3 : Courbe de perméabilité de l'eau, à travers une membrane de diamètre 30nm pour le montage avec la pompe de chromatographie, et le porte-filtre Millipore.

Pleine échelle : 96.7 bar

Au cours de la thèse, les différents montages ont été constamment modifiés et améliorés. Très tôt les connections initialement en téflon ont dû être remplacées par des connections Swagelock en acier inoxydable afin d'éviter les fuites. Les premières seringues utilisées étaient des seringues en verre

Hamilton qui ne résistaient pas longtemps aux forces développées par le pousse-seringue sur le piston, et de nombreux spécimen ont été ainsi sacrifiés. Elles ont été remplacées par une seringue de 8mL en acier. Les autres améliorations, et les étapes principales de l'évolution du montage sont présentées dans le chapitre suivant.

3.1.2 Problèmes et améliorations du montage

a) Du pousse-seringue à la pompe de chromatographie

Le pousse-seringue

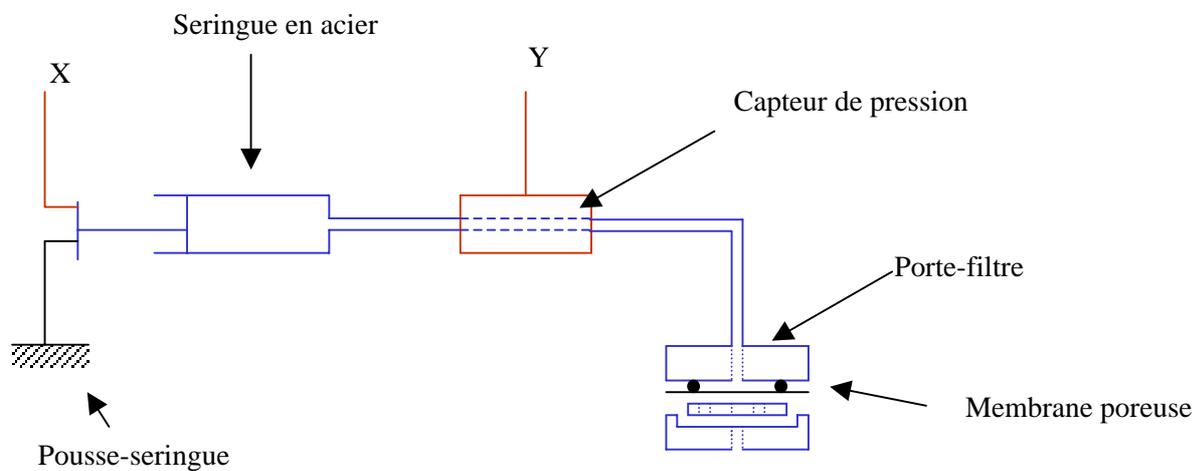


Figure 3-4 : Montage du pousse-seringue.

La solution à extruder est placée dans une seringue en acier d'une contenance de 8mL. Le piston de la seringue est actionné par le pousse-seringue KDScientific. Entraînée par le piston, la solution est acheminée par un tube en acier à travers la membrane Nucléopore, supportée par un porte-filtre de marque Avestin ou Millipore. L'étanchéité des raccordements entre les différents appareils est assurée grâce aux raccords Swagelock. Un capteur de position Monitran Ltd est relié à la voie X du convertisseur analogique-numérique (CAN) Pico ADC212. Il mesure la position du piston à chaque instant, on peut donc facilement en déduire la valeur du débit délivré par le pousse-seringue. On peut ainsi remarquer que le débit mesuré est un peu bruité par rapport au débit théoriquement programmé par le pousse-seringue (Figure 3-5). Le bruit peut venir du moteur pas à pas du pousse-seringue ou du capteur de position. On remarque aussi un léger retard du moteur dans les trente premières secondes. Le capteur de pression Entran donne la perte de charge en amont du filtre et est relié à la voie Y. Le

logiciel Pico® Technology Ltd permet ainsi l'enregistrement simultané de la position du piston et de la pression en amont du filtre, à chaque instant.

Toutefois ce montage montre des limites. Pas assez puissant, le pousse-seringue ne supporte pas des pressions de plus de 20 bars. A cause du moteur pas à pas, on ne peut imposer des rampes de vitesses continues en-dessous de 0,05ml/mn. Un autre problème majeur réside dans l'empoussiérage très rapide des solutions aqueuses, ce qui provoque un bouchage important des membranes. En effet le montage est en circuit ouvert, et chaque fois que la seringue doit être remplie il faut ouvrir le flacon qui contient la solution. Même en travaillant avec de l'eau initialement filtrée les solutions sont très vite contaminées par la poussière.

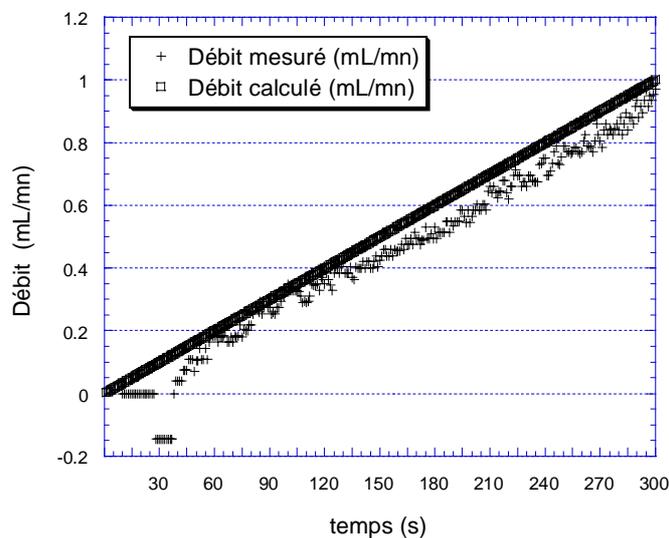


Figure 3-5 : Débit calculé, et mesuré grâce au capteur de position, en fonction du temps.

La pompe de chromatographie

Une pompe de chromatographie est apparue comme la solution idéale puisqu'elle permet de faire circuler des solutions en circuit fermé et évite ainsi leur empoussiérage. Elle peut supporter des pressions jusqu'à 400 bars, avec capteur de pression intégré, et la limite maximale en débit est de 10ml/mn. Elle est utilisée comme une pompe de chromatographie standard ; le support de filtre Millipore remplace simplement la colonne habituelle. On peut injecter 1mL de suspension de vésicules dans le solvant (l'eau) grâce à une boucle d'injection ou bien faire circuler cette suspension continûment, à partir d'un réservoir relié à la pompe par un tuyau. La boucle d'injection n'a été livrée qu'après la pompe, et n'a fait l'objet que de quelques expériences. Pour éliminer totalement les problèmes d'empoussiérage, le préfiltre présent en sortie de pompe doit être nettoyé régulièrement avec une solution de méthanol/isopropanol. La pompe permet en outre de disposer en permanence d'une eau

filtrée avec la taille de pore désirée. En effet, lorsqu'elle n'est pas utilisée pour des expériences d'extrusion, on fait circuler continuellement de l'eau à travers une membrane poreuse.

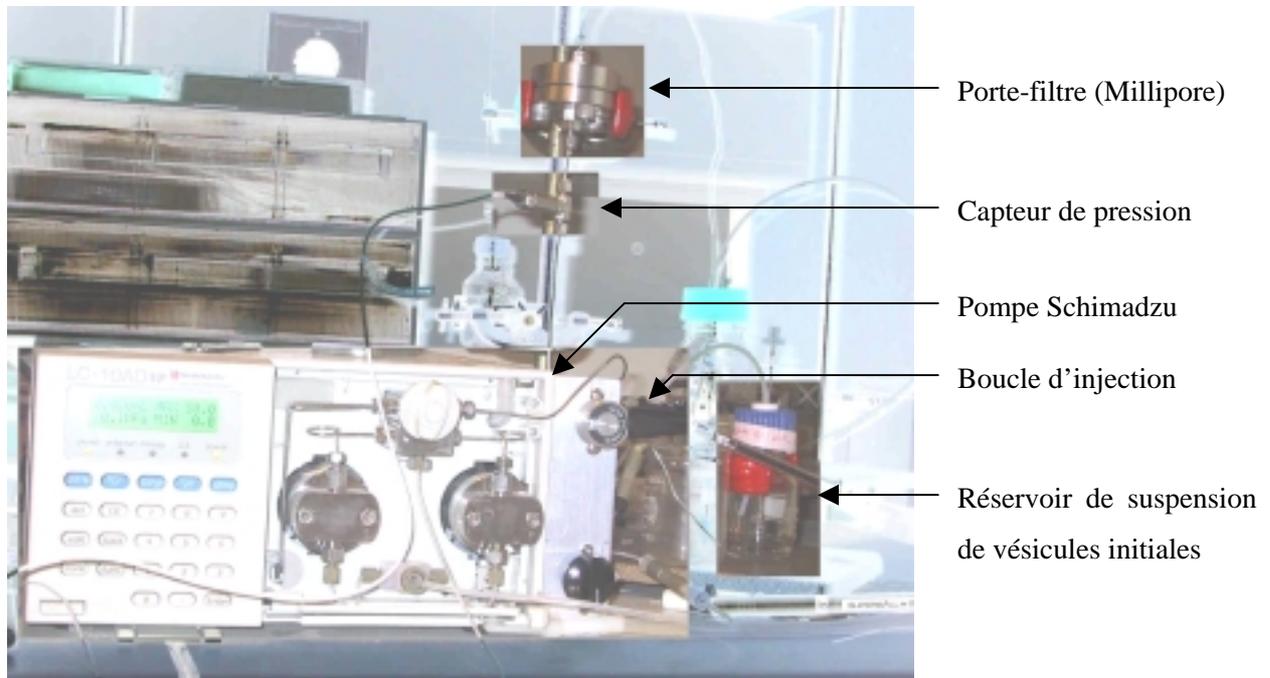


Figure 3-6 : Montage avec la pompe de chromatographie.

b) Comparaison des deux porte-filtres Avestin/Millipore

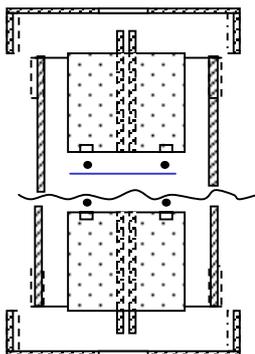


Figure 3-7 : Dispositif Avestin

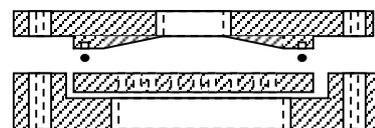


Figure 3-8 : Dispositif Millipore

Remarque : Les parties hachurées sont en acier inoxydable, les parties en pointillées sont en plastique.

Les deux porte-filtres Avestin et Millipore, diffèrent par leur principe de maintien de la membrane, ainsi que par le matériau des supports de membrane. Dans le cas du dispositif Avestin, la membrane

poreuse est maintenue entre deux joints toriques en caoutchouc, eux-mêmes encastrés dans deux supports cylindriques en plastique. Maintenu seulement le long d'une ligne circulaire, la membrane de polycarbonate très fine (épaisseur de 6 à 11 μ m) peut facilement se déformer sous la pression. Le fluide est amené en amont de la membrane, et évacué en aval, par un tuyau de circulation central de très faible section (0.2mm de diamètre). Par conséquent le flux est réparti de manière très inhomogène à la surface de la membrane ; en effet, après extrusion, la pression du fluide laisse une marque circulaire de même section que le tuyau central sur la membrane. En présence d'une membrane Nucléopore, la courbe débit-pression présentée sur la Figure 3-9 b), n'est pas du tout droite pour le dispositif Avestin, par rapport à la courbe sans membrane (Figure 3-9 a)). Les causes de cette non linéarité peuvent être la modification des lignes de courant en fonction de la pression, ou bien la déformation de la membrane. Quoiqu'il en soit, elle est très gênante pour l'interprétation des résultats. Pour cette raison, nous avons remplacé le dispositif Avestin par le dispositif Millipore dès que cela a été possible.

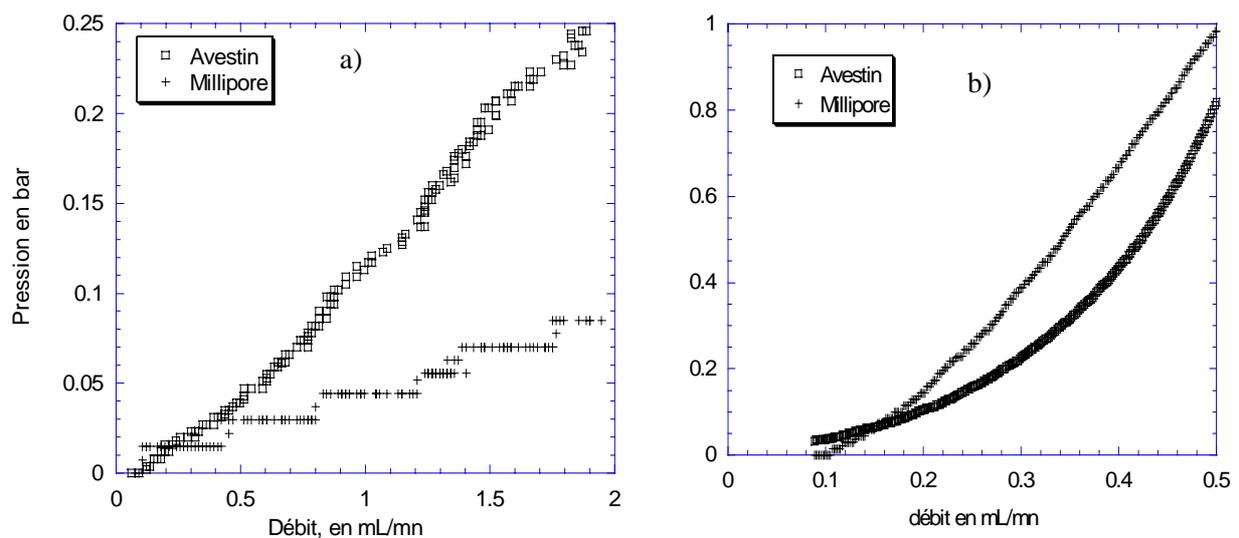


Figure 3-9 : Mesure de perméabilité avec les dispositifs Avestin et Millipore, a) sans membrane, b) avec une membrane de $R_p=50$ nm.

Le dispositif Millipore (Figure 3-8), quant à lui est entièrement constitué en acier. Le fluide est acheminé vers la membrane par un conduit beaucoup plus large que pour le dispositif Avestin. On observe ainsi sur la Figure 3-9 a) que, sans membrane, la pression en amont du porte filtre est tellement faible qu'elle atteint la limite de précision du capteur Entran. La membrane est plaquée par un joint torique en caoutchouc contre une grille en acier épaisse et amovible. Celle-ci est percée de petits trous de façon à uniformiser le flux. La membrane étant maintenue sur toute sa surface, elle ne peut se déformer que faiblement au niveau des petits trous de la grille. La Figure 3-9 b) ne montre

d'ailleurs aucune déformation de ce type pour Millipore, la courbe débit-pression est parfaitement droite. On retrouve la même linéarité pour des gammes de débits et de pression 100 fois plus élevés sur la Figure 3-3, avec le dispositif Millipore.

Remarque : Ces dispositifs ne permettent pas d'agiter les solutions en amont et en aval de la membrane comme cela est fait dans des expériences de filtrations antérieures (27), (43), (44). Il est certain qu'une couche d'accumulation doit se créer pendant l'extrusion. Les caractérisations nous permettrons de quantifier ces effets.

c) Bulles d'air

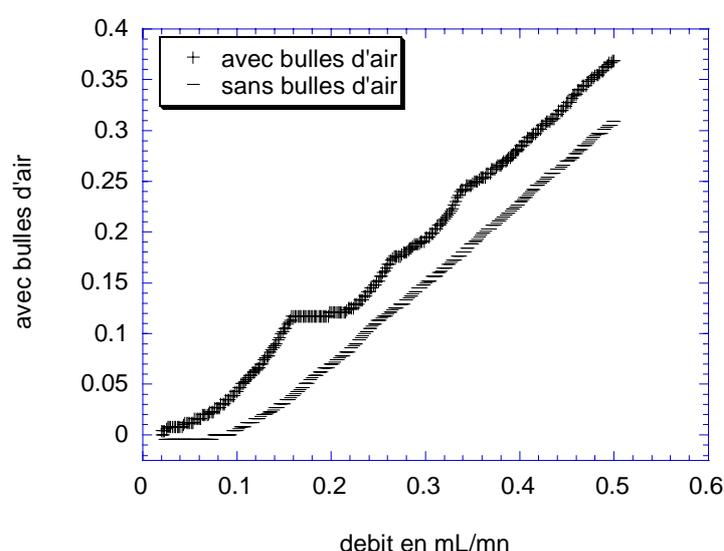


Figure 3-10 : Courbes débit-pression d'une membrane, avec ou sans bulles d'air dans le système.

Le dispositif Millipore présente quelques inconvénients, en particulier un volume mort important à proximité de la membrane, ce qui génère la présence de bulles d'air visibles sur des courbes de perméabilité, comme ici sur la Figure 3-10. Pour diminuer le volume mort, une pièce en acier s'adaptant parfaitement au volume pré-membranaire a du être fabriquée.

d) Bouchage des pores

L'un des problèmes majeurs parmi ceux que nous avons rencontré est le bouchage des membranes par les poussières, mais aussi par les lipides. En ce qui concerne les poussières, il est nécessaire de rincer toute la tuyauterie avec plusieurs dizaines de millilitres d'eau filtrée avant chaque utilisation. On a vu que l'utilisation de la pompe de chromatographie est une amélioration considérable, puisque le système est alors en circuit fermé. Un nettoyage régulier du filtre intégré dans la pompe est alors nécessaire. Le cas du bouchage des pores par les lipides, a été abordé seulement en fin de thèse (cf Chapitre 4.4.3).

3.2 Les membranes

Nous avons utilisé des membranes commerciales, dont les caractéristiques (nombre et dimensions des pores...) sont imposées et indiquées par le fournisseur. L'une de nos préoccupations a été de vérifier dans quelles mesures les dimensions indiquées étaient proches de la réalité. Après une brève présentation de leur méthode de fabrication, nous aborderons la caractérisation de ces membranes.

3.2.1 Description

Les membranes sont fabriquées suivant le procédé indiqué au chapitre 2.1. Nous avons achetés des membranes standards chez les deux principaux fabricants : Nucléopore (revendus par Whatman, Avestin, Inc. ou COSTAR®) et SPI supplies. Les distributeurs proposent des filtres de matériaux différents (polycarbonate ou polyester) dans une gamme de rayon de pore très étendue. Pour toutes les expériences que nous avons réalisées, nous avons utilisés des filtres en polycarbonate de rayon nominal 100nm, 50nm, 25nm, 15nm, 7.5nm et 5nm. En plus du diamètre des pores R_p , d'autres dimensions caractéristiques des filtres sont données par les fabricants et reportées dans le Tableau 3-1. Nous les qualifions de « nominales ». En optant pour des membranes commerciales nous perdons un grand contrôle sur leur structure, et pas uniquement sur la dimension des pores et leur densité. Généralement ces pores ne sont pas perpendiculaires à la surface, mais inclinés avec un angle aléatoire compris entre 0° et 37°. L'état de la surface n'est pas non plus maîtrisé, et dans la plupart des cas, la paroi des pores est recouverte d'une couche de PVP (Poly Vinyl Pyrrolidone) pour la rendre plus hydrophile.

Dans la suite on désignera toujours une membrane par son rayon de pores nominal : on parlera d'une **membrane R_p** .

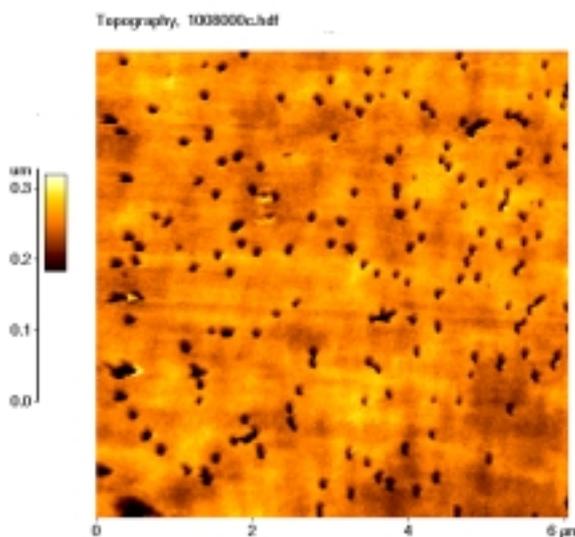


Figure 3-11 : Cliché de microscopie AFM d'une membrane 100nm.

3.2.2 Caractérisation

Toute variation du rayon moyen des pores ou de leur densité surfacique par rapport aux valeurs nominales, données par le fournisseur, la moindre dégradation de la porosité (bouchage partiel des pores par des poussières, micro-fractures...) sont autant de causes de variation de perméabilité des membranes. Pour mesurer l'écart entre la porosité réelle, et les dimensions nominales annoncées par le fabricant, certaines membranes ont fait l'objet d'une étude plus approfondie. Mais pour connaître précisément la perméabilité d'une membrane, et ainsi se faire une idée de sa porosité, la meilleure façon est de mesurer directement sa perméabilité à l'eau. Ce type de mesure, effectués systématiquement sur toutes les membranes utilisées, nous permet de vérifier la loi de Poiseuille sur une grande gamme de rayon de pore.

a) Dimension et densité des pores

Nous avons tenté de mesurer les dimensions des pores pour quelques membranes aussi précisément que possible. Ces valeurs expérimentales sont comparées aux dimension nominales sur le Tableau 3-1.

La longueur des pores

L'épaisseur des filtres a été mesurée directement grâce à un comparateur. Cet appareil permet de mesurer des épaisseurs avec une précision de 10 μ m. La mesure de l'épaisseur d'une trentaine de membranes nous donne l'épaisseur moyenne e^* d'une membrane à 3-5% près. Les valeurs obtenues sont très proches des épaisseurs nominales. Seules que les membranes SPI 100nm et SPI 40nm qui donnent une dimension un peu différente (au maximum à 10% près) de celle donnée par le fabricant.

Mesure du rayon par microscopie à force atomique.

Pour mesurer directement le rayon des pores, nous avons utilisé un microscope à force atomique. Les clichés de microscopie ont été réalisées par Patrick Guénoun et Frédéric Dubreuil, au Service de la Physique de l'Etat Condensé (CEA Saclay). Pour chaque type de membrane 2 à 4 clichés ont été pris, et les rayons d'une centaine de pores en moyenne ont été mesurés grâce à un logiciel de traitement d'image (PSI ProScan Image Processing). Ces photos nous ont permis de caractériser chaque membrane par une courbe de distribution de taille des pores, donc nous avons déduit le rayon moyen gaussien R_p^* et l'écart-type σ^* . Comme nous ne disposions pas des membranes 7.5nm et 5nm au moment de ces expériences, nous n'avons fait aucune mesure pour ces deux types de filtres. Du reste, plus les pores sont petits, et moins les mesures sont précises. La plupart des mesures de tailles de pores donne une valeur qui diffère de celle indiquée le fabricant avec une écart de 17% environ du rayon moyen (seules les membranes SPI 50nm et 15nm ont un rayon moyen R_p^* qui diffère de 26% de la

valeur nominale). En ce qui concerne la polydispersité, on peut noter que les écart-types sont généralement compris entre 15 et 25% des rayons moyens. Les membranes Nucléopore 100nm et SPI 15nm sont les seules à présenter un écart-type supérieur à 25%.

Mesure de la densité des pores.

Dans le catalogue de Corning de 1997-1998, il est précisé que les diamètres des pores sont vérifiés par microscopie électronique alors que la densité des pores ne fait pas l'objet d'une vérification, cette valeur est donnée à titre indicatif uniquement. Il semble donc particulièrement intéressant de la déterminer expérimentalement. D'après les valeurs de longueur des pores et de rayons moyens mesurés précédemment, il est facile de calculer la densité des pores d'un filtre donné si on connaît son poids. Le poids moyen de chaque filtre a été mesuré précisément, et les valeurs de densité de pores sont reportées sur le Tableau 3-1 et comparées aux densités de pores mesurées par AFM. Si les valeurs mesurées par AFM sont du même ordre que les densités nominales, pour la plupart des membranes, les valeurs obtenues par pesée sont quant à elles très supérieures aux deux autres, comme si le polycarbonate qui constitue ces membranes était anormalement léger.

Quoiqu'il en soit, même si on pouvait mesurer précisément la densité moyenne des pores, cette valeur varie au cours du temps pour une même membrane. En effet le bouchage des membranes par les poussières diminue n_p alors que la présence de défauts l'augmente. Ce qui en fait le paramètre le moins connu de ces milieux poreux.

En conclusion, bien que ces mesures peu précises aient été réalisées sur un faible nombre de membranes, elles nous donnent une idée de la largeur de distribution des dimensions des pores. De 3 à 5% d'erreur pour la longueur des pores, l'écart-type est compris entre 15% 30% pour leur rayon moyen. La densité des pores est mal connue et variable.

Diamètre Nominal (nm)	Marque	Rayon moyen mesuré R_p^*	Ecart-type σ^*	Densité de pores (10^8 pores/ cm^2) n_p			Epaisseur (μm)	
				Nominale	Mesurée par AFM	Mesurée par pesée	Nominale e	Mesurée e^*
100	SPI-Pore	96,8	17,4	3	3,19±0.25	7.3	10	9.63 ±0.5
	Nuclepore	109	32.6	3	2.22 ±0.25	6.4	10	9.12 ±0.5
50	SPI-Pore	<i>63.1</i>	11	4	4.8±0.25	18.2	6	6.05 ±0.2
	Nuclepore	45	10	3	4.88 ±0.25	8.6	6	5.95 ±0.2
40	SPI-Pore	46,6	8,0	4	6,33±0.25	24.3	6	5.6 ±0.2
	Nuclepore			6			6	
25	SPI-Pore	24.7	5.5	6	7.88 ±0.25	74.0	6	5.95 ±0.2
	Nuclepore			6		40.3	6	5.83 ±0.2
15	SPI-Pore	<i>19,6</i>	<i>4,1</i>	6	6,0±0.5		6	6.1 ±0.2
	Nuclepore			6			6	
7.5	Nuclepore			6			6	
5	SPI-Pore			6			6	

Tableau 3-1: Dimensions nominales et mesurées des pores des membranes poreuses de polycarbonate, les valeurs en italique sont éloignées de plus de 25% des valeurs nominales

b) Mesure de la perméabilité de la membrane à l'eau

En réalité, ce n'est pas très grave de ne pas connaître précisément les dimensions des pores, car ce qui nous intéresse réellement c'est la perméabilité des membranes à l'eau pure. C'est en effet cette valeur qui permet de calibrer la membrane avant d'étudier sa perméabilité à des fluides complexes comme les suspensions de vésicules. Nous verrons au Chapitre 4 comment le rapport des perméabilités à l'eau et aux suspensions vésiculaires ne dépend que de la taille des pores, indépendamment du nombre de pores, ni de leur longueur, ni de la température.

Cette grandeur est directement mesurable grâce aux mesures de pression en fonction du débit pendant l'extrusion d'eau à travers la membrane. C'est ce qui a été fait pour des dizaines de membranes au cours de cette thèse. Pour chaque membrane étudiée la relation entre la pression et le débit est linéaire, et on mesure la pente a de cette droite. Cette pente est liée à la viscosité de l'eau η , l'épaisseur de la membrane e , et la perméabilité K de la membrane à l'eau par la relation :

$$\text{Eq 3-1} \quad \Delta P = a Q = e \times \frac{\eta Q}{K}$$

Ici a est appelé le **facteur de Poiseuille**. C'est ce paramètre a que nous utiliserons, et non la perméabilité K elle-même, car il est plus simple pour l'esprit de parler de la pente d'une droite plutôt que de l'inverse de sa pente. La loi de Poiseuille permet de calculer a d'après les dimensions et le nombre des pores.

$$\text{Eq 3-2} \quad a = \frac{e \times \eta}{K} = e \times \eta \frac{8}{n_p A_{ef} \times \pi R_p^4}$$

Normalisée par la densité de pores n_p , l'épaisseur de la membrane e , la viscosité de l'eau η et la surface efficace d'extrusion A_{ef} , la nouvelle valeur ne dépend pas de la surface efficace (c'est-à-dire du type de porte-fitre), ni de l'épaisseur de la membrane (qui peut varier d'une marque à l'autre), mais uniquement du rayon moyen des pores. Nous avons tracé sur la Figure 3-12, le logarithme des valeurs expérimentales de a normalisées, en fonction du logarithme de R_p , ainsi que les valeurs théoriques équivalentes, calculées d'après les dimensions nominales des membranes. Si on paramètre la courbe expérimentale par une droite, la pente obtenue est de -2.8 , ce qui n'a ici pas de signification particulière. Mais la droite théorique de pente -4 , obtenue sans paramètres ajustables, recoupe assez bien les résultats étant donné les barres d'erreur. La concordance entre les valeurs théoriques et les valeurs expérimentales est très bonne pour les gros pores ($40\text{nm} \leq R_p \leq 100\text{nm}$), et pas très bonne pour les petits pores. Pour ces petits pores, les pressions dépassent les 30 bars pendant les mesures de perméabilité, ce qui peut les endommager (micro-fractures...), la pression de rupture pour ce type de membrane étant de l'ordre de 100 bar. Mais la raison la plus probable est la divergence des rayons réels par rapport aux rayons nominaux. Nous n'avons pas mesuré les rayons de pores directement par

AFM pour les plus petits pores ($R_p=7.5$ et 5nm) mais, déjà pour $R_p=15\text{nm}$, le rayon moyen mesuré était 30% supérieur au rayon nominal. Il est donc possible que plus les pores sont petits, et plus leur monodispersité en taille soit difficile à contrôler.

Pour chaque rayon R_p , les valeurs de a sont assez dispersées d'une membrane à l'autre. Ceci nous confirme qu'il est nécessaire de mesurer ce paramètre a pour chaque membrane afin de la caractériser précisément.

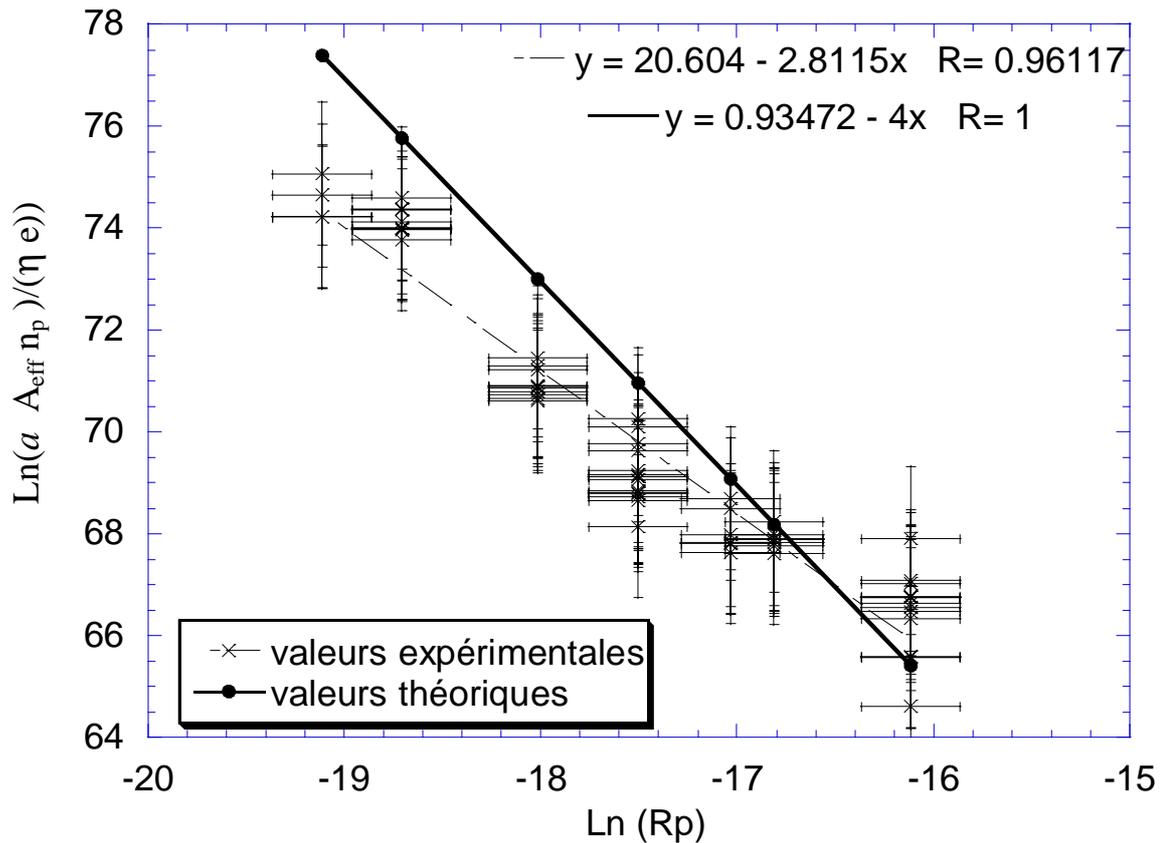


Figure 3-12: Le facteur de Poiseuille a a été mesuré pour l'extrusion de plusieurs membranes de rayon de pores différents. Les valeurs logarithmiques de a , normalisées par le nombre de pores et l'épaisseur de la membrane sont reportées en fonction de $\text{Ln}(R_p)$.

3.3 Les vésicules

Le choix des vésicules a été guidé par deux préoccupations. La première est de disposer d'une suspension homogène d'objets identiques, dont on peut facilement caractériser la structure avant et après extrusion. La deuxième est de pouvoir moduler les propriétés physiques des vésicules (module de courbure et tension de lyse...). Au vu de ce cahier des charges nous avons opté pour deux types de vésicules : d'une part les vésicules lipidiques et « rigides », et d'autre part les vésicules de tensioactifs SDS / octanol / Myrj / NaCl 0.5%/0.4%/0.4%/2%. Avec ces deux systèmes on obtient facilement des

vésicules unilamellaires et monodisperses, de taille modulable. Les vésicules de tensioactifs présentent l'avantage de se former spontanément et d'offrir une gamme de taille étendue. Les vésicules lipidiques sont aussi préparées facilement par extrusion, et ont des propriétés physiques très différentes de celles de tensioactifs (cf chapitre 2-2), ce qui promet des comparaisons de résultats riches en informations. L'utilisation de lipides de natures différentes et de l'ajout de cholestérol dans la bicouche permet une variation du module de courbure et de la tension de lyse dans une moindre mesure.

3.3.1 Description et préparation

a) Vésicules lipidiques

Les lipides qui ont été utilisés au cours de cette thèse sont en grande majorité un mélange de phosphatidylcholines extrait de l'oeuf (EPC). L'EPC est fluide à température ambiante, ce qui facilite sa manipulation. D'autres lipides purs et fluides à température ambiante ont aussi été utilisés comme la DOPC dioléyl phosphatidylcholine, et SOPC: stéaryl oléyl phosphatidylcholine). Pour augmenter le module de courbure, du cholestérol a parfois été ajouté dans la bicouche. Les vésicules ont toutes été préparées grâce au procédé d'extrusion à travers des membranes Nucléopore. Elles sont généralement unilamellaires, l'épaisseur de la bicouche est typiquement de 4 nm, et leur rayon est fixé par la taille des pores de la membrane et peut varier entre 15nm et 80nm. Les formules chimiques semi-développées des molécules qui ont été utilisées au cours de cette thèse sont indiquées en Annexe 1.

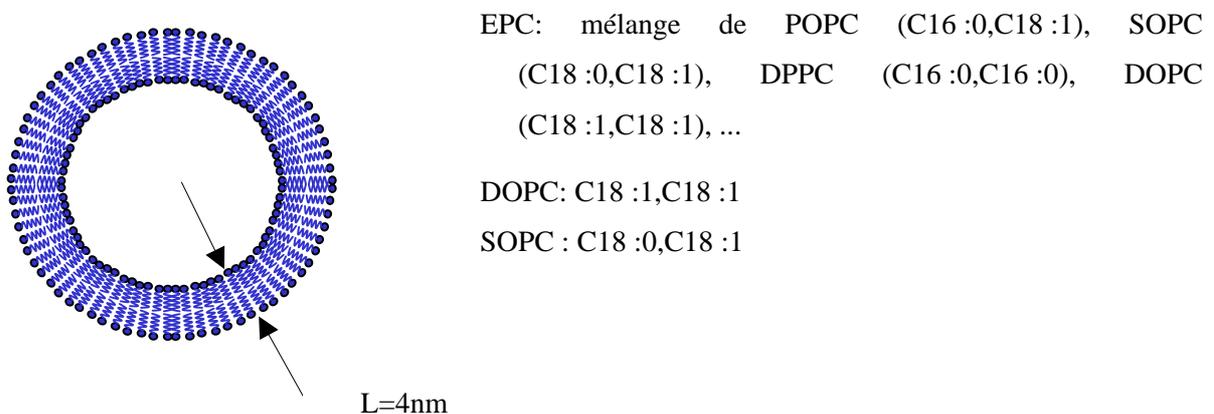


Figure 3-13 : LUV ou SUV de EPC.

Les lipides sont fournis par Sigma, en solution dans le chloroforme. Après évaporation du solvant sous flux d'azote, les lipides sont suspendus dans l'eau, avec une concentration finale de 1mg/mL (0.1% en concentration massique). Pour les vésicules avec cholestérol, cet additif est ajouté dans la solution de chloroforme à raison de 30% par rapport à la concentration lipidique. Après évaporation du

solvant, les constituants membranaires sont là aussi suspendus dans l'eau à 1mg/mL. Les échantillons sont ensuite plongés dans un bain de sonication pendant une vingtaine de minutes, avant de subir onze extrusions successives à travers une membrane R_p , à l'aide du dispositif d'extrusion manuel Liposofast Basic Avestin. Les vésicules sont finalement notées : **EPC R_p** ou **DOPC R_p** , etc... suivant la nature des lipides, et le rayon des pores qui ont servi à les préparer.



Figure 3-14 : Liposofast Basic Avestin

b) Les vésicules de tensioactifs

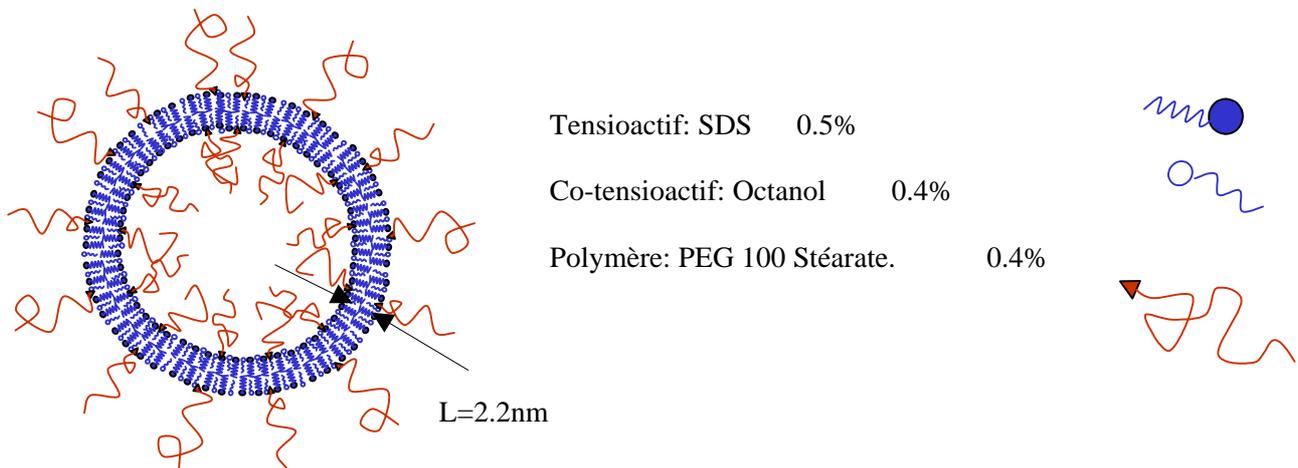


Figure 3-15 : Vésicule de composition SDS / octanol / PEG / NaCl, 0.5/0.4/0.45/2 en % massique.

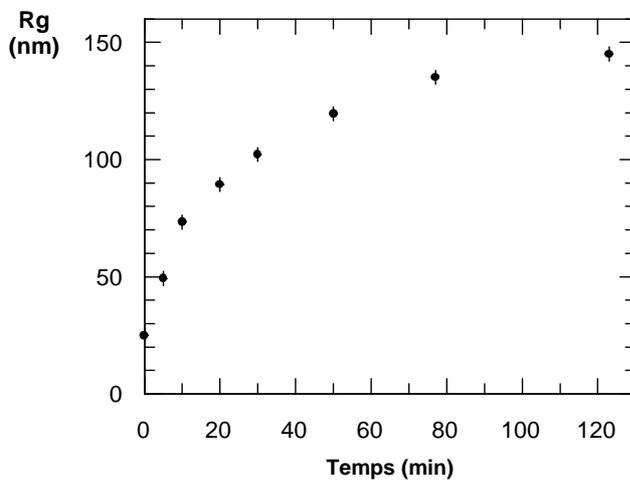


Figure 3-16 : Courbe de grossissement des vésicules par chauffage à 55°C (99) pour les systèmes SDS 0.5%/ octanol 0.4%/ Myrj 0.45% dans l'eau salée à 2%.

Les vésicules sont préparées à partir de trois constituants différents. Un tensio-actif -le sodium dodécyl sulphate (SDS)- et un cotensio-actif -l'octanol- forment la bicouche. Un copolymère dibloc – le polyéthylèneglycol 100 stéarate (Myrj 59) - se greffe sur cette surface. Les formules chimiques sont indiquées à l'Annexe 2. Pour ce système, le domaine d'existence des vésicules (L4) est représenté par une ligne sur le diagramme de phase (54). La phase de vésicules est alors à l'équilibre, mais elle est très difficile à obtenir car la moindre variation de composition de la solution fait basculer le système vers une phase de lamelles ou de sphérulites. Le greffage de copolymères dibloc à la surface des vésicules permet d'élargir ce domaine. Le rôle du polymère greffé sur la membrane est de former une barrière stérique, empêchant les vésicules de se rencontrer et de fusionner. Ainsi, avec une concentration en PEG stéarate $C_p=0.45\%$, le temps de fusion à température ambiante est de 4 mois (100). De toute évidence la taille des vésicules est manifestement une propriété cinétique du système. Ces vésicules possèdent la particularité de grossir de manière irréversible lorsqu'on les chauffe (Figure 3-16). Lorsque la température augmente, la couche de polymère se rétrécit et la barrière énergétique du mécanisme de fusion entre deux vésicules diminue. Les vésicules peuvent alors se rapprocher et fusionner. Quand le système revient brutalement à 25°C le système est de nouveau figé par la présence du polymère.

Au cours de sa thèse, Joannic a étudié tout le domaine d'existence des vésicules dans le diagramme de phase des composants. Nous nous sommes intéressés uniquement à un système particulier de composition : SDS 0.5%/ octanol 0.4%/ Myrj 0.4% dans l'eau salée à 2% ¹. A ce point du diagramme de phase le système ne contient ni micelles, ni sphérulites, mais uniquement des vésicules.

Le protocole de préparation des vésicules est le suivant : le tensioactif et le co-tensioactif sont tout d'abord mélangés avec le polymère en solution aqueuse, avec les concentrations données plus haut. Ils s'associent alors sous forme de micelles. Si des phases lamellaires se forment (solution trouble), la solution doit être vortexée ou chauffée jusqu'à ce qu'elle devienne complètement transparente. Lorsqu'on ajoute à ce premier mélange une solution aqueuse de NaCl, des vésicules unilamellaires se forment spontanément. Ces vésicules sont ensuite chauffées à 55°C pendant la durée nécessaire à l'obtention de la taille désirée (Figure 3-16).

3.3.2 Détermination de la structure

Selon les gammes de taille ciblées (quelques nm pour l'épaisseur des bicouches, ou de la dizaine à la centaine de nm pour les rayons), nous avons utilisé la diffusion statique soit de neutrons soit de lumière. La diffusion dynamique de la lumière permet de compléter ces résultats.

¹ Les concentrations sont donnés en pourcentage massique.

a) Diffusion de neutrons aux petits angles

Les expériences de diffusion de neutrons aux petits angles ont été réalisées au LLB, sur le spectromètre « PACE » en utilisant deux gammes de vecteurs de diffusion : de 0.003 à 0.03 Å⁻¹ et de 0.01 à 0.14 Å⁻¹ pour les longueurs d'onde respectives $\lambda=12$ Å et $\lambda=6$ Å. Les échantillons sont maintenus à 25°C dans des cellules en quartz de 2mm d'épaisseur. L'intensité diffusée par unité de volume est détectée par 30 anneaux de détection, correspondant chacun à un vecteur de diffusion d'après la loi de Bragg $q = 2\pi \sin \theta / \lambda$. L'intensité est normalisée à l'échelle absolue en cm⁻¹ en utilisant comme référence la diffusion cohérente de l'eau, procédure dont on ne peut attendre une meilleure précision que 10%. Les densités de longueur de diffusion des produits utilisés sont reportés dans le Tableau 3-2. Dans chaque échantillon on a utilisé des produits hydrogénés en solution dans de l'eau deutérée. Ceci permet d'obtenir un très bon contraste entre la bicouche hydrogénée et la solution deutérée, en particulier pour les vésicules lipidiques. Pour les vésicules de tensioactifs, la bicouche n'est pas le seul objet contrasté par rapport à la solution, les molécules de polymères sont aussi hydrogénées. Cependant, comme les molécules de tensioactif sont très concentrées dans la bicouche alors qu'au contraire la couche de polymères est beaucoup plus diffuse, cette dernière est quasiment invisible avec cette technique. On dit qu'on travaille en contraste « tensioactif ».

Composants	n (10 ¹⁰ cm ⁻²)
D ₂ O	6.53
SDS hydrogéné	0.566
Octanol hydrogéné	-0.31
Myrj 59	0.148
DOPC	0.717
SOPC	0.605

Tableau 3-2 : densité de longueur de diffusion des différents composants membranaires

Pour les petites vésicules dont le rayon est inférieur à 50nm, la mesure du rayon est possible avec les gammes de q utilisées. Le spectre de l'intensité diffusée par les échantillons en fonction du vecteur de diffusion, $I(q)$, est bien décrit par un modèle de coquilles sphériques sans interaction. En convoluant le facteur de forme de sphères polydisperses avec celui d'une lamelle d'épaisseur non nulle, on en déduit (99):

Eq 3-3
$$qD \ll 1: q^2 I(q) \approx A \left(1 - \frac{(qL)^2}{12} \right) \frac{\langle R^2 \sin^2(qR) \rangle_R}{\langle R^2 \rangle_R}$$

Eq 3-4
$$A/2 = 2\pi (n_{bic} - n_{D_2O})^2 \frac{\phi_{bic}^2}{S/V}$$

$A/2$ est la limite asymptotique atteinte aux grand vecteurs de diffusion dans le régime $qR \gg 1$ et $qL \ll 1$, ϕ_{bic} est la fraction volumique de bicouche, S et V sont sa surface et son volume, et n_{bic} et n_{D_2O} sont les densités de longueurs de diffusion de la bicouche et de D_2O . Dans le cas où la bicouche est constituée de tensioactifs, les paramètres de la bicouche sont moyennés sur les paramètres du SDS et de l'octanol : $\phi_{bic} = \phi_{sds} + \phi_{oc\ tan\ ol}$ et $n_{bic} = (n_{sds} \phi_{sds} + n_{oc\ tan\ ol} \phi_{oc\ tan\ ol}) / \phi_{bic}$. R est le rayon des vésicules, et L est l'épaisseur de la bicouche, les crochets $\langle \rangle_R$ désignent la moyenne prise sur la distribution de taille des vésicules. Pour la calculer on utilise la distribution normalisée de type Schultz-Flory :

Eq 3-5
$$F(R, \bar{R}, Z) = \left(\frac{Z+1}{\bar{R}} \right)^{(Z+1)} \frac{R^Z}{\Gamma(Z+1)} e^{-(Z+1)R/\bar{R}}$$

Z est un index de polydispersité relié à l'écart quadratique moyen des rayons par l'équation : $\frac{1}{Z+1} = \frac{\langle R^2 \rangle_R - \bar{R}^2}{R^2}$. Le rayon moyen $\langle R \rangle$ trouvé par le pramaéfrage d'un spectre de diffusion statique est noté R_s .

Pour l'étude de ces objets bidimensionnels, la représentation classique d'un spectre de neutrons est donc $q^2 I(q)$. Sur la Figure 3-17 l'équation théorique a été tracée pour des paramètres classiques des vésicules étudiées. Nous avons choisi une représentation logarithmique pour l'axe des abscisses, de façon à bien visualiser à la fois les oscillations aux petits vecteurs d'onde, qui correspondent au facteur de forme des sphères polydisperses (Eq 3-6) et la décroissance en $-q^2$ aux grands vecteurs d'onde (le régime de Porod).

Eq 3-6
$$P(q, \langle R \rangle) = \frac{\langle R^2 \sin^2(qR) \rangle_R}{\langle R^2 \rangle_R}$$

Un moyen très simple pour obtenir une bonne approximation du rayon moyen des vésicules est de prendre l'abscisse du maximum du pic des oscillations q_{max} . Cette abscisse correspond au maximum de la fonction $\sin(qR_{\pi/2})$. Le rayon moyen mesuré par cette méthode est noté $R_{\pi/2} = \frac{\pi}{2q_{max}}$, il est environ égal au rayon moyen des vésicules $\langle R \rangle$. Aux grands angles, le comportement asymptotique de l'intensité donne des informations sur le nombre de bicouches des vésicules et leur épaisseur.

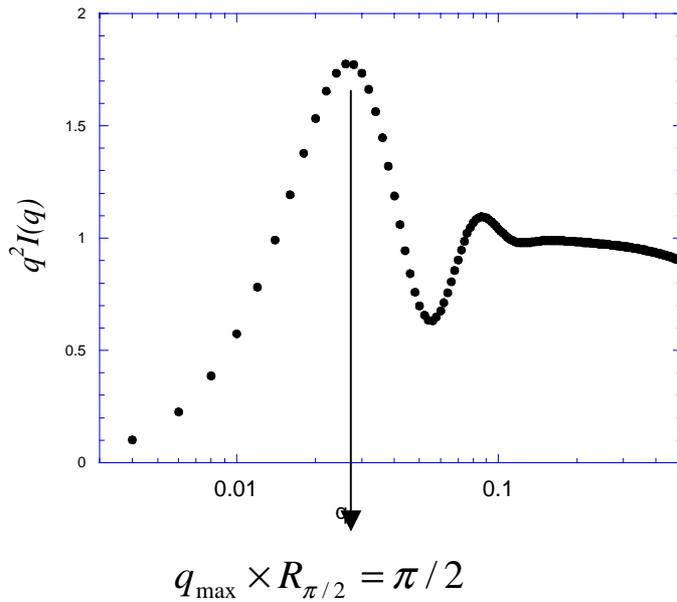


Figure 3-17 : Courbe de l'équation Eq3-4 pour les paramètres suivants : L=2.2nm, R=50nm, Z=16.

b) Diffusion de lumière

La technique de DNPA est bien adaptée à l'étude des objets dont la taille est comprise entre 10 et 300Å. Lorsque le rayon des vésicules dépasse 40nm, il faut descendre à une échelle plus petite de vecteurs d'onde en utilisant la diffusion statique de la lumière. Il ne reste plus qu'à raccorder les deux spectres de diffusion, de lumière et de neutrons, et à ajuster la courbe expérimentale ainsi obtenue à la relation (Eq 3-3) vue au chapitre précédent. Grâce à un corrélateur, la diffusion de lumière nous apporte un autre outil qu'est la diffusion dynamique de la lumière (DDL).

Les expériences de diffusion de lumière ont été effectuées au laboratoire Léon Brillouin sur le spectromètre mis au point par M.Adam et D. Lairez. Le laser source, de marque Cohérent, est à mélange d'ions Argon et Krypton pouvant fournir respectivement les longueurs d'onde $\lambda=488\text{nm}$ ($q \in [0.006 ; 0.033]$) et $\lambda=647\text{nm}$ ($q \in [0.004 ; 0.025]$). Les échantillons sont contenus dans des cellules cylindriques de diamètre 8mm immergés dans une chambre remplie de toluène pour l'accord d'indice. L'angle de diffusion entre le faisceau incident et l'axe du détecteur (un photomultiplicateur) peut varier entre 15° et 150°. L'appareil est utilisé en mode statique ou en mode dynamique.

Analyse en statique

Le spectre statique de lumière sert, d'une part à faire le raccord avec le spectre de neutrons, et d'autre part à mesurer le rayon de gyration des vésicules R_g . L'intensité diffusée de manière dite statique est simplement la valeur moyenne de l'intensité diffusée à un angle au cours du temps, $I(q) = \langle I(q, \tau) \rangle_{\tau}$ moyenne qui se confond avec la moyenne thermodynamique. L'intensité statique

diffusée par une suspension de vésicules données $I(q, f)$ est mesurée en fonction du vecteur de diffusion q et de la fraction volumique totale ϕ de matière constitutive, $\phi = \phi_{sds} + \phi_{octanol} + \phi_{polymère}$. Cette intensité diffusée est ajustée à une loi de Guinier dans le domaine des très petits angles ($qRg < 1$).

Eq 3-7
$$I(q, \phi) = I(0, \phi) \exp(-q^2 Rg(\phi)^2)$$

Analyse en dynamique

Les mesures de diffusion « dynamique » de la lumière ont été effectuées en mode d'autobatteement. Pour un angle donné, le corrélateur calcule la fonction d'autocorrélation de l'intensité diffusée : $\langle I(q, \tau+t)I(q, t) \rangle$. Dans l'hypothèse où le champ électrique diffusé $E(q, t)$ est une variable aléatoire de statistique gaussienne, on peut relier la fonction d'autocorrélation de l'intensité $I(q, t)$ à la fonction d'autocorrélation normalisée $g(q, t)$ par la relation :

Eq 3-8
$$\langle I(q, 0)I(q, t) \rangle = \langle I(q) \rangle^2 (1 + B|g(q, t)|^2) \quad \text{avec} \quad g(q, t) = \frac{\langle \bar{E}(q, t)E(q, 0) \rangle}{\langle \bar{E}(q, 0)E(q, 0) \rangle}$$

\bar{E} est la quantité conjuguée de E , et $\langle \rangle$ désigne une moyenne temporelle. B est un facteur expérimental compris entre 0 et 1 et qui dépend du nombre d'aires de cohérence détectées pas le photomultiplicateur.

Pour des particules monodisperses et diluées et pour $qR \ll 1$, $g(q, t)$ s'ajuste à une exponentielle dont on peut mesurer la constante de temps τ . De ce temps de relaxation τ , on peut en déduire le coefficient de diffusion de translation des vésicules D , grâce à la relation : $1/\tau = Dq^2$. D est lui-même relié au rayon hydrodynamique R_h par la loi de stokes-Einstein : $D = k_b T / 6\pi\eta R_h$ (η est la viscosité de l'eau à la température T).

Théoriquement R_h est indépendant de l'angle de mesure. Mais la polydispersité et la présence de poussières provoque une remontée de R_h aux petits angles. En effet, aux petits angles la dynamique est plus lente, et ce sont les gros objets qui prédominent. En pratique on mesure la fonction g pour 7 angles compris entre 30° et 150° et on en déduit le terme Dq^2 par la méthode des cumulants (101) qui tient compte d'une polydispersité non nulle des objets étudiés. Cette méthode consiste à paramétrer la fonction g par une exponentielle étirée, le terme du second ordre est relié à l'écart-type σ de la distribution gaussienne du coefficient de diffusion D . Les 7 termes Dq^2 sont représentés en fonction du carré des vecteurs d'onde q^2 et la courbe obtenue est paramétrée par l'équation d'une droite passant par 0. Le coefficient moyen $\langle D \rangle$ est défini comme la pente de cette droite, et nous en déduisons le rayon moyen R_h . L'écart-type moyen $\langle \sigma \rangle$ est la moyenne des écart-types pour les 7 angles.

3.3.3 Caractérisation des vésicules initiales

La caractérisation structurale des vésicules servira principalement à étudier l'évolution de la taille et de la polydispersité des vésicules en fonction des paramètres de l'extrusion. En ce qui concerne les vésicules initiales, avant extrusion, leur étude est un peu plus approfondie. Nous devons en effet nous assurer que les vésicules sont bien unilamellaires, en plus de la mesure de rayon et d'écart-type. Dans ce cas toute la gamme de vecteurs d'onde qu'offrent les neutrons et la lumière est utilisée.

a) Les vésicules lipidiques

L'étude de la lamellarité (nombre de bicouches) est particulièrement importante pour les vésicules de lipides. En effet, nous n'obtenons des vésicules unilamellaires que dans certaines conditions de préparations. Nous verrons aussi que la taille des vésicules ainsi préparées est très limitée.

Lamellarité

Lorsque les vésicules sont plurilamellaires, les bicouches s'emboîtent les unes dans les autres à la manière de poupées russes, et la distance séparant ces coquilles concentriques est sensiblement la même pour toutes les vésicules. Cette distance interlamellaire est représentée sur les spectres de diffusion de neutrons par un pic plus ou moins marqué aux grands vecteurs de diffusions $q \approx 0.1 \text{ \AA}^{-1}$ (Figure 3-18). Elle est donc à peu près égale à 10 \AA pour des vésicules de EPC. On remarque sur la Figure 3-18 que le caractère multilamellaire des vésicules est favorisé par un nombre d'extrusions successives faible (en-dessous de 4), un rayon de pore élevé ($\geq 100 \text{ nm}$), l'absence d'une étape de sonication dans la préparation des échantillons, et une concentration élevée en EPC (de 1%). Cette étape précède les extrusions successives à travers la membrane R_p de préparation, et consiste à plonger le tube à essai contenant la suspension lipidique dans un bain de sonication pendant 20mn environ.

De ces résultats nous pouvons conclure que pour obtenir des vésicules unilamellaires, l'étape de sonication est nécessaire, le nombre d'extrusions successives doit être supérieur à 4 et la concentration en lipides doit être de 0.1% pour les vésicules les plus grosses, préparées avec des membranes 100nm.

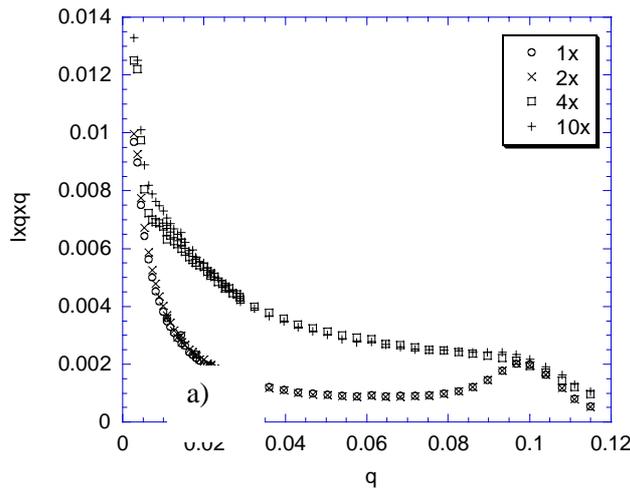
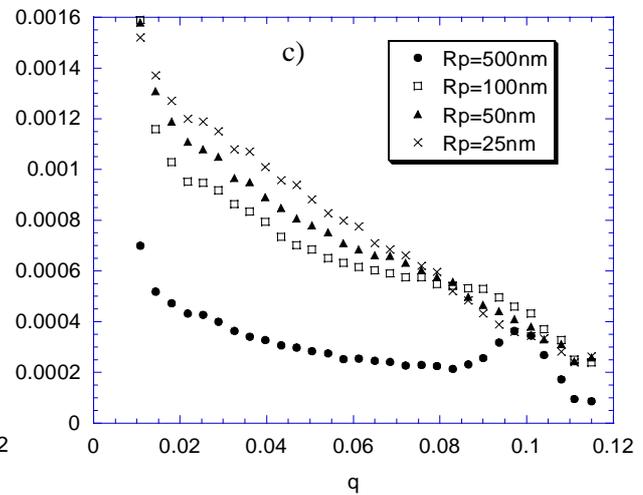
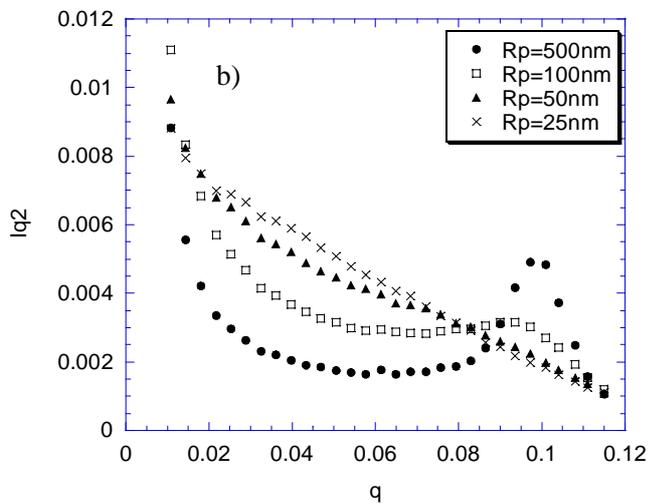


Figure 3-18 : a) sus es un certain nombre de fois à travers une membrane pension de EPC 1%, non soniquée, extrudé $R_p=50\text{nm}$. b) Vésicules de EPC 1% soniquées et extrudées 11 fois à travers des membranes de différents R_p , c) Vésicules de EPC 0.1% soniquées et extrudées 11 fois à travers des membranes de différents R_p .



Dimensions des vésicules

Pour des vésicules unilamellaires et relativement monodisperses, le spectre de diffusion de neutrons (Figure 3-19) est bien paramétré par l'équation Eq 3-4. Les paramètres déduit de l'ajustement des spectres statiques expérimentaux sont donnés dans le Tableau 3-3. Les spectres statiques des échantillons obtenus après 11 extrusions à travers des pores de rayons $R_p= 10\text{nm}, 25\text{nm}, 50\text{nm}$, sont présentés sur la Figure 3-19. Ces spectres ont été normalisés par A , la plateau des oscillations, pour s'affranchir des éventuelles différences de concentrations. Aux grands vecteurs d'onde, $qL \gg 1$, les spectres sont parfaitement superposés. Quelle que soit leur taille, l'épaisseur de la bicouche est toujours la même, un peu inférieure à 3nm. On s'attend plutôt à 4 nm pour une bicouche de lécithine, mais les têtes polaires sont moins contrastées (contraste par rapport à D_2O : $19,7 \cdot 10^{20} \text{ cm}^{-4}$) que les queues hydrophobes ($45 \cdot 10^{20} \text{ cm}^{-4}$) et on les "voit" moins bien. Les spectres diffèrent par l'abscisse du pic des oscillations q_{max} , et dans une moindre mesure, par l'amplitude de ces oscillations. On trouve ainsi logiquement une diminution de $R_{\pi 2}$, lorsque R_p diminue. Sur la Figure 3-20 l'évolution du rayon des vésicules, mesuré par différentes techniques, est représenté en fonction du rayon des pores. Le

rayon R_s est le rayon moyen issu du paramétrage des spectres de diffusion statiques $q^2I(q)$. Les trois valeurs mesurées du rayon des vésicules R_h , R_g et R_s augmentent avec R_p jusqu'à $R_p=50\text{nm}$ puis se stabilise vers 70-80nm, et au-delà les vésicules ne sont plus unilamellaires. La plupart des vésicules ont été préparées avec les membranes 50 et 100nm, dont les pores sont les plus larges. En effet nous cherchons à préparer les vésicules les plus grosses possibles puisque nous voulons ensuite étudier leur écoulement à travers des pores étroits. Le rayon des vésicules initiales R_i doit donc être supérieur, autant que possible, au rayon des pores qui servent à les étudier R_p .

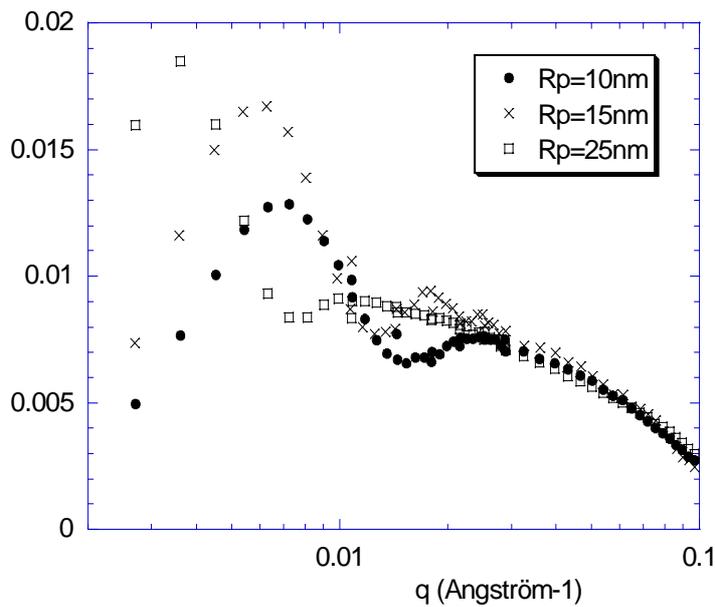


Figure 3-19 : suspensions soniquées, extrudées 11 fois à travers des membranes de R_p différents, avec 0.1% de lipides.

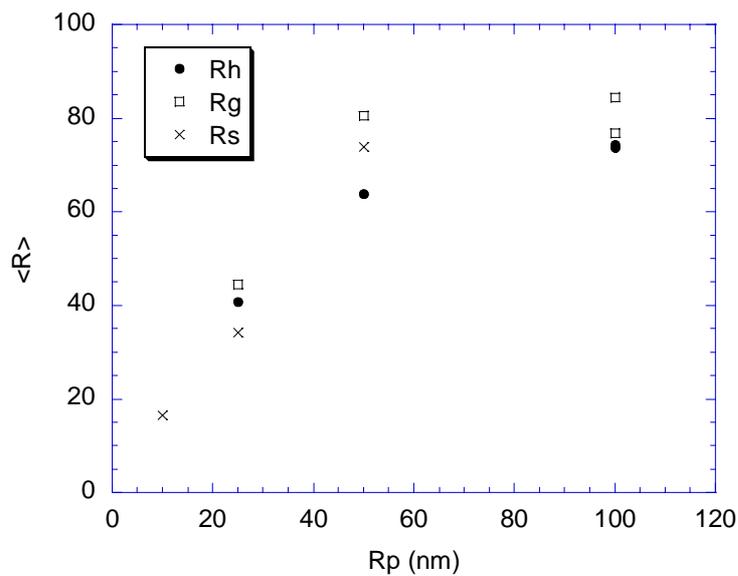


Figure 3-20 : Rayons moyens des vésicules, mesurés par différentes techniques. : rayons hydrodynamiques R_h , rayons de gyration R_g , rayons statiques R_s .

	$\langle R \rangle$	L	Ecart-type
$R_p=100\text{nm}$	$73,8 \pm 6,9 \text{ nm}$	$2,97 \pm 0,13 \text{ nm}$	$0,45 \pm 0,09$
$R_p=25 \text{ nm}$	$34,2 \pm 1,6 \text{ nm}$	$2,98 \pm 0,08 \text{ nm}$	$0,30 \pm 0,01$
$R_p=10 \text{ nm}$	$16,5 \pm 0,3 \text{ nm}$	$2,87 \pm 0,04 \text{ nm}$	$0,36 \pm 0,02$

Tableau 3-3 : Paramètres pour des suspensions soniquées, extrudées 11 fois à travers des membranes de R_p différents, avec 0.1% de lipides.

b) Les vésicules de tensioactifs

Concernant les vésicules de tensioactifs les préoccupations sont différentes. Ces vésicules sont presque toujours unilamellaires, en revanche leur structure varie avec la dilution. Il est alors nécessaire de se placer dans la bonne gamme de concentration pour éviter les interactions répulsives entre vésicules d'une part et la solubilisation des bicouches d'autre part. Une fois qu'on a choisi une concentration en constituants membranaires adéquate, elle ne doit plus être modifier car le rayon hydrodynamique dépend de façon cruciale de ce paramètre.

Effet de la concentration

La surface des vésicules étant couverte de polymères, les vésicules sont susceptibles de se repousser fortement à partir d'une certaine concentration ϕ_s . Or les interactions répulsives ont pour effet de diminuer l'intensité statique de rayonnement diffusée par ces objets, et donc de gêner leur caractérisation par les techniques de diffusion. Pour ces raisons, nous nous proposons d'étudier ces interactions en mesurant l'intensité extrapolée à $q=0$, normalisée par une référence (ici l'intensité diffusée par le benzène), en fonction de la concentration en SDS : C_{sds} (Figure 3-23). $I(q=0)$ est obtenu par extrapolation de la courbe $\ln[I(q)]$ en fonction de q^2 lorsque q tend vers 0. Cette courbe correspond à des vésicules préalablement chauffées à 55°C pendant 30mn avec une concentration en SDS de 0.5%, puis diluées à différentes concentrations. On voit sur la Figure 3-21 que les interactions commencent à se faire sentir à partir de 0.15%, concentration pour laquelle la dépendance de $I(q=0)$ n'est plus linéaire en C_{sds} . Pour s'affranchir de ces interactions répulsives, il convient de diluer les échantillons. Cependant, la solubilité importante du SDS dans l'eau limite la dilution. En effet en extrapolant, à faibles concentrations, la relation linéaire entre $I(q=0)$ et C_{sds} , on obtient une intensité nulle pour une concentration égale à 0.032% en SDS. Cette concentration est appelée Concentration Vésiculaire Critique, ou CVC. En-dessous de cette valeur les vésicules sont complètement détruites

par solubilisation du SDS dans l'eau. Pour la mesure des rayons, chaque échantillon a donc été dilué à $C_{sds}=0.1\%$ la concentration intermédiaire entre 0.032 et 0.15%.

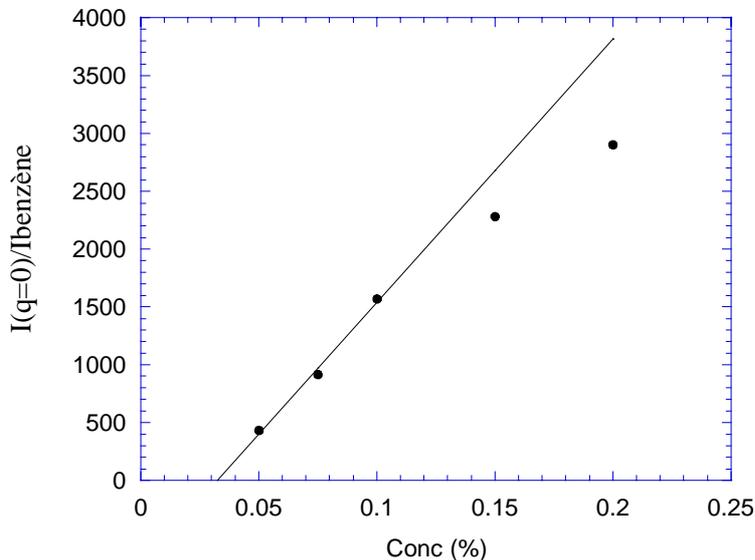


Figure 3-21 : Intensité extrapolée à $q=0$, normalisée par l'intensité diffusée par du benzène, en fonction de C_{sds} .

Pour fixer les idées, nous représentons sur la Figure 3-22 la fraction volumique de solvant théoriquement encapsulée dans les vésicules pour les deux concentrations $C_{sds}=0.1\%$ et 0.5% en fonction du temps de chauffage. La relation liant la fraction volumique de solution interne des vésicules ν au rayon des vésicules R (pour les calculs nous avons pris les valeurs du rayon hydrodynamique), à l'épaisseur de membrane L et à la fraction volumique de bicouche Φ_{bic} est la suivante :

Eq 3-9
$$\nu = \phi_{bic} \times R/3L$$

Un calcul simple et rapide nous indique que dans les suspensions concentrées à 0.1% en SDS, la distance entre bicouche varie entre 2 et 3.25 fois le rayon des vésicules (valeurs correspondant à $1.3\% < \nu < 3.8\%$). Les vésicules sont assez éloignées et les interactions sont alors peu probables. Alors que pour $C_{sds}=0.5\%$ cette distance inter-vésiculaire est comprise entre 0.5 et 1.5 fois le rayon des vésicules (pour $6.5\% < \nu < 26.3\%$). Pour les échantillons de $C_{sds}=0.5\%$, la densité en vésicules est donc importante et devient même critique aux temps de chauffage longs, puisque ν dépasse 20% pour 4 heures de chauffage. Or, d'après R. Joannic, des sphérulites apparaissent à cette valeur (99). En effet à cette concentration, les vésicules entrent en contact et le système doit fabriquer des vésicules multilamellaires pour relaxer la pression osmotique.

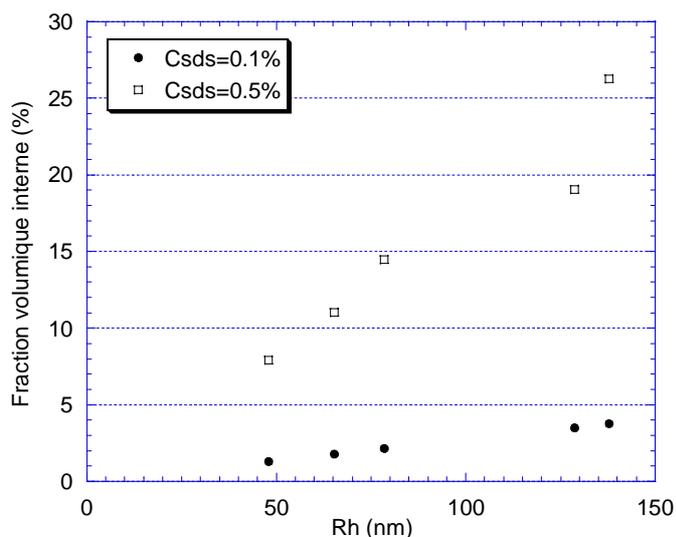


Figure 3-22 : Fraction volumique interne des vésicules en fonction du rayon moyen, mesuré à 0.1%. Les valeurs sont représentées pour les échantillon concentrés à 0.5% et à 0.1% en SDS.

Effet de température

Tout d’abord commençons par étudier le spectre statique obtenu par diffusion de neutrons pour les vésicules non chauffées. Le paramétrage de ce spectre (Figure 3-23 a)) par l’équation Eq 3-3 théorique d’une coquille sphérique nous donne les paramètres suivant :

$$\langle \sigma \rangle = 0.0599 (\pm 0.0038) \quad L = 21.9 (\pm 0.52) \text{ \AA} \quad R_s = 150 (\pm 1.8) \text{ \AA}$$

La concordance entre la théorie et la courbe expérimentale permet d’affirmer que la suspension ne contient pas de micelles ni de vésicules multilamellaires. On en déduit la distribution de Schultz-Flory correspondante (Figure 3-23 b)).

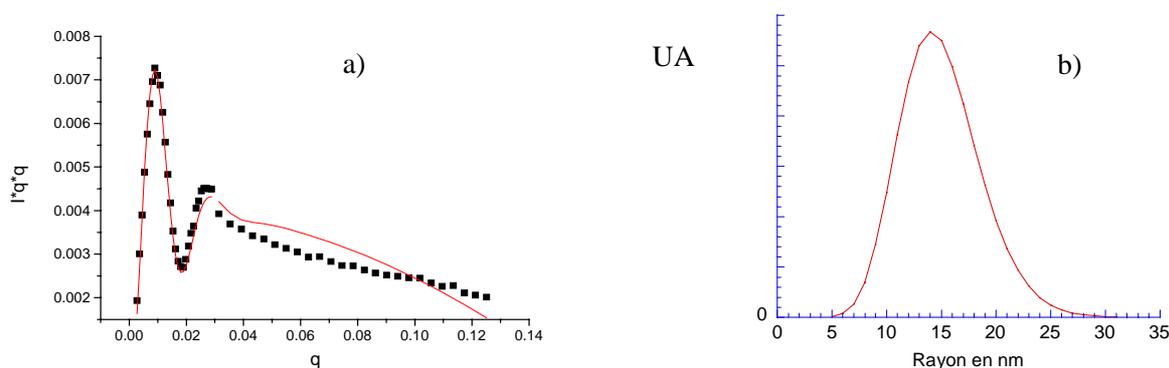


Figure 3-23 : a) Spectre de diffusion de neutrons d’un échantillon de vésicules non chauffées, et b) la distribution de taille correspondante.

Pour les vésicules chauffées, les rayons des vésicules sont généralement supérieurs à 30nm et il est nécessaire de compléter la diffusion de neutrons par la diffusion de lumière. Sur la Figure 3-24 a) dès les premières minutes de chauffage, le pic des oscillations de la courbe $q^2 I(q)$ est décalé vers les petits angles, ce qui signifie que le rayon augmente. Ce comportement est vérifié par les mesures de R_h , R_g et $R_{\pi/2}$ en fonction du temps de chauffage des vésicules à 55°C. Sur la Figure 3-24 b) nous voyons en effet que ces trois valeurs expérimentales du rayon moyen des vésicules augmentent avec le temps de chauffage. Cette courbe vérifie bien les mesures effectuées par Joannic sur les mêmes systèmes (cf Figure 3-18). Nous remarquons aussi que, contrairement aux vésicules chauffées, l'écart entre R_h et R_g est très important pour les vésicules non chauffées. En réalité il est possible que ces systèmes contiennent quelques sphérulites. La présence, même en faible quantité, de sphérulites peut expliquer cet écart, lié à une forte polydispersité de taille. Fragiles et instables ces sphérulites disparaissent lorsque le système est perturbé, par chauffage par exemple.

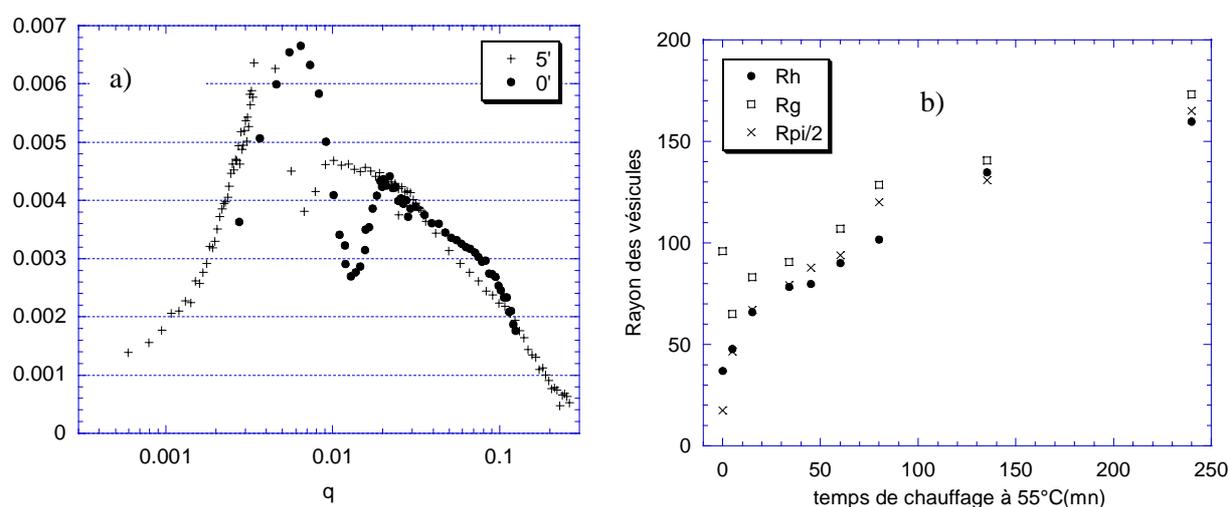


Figure 3-24 : a) Spectre de diffusion de neutrons d'échantillons de vésicules chauffées pendant 5mn et non chauffées, b) R_h , R_g et $R_{\pi/2}$ des vésicules de tensioactifs, en fonction de la durée de leur chauffage à 55°C.

Pour les vésicules les plus grosses, celles obtenues après chauffage à 55°C pendant 4h, nous avons pu observer des oscillations caractéristiques des vésicules jusqu'au second ordre, en diffusion de lumière. Ceci est remarquable car il est très rare de former des vésicules unilamellaires et quasiment monodisperses avec un rayon moyen de l'ordre de 200nm.

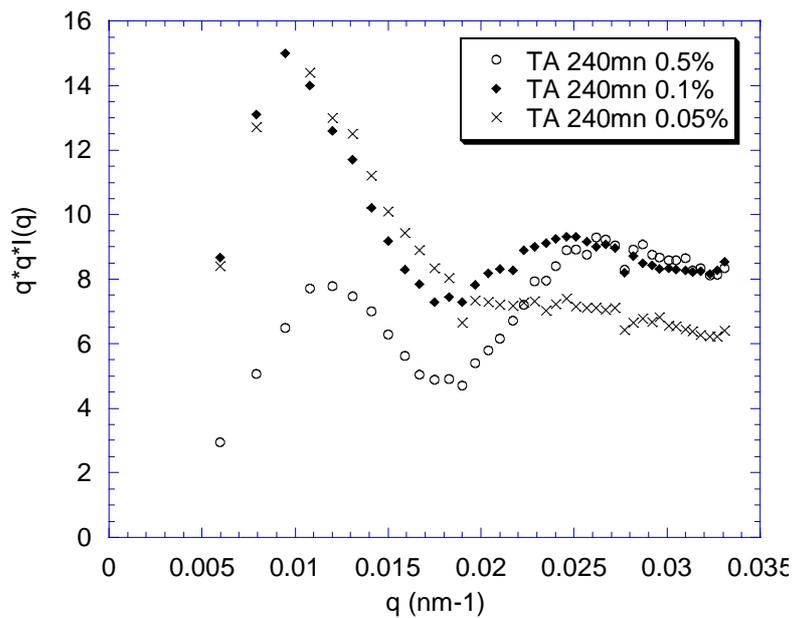


Figure 3-25 : Spectre de diffusion de lumière pour des vésicules de tensioactifs chauffées pendant 240mn, de différentes concentrations en SDS.

4 Extrusion de vésicules – Etude rhéologique

4	<u>EXTRUSION DE VESICULES – ETUDE RHEOLOGIQUE</u>	79
4.1	INTRODUCTION	83
4.2	ANALYSE D’UNE COURBE DEBIT-PRESSION	83
4.2.1	LES PRINCIPAUX PARAMETRES	83
4.2.2	CHOIX DES CONDITIONS OPERATOIRES POUR LA MESURE DE COURBES DEBIT-PRESSION	86
	a) Vésicules de lipides	86
	b) Vésicules de tensioactifs	90
4.2.3	QUELQUES EXEMPLES	92
4.3	PRESSION SEUIL: EFFETS D'ENTREE	94
4.3.1	EFFET DE LA TAILLE DES PORES	95
4.3.2	EFFET DE LA NATURE DE LA BICOUCHE	98
	a) Nature des lipides et effet du cholestérol	98
	b) Lipides/tensioactifs	99
4.4	FACTEUR DE POISEUILLE RELATIF	100
4.4.1	EVALUATION DU FACTEUR DE POISEUILLE RELATIF SELON LA LOI DE BRUINSMA	100
4.4.2	RESULTATS ET DISCUSSION	102
	a) Vésicules de tensioactifs	102
	b) Vésicules de lipides	103
4.4.3	HYPOTHESES POUR LES RESULTATS OBTENUES AVEC LES VESICULES DE LIPIDES	106
	a) Elongation des vésicules en très long filament dans les pores	106
	b) Accumulation des vésicules en amont de la membrane	106
	c) Adsorption des lipides	107
4.5	CONCLUSION	110

4.1 Introduction

Nous présentons et discutons dans ce chapitre les mesures de la relation entre débit et pression lorsque nous extrudons différents types de vésicules à travers des membranes poreuses de différents rayons.

Nous avons choisi de mesurer l'excès de pression en amont du filtre et d'imposer une rampe de débit. Les courbes expérimentales représentant la variation de cette pression en fonction du débit imposé sont appelées courbes « débit-pression ». Nous présentons quelques exemples de ces courbes et nous en déduisons deux paramètres physiques principaux de l'extrusion.

Les courbes débit-pression présentent toutes les mêmes caractéristiques. La montée en pression ne se fait qu'à partir d'un débit minimum, correspondant à une certaine pression seuil. La pression varie ensuite linéairement en fonction du débit, ce qui permet de définir une perméabilité effective, que nous comparons aux prédictions théoriques. Ces deux paramètres, pression seuil et perméabilité, contiennent des informations complémentaires, le premier sur les effets d'entrée des vésicules dans les pores, le second sur l'hydrodynamique des vésicules dans les pores.

Nous verrons rapidement que nous avons été confrontés à quelques problèmes pour les mesures de perméabilité des vésicules de lipides, dus au bouchage des pores par les vésicules.

4.2 Analyse d'une courbe débit-pression

4.2.1 Les principaux paramètres

Une courbe débit-pression, telle que celle qui est tracée sur la Figure 4-1, est la représentation graphique de la pression mesurée en fonction du débit imposé pendant l'extrusion du fluide à travers une membrane « Nucléopore ». Dans la plupart des cas, le débit varie linéairement en fonction du temps pendant la mesure, de 0 à une valeur maximale Q_{\max} . On dit qu'on impose une rampe de débit. Cette rampe est caractérisée par sa durée D , ou encore par l'accélération du débit, égale à Q_{\max} / D .

La Figure 4-1 présente un exemple type de courbe débit-pression. Cette courbe correspond à l'extrusion de vésicules de SOPC 50 à travers une membrane $R_p=25\text{nm}$, le débit du fluide variant de 0 à $1\text{mL}/\text{mn}$ en $D=10\text{mn}$. Toutes les autres courbes ont la même allure, mais celle-ci a été choisie car elle présente des effets forts et nettement marqués. Elle se divise en deux parties distinctes. Pendant le régime transitoire aux faibles débits, la pression augmente jusqu'à une valeur appelée **pression seuil** ΔP_s . Lorsqu'on se place suffisamment loin de cette valeur, on atteint un régime stationnaire où la pression est proportionnelle au débit. La pente de la droite est appelée **facteur de Poiseuille effectif** et noté a_{eff} . Pour évaluer l'importance des effets de l'extrusion des vésicules par rapport à l'eau pure,

cette courbe débit-pression est comparée à celle correspondant à l'extrusion de l'eau à travers la même membrane (Figure 4-1).

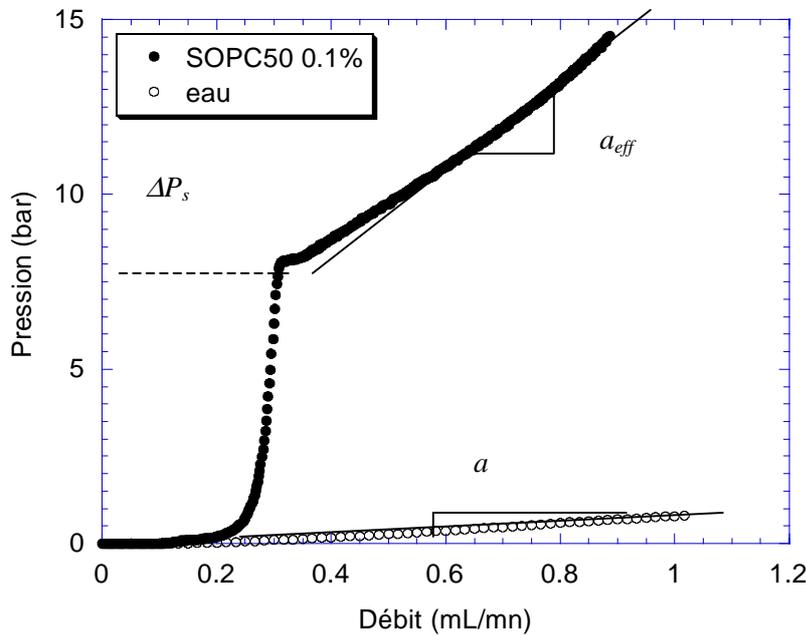


Figure 4-1 : Courbes débit-pression, réalisées pendant l'extrusion d'eau pure et d'une suspension de vésicules SOPC50 à 0.1%, à travers une membrane $R_p=25\text{nm}$.

Nous assimilons la pression seuil ΔP_s à la pression minimale à appliquer pour observer un écoulement, mesurée dans les expériences antérieures d'extrusion à pression imposée (11), (12). Dans nos expériences d'extrusion à débit imposé nous observons un écoulement, très faible, pour des pressions inférieures à ΔP_s ; mais il est très probable que les vésicules soient retenues en amont des pores tant que la pression seuil n'est pas atteinte.

Au Chapitre2-5-2 b) nous avons vu que la pression minimale, pour qu'une vésicule rentre dans un pore, est égale à la pression dite de courbure $\Delta P_c = F \kappa_c / R_p^3$ si l'étape limitante est la courbure de la bicouche de la vésicule. De même, si l'entrée de la vésicule dans le pore est marquée par la cassure de sa bicouche, alors la pression seuil sera égale à la pression dite de rupture $\Delta P_r = \sigma_L / 2R_p$. Ainsi, la variation de la pression seuil en fonction du rayon des pores R_p doit nous donner des indications sur le mécanisme d'entrée des vésicules dans les pores.

Une fois dépassée cette pression seuil, on retrouve, aux plus forts débits, une relation linéaire entre la pression et le débit, comme le prédit la loi de Darcy pour les liquides purs. Retrouver, pour des suspensions de vésicules transportées dans des pores fins, le même comportement hydrodynamique que celui du solvant seul n'est pas du tout un résultat a priori évident. Il était certes prévu théoriquement par les calculs de Bruinsma (13), mais ce résultat mathématique, dû à l'annulation fortuite de deux exposants, avait de grandes chances d'être contredit par l'expérience. Pour se rendre compte à quel point l'écoulement du solvant peut être perturbé par la présence des vésicules, nous

calculons le nombre de vésicules contenues dans un pore pour l'exemple de la Figure 4-1. Avec les concentrations utilisées, et en faisant l'approximation grossière et inexacte que les vésicules ne sont pas déformées dans les pores, le rapport du volume de solution encapsulée par les vésicules dans un pore, sur le volume d'une vésicule, nous indique qu'un pore de rayon $R_p=25\text{nm}$ contient environ 2.5 vésicules de SOPC, ce qui n'est pas négligeable.

La présence de ces vésicules est susceptible de modifier l'écoulement hydrodynamique par rapport à l'eau pure, et nous pouvons quantifier l'écart de cette relation linéaire par rapport à la loi de Poiseuille observée pour le solvant. Pour cela nous comparons les facteurs de Poiseuille obtenus dans les deux cas. Le facteur de proportionnalité entre la pression et le débit pour la courbe des vésicules est appelé le facteur de Poiseuille effectif a_{eff} , et Bruinsma a calculé son expression théorique (cf. chapitre 2.4.1):

$$\text{Eq 4-1} \quad a_{eff} = \frac{L_p \times \eta}{K_{eff}} = L_p \times \eta \frac{8 + 0.233 \times (nL^*)(L^{*2} / R_p^2)}{n_p A_e \times \pi R_p^4}$$

L^* est la longueur du sphérocyindre de rayon R_p représentant la vésicule étirée dans le pore à surface constante, n le nombre de vésicules par unité de longueur dans un pore, $n_p A_e$ le nombre total de pores, et L_p et η sont la longueur des pores et la viscosité de l'eau. Nous mesurons l'écart de la pente de la droite $\Delta P = f(Q)$ obtenue pour la suspension de vésicules par rapport à la loi de Poiseuille pour l'eau pure, en divisant a_{eff} par le facteur de Poiseuille de la même membrane a (défini au chapitre 3-2-2 b)). On obtient alors **le facteur de Poiseuille relatif** a_{eff}/a dont la valeur théorique est, dans le modèle de Bruinsma :

$$\text{Eq 4-2} \quad a_{eff}/a = 1 + 0.233/8 \times nL^*(L^*/R_p)^2$$

Ce terme traduit les phénomènes de transport des vésicules à l'intérieur des pores. D'après Eq 4-2, il est lié à la concentration et aux dimensions des vésicules, ainsi qu'à celles des pores. La normalisation du facteur de Poiseuille effectif a_{eff} par celui de l'eau a permet de s'affranchir des variations de températures d'une expérience à l'autre et des variations du nombre de pores d'une membrane à l'autre puisque les termes η et $n_p A_e$ ont disparu. Cela rend possible la comparaison d'un grand nombre de résultats pour des expériences réalisées à plusieurs jours d'intervalles avec des membranes différentes.

L'extrusion de vésicules est donc caractérisée par ces deux paramètres : **la pression seuil ΔP_s** et **le facteur de Poiseuille relatif a_{eff}/a** . Nous allons maintenant essayer d'extraire le maximum d'informations de ces valeurs.

4.2.2 Choix des conditions opératoires pour la mesure de courbes débit-pression

Avant nous B. Frisken a aussi étudié des courbes débit-pression pendant l'extrusion de suspensions de lipides variés, mais dans des gammes de débits et de pressions plus élevés. Ces courbes sont obtenues par mesure du débit à pression constante. Nous avons choisi, quant à nous, de mesurer la pression pendant que le débit est modifié continûment par un programme de rampe. Comme nous l'avons expliqué au début du chapitre 3, notre choix a tout d'abord été guidé par un souci de précision des courbes. En utilisant un capteur de pression Entran et un contrôle du débit par une pompe de chromatographie nous gagnons en précision par rapport à un manomètre mécanique et une mesure du débit avec un Becher gradué. D'autre nous avons choisi d'utiliser des rampes de débit pour consommer un volume minimum d'échantillon. Par exemple une rampe de 0 à 0.2mL/mn en 20mn en 1200 points consomme 2mL seulement de suspension de vésicules, alors que la même courbe, exécutée à débit constants, en 10 points, nécessiterait 5 à 10mL. Un volume de 30mL de suspensions de vésicules lipidiques, nécessitant plus d'une journée de préparation (par extrusion manuelle), ces échantillons ne peuvent être gaspillés.

Lorsque nous appliquons une rampe de débit, nous choisissons les paramètres Q_{\max} et D dans ce souci d'économie des échantillons, mais aussi en cherchant à s'assurer que les mesures se font bien à l'équilibre, c'est-à-dire que la variation du débit n'est pas trop rapide par rapport à la relaxation du système. Pour ces deux raisons nous avons favorisé une longue durée de rampe D (ou une accélération faible) et un débit maximal Q_{\max} faible. L'accélération de la rampe peut avoir d'autres effets imprévus sur l'allure des courbes, comme nous le verrons pour les vésicules de lipides, aussi nous commençons par montrer l'influence de ce paramètre sur les grandeurs qui nous intéressent ΔP_s et a_{eff}/a pour les deux types de vésicules. Nous comparerons aussi ces courbes, obtenues avec des rampes, avec une courbe débit-pression obtenue par paliers successifs de débit constants. Une courbe « par paliers » représente la courbe « à l'équilibre ».

Le but ici est uniquement de distinguer les grandeurs mesurables indépendantes des conditions de mesures de celles qui ne le sont pas, et par conséquent posent des problèmes d'interprétation. Nous tenterons d'analyser ces différentes grandeurs ultérieurement.

a) Vésicules de lipides

Comparaison entre une courbe « par paliers » et une courbe obtenue avec une rampe

Pour les vésicules de lipides il est en fait impossible de tracer une courbe « par palier ». Lorsqu'un débit constant est appliqué la pression augmente continûment en fonction du temps. L'encadré de la Figure 4-2 est un bon exemple de cette croissance ininterrompue de la pression (environ 1 bar/mn). Même après une heure, la pression ne se stabilise pas (résultats non montrés ici). Ceci montre déjà les

problèmes de bouchage des pores pour ce type de vésicules. Malgré cela nos courbes sont exploitables, et pour le montrer nous allons tout d'abord distinguer les effets sur la pression seuil des effets sur le facteur Poiseuille relatif.

Malgré l'augmentation de pression en fonction du temps, nous avons tout de même tracé une courbe débit-pression par "paliers" en utilisant la boucle d'injection de 1mL de la pompe de chromatographie. Lorsqu'on injecte un échantillon de 1mL de vésicules à débit constant la pression n'augmente bien-sûr pas indéfiniment puisque, au bout d'un certain temps, la concentration en vésicules devient nulle et la pression est censée reprendre la valeur qu'elle aurait pour l'extrusion d'eau pure. Dans l'expérience, la pression ne diminue pas aussi brutalement, néanmoins elle diminue faiblement après avoir atteint un maximum. C'est cette valeur maximale que nous notons comme valeur de la pression pour un débit donné. Il ne s'agit évidemment pas de mesures à l'équilibre, mais au moins le protocole est toujours le même pour chaque débit. Et il semble intéressant de comparer, au moins une fois, une telle courbe à celles obtenues avec une rampe de débit. Nous avons réalisé cette expérience une fois pour des vésicules de DOPC 50, à travers des membranes $R_p=15\text{nm}$.

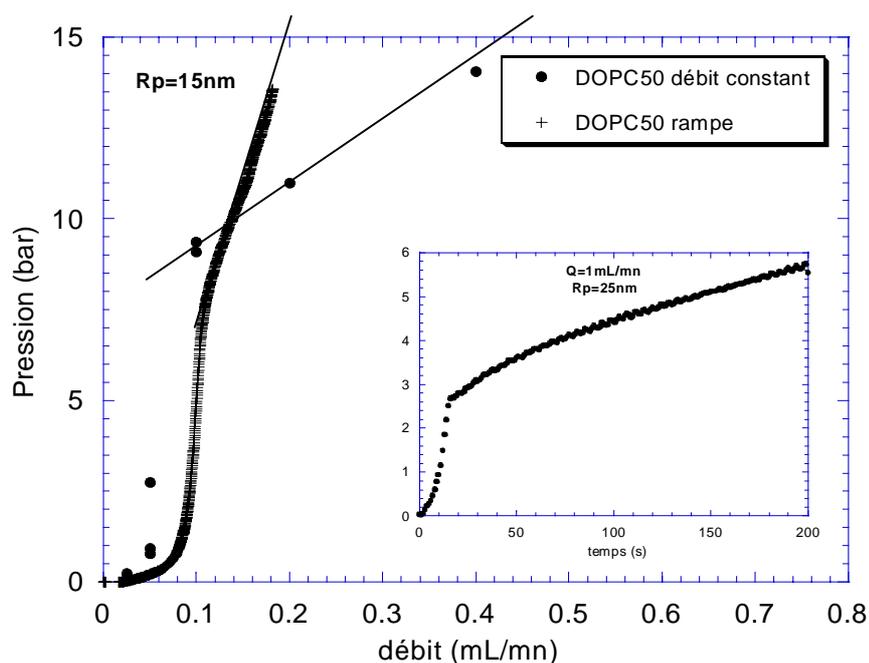


Figure 4-2: Pression en fonction du débit, pour des expériences d'extrusion de DOPC 50 à travers des pores de rayon $R_p=15\text{nm}$, à débit constant (avec la boucle d'injection) et pour une rampe d'accélération $0.01\text{mL}/\text{mn}^2$. En encadré, une courbe de pression en fonction du temps pour l'extrusion de vésicules de lipides 50 à $Q=1\text{mL}/\text{mn}$ (injection en continu) à travers une membrane $R_p=25\text{nm}$.

La courbe résultante est comparée à une extrusion équivalente (DOPC 50 et $R_p=15\text{nm}$) obtenue avec une rampe de débit d'accélération 0.01mL/mn^2 sur la Figure 4-2. Si on divise le facteur de Poiseuille effectif par le facteur de Poiseuille moyen des 8 membranes utilisées pour la courbe à débits constants, on obtient un facteur de Poiseuille relatif $a_{\text{eff}}/a=4.8\pm 2.4 \text{ bar.mn/mL}$, très inférieur à celui mesuré pour la rampe $a_{\text{eff}}/a=18\pm 0.6 \text{ bar.mn/mL}$. Pour les pressions seuil, on peut lire : $\Delta P_s=7.7\pm 0.3$ bar pour la rampe et $\Delta P_s=8.4\pm 0.5$ bar pour la courbe à débits constants. Ces valeurs sont très proches compte tenu de leur dispersion habituelle pour différentes membranes de même rayon de pores. D'après nos observations, cette dispersion est telle qu'on parle d'écart significatif lorsque le rapport des deux grandeurs comparées est supérieur à 2.

Effet de l'accélération de la rampe de débit

Le facteur de Poiseuille mesuré pour les vésicules de lipides varie aussi entre deux courbes obtenues avec des rampes d'accélération différentes. La Figure 4-3 présente la mesure de pression pendant l'extrusion de vésicules lipidiques EPC 100 à travers deux membranes $R_p=25\text{nm}$, avec deux rampes de débit d'accélération différentes : 0.1mL/mn^2 et 0.2mL/mn^2 . Si l'écart entre les pressions seuil n'est pas significatif : $\Delta P_s=4.2\pm 0.2$ bar et $\Delta P_s=5.2\pm 0.2$ bar, ce n'est pas le cas des facteurs de Poiseuille relatifs. En effet $a_{\text{eff}}/a=3.2$ pour la plus petite accélération 0.1mL/mn^2 et $a_{\text{eff}}/a=1.2$ pour 0.2mL/mn^2 .

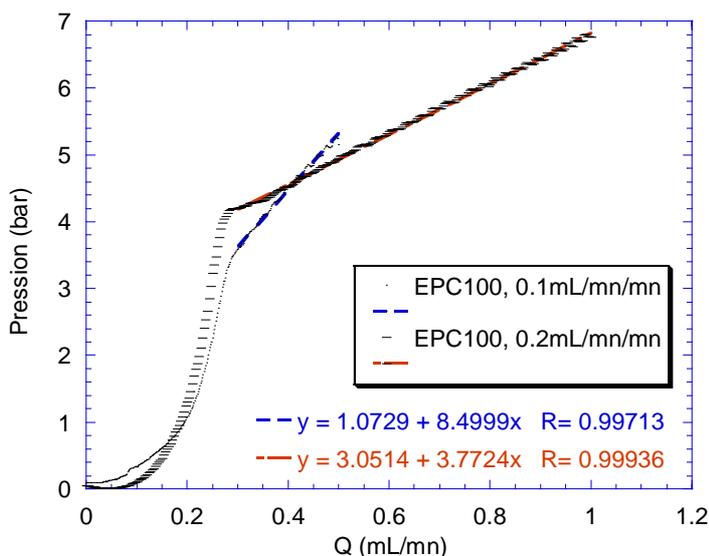


Figure 4-3 : Pression en fonction du débit, pour l'extrusion de vésicules EPC100, à travers des membranes $R_p = 25\text{nm}$, dont le facteur de Poiseuille est respectivement égal à $a = 2.6$ (0.1mL/mn^2) et 2.99 (0.2mL/mn^2).

Discussion et conclusion

Tout d'abord nous remarquons que les courbes débit-pression obtenues par rampe de débit, à faibles débits, semblent particulièrement bien adaptées à la mesure de la pression seuil. En effet ces courbes sont très précises aux faibles débits, et on y distingue nettement un seuil bien défini, marquant le début du régime linéaire. La valeur de la pression correspondante, que nous appelons pression seuil, est indépendante du protocole utilisé : les valeurs sont les mêmes pour des mesures à débit constant et pour une rampe, et ce quelle que soit l'accélération de la rampe. Ces valeurs, et leurs interprétations, constituent les principaux résultats de ce chapitre (cf. Chapitre 4.2).

En revanche le facteur de Poiseuille relatif dépend des conditions de mesures, et en particulier de l'accélération de la rampe. L'interprétation du comportement de a_{eff}/a en fonction de ce paramètre, mais aussi en fonction du rayon des pores sera l'objet de la partie 4.3.

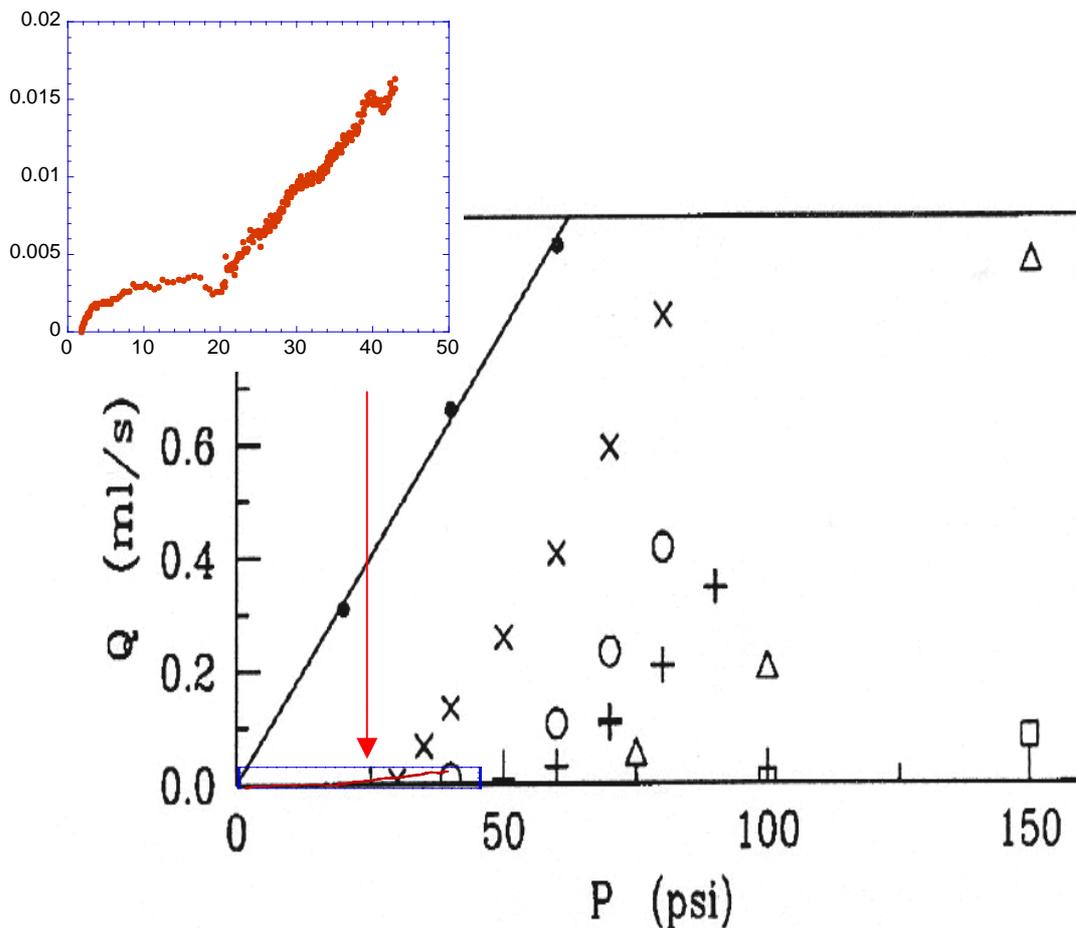


Figure 4-4 : Débit mesuré en fonction de la pression imposée lorsqu'une suspension de DMPC concentrées à (×) 0.02%, (○) 0.1%, (+) 0.5%, (Δ) 1%, ou (□) 10% est poussée à travers des membranes $R_p=50\text{nm}$ (12). En rouge aux très faibles débit : courbe obtenue pour l'extrusion de EPC 100 à travers une membrane $R_p=50\text{nm}$ avec une rampe de $0.2\text{mL}/\text{mn}^2$.

Les seules expériences antérieures similaires (celles de B. Frisken) ne font pas état du problème principal, qui est l'augmentation de la pression en fonction du temps à débit constant. Nous ne pouvons même pas comparer nos valeurs expérimentales aux leurs, étant donné l'écart très important entre nos gammes de débits et les leurs, comme le montre la Figure 4-4. Il s'agit d'une copie de l'un des graphiques de l'article de B. Frisken (12) représentant la variation de débit en fonction de la pression pendant l'extrusion de suspensions de DMPC, de différentes concentrations, à travers des pores de rayon 50nm. Nous avons superposé sur ce graphique une de nos courbes, correspondant à une rampe de débit d'accélération $0.2\text{mL}/\text{mn}^2$ pour l'extrusion de EPC 100 à 1% en lipides, à travers une membrane de 50nm. Cette courbe (agrandie en haut à gauche) est à peine visible sur la figure, et ne se raccorde pas aux mesures de B. Frisken. A priori nous n'explorons pas du tout les mêmes régimes et nos résultats ne sont pas comparables.

b) Vésicules de tensioactifs

Rampe de débit

En ce qui concerne les vésicules de tensioactifs, les problèmes rencontrés avec les vésicules de lipides sont ici beaucoup atténués. Contrairement aux vésicules de lipides, il est possible de tracer une courbe débit-pression « par paliers » reproductible. Pour un débit fixé, la pression augmente en effet très faiblement avec le temps comme l'illustre l'encadré de la Figure 4-5. Pour cette extrusion de vésicules de tensioactifs à $Q = 1\text{mL}/\text{mn}$ à travers des pores de rayon 25nm, la pression ne varie que de 0.12 bar/mn. Sur la Figure 4-5 on compare deux courbes débit-pression, l'une obtenue par des mesures à débits constants, et l'autre par une rampe de débit d'accélération $0.2\text{mL}/\text{mn}^2$. La membrane est la même dans les deux cas, et le facteur de Poiseuille a est donc identique pour les deux courbes. L'écart entre les facteurs de Poiseuille effectifs respectifs de $a_{eff} = 3.4 \pm 0.5 \text{ bar.mn/mL}$ et $a_{eff} = 2.3 \pm 0.2 \text{ bar.mn/mL}$ est très inférieur à celui observé pour les lipides, et n'est pas significatif. L'écart entre les deux pressions seuil $\Delta P_s = 2.6 \pm 0.25 \text{ bar}$ et $\Delta P_s = 1.5 \pm 0.2 \text{ bar}$ est plus important, mais il est aussi compris dans les barres d'erreur. Nous pouvons donc considérer que la courbe débit-pression « par paliers » est similaire à celle obtenue par rampe de débit. Cette similitude, observée dans cet exemple, a été vérifiée de nombreuses fois pour d'autres extrusions de vésicules de tensioactifs (différents R_i et R_p).

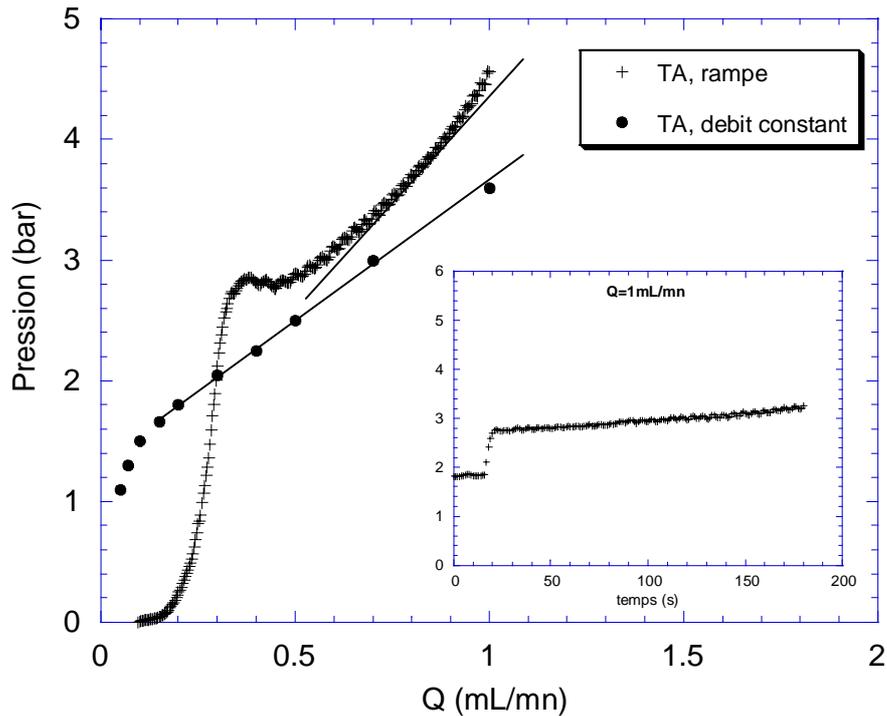


Figure 4-5 : Courbes débit-pression, à débit constant et avec une rampe de débit de 0.2mL/mn^2 , pour l'extrusion de vésicules de tensioactifs ($R_i=35\text{nm}$, $C_{sds}=0.5\%$) pour la même membrane $R_p=25\text{nm}$. En encadré une courbe de pression type de l'extrusion de vésicules de tensioactifs à un débit de 1mL/mn à travers une membrane $R_p=25\text{nm}$.

Effets de l'accélération de la rampe de débit

Intéressons-nous maintenant aux effets éventuels de l'accélération de la rampe de débit appliquée. Le même échantillon de tensioactifs a été extrudé à travers deux membranes différentes, de même rayon de pores, pour des rampes de débit d'accélération différente 0.2 et 0.4mL/mn^2 (Figure 4-6). Dans le premier cas $\Delta P_s = 2.6 \pm 0.25$ bar et $a_{eff}/a = 1.0 \pm 0.1$, et dans le deuxième cas $\Delta P_s = 2.0 \pm 0.2$ bar et $a_{eff}/a = 2.1 \pm 0.2$. Si les pressions seuil sont très voisines, l'écart entre les facteurs de Poiseuille relatif est non négligeable. Il est toutefois bien moins important que pour les vésicules de lipides. Par ailleurs nous avons vérifié sur une dizaine de courbes que a_{eff}/a est bien indépendant de l'accélération de la rampe, comme nous le verrons plus loin (Figure 4-16).

Remarque : La concentration en bicouche n'est jamais indiquée sur les figures car les caractéristiques des courbes débit-pression sont quasiment indépendants de la concentration dans une gamme allant de 0.01 à 1% en constituants membranaires.

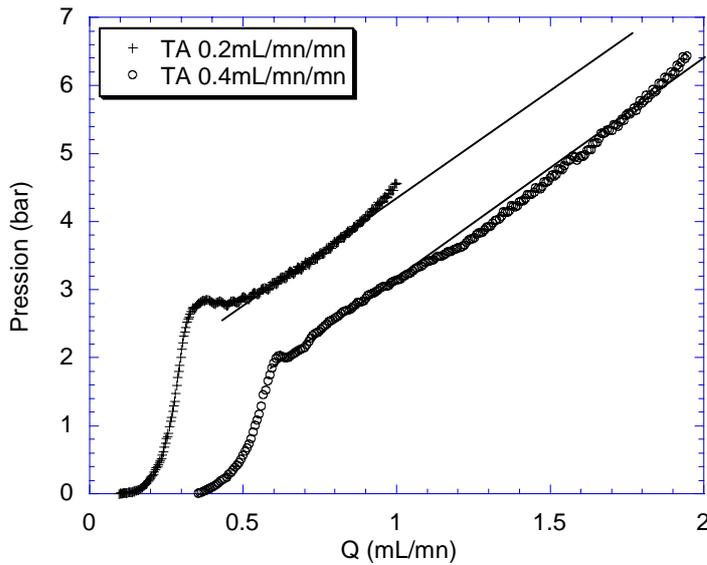


Figure 4-6 : Pression en fonction du débit d'extrusion de vésicules de tensioactifs ($C_{sds}=0.5\%$) à travers deux membranes différentes $R_p=25nm$, dont les facteurs de Poiseuille respectifs sont $a = 3.2$ ($0.2mL/mn^2$) et 1.75 ($0.4mL/mn^2$) pour l'eau. Les rampes de débits sont appliquées avec le pousse-seringue.

En conclusion, pour les vésicules de tensioactifs, compte tenu de la dispersion importante des résultats, nous considérons que la pression seuil et le facteur de Poiseuille relatif sont indépendants de l'accélération de la rampe de débit.

4.2.3 Quelques exemples

Nous avons tracé des dizaines de courbes débit-pression pour les deux systèmes de vésicules et tous les rayons de pores disponibles de 5nm à 100nm. A chaque fois les extrusions étaient réalisées avec des rampes de débits d'accélération comprise entre 0.01 et $1mL/mn^2$. Nous présentons ici quelques unes de ces courbes. Nous insistons particulièrement sur les différences entre les cas extrêmes, aux très grands et aux très petits pores par exemple.

La Figure 4-7 présente deux courbes débit-pression obtenues pour l'extrusion de vésicules lipidiques et de tensioactifs à travers des membranes $R_p=15nm$. Nous avons choisi cette taille de pore car c'est ce rayon qui, généralement, exacerbe le plus les différences entre les deux systèmes étudiés. Les deux courbes ont la même allure, mais les pressions sont 5 à 10 fois plus élevées pour les vésicules de lipides, à des débits comparables. La pression seuil et le facteur de Poiseuille effectif sont tous les deux beaucoup plus importants pour les vésicules de lipides que pour celles de tensioactifs:

$$\Delta P_s = 7.5$$

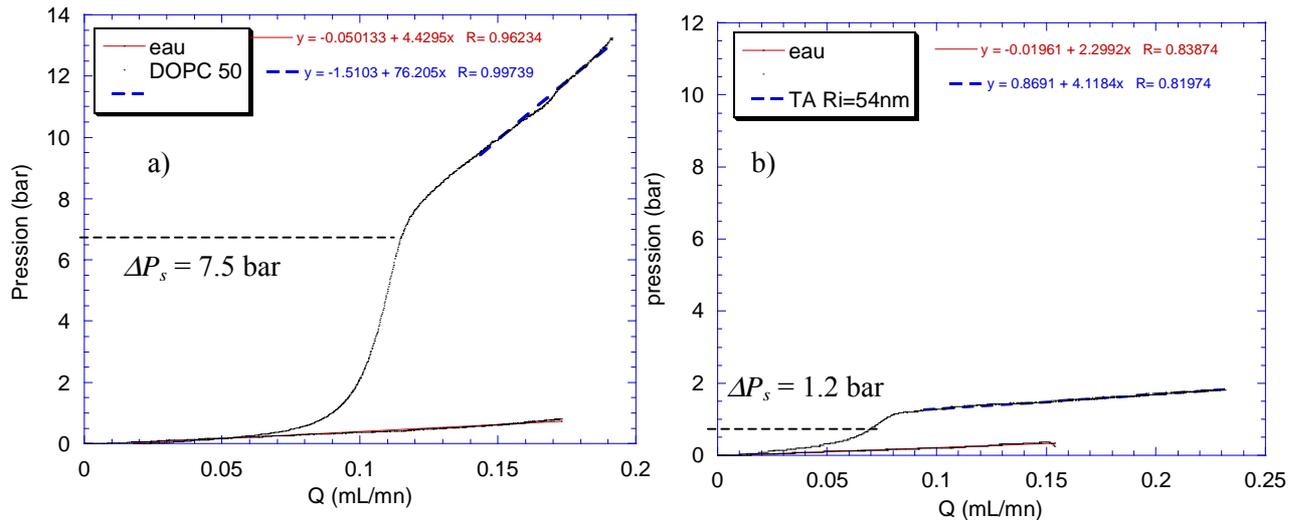


Figure 4-7 : Pression en fonction du débit pour une extrusion à travers deux membranes $R_p=15\text{nm}$, avec une rampe d'accélération : $0.01\text{mL}/\text{mn}^2$, a) pour des vésicules de DOPC 50, b) pour des vésicules de tensioactifs

Le cas de l'extrusion des vésicules à travers des grands pores $R_p=100\text{nm}$, est illustré sur la Figure 4-8 pour des vésicules de lipides EPC 50 et une rampe d'accélération $1\text{mL}/\text{mn}^2$. Bien que le rayon initial des vésicules soit plus faible que le rayon des pores ($R_i=64\text{nm}$) on remarque la présence d'une pression seuil très faible : $\Delta P_s \approx 0.15 \text{ bar}$. Le facteur de Poiseuille relatif est égal à $a_{\text{eff}}/a=2.3 \text{ bar.mn/mL}$

La Figure 4-9 présente un exemple d'extrusion de vésicules de lipides à travers les plus petit pores disponibles de rayon 5nm . Pour ces très petits pores, il existe une pression seuil importante même pour l'eau ($\Delta P_{\text{eau}} \approx 12 \text{ bar}$). Ceci est certainement dû à la présence de poussières. On soustrait cette valeur à la pression seuil de la courbe d'extrusion des vésicules ΔP_{ves} pour obtenir la pression seuil uniquement due au passage des vésicules, soit $\Delta P_s = \Delta P_{\text{ves}} - \Delta P_{\text{eau}} \approx 28 \text{ bar}$. C'est cette valeur qui différencie le plus une courbe obtenue pour des petits pores d'une courbe caractéristique des gros pores $R_p=100\text{nm}$, puisque ΔP_s est ici vingt fois supérieure à la valeur correspondante de la Figure 4-8, obtenue pour $R_p=100\text{nm}$. En revanche le facteur de Poiseuille relatif varie peu par rapport aux grands pores : $a_{\text{eff}}/a=3.5 \text{ bar.mn/mL}$. Notons toutefois que ces dernières valeurs ne sont pas directement comparables puisque l'accélération de la rampe n'est pas la même dans les deux cas.

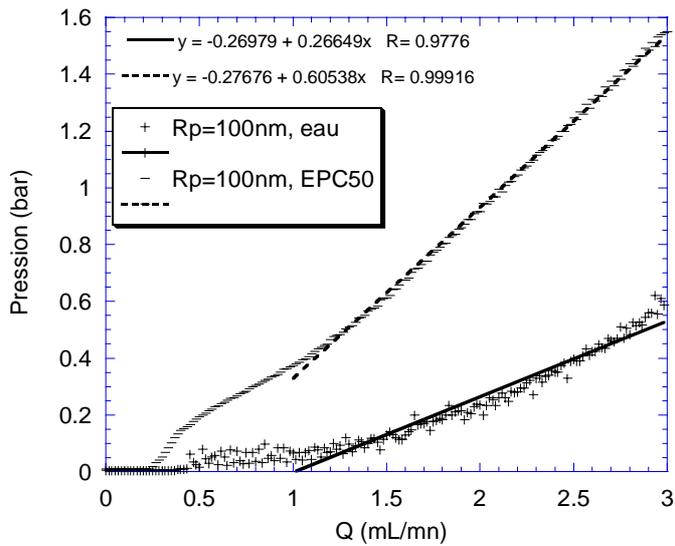


Figure 4- 8: Pression en fonction du débit, pour une extrusion à travers des pores de rayon 100nm de vésicules EPC 50 avec une rampe d'accélération de 1 mL/mn², et à travers

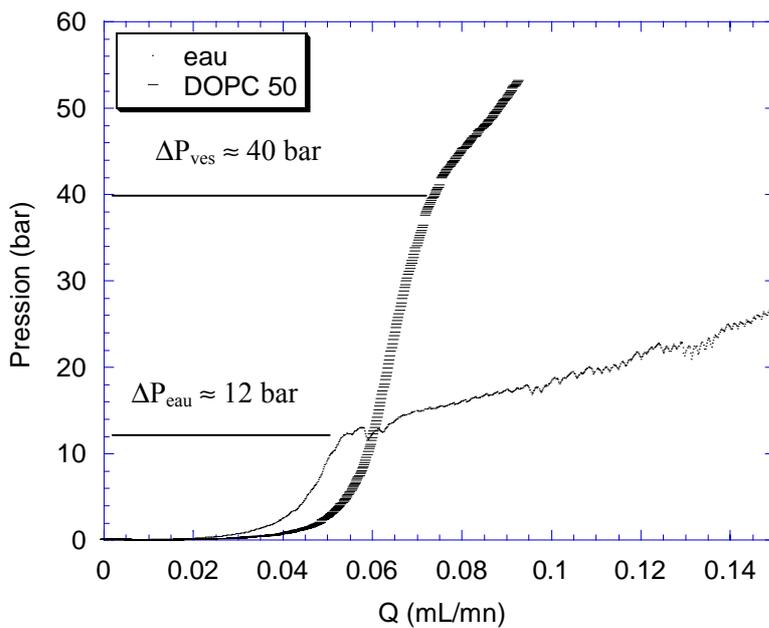


Figure 4-9 : Pression en fonction du débit, pour l'extrusion de vésicules DOPC 50 à travers une membrane $R_p=5\text{nm}$, avec une rampe d'accélération 0.01mL/mn²

4.3 Pression seuil: effets d'entrée

Nous avons tracé une quarantaine de courbes débit-pression pour l'extrusion de lipidiqes de natures différentes (DOPC, SOPC et EPC) et de tensioactifs, en variant les rayons des vésicules initiales R_i et les rayons de pores R_p de 5m à 100nm. Il apparaît à chaque fois une pression seuil. L'effet de la taille des pores a été particulièrement étudié sur les vésicules de lipides. Les résultats des vésicules de tensioactifs permettent, en comparaison, de quantifier l'influence des propriétés élastiques de la bicouche sur les effets d'entrée.

4.3.1 Effet de la taille des pores

Les valeurs mesurées de la pression de seuil sont assez dispersées d'une membrane à l'autre pour un même rayon nominal de pore, mais malgré cela, on observe très nettement une augmentation de cette grandeur lorsque le rayon de pore diminue. Sur la Figure 4-10 les valeurs expérimentales de ΔP_s sont représentées en échelle logarithmique, en fonction du rapport du rayon des pores sur le rayon des vésicules R_p / R_i , pour des vésicules de lipides différents. Nous avons choisi cette représentation car les points expérimentaux semblent s'aligner sur une courbe maîtresse. Cette courbe, en représentation logarithmique, peut être paramétrée par l'équation d'une droite avec un changement de pente à $R_p / R_i = 0.5$. Dans la gamme des grands pores la pente est de -3.3 ± 1.0 , et dans la gamme des petits pores, la pente est de -1.3 ± 0.8 . Malgré une dispersion assez importante, les facteurs de corrélation des droites ajustées avec les valeurs sont assez bons : 0.94 sur 14 points pour les petits pores et 0.92 sur 7 points pour les gros pores.

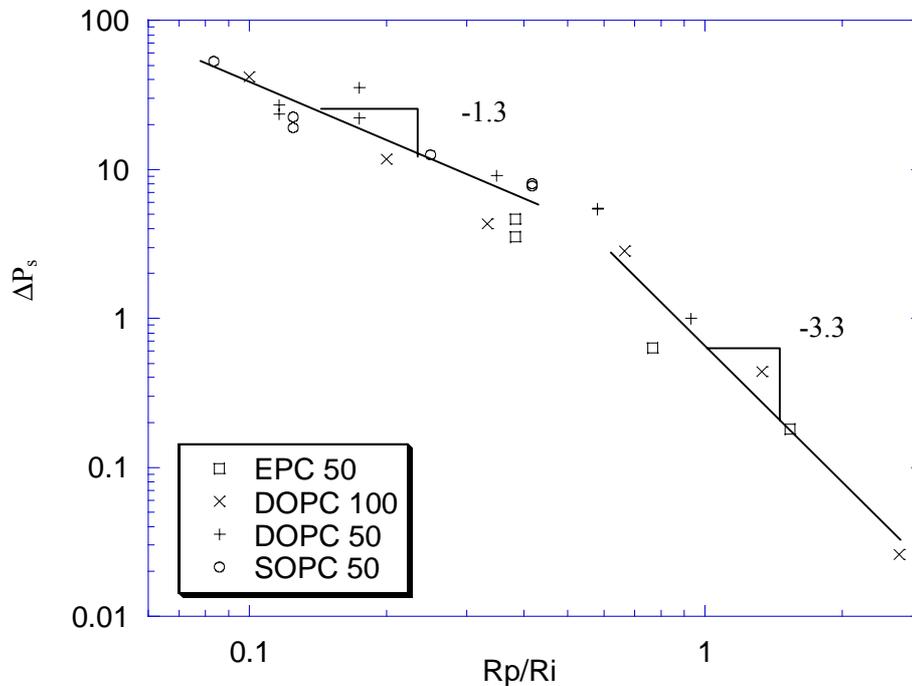


Figure 4-10 : Pression seuil en fonction de la taille des pores, valeurs logarithmiques, pour des vésicules de lipides de taille initiale $R_i=75\text{nm}$ (DOPC100) ou $R_i=45-60\text{nm}$ (lipides 50).

Comparons tout d'abord quelques unes de ces valeurs à celles obtenues par B. Frisken. La plupart de ses expériences d'extrusions ont été réalisées avec des rayons de pores de 50nm. Pour cette valeur de R_p , nous obtenons une pression seuil de $\Delta P_s = 2.8\text{bar}$ pour les vésicules DOPC 100. Pour des vésicules de DOPC passées plusieurs fois à travers les pores, B. Frisken mesure une valeur un peu plus élevée $\Delta P_s=4.5\text{ bar}$. Comme elle fait passer ces vésicules à travers deux membranes Nuclépore

superposées, ceci a théoriquement pour effet de doubler la longueur des pores et donc la pression. Mais l'effet de la longueur des pores sur la pression seuil n'est sûrement pas si simple, et nous ne l'avons pas étudié. Quoiqu'il en soit nous retenons que nos valeurs de pressions seuil sont du même ordre de grandeur que celles mesurées par B. Frisken.

Comparons maintenant ces résultats aux prédictions théoriques présentées dans le Chapitre 2.5.2. Rappelons que d'après celles-ci, si la déformation de la bicouche est le phénomène limitant pendant l'entrée des vésicules, alors la pression seuil dépendra de la rigidité de courbure et évoluera en $1/R_p^3$. en revanche, si les vésicules doivent rompre leur bicouche pour entrer dans les pores, alors la pression seuil sera proportionnelle à la tension de lyse et à $1/R_p$. Si on reprend les résultats obtenus pour les grands pores et qu'on représente cette fois-ci $\ln(\Delta P_s)$ en fonction de $\ln(R_p)$ (Figure 4-11 b)), on trouve une pente moyenne de égale à -3.2 ± 1 , ce qui est compatible avec une interprétation en terme de courbure des bicouches. Pour les petits pores, la pente moyenne est de -1.2 ± 0.5 , proche de la valeur théorique si le phénomène de rupture des bicouches est prédominant (Figure 4-11 a)). Ces résultats nous indiquent une interprétation possible pour l'entrée des vésicules dans les pores : les vésicules courbent leur bicouche $R_p / R_i > 0.5$, et rompent la bicouche pour $R_p / R_i < 0.5$. Nous n'avons pas d'explication particulière pour cette valeur de 0.5 correspondant à la transition entre le régime de rupture et celui de courbure.

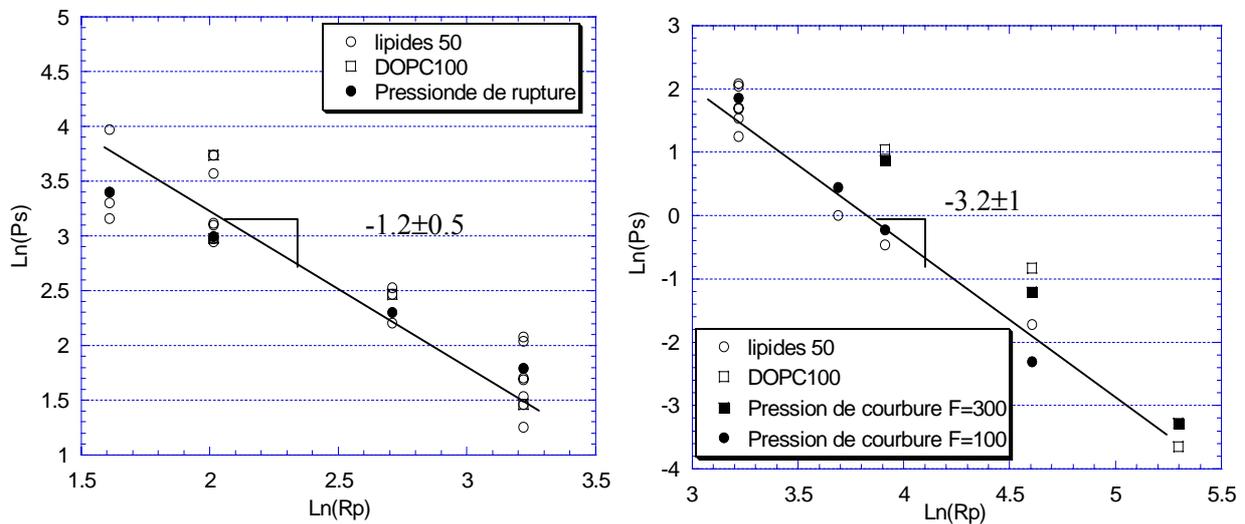


Figure 4-11 : a) Pression seuil en fonction du rayon des pores pour des lipides 50 et 100, comparé à des valeurs théoriques de pression de rupture calculée avec une tension de lyse de 7.5mN/m. b) Pression seuil des lipides 50 et 100, comparée à des valeurs théorique de pression de courbure calculée avec une facteur multiplicatif de F=100 pour se rapprocher des données des lipides 50 et F=300 pour les lipides 100

Dans la gamme $R_p / R_i > 1$, les vésicules sont plus petites que les pores et elles ne devraient pas avoir à se déformer pour pénétrer à l'intérieur. Pourtant on mesure encore une pression seuil pour $R_p / R_i \geq 2$. Les déformations des vésicules sont alors certainement dues à leur encombrement à l'entrée des pores.

Cette interprétation est basée sur une observation expérimentale de lois de puissance. Nous pouvons aussi analyser les valeurs numériques des pression de rupture ΔP_r et de courbure ΔP_c . Sur la Figure 4-11, on compare les valeurs expérimentales de pression seuil aux valeurs théoriques de pression de rupture aux petits pores $\Delta P_r = 2\sigma_l / R_p$, et à celles de la pression de courbure $\Delta P_c = F \kappa_c / R_p^3$ aux grands pores. Les valeurs théoriques de pression de rupture concordent bien avec les valeurs expérimentales des petits pores (Figure 4-11 a)) pour une tension de lyse égale à $\sigma_l = 7.5$ mN/m. Cette valeur est comprise entre les valeurs $\sigma_l = 5.5$ mN/m et $\sigma_l = 9$ mN/m trouvées dans les littératures pour le SOPC (102) et (103), ainsi que pour le DOPC $\sigma_l = 10$ mN/m (103).

	Module de courbure κ_c ($\times 10^{-19}$ J)	Tension de lyse σ_l (mN/m)
EPC	2.3 (104) 0.4 (105) 1-2.1 (106) 1.15 \pm 0.15 (107)	
DOPC	0.85 \pm 0.10 (108)	10 (103)
SOPC	0.9 (109) 0.9 \pm 0.06 (108)	5.5 (110) 9 (103)
SOPC/Chol (30%)	2.46 (109)	15-20 (110)
SDS/octanol/ Myrj	$\approx 0.12 \pm 0.04$ (99)	

Tableau 4-1 : Valeurs de modules de courbure et de tension de lyse pour des lipides de différentes nature.

Pour calculer la valeur théorique de la pression de courbure $\Delta P_c = F \kappa_c / R_p^3$ il faut choisir une valeur de module de courbure parmi ceux proposés par la littérature (Tableau 4-1). Nous prenons $\kappa_c = 10^{-19}$ J et nous ajustons la valeur du facteur multiplicatif F pour avoir une bonne concordance avec les valeurs expérimentales. Pour les vésicules de DOPC100 $F=300$, et pour les vésicules de lipides50 (EPC et DOPC) $F=100$. Dans la littérature, on trouve plusieurs facteur F théoriques : $F=8$ (110) lorsque la vésicule est beaucoup plus grande que le pore, et $F=55$ ou $F=135$ lorsque le rapport

R_i/R_p est égal à 6 ou 3 (60). Les valeurs de F trouvées ici sont un peu plus élevées que ces valeurs théoriques, et elles diminuent avec le rayon des vésicules, ce qui contredit les calculs de Evans. Mais étant donné la dispersion de nos valeurs expérimentales et de celles de la littérature (le module de courbure varie entre 0.4 et 2.3 10^{-19} J), l'écart observé n'est relativement pas très important.

Toutefois il pourrait être expliqué par les faibles rayons des vésicules étudiées, et les rayons de courbure encore plus faibles. Si on se réfère aux calculs de Gennes et Taupin qui préconisent que κ_c proportionnelle diminue avec le logarithme de l'échelle de taille, nous pouvons évaluer l'écart entre le module de courbure pour une vésicule de rayon R' (par exemple 50nm) et une vésicule géante de rayon R (50 μ m) (Eq 2-13) :

Eq 4-3
$$\kappa_c(R') = \kappa_c - \frac{3}{4\pi} k_B T \ln(R'/R)$$

Pour une échelle de taille mille fois plus petites que les vésicules géantes, la rigidité de courbure ne serait modifiée que de 10%, et ne permet donc pas d'expliquer les valeurs assez fortes de $F \kappa_c$ que nous mesurons:

$$\kappa_c' = (10 + 1.7) k_B T$$

4.3.2 Effet de la nature de la bicouche

Les modules élastiques des bicouches dépendent fortement de la nature chimique des molécules qui la composent. Par exemple, on sait depuis longtemps que la présence de cholestérol dans une bicouche de lipides a pour effet de la rigidifier, alors que les bicouches de tensioactifs sont beaucoup plus flexibles que celles de lipides. Nous avons donc comparé les pressions seuil pour des vésicules de tensioactifs et de lipides, avec ou sans cholestérol, et nous avons confronté ces résultats aux modules de courbure et aux tensions de lyse correspondant donnés par la littérature.

a) Nature des lipides et effet du cholestérol

Sur la Figure 4-12 sont représentées les valeurs expérimentales de ΔP_s en fonction de R_p / R_i pour des vésicules de SOPC 50 et DOPC 50 pur ou avec 30% de cholestérol incorporé dans la bicouche, uniquement pour les petits pores. Ces résultats sont comparés aux valeurs théoriques de la pression de rupture (cf. Tableau 4-1) pour des bicouches de SOPC pur et avec 30% de cholestérol.

On n'observe aucune différence entre les valeurs expérimentales des pressions seuil des vésicules de DOPC50 avec ou sans cholestérol. Pourtant, la présence de cholestérol provoque un écart important entre les valeurs de pression de rupture théorique. La qualité du cholestérol que nous avons utilisé est peut-être en cause. Il est possible que le cholestérol ait été partiellement oxydé lorsque nous l'avons utilisé, et que ses propriétés rigidifiantes soient altérées.

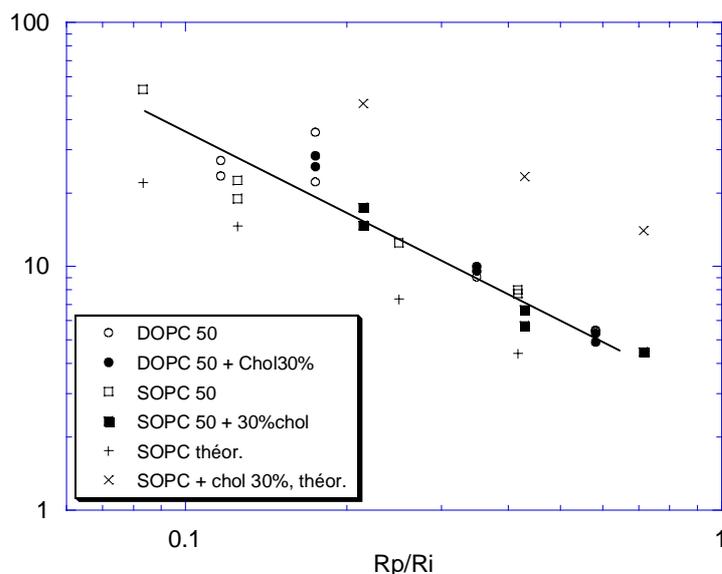


Figure 4-12: Pression seuil en fonction du rayon des pores, dans la gamme 7.5-25nm. Valeurs expérimentales pour des vésicules de DOPC50 et de SOPC 50 pur ou avec du cholestérol à 30%. Valeurs théoriques de la pression de rupture pour une bicouche de SOPC avec ou sans cholestérol.

b) Lipides/tensioactifs

Nous avons extrait les valeurs de pression seuil de sept courbes débit-pression réalisées pour des vésicules de tensioactifs de différents rayons R_i . Ces mesures sont représentées en fonction de R_p / R_i sur la Figure 4-13, et y sont comparées à celles obtenues pour les lipides. On retrouve bien le même comportement que pour les vésicules lipidiques: une relation linéaire avec un changement de pente vers $R_p / R_i = 0.5$. Si on regarde plus précisément les valeurs numériques on remarque que les pressions seuils sont plus faibles pour les vésicules de tensioactifs que pour les vésicules de lipides.

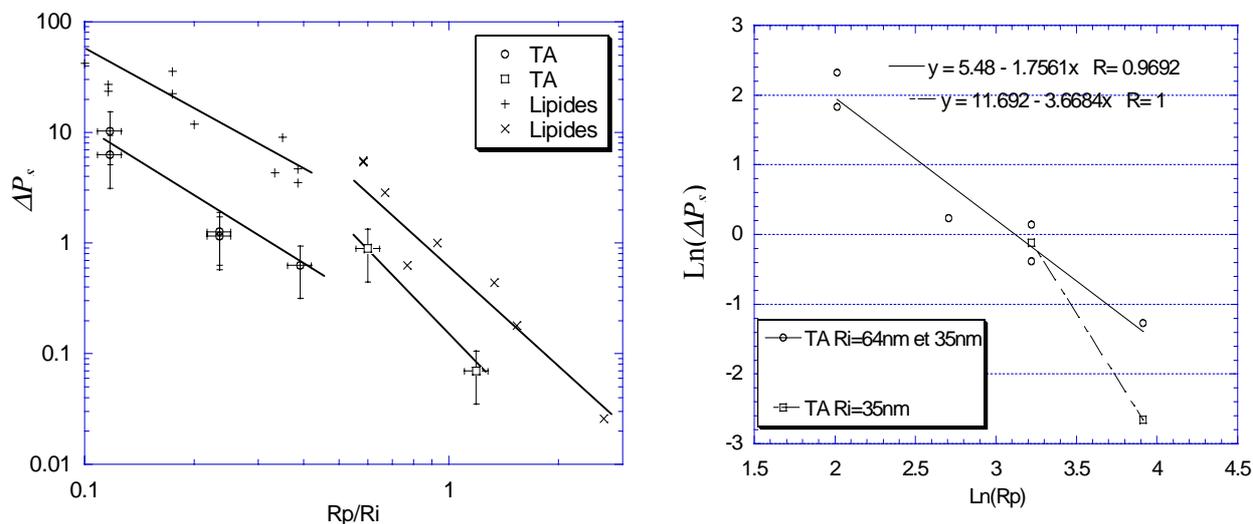


Figure 4-13 : Pressions seuil en fonction du rayon des pores pour des vésicules de tensioactifs de rayon initial $R_i=55\text{nm}$, et $R_i=65\text{nm}$, et les vésicules de DOPC100

L'écart se resserre un peu pour les petits pores. Nous pouvons déduire de ces résultats les valeurs numériques de la tension de lyse et du module de courbure pour ces vésicules de tensioactifs. Pour cela nous représentons $\text{Ln}(\Delta P_s)$ en fonction de $\text{Ln}(R_p)$ (Figure 4-13 b)). Pour les deux valeurs correspondant à $R_p / R_i > 0.5$, le rapport des pressions seuil est environ de 5.2 ± 4 , ce qui représente la moitié du rapport des modules de courbure (cf Tableau 4-1). Compte tenu de la faible précision des mesures, nous pouvons simplement en conclure que les ordres de grandeurs sont en accord avec ce que l'on attendait. Pour les petits pores (de 7.5nm à 25nm) les pressions de seuil des vésicules de lipides sont environ 5.4 fois plus élevées que celles de vésicules de tensioactifs. On en déduit la tension de lyse des vésicules de tensioactifs : $\sigma_l \approx 1.4 \pm 1 \text{ mN/m}$. Pour les vésicules de tensioactifs plus perméables à l'eau, et plus "fragiles", il semble naturel d'obtenir une tension de lyse plus faible que pour les vésicules de lipides.

4.4 Facteur de Poiseuille relatif.

A partir des courbes débit-pression, qui nous ont déjà servi à déterminer les valeurs des pressions seuils, nous avons aussi mesuré les facteurs de Poiseuille relatifs a_{eff}/a . Comme nous l'avons souligné en introduction de ce chapitre, ces valeurs dépendent de la nature des bicouches. Pour les vésicules de tensioactifs nous n'observons aucune dépendance particulière de cette valeur en fonction des paramètres de l'extrusion (R_p , accélération de la rampe de débit...), ce qui n'est pas le cas des vésicules de lipides. En ce qui concerne ces dernières, nous montrerons que ce comportement est dû à d'autres phénomènes parasites, comme la présence d'une couche d'accumulation en amont des pores ou l'adsorption des lipides sur la paroi des membranes. Pour les deux systèmes de vésicules, les valeurs expérimentales sont confrontées aux résultats théoriques de Bruinsma. Nous commencerons donc par calculer les valeurs analytiques de a_{eff}/a d'après les équations de Bruinsma. Nous présenterons ensuite les résultats concernant les vésicules de tensioactifs pour lesquels les effets sont relativement plus simples à interpréter. Puis nous proposerons des interprétations pour les résultats observés avec les vésicules de lipides.

4.4.1 Evaluation du facteur de Poiseuille relatif selon la loi de Bruinsma

Bruinsma suppose que dans un pore étroit, la vésicule prend la forme d'un sphérocyindre de rayon R_p décrit au Chapitre 2.5.2 c). L'expression théorique de a_{eff}/a donnée par l'Eq 4-2 dépend des dimensions de ce sphérocyindre, du nombre de vésicules par pore et du rayon du pore. Pour calculer les valeurs théoriques de a_{eff}/a il est donc nécessaire de pouvoir évaluer la longueur du sphérocyindre L^* et le nombre de vésicules par pores n . La longueur du sphérocyindre est calculée

d'après la surface S des vésicules finales après extrusion. On suppose que, en sortant des pores, les vésicules passent de la forme de sphérocyindre à leur forme sphérique finale en se gonflant d'eau à surface constante, car les vésicules de lipides sont peu extensibles. Le rayon final des vésicules R_f est connu grâce aux techniques de diffusion de rayonnement, et les valeurs sont répertoriés dans le Chapitre 5 (valeurs du Graphique 5-2 a) pour les vésicules lipidiques). Il n'y a plus qu'à en déduire L^* .

$$\text{Eq 4-4} \quad 4\pi R_f^2 = 4\pi R_p^2 + 2\pi R_p L^* = S$$

Le nombre de vésicules par pore est obtenu en divisant le volume de lipides contenus dans un pore V_{lip} par le volume de la bicouche d'un sphérocyindre contenu dans ce pore V_s . On suppose que les lipides ont la même densité que l'eau, et donc que la concentration massique en bicouche est égale à la concentration volumique. Nous verrons au Chapitre 5 que la concentration des vésicules n'est pas la même à la sortie des pores que dans les échantillons avant extrusion. Il faut tenir compte du phénomène de rétention des vésicules en amont de la membrane. V_{lip} est donc obtenu en multipliant le volume du pore par la concentration de lipides dans l'échantillon initial (0,1%), et par le pourcentage de vésicules éluées à travers la membrane E , (cf Chapitre 5.1.1.2).

$$\text{Eq 4-5} \quad V_{lip} = 0.001 \times E \times \pi R_p^2 L_p$$

On obtient ainsi le nombre de vésicules par pore et par unité de longueur :

$$\text{Eq 4-6} \quad n = \frac{V_{lip}}{S \times L \times L_p}$$

Les valeurs théoriques de a_{eff}/a , qui peuvent maintenant être calculées d'après Eq 4-2, les longueurs de sphérocyindre et le nombre de vésicules par pores sont reportées sur le Tableau 4-2, pour les rayons finaux R_f mesurés après extrusion des vésicules de DOPC (cf Chapitre 5).

R_p (nm)	50	40	25	15	7.5	5
R_f (nm) DOPC100	63,9	71	56,5	42	35	43
L^* (nm) DOPC100	74,1	189,3	231	245	434	1226
$n L_p$ DOPC100	0,209	0,106	0,0654	0,0399	0,01417	0,00429
a_{eff}/a DOPC100	1,000	1,002	1,006	1,012	1,100	2,537
a_{eff}/a TA	1,001		1.028	1.078	2.18	

Tableau 4-2 : Valeurs théoriques du Facteur de Poiseuille relatif, calculées d'après la loi de Bruinsma et grâce à des valeurs expérimentales de rayon final des vésicules après extrusion (cf Chapitre 5).

Nous avons aussi effectué les mêmes calculs pour des vésicules de tensioactifs à partir des rayons R_f expérimentaux (cf Chapitre 5), mais nous ne faisons figurer sur ce tableau que les valeurs finales de a_{eff}/a . Le Tableau 4-2 nous indique que, pour les deux types de vésicules, le facteur de Poiseuille relatif théorique augmente très légèrement quand R_p diminue. Toutefois il reste égal à 1.0 sur une très large gamme de pores. En fait, pour que cette théorie prévoit des effets significatifs, il faudrait utiliser des concentrations de lipides de plus de 100mg/mL. A ces concentrations, les vésicules interagissent et sont multilamellaires.

4.4.2 Résultats et discussion

a) Vésicules de tensioactifs

Les valeurs de a_{eff}/a mesurées pour les vésicules de tensioactifs sont reportées sur la Figure 4-14 en fonction de R_p . A part une valeur à 6.8 pour $R_p=5nm$, elles sont toutes comprises entre 1 et 2.6 sans variation particulière avec le rayon des pores ni le rayon initial. Les valeurs théoriques correspondantes, calculées d'après la loi de Bruinsma sont rappelées sur ce graphique (Tableau 4-2).

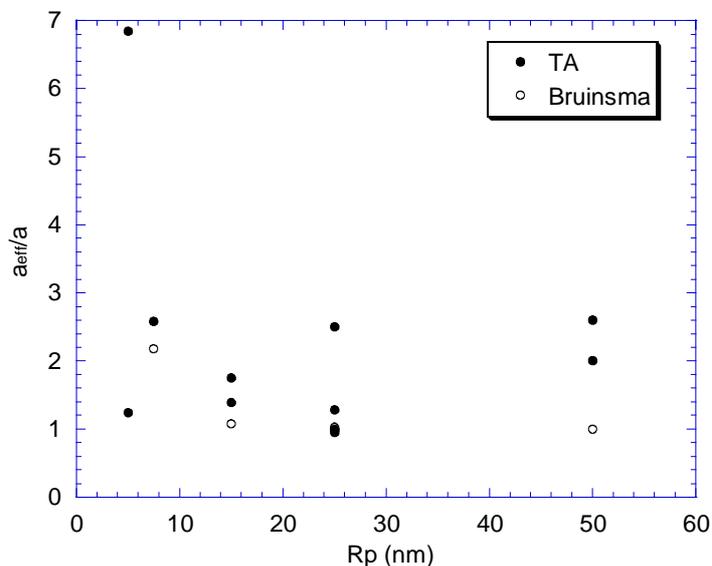


Figure 4-14 : Facteur de Poiseuille relatif en fonction du rapport taille des pores sur taille de vésicules initiales.

Les valeurs expérimentales un peu plus élevées que celles calculées d'après Bruinsma peuvent être expliquées par un allongement raisonnable de la vésicule dans le pore. Par exemple, le plus gros écart par rapport aux valeurs théoriques est observé pour $R_p=50nm$, la valeur $a_{eff}/a=2.6$ (au lieu 1.001) peut être retrouvée numériquement pour une longueur du sphérocyindre de $L^*=780nm$ (au lieu de $L^*=70nm$). Le rayon du sphérocyindre serait alors de 11nm, à peu près égale à cinq fois l'épaisseur de

la bicouche. Physiquement, une telle extension de la vésicule est possible. En revanche, avec une distance de la vésicule à la paroi du pore égale à 39nm les calculs de Bruinsma ne s'appliquent plus. Une autre raison serait que les vésicules s'écoulent moins vite que l'eau dans les pores, freinées par un peu d'adsorption ou encore par des obstacles (autres vésicules, aspérités ...), et que la concentration des vésicules dans les pores soit plus importantes qu'en solution.

En conclusion, on n'observe pas de différence très importante entre les valeurs expérimentales et les valeurs théoriques de Bruinsma. Il est donc possible que la théorie de Bruinsma s'applique pour les vésicules de tensioactifs, c'est-à-dire que les vésicules s'écoulent dans les pores sous la forme d'un sphérocyindre. Il est possible que cette forme soit un peu plus allongée que prévu.

b) Vésicules de lipides

Pour ces vésicules, l'accélération de la rampe de débit a un effet prépondérant sur a_{eff}/a . Nous montrons tout d'abord cet effet. Nous présentons ensuite les valeurs de a_{eff}/a obtenues avec les gammes de débits les plus étendues et les accélérations de rampes les plus élevées. Nous retrouvons alors des valeurs proches de celles mesurées pour les vésicules de tensioactifs et comparables aux prédictions théoriques. Nous présentons ensuite les valeurs obtenues pour les accélérations les plus faibles 0.01 mL/mn^{-2} . Nous pourrions commenter aussi leur variation avec R_p/R_i .

Evolution en fonction de l'accélération de la rampe

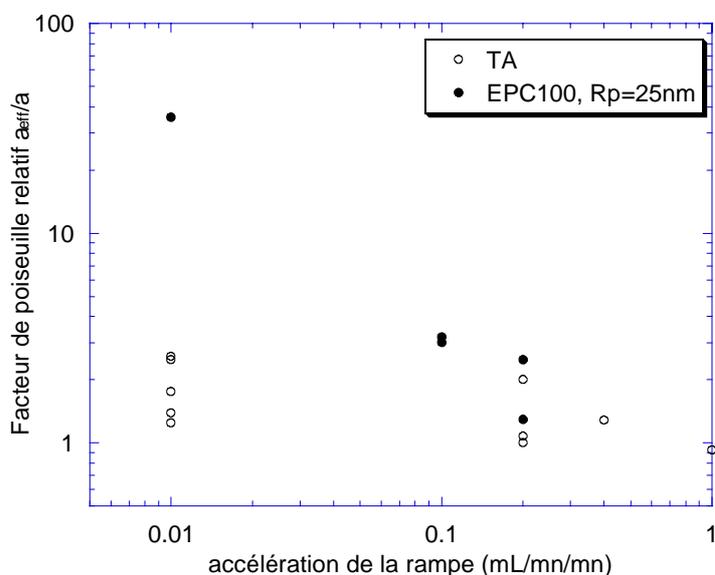


Figure 4-15: Facteurs de Poiseuille relatifs a_{eff}/a en fonction de l'inverse de l'accélération de la rampe, pour des vésicules EPC100 extrudées à travers des membranes $R_p=25\text{nm}$, et pour des vésicules de tensioactifs, de rayons (de pores ou de vésicules) différents.

Sur la Figure 4-15 nous avons tracé les facteurs de Poiseuille relatifs pour l'extrusion de les vésicules EPC 100 extrudées à travers des pores de rayon $R_p=25\text{nm}$ en fonction de l'accélération des

rampes de débit. Nous observons l'effet important de la diminution de l'accélération de la rampe, ici de $0.2\text{mL}/\text{mn}^2$ à $1\text{mL}/\text{mn}^2$ sur le facteur a_{eff}/a puisque celui est alors multiplié par 100. Pour les accélérations les plus grandes, les valeurs de a_{eff}/a se rapprochent de 1, c'est-à-dire la valeur théorique. Mais plus le passage des vésicules dans les pores est lent et plus la pression est anormalement élevée.

La deuxième série correspond à des vésicules de tensioactifs pour différents rayons initiaux et des rayons de pores variés (rappel: a_{eff}/a est indépendant de R_i et R_p pour les vésicules de tensioactifs). Nous vérifions l'absence de variation du facteur de Poiseuille relatif a_{eff}/a avec la rampe de débit pour ces vésicules.

Accélérations de rampe élevées

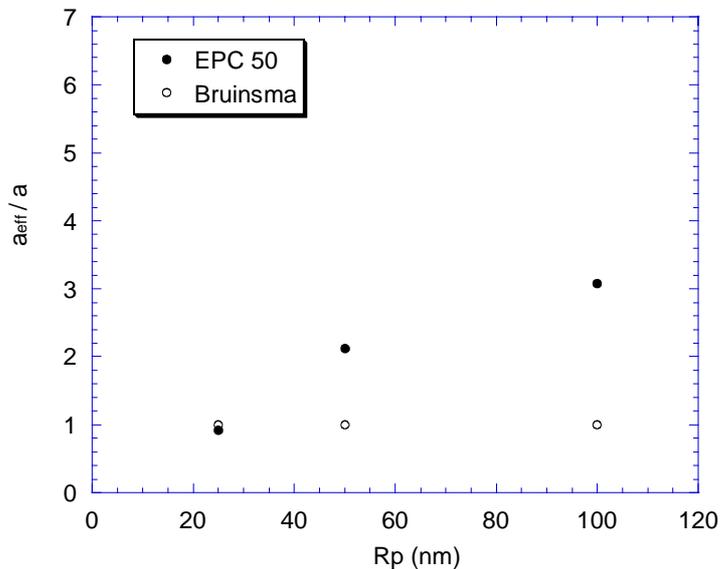


Figure 4-16: Facteurs de Poiseuille relatifs a_{eff}/a pour des vésicules de EPC 50, en fonction de R_p pour une accélération de rampe de $1\text{mL}/\text{mn}^2$

Sur la Figure 4-16, nous avons reporté les valeurs de a_{eff}/a pour l'accélération de rampe maximale $1\text{mL}/\text{mn}^2$, pour des vésicules EPC 50, en fonction du rayon des pores. Ces valeurs expérimentales sont comparées aux valeurs théoriques correspondantes. Nous remarquons tout d'abord que les points expérimentaux et théoriques sont du même ordre de grandeur, et d'autre part que le facteur que les valeurs expérimentales ont tendance à augmenter (et ainsi à s'éloigner des valeurs théoriques) lorsque le rayon des pores augmente. Ce comportement n'est observé que sur trois points, néanmoins nous le retrouvons pour les faibles accélérations.

Faibles accélérations

Une grande majorité des expériences d'extrusion ont été réalisées avec les accélérations de rampe les plus faibles: 0.01 mL/mn^2 . En faisant varier le débit le plus lentement possible, nous espérons nous placer dans des conditions très proches de l'équilibre thermodynamique. Les valeurs du facteur de Poiseuille relatif correspondant à ces expériences sont reportées sur la Figure 4-17 en échelle logarithmique. Nous avons représenté a_{eff}/a en fonction du rapport R_p/R_i car là encore, dans cette représentation, les points se superposent sur une courbe maîtresse. Malgré la dispersion des résultats, on peut dégager une évolution en fonction du rapport de confinement R_p/R_i . Les valeurs sont maximales lorsque la taille des pores est un peu supérieure à la moitié de la taille des vésicules initiales : $R_p/R_i \approx 0.6$. De très nombreuses expériences nous montrent que a_{eff}/a a tendance à diminuer lorsque le rayon des pores devient inférieur à $0.6 R_i$, alors que quelques résultats indiquent que le facteur de Poiseuille relatif diminue aussi quand le rayon des pores devient égal ou supérieur au rayon initial des vésicules. Nous remarquons que le changement de variation s'effectue pour $R_p/R_i=0.6$, très proche du rapport $R_p/R_i=0.5$ de changement de comportement pour la pression seuil.

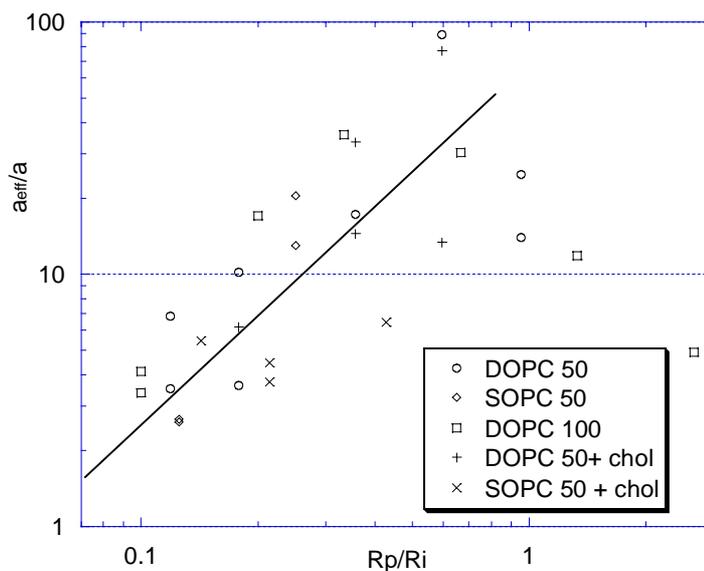


Figure 4-17 : Facteurs de Poiseuille relatifs a_{eff}/a pour des vésicules de lipides de natures différentes, en fonction du rapport de taille R_p/R_i , pour une accélération de rampe de 0.01 mL/mn^2

4.4.3 Hypothèses pour les résultats obtenues avec les vésicules de lipides

a) Elongation des vésicules en très long filament dans les pores

Dans l'hypothèse où le facteur de Poiseuille relatif ne décrit pas d'autre phénomène que le transport des vésicules dans des pores étroits, prédit par Bruinsma, il est intéressant de tenter de raccorder les valeurs expérimentales à la théorie, en ajustant la longueur L^* du sphérocyindre, comme nous l'avons fait pour les vésicules de tensioactifs. Si la vésicule étirée est beaucoup plus fine que le pore, sa longueur peut s'accroître considérablement.

A partir des valeurs expérimentales de a_{eff}/a obtenue avec les vésicules de DOPC 100, nous en avons déduit la longueur L^* correspondante, en supposant que la surface du sphérocyindre restait toujours égale à $4\pi R_f^2$. Les résultats de ce calcul sont reportés dans le Tableau 4-3.

R_p (nm)	100	50	25	15	7.5	5
L^* (nm)	150	4000	4000	2500	1200	1600

Tableau 4-3 : Longueur du sphérocyindre, calculé pour chaque rayon de pore, d'après les facteurs de Poiseuille relatifs mesurés pour les vésicules de DOPC 100.

Les valeurs de L^* sont les plus grandes pour les rayons de pores $R_p=50$ et 25 nm, elles atteignent alors presque la longueur totale du pore. Il est concevable que des vésicules soient étirées ou qu'elles s'alignent bout à bout dans les pores sur une telle longueur, mais il est étrange que cette longueur diminue avec le rayon des pores dès que $R_p < 25$ nm. En effet dans les pores les plus fins, les vésicules sont naturellement amenées à s'étirer plus que dans les grands pores. En outre, lorsque les vésicules sont étirées sur une longueur de $4\mu\text{m}$, le rayon du sphérocyindre est alors de 2 nm (calculé par conservation de la surface avec la vésicule de rayon final). Non seulement un tel rayon est inconcevable car il est inférieur à l'épaisseur de la bicouche, mais en plus il est très inférieur au rayon du pore, et la relation de Bruinsma n'est plus valable.

Il apparaît donc que l'élongation des vésicules n'est pas une raison suffisante pour expliquer le grand écart observé avec les valeurs théoriques.

b) Accumulation des vésicules en amont de la membrane

Des expériences antérieures étudiant l'extrusion de polymères à travers des membranes poreuses similaires ont mis en évidence une couche d'accumulation en amont des pores [Guillot, 1986 #9]. Des polymères trop gros pour passer instantanément dans les pores sont bloqués à leur entrée pendant un certain temps. Si dans nos expériences, une telle couche d'accumulation se forme à l'entrée des pores, les vésicules compactées peuvent gêner l'écoulement. Il pourrait en résulter une perte de charge qui s'ajouterait à la pression trans-membranaire.

Cette supposition concorde bien avec la variation du facteur de Poiseuille relatif, aussi bien en fonction de l'accélération de la rampe qu'en fonction du rapport R_p / R_i . En effet il est logique de penser que plus la durée d'une rampe de débit sera importante, et donc plus l'accélération sera faible, et plus les vésicules auront tendance à s'accumuler à l'entrée des pores. De même, à durée de rampe égale, un débit fort, et donc un cisaillement fort facilite la déformation des vésicules et leur entrée dans le pore. Inversement, une accélération plus faible, c'est-à-dire un débit maximal plus faible, entraînera moins efficacement les vésicules dans les pores. La formation et l'augmentation de l'épaisseur d'une couche d'accumulation est donc favorisée par une faible accélération.

Si on reprend cet argument basé l'aptitude des contraintes de cisaillement à déformer les vésicules, on comprend que pour une accélération donnée, la diminution du rayon des pores augmente le taux de cisaillement (d'après Eq2-1), et donc favorise l'entrée des vésicules dans les pores. Il semble assez logique alors, que le facteur de Poiseuille relatif, qui représente l'excès de pression par rapport à l'écoulement sans vésicules, diminue lorsque le rayon de pore diminue, en-dessous de $0.6 R_i$. Au delà de cette valeur, le rayon des pores n'est pas significativement inférieur au rayon des vésicules, et celles-ci ne sont plus vraiment « bloquées » par la membrane. N'oublions que pour des rayons de pores supérieurs à $0.5R_i$, les vésicules rentrent assez facilement dans les pores, par simple courbure de leur bicouche. Dans ce régime de pores larges, il semble normal que plus le rapport R_p / R_i est grand et plus les vésicules entrent facilement dans les pores.

c) Adsorption des lipides

Une autre hypothèse est que le bouchage des pores soit du à l'adsorption des lipides sur la paroi des pores. Le bouchage des pores provoque une diminution de la perméabilité de la membrane (c'est-à-dire une augmentation de a_{eff} / a). Si le bouchage est du à l'adsorption des lipides, il est possible d'amoindrir cet effet en adsorbant au préalable sur la membrane une couche de Bovine Serum Albumine. Cette protéine, la BSA, s'adsorbe de façon non spécifique sur les parois hydrophiles, et elle est couramment utilisée par les biophysiciens pour éviter l'adsorption des lipides. Pour mettre en évidence le phénomène d'adsorption, il suffit donc de comparer l'augmentation de la perméabilité du au passage des vésicules de lipides, dans le cas où les membranes sont préalablement traitées avec la BSA d'une part, et dans le cas où elles ne le sont pas d'autre part.

Estimation du rayon apparent avant et après extrusion des vésicules lipidiques

Nous supposons que le bouchage est uniquement du à l'adsorption des lipides sur la paroi des pores. On peut déduire de la valeur du facteur de Poiseuille mesurée avant le passage des vésicules a^{av} , un rayon de pores apparent noté R_p^{av} . De la même façon nous mesurons un rayon apparent après le passage des vésicules R_p^{ap} . L'épaisseur de la couche adsorbée est estimée en comparant ces deux

valeurs de rayon apparent des pores. La relation entre les rayons avant et après extrusion des vésicules, est donnée par:

$$\text{Eq 4-7} \quad a^{ap} / a^{av} = \left(R_p^{av} / R_p^{ap} \right)^4$$

Des mesures de rayons de pores ont été effectuées avant et après passage de 3mL de vésicules EPC50 0.1% pour différentes membranes de différents R_p . Les résultats sont reportés sur le Tableau 4-4. La plus grande épaisseur de couche de lipides adsorbés est observée pour un rayon de pore nominal de 100nm. Elle est de l'ordre de 40nm, soit 10 bicouches empilées. On remarque que lorsque le pore est large par rapport à la taille des vésicules, il n'y a quasiment pas d'adsorption: pour un rayon nominal de 500nm, la couche de lipides serait de 4nm, ce qui correspond à l'erreur de mesure.

	$R_p=500\text{nm}$	$R_p=100\text{nm}$	$R_p=50\text{nm}$	$R_p=25\text{nm}$
R_p^{av} (nm)	257	87	55	37
R_p^{ap} (nm)	253	49	33	22

Tableau 4-4: Rayons de pores pour différents types de membranes, avant et après le passage de 3mL passage de suspensions de EPC50 0.1%.

Diminution de la couche de lipides adsorbés par utilisation de la BSA

Pour éviter l'adsorption des lipides sur la paroi des pores nous traitons une membrane de rayon $R_p = 100\text{nm}$ avec de la BSA. Une solution de BSA à 5mg/mL est extrudée à 0.2mL/mn pendant 15mn à travers la membrane étudiée. La membrane est ensuite rincée à l'eau filtrée pendant 10mn (0.5mL/mn).

Des courbes représentant l'extrusion d'eau à débit constant, avant et après passage de vésicules EPC 100, sur des membranes préalablement traitées ou non, sont représentées sur la Figure 4-18.

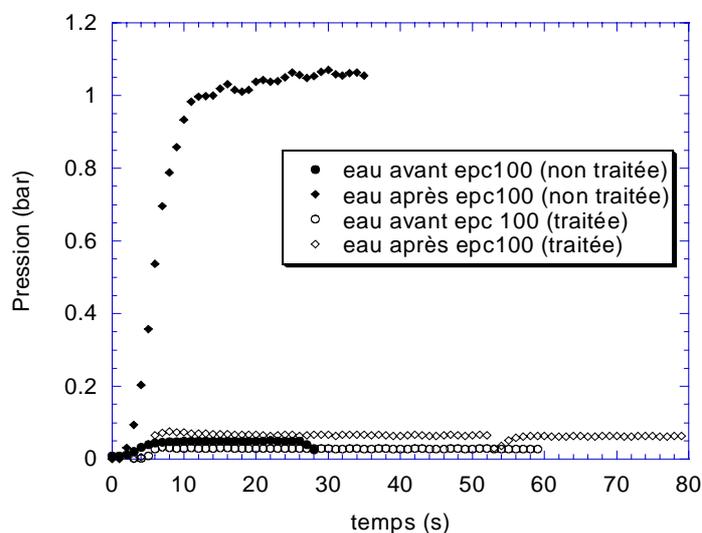
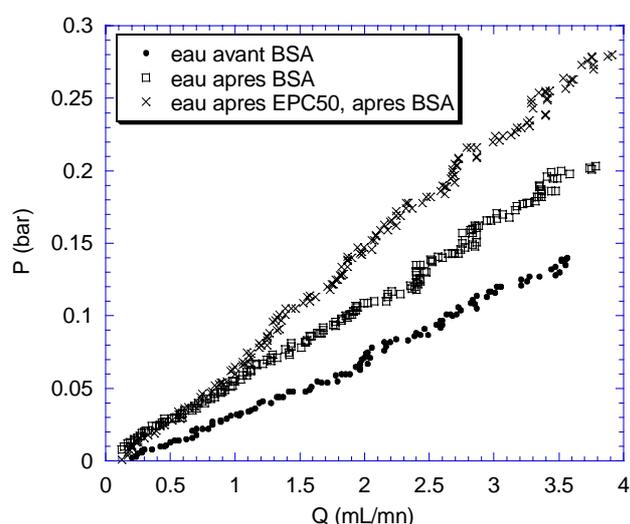


Figure 4-18 : Pression en fonction du temps, pendant l'extrusion d'eau à débit constant, $Q = 1\text{mL/mn}$, à travers une membrane $R_p=100\text{nm}$ non traitée à la BSA (\bullet) avant et (\blacklozenge) après le passage des vésicules. Et à travers une membrane $R_p=100\text{nm}$ préalablement traitée avec de la BSA (\circ) avant et (\diamond) après le passage des vésicules.

De nouveau, nous déterminons les valeurs de rayon apparent, avant et après passage de vésicules lipidiques, d'après des courbes de pression en fonction du débit (cf Figure 4-19). Les valeurs de rayons apparents sont reportés dans le Tableau 4-5. Après adsorption de la BSA et extrusion des lipides, on mesure, pour une membrane $R_p=100\text{nm}$, une couche d'adsorption de 13nm dont 8nm de lipides, soit 5 fois moins qu'avant le traitement à la BSA.



	Traitée	Non traitée
R_p avant BSA	89	87
R_p^{av} (nm)	84	
R_p^{ap} (nm)	76	49

Tableau 4-5: Rayons de pores apparents avant, après extrusion de la solution de BSA R_p^{av} (nm), et après le passage de la BSA et des vésicules R_p^{ap} (nm).

Figure 4-19 : Courbes débit-pression d'eau pour des rampes de 0 à 3mL/mn en 3mn avant et après traitement de la membrane $R_p=100\text{nm}$ à la BSA, et après passage des vésicules EPC50.

Discussion

L'adsorption des lipides sur les parois de polycarbonate n'est sûrement pas l'unique cause du bouchage des pores et des valeurs élevées de a_{eff}/a . Par conséquent les valeurs de rayons apparents mesurés d'après les valeurs de facteur de Poiseuille ne correspondent certainement pas à la réalité. Néanmoins ces résultats démontrent bien l'existence du phénomène d'adsorption, puisque que le traitement des membranes avec la BSA permet d'amoindrir considérablement la diminution de la perméabilité des membranes après le passage des vésicules. Dans la suite de la thèse, les membranes étudiées n'ont pas été traitées à la BSA. Dans l'interprétation des résultats il faut donc tenir compte du phénomène d'adsorption.

L'adsorption des lipides permet aussi d'expliquer l'augmentation du facteur de Poiseuille relatif lorsque l'accélération de la de débit. En effet, l'adsorption est d'autant plus importante que les vésicules s'écoulent lentement dans les pores, car l'adhésion d'une vésicule en mouvement le long d'une paroi est d'autant plus probable que sa vitesse est faible (71). En revanche le comportement du facteur de Poiseuille relatif avec R_p est moins évident. Plus le pore est fin et plus les vésicules sont confinées. On aurait donc tendance à penser qu'elles adhèrent plus à la paroi, ce qui devrait entraîner

un bouchage plus important des pores et une augmentation de la pression. Pourtant a_{eff}/a diminue quand le rayon des pores diminue. Toutefois, le taux de cisaillement, qui augmente lorsque R_p diminue, a tendance à décoller les vésicules des parois et à les entraîner.

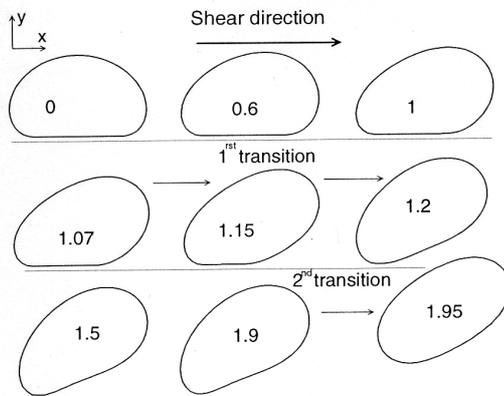


Figure 4-20 : Décollement d'une vésicule adhérant à une paroi, lorsque le taux de cisaillement de l'écoulement augmente (71).

FIG. 1. Stationary vesicle shape evolution under an increasing shear rate. (The numbers refer to typical shear rate values measured in units of 100 s^{-1} .)

La présence d'une couche d'accumulation à l'entrée des pores et l'adsorption des lipides sont les deux causes possibles pour les fortes valeurs du facteur de Poiseuille relatif pour les vésicules de lipides. Toutefois nous n'avons pu prouver directement le phénomène. Ces problèmes touchent plus les vésicules de lipides car les molécules de tensioactifs, beaucoup plus solubles que les lipides dans l'eau, s'adsorbent pas ou peu sur les parois solides. Les vésicules de tensioactifs sont aussi beaucoup plus déformables (rigidité de courbure et tension de lyse cinq fois plus faibles pour les vésicules lipidiques), et le phénomène d'accumulation des vésicules en amont des pores est peut-être moins important.

4.5 Conclusion

➤ Le montage que nous avons mis au point pour mesurer la pression en amont du filtre, pendant l'application d'une rampe de débit, permet d'obtenir des courbes débit-pression très précises. Ces courbes sont particulièrement sensibles aux effets d'entrée des vésicules dans les pores, visibles aux faibles débits ($Q < 0.5 \text{ mL/mn}$). En utilisant le capteur de pression de la pompe de chromatographie (capable de supporter des pressions de 400bars), il est possible de mieux caractériser la partie linéaire de la courbe aux débits élevés. Ces expériences nécessitent simplement des volumes d'échantillons plus importants.

➤ Les courbes de débit-pression montrent l'existence des deux régimes prévus par Bruinsma lorsque des vésicules s'écoulent dans des pores étroits. Le premier est transitoire : la pression augmente jusqu'à une valeur critique qui correspond à la transition entre les deux régimes. Le

deuxième régime est stationnaire, la loi de Darcy est vérifiée et la pression est proportionnelle au débit.

- Les principaux résultats de ce chapitre concernent la pression seuil et sa dépendance en fonction de R_p . La pression seuil évolue se comporte comme une pression de courbure pour les pores de rayons supérieurs à la moitié du rayon initial des vésicules, et comme une pression de rupture pour les pores plus petits. Ce résultat montre que pour rentrer dans des pores supérieurs à la moitié de leur rayon initial, les vésicules courbent leur bicouche, mais quand le rayon des pores inférieur, elles se cassent pour pénétrer à l'intérieur. Les valeurs expérimentales nous ont permis de retrouver une valeur numérique de la tension de lyse proche de celles données par la littérature : $\sigma_l = 7.5 \text{ mN/m}$ pour les vésicules de lipides. Les valeurs ajustées à l'équation de la pression de courbure donne des rigidités de courbure en bon accord pour les vésicules de lipides 50 mais un peu élevée pour celles de DOPC 100. En utilisant les mêmes équations nous trouvons pour les vésicules de tensioactifs : $\sigma_l \approx 1.4 \pm 1 \text{ mN/m}$.
- En ce qui concerne le régime stationnaire, notre protocole n'est pas bien adapté à la mesure du facteur de Poiseuille relatif, qui devrait nous donner des information sur les dimensions et la concentration des vésicules dans les pores. Les expériences montrent tout de même un assez bon accord entre les valeurs théoriques et les mesures pour les vésicules de tensioactifs. Les vésicules de lipides donnent des résultats très différents qui peuvent s'expliquer par l'adsorption des lipides sur la paroi des pores et par la formation d'une couche d'accumulation des vésicules à l'entrée des pores.
- Certaines propriétés physiques semblent avoir un rôle important dans cet écoulement. Pour déterminer réellement l'influence du module de courbure, il faudrait refaire des mesures avec des vésicules de SOPC dont les bicouches sont plus concentrées en cholestérol, et avec du cholestérol de meilleure qualité. Il serait aussi très intéressant de réaliser les mêmes expériences avec des bicouches contenant des sels biliaires, pour au contraire diminuer la rigidité. Toutefois, ces solutés modifient aussi d'autres paramètres : perméabilité à l'eau, tension de lyse, etc...
- Nous avons très peu utilisé la boucle d'injection. Il serait pourtant très intéressant de suivre la passage d'un échantillon de vésicules (expériences bouchon) grâce à la mesure de pression, ou en utilisant une technique de détection en ligne (fluorimétrie, diffusion dynamique de lumière...). Malheureusement nous n'avons pas eu les moyens de mettre au point un tel montage.

5 Chapitre 5 : Structure des vésicules avant et après extrusion

5 CHAPITRE 5 : STRUCTURE DES VESICULES AVANT ET APRES EXTRUSION 113

5.1	EFFET DE L'EXTRUSION SUR LA STRUCTURE DES VESICULES	117
5.1.1	PREMIERES OBSERVATIONS	117
5.1.2	VARIATION DU RAYON FINAL DES VESICULES EN FONCTION DE LEUR RAYON INITIAL.....	118
5.1.3	EVOLUTION AVEC LE RAYON DES PORES	119
	a) Effet sur le rayon final des vésicules	119
	b) Caractérisation de la rétention	122
	c) Relation entre la rétention et le changement de taille des vésicules	126
5.1.4	EFFET DU CISAILLEMENT.....	129
	a) Faibles taux de cisaillement ($<4200s^{-1}$).....	130
	b) Forts cisaillements	135
5.1.5	CORRELATION ENTRE LA RUPTURE ET LE CHANGEMENT DE TAILLE DES VESICULES	137
	a) Rupture avec changement de taille	137
	b) Rupture sans changement de taille.....	140
5.2	EFFET DE L'EXTRUSION SUR LA PERMEATION DES VESICULES. ETUDE DU RELARGAGE DE MARQUEURS ENCAPSULES	141
5.2.1	PRESENTATION DE LA METHODE D'ENCAPSULATION, ET DE SON UTILISATION.....	141
	a) Principe général	141
	b) Application à l'étude de l'extrusion de vésicules.	142
5.2.2	PROTOCOLE EXPERIMENTAL.....	144
	a) Encapsulation des marqueurs.....	144
	b) Echantillons	144
	c) Mesures de concentrations de marqueurs	145
5.2.3	RESULTATS	145
	a) Rétention	145
	b) Perméation	146
5.3	CONCLUSION.....	148

Lors de l'extrusion, les vésicules dont le rayon est supérieur à celui des pores subissent des contraintes mécaniques fortes qui peuvent changer leur structure. Nous étudions ces changements par des expériences de diffusion de la lumière et de neutrons effectuées sur les vésicules avant et après extrusion. Nous varions le rayon des vésicules, celui des pores et le débit de l'écoulement. En général l'extrusion diminue le rayon des vésicules et change leur distribution de taille, ce qui peut s'expliquer par la rupture des bicouches. Nous cherchons à prouver et à quantifier cette rupture par des mesures de relargage de marqueurs fluorescents encapsulés. Les mesures conjointes d'intensité diffusée et de fluorescence permettent aussi d'observer et de quantifier la rétention des vésicules par les membranes poreuses.

Bien entendu, la structure des vésicules observée après extrusion n'est qu'indirectement reliée à la structure des vésicules à l'intérieur des pores, pendant l'extrusion. Mais celle-ci est de toute façon, inaccessible pour des vésicules de cette taille. Pour mesurer directement l'effet d'un cisaillement hydrodynamique sur les vésicules, nous avons effectué des expériences complémentaires de diffusion des neutrons sur des vésicules cisailées in situ dans une cellule de Couette, placée dans le faisceau de neutrons. Nous pouvons alors tenter de comparer des effets observés dans le Couette à ceux dus à l'extrusion.

5.1 Effet de l'extrusion sur la structure des vésicules

Les techniques de diffusion de la lumière et des neutrons utilisées pour étudier les vésicules sont classiques et ont été expliquées au chapitre 3. Nous exposons directement les résultats obtenus sur les différentes séries étudiées où nous varions comme au chapitre précédent la nature des vésicules, leur rayon, le rayon des pores, le débit et le cisaillement. Notons que ces trois derniers paramètres ne sont pas indépendants mais reliés par l'équation $\dot{\gamma} = q/R_p^3$, q étant le débit dans un pore unique (Eq 2-1). Les effets du cisaillement seront spécifiquement analysés en comparaison avec les expériences de déformation sous Couette. Enfin nous tenterons de quantifier l'importance des effets du cisaillement, pendant l'extrusion, par rapport à celui du confinement, c'est-à-dire du rayon des pores.

5.1.1 Premières observations

Comme premier exemple des mesures effectuées, nous présentons sur la Figure 5-1 l'intensité diffusée par des vésicules de tensioactif ($C_{sds}=0,5\%$, $R_i = 107\text{nm}$) qui ont été extrudées une fois à travers différentes membranes R_p ($R_p = 100, 50$ et 25nm). Notons que dans la suite du chapitre, quand cela n'est pas précisé, les extrusions se font toujours à débit constant, $Q=0.5\text{mL/mn}$, et chaque membrane est utilisée une seule fois. Dans la représentation choisie $q^2I(q)$ on obtient les caractéristiques classiques de la diffusion par une coquille sphérique. A savoir des oscillations associées à la taille des vésicules, puis un plateau et une décroissance caractéristique de la structure en

bicouche. Sur la Figure 5-1 on voit que plus le rayon des pores est petit, et plus le pic des oscillations est décalé vers les grands vecteurs d'onde, ce qui correspond à une diminution du rayon des vésicules avec R_p . Un second effet de la diminution de R_p est la décroissance de la hauteur du plateau des oscillations. Nous avons vu au chapitre 3 que cette hauteur de plateau est proportionnelle au nombre de vésicules. On en déduit donc que plus les pores sont étroits et plus la concentration des vésicules après extrusion est faible. Enfin, nous remarquons la présence d'un pic aux grands angles, sur le spectre des vésicules extrudées. Nous verrons que ce pic, ou plutôt cette bosse, est associé à l'apparition de micelles de tensioactifs et de polymères.

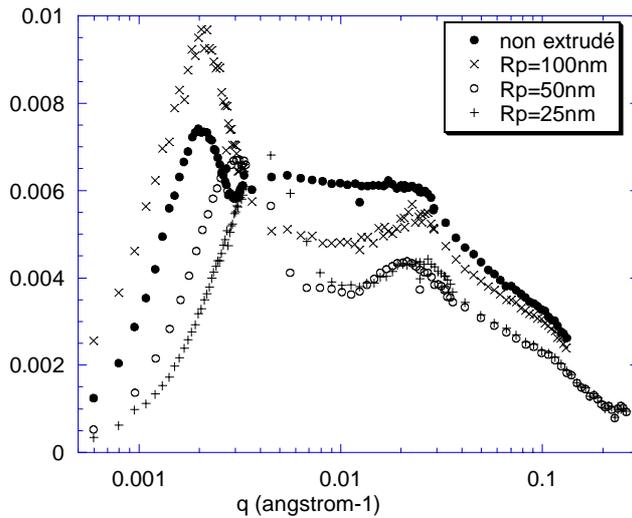


Figure 5-1 : Spectres statiques $q^2 I(q)$ de neutrons et de lumière pour des vésicules de tensioactifs de rayon initial 107nm, extrudées à travers les membranes $R_p=100$, 50 et 25nm.

Ces quatre courbes présentent à elles seules les deux principaux effets de l'extrusion des vésicules à travers des pores fins : la diminution du rayon des vésicules et leur rétention en amont de la membrane. Nous discuterons chacun de ces deux phénomènes, ainsi que leur corrélation éventuelle. L'apparition des micelles après extrusion n'est observée que pour les vésicules de tensioactifs, dont les constituants membranaires sont un million de fois plus solubles dans l'eau que les lipides. Elle montre l'effet violent des contraintes hydrodynamiques engendrées par l'extrusion sur les vésicules de tensioactifs.

5.1.2 Variation du rayon final des vésicules en fonction de leur rayon initial

Avant extrusion, on mesure les rayons hydrodynamiques des vésicules initiales R_i . Ces vésicules sont extrudées une seule fois à travers une membrane calibrée désignée par le rayon de ces pores, R_p . On récupère ensuite l'échantillon après extrusion, et on mesure le rayon hydrodynamique des vésicules finales R_f .

La technique de grossissement des vésicules de tensioactifs par chauffage nous permet de faire varier continûment R_i de 30 à plus de 200nm. Pour ces vésicules, il est donc possible de mesurer le rayon final R_f en fonction du rayon initial R_i sur une gamme étendue, ce qui est impossible pour les

vésicules de lipides. La Figure 5-2 présente ces résultats pour les rayons de pores nominaux $R_p=100\text{nm}$, 50nm , 25nm et 15nm . Tant que R_i est inférieur au rayon des pores R_p , les vésicules ressortent avec leur rayon initial ($R_f = R_i$), et dès que $R_i > R_p$ les vésicules ressortent avec un rayon final plus petit que R_i . Dans ce dernier cas, le rayon final est indépendant du rayon initial et dépend uniquement de R_p . Sur la Figure 5-2, ce rayon moyen est représenté par une ligne horizontale pour chaque rayon de pores.

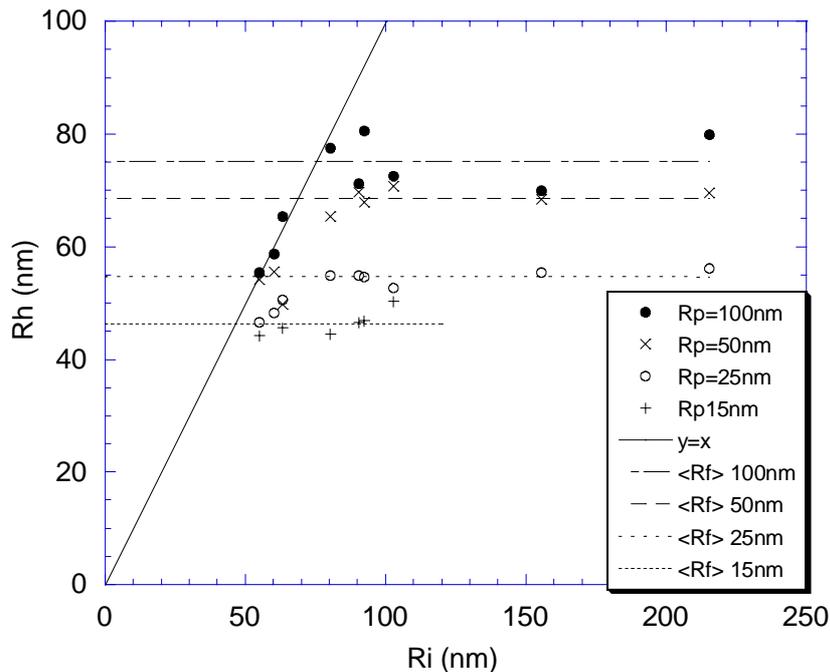


Figure 5-2 : Rayon final des vésicules de tensioactifs R_f en fonction de leur rayon initial R_i . Chaque série de points correspond à un rayon de pores.

5.1.3 Evolution avec le rayon des pores

a) Effet sur le rayon final des vésicules

Relation entre R_f et R_p

La Figure 5-3 présente l'évolution du rayon final R_f en fonction du rayon nominal des pores R_p . Les deux séries de points correspondent à des vésicules de EPC100 ($R_i = 74.4\text{nm}$) et des vésicules de tensioactifs ($R_i = 80\text{nm}$). Pour les deux types de vésicules, lipides ou tensioactifs, on observe le même comportement : tant que le rayon des pores est supérieur au rayon initial des vésicules $R_p > R_i$, le rayon des vésicules n'est pas modifié par l'extrusion ($R_f = R_i$), et dès que les pores sont plus étroits que les vésicules $R_p < R_i$, la taille moyenne des vésicules est réduite par l'extrusion ($R_f < R_i$). Pour des rayons de pores supérieurs à 15nm , le rayon final des vésicules diminue avec celui des pores mais reste

cependant supérieur à R_p . En-dessous de 15nm, le confinement devient extrêmement fort et R_f a un comportement différent. L'écart entre les vésicules de tensioactifs et celles de lipides se creuse, et R_f semble augmenter faiblement quand R_p diminue, à partir de $R_p=15$ nm pour les vésicules de tensioactifs et $R_p=7.5$ nm pour les vésicules de lipides. Cette évolution est corrélée à une augmentation importante de la polydispersité des échantillons. L'écart-type σ de la distribution de taille mesuré pour chaque échantillon, par la méthode des cumulants (101) est reporté sur la Figure 5-3 b) en fonction de R_p . Quasiment indépendant de R_p dans la gamme 15-100nm, il augmente de 30% pour $R_p < 15$ nm. Nous en déduisons une augmentation importante de la polydispersité pour ces échantillons, sans qu'il soit possible de préciser s'il s'agit d'une polydispersité de taille ou de forme des vésicules. C'est ce point particulier que nous allons aborder au paragraphe suivant.

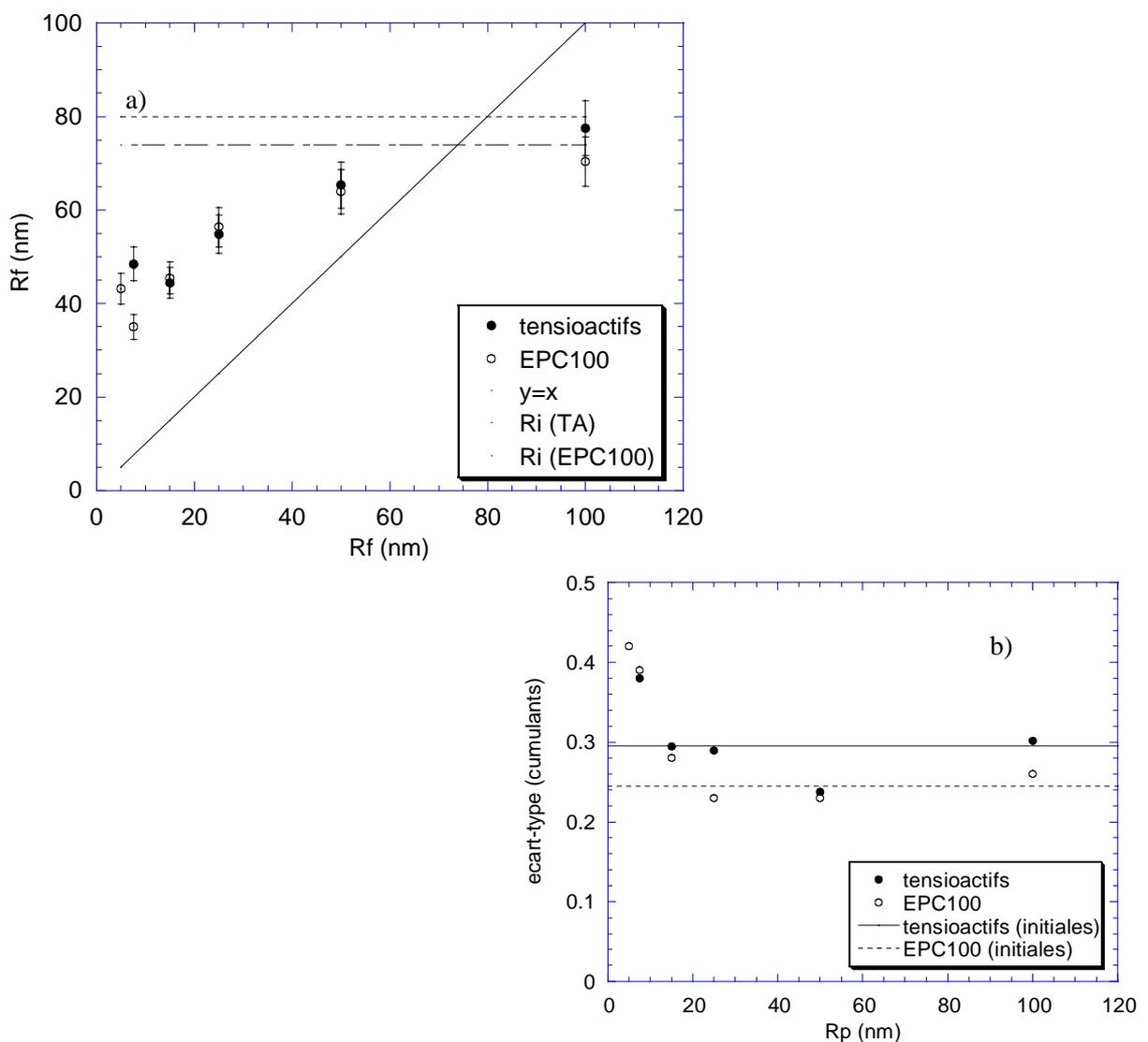


Figure 5-3 : a) Rayon hydrodynamique des vésicules après extrusions à travers différentes membranes, en fonction du rayon de pores R_p . Les deux séries de points correspondent à des vésicules de EPC 100 ($R_i=74$ nm), et de tensioactifs ($R_i=80$ nm). b) Ecart-type correspondant, mesuré avec la méthode des cumulants. Les rayons et écart-types des échantillons initiaux sont représentés par des lignes horizontales sur les figures correspondantes.

Rayon de gyration / rayon hydrodynamique

Une autre façon d'étudier les changements de distribution de taille, et peut-être de forme, des échantillons est de comparer les mesures dynamiques et les mesures statiques.

Les spectres de diffusion statiques de la lumière nous donnent les rayons de gyration des vésicules dans le domaine de Guinier. Dans le cas d'objets monodisperses, sphériques et sans interaction, ce rayon R_g est égal au rayon hydrodynamique R_h . Nous observons pourtant un écart significatif entre ces valeurs pour les vésicules de lipides et de tensioactifs sur la Figure 5-4, en particulier lorsque les rayons de pores sont inférieurs à 25nm.

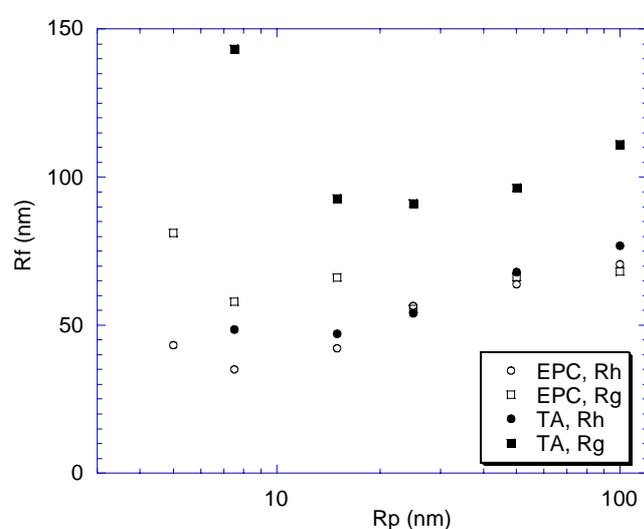


Figure 5-4 : Rayons de gyration R_g et rayons hydrodynamiques R_h pour des vésicules EPC100 .

Cet écart entre R_g et R_h n'est en fait qu'une autre illustration de la polydispersité des échantillons. En fait, il est possible qu'au lieu d'une polydispersité de taille, nous soyons en présence d'une polydispersité de forme. En effet, si les vésicules ont plutôt une forme ellipsoïdale, Berne et Pecora ont montré que le rapport R_h/R_g dépend de l'excentricité de ces ellipsoïdes (111). De plus, Mui et col. (84) et d'autres expérimentateurs ont observé, dans certains cas, la forme oblongue des vésicules préparées par extrusion à travers des membranes Nucléopore, en présence de solutés imperméables à la bicouche. Ces solutés auraient un rôle dans la capacité des vésicules à conserver une forme non sphérique lorsqu'elles sortent des pores où elles étaient confinées. Préparées en milieu salin, et plus déformables que les vésicules lipidiques, les vésicules de tensioactifs seraient plus propices à garder des formes étirées à la sortie des pores. Mais cela reste difficile à prouver sans les techniques de cryo-microscopie.

Nous avons calculé l'élongation théorique des deux types de vésicules, dans le cas où leur forme finale serait ellipsoïdale. Pour cela nous avons utilisé la relation calculée par Jin (112) pour prédire la

forme des vésicules soumises à des pressions osmotiques, et qui donne l'élongation $p^{-1} = a/b$, a étant la longueur de l'axe majeur et b celle de l'axe mineur de l'ellipsoïde axisymétrique.

Eq 5-1
$$p^{-1} = (R_g + L/2) / R_h \times (1 + 1.5\sigma^2 + 1.9\sigma^4)$$

Les résultats numériques présentés sur la Figure 5-5 reproduisent exactement la même évolution que celle de l'écart-type σ sur la Figure 5-3 b), avec des valeurs plus faibles pour les vésicules de lipides que pour celles de tensioactifs.

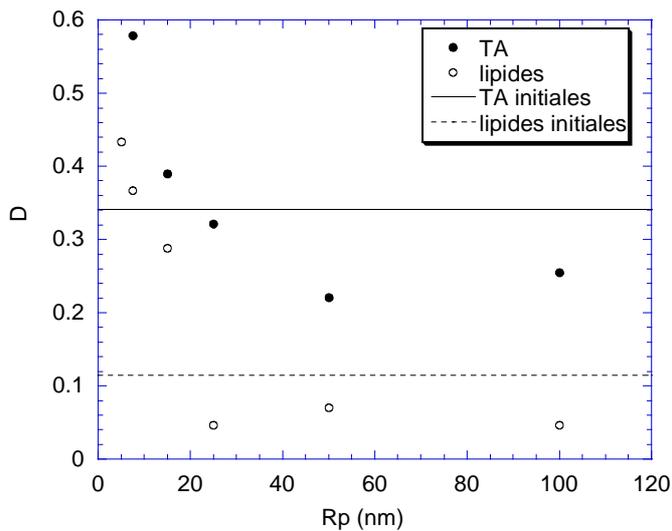


Figure 5-5 : Paramètre de déformation D des ellipsoïdes à la sortie des pores, pour des vésicules de tensioactifs et de lipides, en fonction du rayon des pores.

A titre d'indication on peut évaluer la déformation des vésicules à l'intérieur des pores. En supposant toujours que les vésicules prennent la forme d'un sphérocyindre de rayon R_p dans les pores, et, connaissant le rayon des vésicules à la sortie du pore R_f , on peut calculer le paramètre de déformation des vésicules dans les pores. Pour cela qu'à la sortie elles gonflent à surface constante. Pour $R_p=50\text{nm}$, le paramètre de déformation des vésicules est de $D=0.39$ et ensuite il augmente très fortement lorsque le rayon des pores diminue: $D=0.8$ ($b/a= 9$) pour $R_p = 25\text{nm}$, $D=0.87$ ($b/a= 14$) pour $R_p = 15\text{nm}$, $D=0.95$ ($b/a= 39$) pour $R_p = 7.5\text{nm}$ et $D=0.99$ ($b/a= 199$) pour $R_p = 5\text{nm}$. On peut remarquer que ces paramètres de déformations sont tous supérieurs à ceux évalués pour les vésicules à l'extérieures des pores (Figure 5-5), ce qui est un résultat raisonnable.

b) Caractérisation de la rétention

Les spectres de diffusion statique des Figures 5-6 a) et 5-1 révèlent la diminution très importante de la concentration des bicouches après extrusion. Cette perte est d'autant plus conséquente que le rayon des pores est faible. Après avoir quantifié ce déficit en bicouche, et écarté deux hypothèses : la

destruction des bicouches pour former des micelles de tensioactifs et l'adsorption de lipides sur les parois, nous déduisons que la rétention des vésicules en amont des pores est la seule cause possible.

Perte de matière lorsque R_p diminue

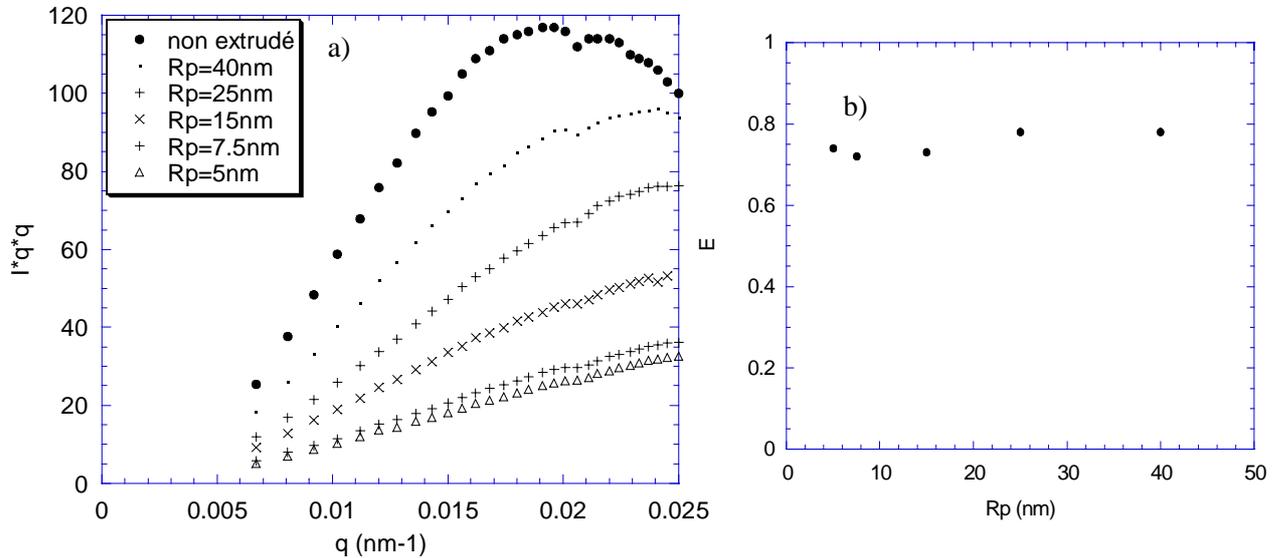


Figure 5-6 : a) Spectre statique $q^2 I(q)$ en lumière de vésicules de DOPC100 extrudées à travers des membranes de rayons de pores 40, 25, 15, 7.5 et 5nm, b) intensité extrapolée à $q=0$ pour les mêmes échantillons, normalisé par rapport aux vésicules initiales.

La fraction volumique des bicouches peut être évaluée de deux manières différentes, suivant la gamme de vecteurs d'ondes balayée par la technique de diffusion. Avec la diffusion de lumière, dans chaque échantillon final, après extrusion, on mesure la masse d'objets diffusants par extrapolation de l'intensité à $q=0$. Dans le domaine où les vésicules n'interagissent pas, cette valeur est proportionnelle à la concentration en vésicules multiplié par la masse (ou au volume) de la bicouche dans une vésicule. Ainsi, on normalise l'intensité extrapolée à 0, $I(q=0)$, par rapport au volume moyen de la bicouche dans une vésicule, et ce pour l'échantillon initial, et pour chaque échantillon final, on obtient

$$I^N(q=0) = \frac{I(q=0)}{4\pi R_f^2 L}$$

Pour déterminer le pourcentage de vésicules éluées dans chaque échantillon final, il suffit de diviser de l'intensité $I^N(q=0)$ normalisée pour cet échantillon par la valeur correspondante pour l'échantillon initial. Ce pourcentage est noté E . Ces valeurs sont tracées en fonction du rayon des pores sur la Figure 5-6 b), d'après les spectres de diffusion de lumière de la Figure 5-6 a). On en déduit les pertes en quantité de bicouches suivantes : $22 \pm 4\%$ dès $R_p=40$ nm, puis $22 \pm 6\%$, $27 \pm 9\%$, $28 \pm 6\%$ et $26 \pm 7\%$ pour les rayons de pores respectifs 25, 15, 7.5 et 5 nm.

Sur les spectres $q^2 I(q)$ des vésicules obtenus par diffusion de neutrons (Figure 5-1), le plateau des oscillations est visible dans le régime $qR \gg 1$ et $qL \ll 1$, et atteint la limite asymptotique $A/2$. Cette

valeur est proportionnelle à la fraction volumique de bicouche ϕ_{bic} . En comparant les hauteurs de plateau des spectres pour les échantillons avant et après extrusion, on obtient donc la perte de volume en membrane après extrusion. La Figure 5-1, présente les spectres $q^2 I(q)$ de vésicules de tensioactifs $R_f = 107\text{nm}$, avant extrusion après extrusion à travers trois rayons de pores différents. On mesure une perte bicouche de 22% pour $R_p = 100\text{nm}$ et 34% pour $R_p = 50$ et 25nm .

Le cas particulier des vésicules de tensioactifs

Sur les spectres de diffusion de lumière et de neutrons de la Figure 5-1 une bosse apparaît vers 0.023 \AA^{-1} . Elle correspond à la bosse qu'a observé R. Joannic au cours de sa thèse vers 0.022 \AA^{-1} . Il s'agit de l'apparition de micelles mixtes lorsque du polymère est ajouté à la suspension de vésicules au-delà de son seuil de saturation. Dans ce cas, les micelles formées sont fortement concentrées en polymères : le rapport de fraction volumique en polymère ϕ_p sur la fraction volumique en tensioactifs ϕ_{TA} , dans ces micelles est de $\phi_p / \phi_{TA} = 1.9$, Si on fait correspondre cette bosse avec un spectre théorique de diffusion de neutrons pour des sphères pleines, modélisant les micelles, on obtient un rayon d'environ 8.9nm . Ce résultat est comparable au rayon de gyration $R_g = 8\text{nm}$ des micelles pures de polymères (99). Pour évaluer la fraction volumique de ces micelles par rapport à celle des vésicules, on paramètre les spectres expérimentaux par l'équation Eq 5-2 qui couple la contribution de la bicouche avec celle des sphères pleines:

Eq 5-2

$$q^2 I(q) = \Delta n_{bic}^2 \phi_{bic} \left[2\pi L \left(\frac{2}{qL} \sin(qL/2) \right)^2 \right] + \Delta n_{mic}^2 \phi_{mic} \times \frac{4}{3} q^2 \pi r^3 \left[\frac{3}{(qr)^3} [\sin(qr) - qr \cos(qr)] \right]^2$$

ϕ_{bic} , ϕ_{mic} et Δn_{bic} et Δn_{mic} sont respectivement les fractions volumiques et les contrastes neutroniques des bicouches et des micelles, et r est le rayon moyen des micelles. Le spectre est ajusté par cette équation, uniquement aux grands angles $qR \gg 1$. La courbe est présentée sur la Figure 5-7 et les paramètres associés sont donnés dans la légende.

On remarque que l'épaisseur de la membrane est maintenant de 1.7nm , contre 2.2nm pour les vésicules non extrudées (cf Chapitre 3.3.4.2). Ceci confirme l'hypothèse d'un arrachage important des polymères à la surface des vésicules pour former des micelles riches en polymères. Le rapport des contrastes neutroniques, entre des micelles de polymères pures et les membranes, est calculé d'après les densités de longueur de diffusion reportées sur le Tableau 3-4: $\Delta n_{pol}^2 / \Delta n_{bic}^2 = 0.7$. Ce calcul suppose que la densité des micelles est proche de celle des bicouches. Pour $R_p = 25\text{nm}$, le rapport des

fractions volumiques ϕ_{mic} / ϕ_{bic} est donc de l'ordre de 5 %. Ce rapport est très faible, et ne compense pas la diminution de fraction volumique de bicouche après extrusion.

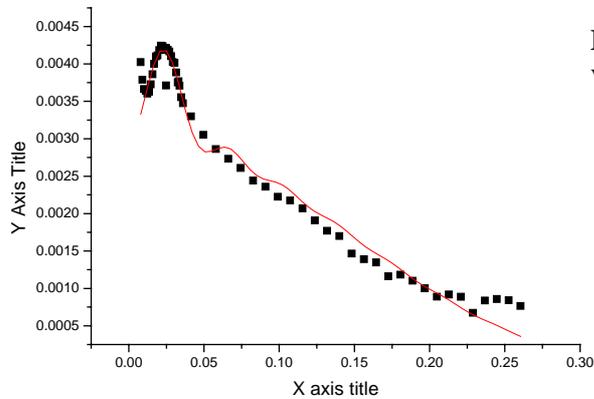


Figure 5-7 : Paramétrage d'un spectre $q^2 I(q)$ de vésicules de tensioactifs par la relation Eq 5-1 .

$$\begin{aligned} \phi_{bic} \cdot \Delta n_{bic}^2 &= 0.00003 \\ \phi_{mic} \cdot \Delta n_{mic}^2 &= 0.0000019 \\ r &= 8.9 \text{ nm} \\ L &= 1.7 \text{ nm} \end{aligned}$$

Nous avons tenté de mettre en évidence une éventuelle influence du rayon des pores et du rayon initial des vésicules sur la quantité de micelles formées. Les courbes de la Figure 5-1 ont été normalisées par rapport à la concentration des vésicules en solution, et reportées sur la Figure 5-8. L'amplitude de la « bosse » des micelles est comparée après une extrusion à travers les membranes $R_p=100, 50$ et 25 nm . On ne remarque pas d'évolution notable, sauf pour le rayon des pores le plus gros $R_p=100 \text{ nm}$, où la bosse est un peu amoindrie. Pour ce rayon de pore le rapport R_p / R_i est proche de 1 et la rupture n'est pas le phénomène prépondérant d'après les résultats du Chapitre 4. La Figure 5-9, montre que la quantité de micelles formées est un peu plus petite pour le plus petit R_i . Le phénomène de rupture a lieu à chaque fois, mais l'influence du rayon initial reste faible. Au passage, nous vérifions encore une fois que le rayon final (ici donné par l'abscisse du pic des oscillations) est indépendant de R_i .

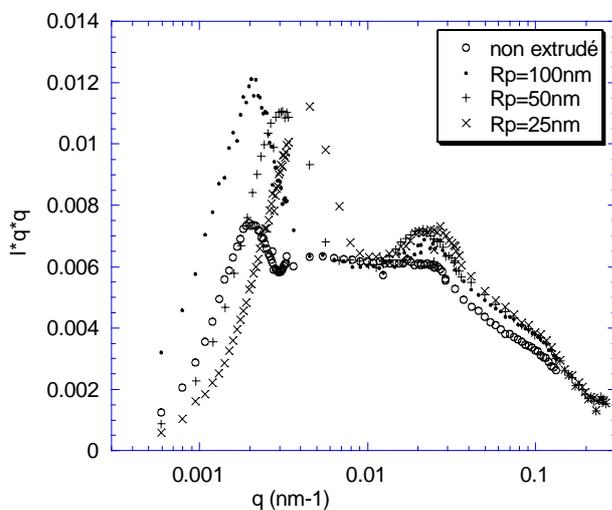


Figure 5-8: vésicules de tensioactifs, chauffées pendant 20mn, et extrudées une fois à travers des membranes $R_p=100, 50$ et 25 nm .

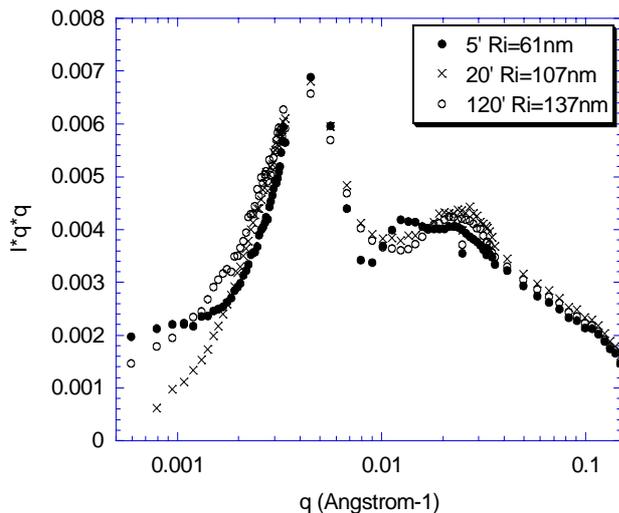


Figure 5-9: vésicules de tensioactifs, chauffées pendant différentes durées, et extrudées une fois à travers des membranes $R_p = 25\text{nm}$.

La perte de matière peut-elle être due à l'adsorption des lipides sur les parois des pores ?

Nous avons aussi montré au Chapitre 4.1.1 que, pendant l'extrusion, une partie des lipides s'adsorbent sur la paroi des pores. L'adsorption pourrait donc expliquer en partie la perte en lipides après chaque extrusion. Nous pouvons tester cette hypothèse en prenant le cas d'une suspension de vésicules de EPC50 extrudées à travers une membrane $R_p = 100\text{nm}$ (chapitre 4.4.3 c)). Après le passage de 3mL de suspension, les mesures hydrodynamiques indiquent que l'adsorption des lipides est de 5%. Pour $R_p = 50$ et 25nm , l'adsorption n'est plus que de 1 ou 2%, ce qui est dix à vingt fois plus faible que la perte de matière totale mesurée par les techniques de diffusion. L'adsorption des lipides à la surface des pores est donc négligeable par rapport à l'effet de rétention.

En conclusion, ni la formation de micelles, ni l'adsorption de constituants membranaires ne sont des phénomènes d'ampleur à expliquer la perte en quantité de bicouches. Ce déficit de vésicules après extrusion ne peut être du qu'à leur rétention en amont des pores. Cet effet de rétention a aussi été mis en évidence, indirectement au chapitre 4.4.3.b).

c) Relation entre la rétention et le changement de taille des vésicules

La rétention des vésicules et leur diminution de taille sont les deux principaux effets de l'extrusion. Il est fort possible que ces deux effets soient corrélés. Avec un écart-type un peu inférieur compris entre 0,25 et 0,3 (Figure 5-3 b)), la distribution de taille des vésicules initiales est assez large. Les rayons des pores ne sont pas monodisperses non plus, comme nous l'avons vu au Chapitre 3 (cf Tableau 3-1). Une partie plus ou moins importante des vésicules peut avoir un rayon plus faible que celui de certains pores, et l'extrusion peut tronquer la distribution de taille des vésicules.

Comparaison entre la proportion de vésicules plus larges que les pores et le pourcentage de rétention

Nous nous proposons de comparer la distribution de taille des vésicules initiales à celles des pores pour différentes membranes, et d'en déduire la proportion de vésicules plus larges que tous les pores.

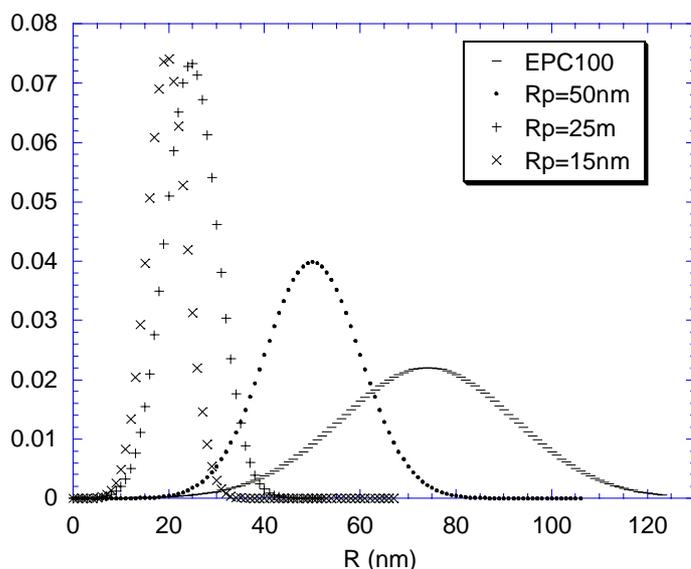


Figure 5-10 : Distribution de taille des vésicules DOPC100 et des pores de tailles nominales $R_p=25\text{nm}$ et $R_p=15\text{nm}$.

La distribution de taille d'une population de vésicules DOPC100 est comparée à celle des pores de rayons 50, 25 et 15nm sur la Figure 5-10. Ces courbes de distributions de tailles des pores sont des gaussiennes dont les rayons moyens R_p et les écart-types sont répertoriées dans le Tableau 3-1. L'écart-type de la distribution des vésicules est donné par la méthode des cumulants. Les fonctions de ces courbes nous indiquent que 80% des vésicules DOPC100 sont plus grandes que les pores de rayon $R_p=40\text{nm}$, et 98% d'entre elles sont plus grandes que les pores $R_p=25\text{nm}$. La proportion de ces mêmes vésicules à être retenues par ces pores est environ de 78%. On en déduit que au moins 75% (78%) des vésicules plus grandes que les pores de 40nm (25nm) passent tout de même à travers la membrane. Le taux de réjection est donc loin d'être total pour les vésicules plus grandes que les pores.

Nouvelle distribution de taille issue de la rétention des vésicules les plus grosses.

Nous venons de montrer que la rétention n'est que partielle, et que la grande majorité des vésicules passent à travers des pores plus petits qu'elles. Cependant, on peut supposer que la rétention des vésicules par la membrane affecte en priorité les vésicules les plus grosses dans la distribution de taille, et que la membrane a pour effet de « trier » les vésicules et de ne laisser passer que les plus petites. Ainsi, pour une rétention de R% la nouvelle distribution de taille des vésicules est la distribution des

vésicules initiales à laquelle on a enlevé $R\%$ des vésicules les plus grosses (Figure 5-11). Cette nouvelle distribution donne un nouveau rayon moyen directement issu du phénomène de rétention, et donc noté R_{ret} .

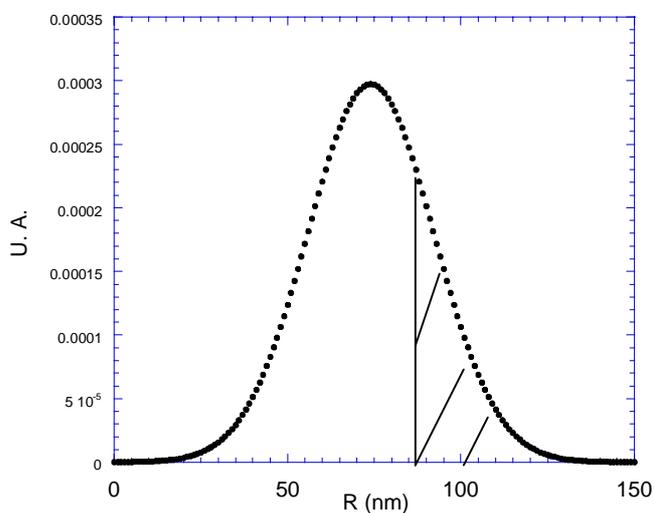


Figure 5-11 : Distribution de taille de lipides 100, tronquée, pour une rétention de $R\%$ (ici $R=14$) des plus grosses vésicules.

Pour les vésicules de DOPC 100 et celles de tensioactif ($R_i=107\text{nm}$) nous avons repris les résultats des mesures de rétention présentées au Chapitre 5.1.3 b), et nous en avons déduit les rayons R_{ret} correspondant, pour chaque rayon de pore R_p . Ces valeurs sont tracées en fonction de R_p sur la Figure 5-12, et comparées au vrai rayon final mesuré R_f .

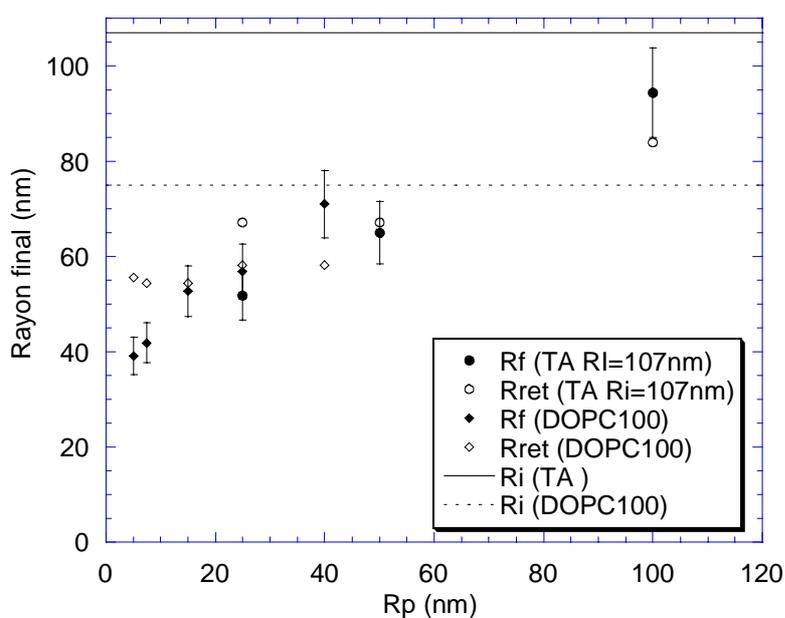


Figure 5-12 : Rayon final mesuré R_f et rayon moyen de la nouvelle distribution de taille des vésicules $\langle R' \rangle$ après extrusion

Pour les vésicules de tensioactifs extrudées à travers des membranes $R_p=100$ et 50nm , l'écart entre R_{ret} et R_f est compris dans les barres d'erreurs. Mais cet écart se creuse pour $R_p=25\text{nm}$. Pour les vésicules de lipides, R_{ret} est très proche de R_f pour $R_p=25$ et 15nm , mais R_f devient significativement plus faible pour les rayons de pores plus petits. Curieusement, pour $R_p = 40\text{nm}$, R_f est plus élevé que R_{ret} . Pour les pores plus petits, les valeurs du rayon final plus faibles que celles de R_{ret} ne peuvent s'expliquer que par le phénomène de rupture qui viendrait s'ajouter au phénomène de « tri » des vésicules. Si ce phénomène de tri existe, il n'est pas prépondérant pour les petits pores. Un argument vient étayer cette conclusion, c'est l'évolution de la polydispersité avec le rayon des pores (Graphique 5-2 b)). Si les vésicules étaient effectivement triées par la membrane, l'écart-type diminuerait avec le rayon des pores. Or ce n'est pas le cas, au contraire.

En conclusion, pour les plus petits pores, la diminution de la taille des vésicules est certainement déterminée par leur mécanisme de rupture. Nous reviendrons sur ce point au Chapitre 5.1.5 b).

5.1.4 Effet du cisaillement

L'écoulement des suspensions dans les pores engendre des taux de cisaillements qui sont d'autant plus forts que le rayon des pores est faible (Eq 2-1). Avec les tailles de pores et les débits dont nous disposons, les taux de cisaillements sont compris entre 300 et 6.10^6 s^{-1} . Ces taux de cisaillements exceptionnels créent des contraintes visqueuses elles-mêmes très fortes (0.3 à 6000 Pa) à la surface des vésicules, et peuvent être à l'origine de cassures et de déformations. Ces contraintes sont appliquées pendant le temps de passage de la vésicule dans le pore, environ entre $25\mu\text{s}$ et 8ms , ce qui est suffisant pour déformer une vésicule de 100nm de diamètre, dont le temps de relaxation est de l'ordre de la μs . De plus Diat et col. [Diat, 1993 #136] [Diat, 1993 #135] ont aussi montré comment des écoulements peuvent rompre et reformer des vésicules suffisamment fragiles. Dans les changements de structures observés après extrusion il s'agit donc de séparer si possible les effets confinement des effets du taux de cisaillement.

Pour les « faibles » taux de cisaillement ($\dot{\gamma} < 4200\text{s}^{-1}$) il est possible de comparer l'effet du taux de cisaillement pendant l'extrusion à l'effet de cisaillement seul, appliqué par un rhéomètre de Couette. Au delà de 4200s^{-1} , qui est la limite atteinte par les rhéomètres que nous avons utilisés, il est possible de séparer effets de cisaillement seul et effets de confinement, en faisant varier le débit pour un rayon de pore fixé. Inversement, il est possible d'imposer le même taux de cisaillement pour des rayons de pores différents, toujours en variant le débit.

a) Faibles taux de cisaillement ($<4200s^{-1}$)

Pour mesurer la déformation des vésicules uniquement soumises à un cisaillement, en milieu non confiné, nous avons utilisé plusieurs rhéomètres de Couette. Nous avons réalisé des expériences ex-situ, où les vésicules sont étudiées avant et après cisaillement, et des expériences in-situ, où le rhéomètre est directement placé sous faisceau de neutrons. Ces différentes méthodes sont classiques, mais nous rappelons brièvement le fonctionnement d'un rhéomètre.

Un rhéomètre de Couette est constitué de deux cylindres coaxiaux, dont l'un d'entre eux, le rotor interne, est mobile. Si on suppose qu'il n'y a pas de glissement, le fluide contenu entre ces deux cylindres est immobile au voisinage du stator, et au voisinage du rotor est entraîné à la même vitesse que le cylindre. Le gradient de vitesse est linéaire le long de l'axe radial. Le taux de cisaillement qui en résulte est constant et inversement proportionnel à l'écartement des cylindres l .

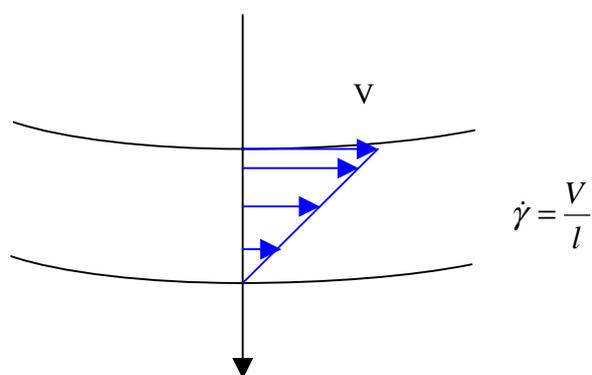


Figure : Schéma représentant le cisaillement auquel est soumis un fluide compris entre deux cylindres coaxiaux dont l'un des deux tourne à vitesse constante.

Rappelons que dans ce type particulier d'écoulement (Chapitre 2.4.2 b)) une vésicule initialement sphérique doit théoriquement prendre la forme d'une ellipsoïde avec une inclinaison de $\pi/4$, et la bicouche doit tourner autour de cette forme fixe avec une fréquence $\dot{\gamma}/2$ (Kraus, 1996). De nombreuses études expérimentales ont montré l'influence du cisaillement sur les vésicules de tensioactifs et en particulier sur leur taille (67) ou sur l'induction d'une phase de vésicule de tensioactifs par cisaillement (68). Les LUV lipidiques, plus rigides et plus solides, sont beaucoup moins sensibles au cisaillement. Dans sa thèse, A. L. Bernard (85) a dû assouplir la bicouche de SUV de lécithine en y ajoutant du POE-stéarate pour mesurer des effets de rupture à $10000s^{-1}$.

Expériences ex-situ

Dans un premier temps on regarde l'effet de ce cisaillement sur le rayon des vésicules, ex-situ, et on le compare à celui de l'extrusion, pour des taux de cisaillements comparables. Les résultats sont reportés sur la Figure 5-13. Pour les vésicules de tensioactifs, le rayon final ($R_f = 70nm$) est inférieur au rayon initial ($R_i=90nm$), et se superpose exactement aux résultats donnés par l'extrusion à travers

des pores de rayon $R_p=100\text{nm}$ et 50nm . Le changement de taille observé après extrusion à travers des rayons de pores supérieur ou égal à 50nm peut donc être uniquement dû aux effets de cisaillement. Pour les vésicules de lipides, le rayon est inchangé après le cisaillement. L'écart par rapport aux résultats de l'extrusion n'est pas significatif au regard des barres d'erreur. A de tels taux de cisaillement le rayon des vésicules lipidiques n'est pas modifié, ni par cisaillement de Couette, ni par extrusion.

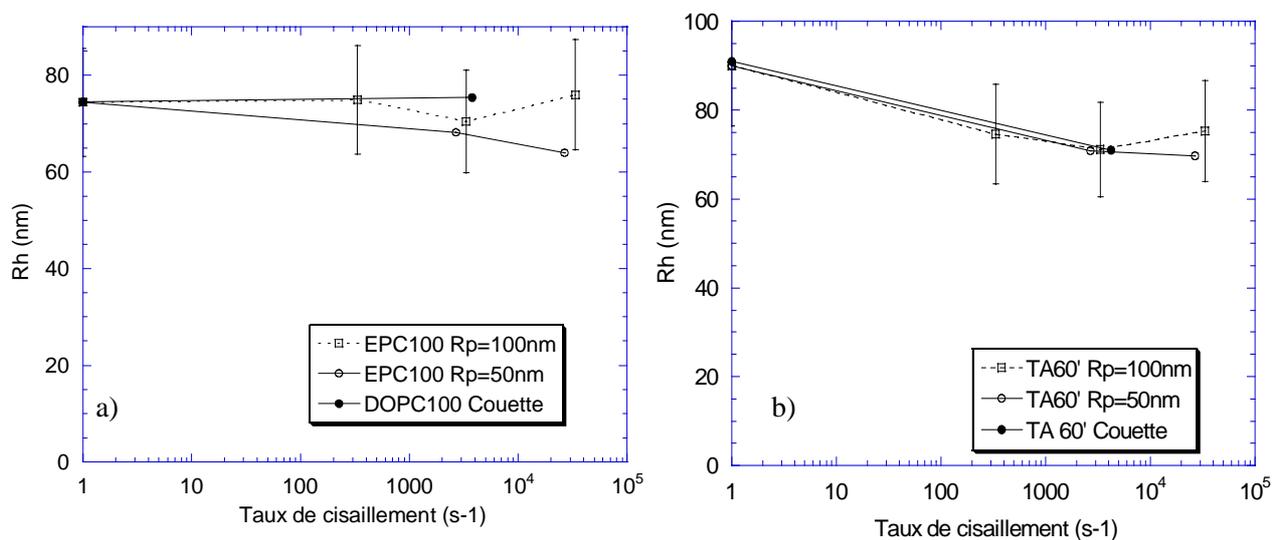


Figure 5-13: Rayon final des vésicules après cisaillement par extrusion (symboles vides) ou par avec un appareil de Couette (symboles pleins) pour des vésicules de a) lipides et de b) tensioactifs, chauffées $60'$. Le taux de cisaillement de Couette est de 3700 s^{-1} .

Nous avons cherché à connaître les effets du cisaillement sur la polydispersité de la distribution de taille des vésicules et sur l'épaisseur de la bicouche en comparant des spectres de diffusion statique de neutrons et de lumière avant et après cisaillement. Les taux de cisaillements sont plus faibles que précédemment : le maximum est de 1082 s^{-1} . Dans aucun des cas on n'observe un changement de taille. Le spectre des vésicules de tensioactifs ($R_i=103\pm 3\text{nm}$) avant et après cisaillement à 480 s^{-1} , montre une légère diminution de l'épaisseur de la bicouche, ainsi qu'une augmentation de polydispersité (Figure 5-14 a)). Concernant les vésicules de EPC ($R_i=89\text{nm}$), la superposition des deux spectres, avant et après cisaillement montre que le rayon, la polydispersité et l'épaisseur de la bicouche restent inchangés après un cisaillement de 609 s^{-1} (cf Figure 5-14 b)). On remarque cependant la présence d'une bosse à 0.03\AA^{-1} sur le spectre après cisaillement, très comparable à celle observée sur les spectres de vésicules de tensioactifs après extrusion. Il est peu probable qu'il s'agisse de micelles de constituants membranaires, comme dans le cas des vésicules de tensioactifs, étant donné la faible CMC des lipides. C'est le seul spectre de vésicules de lipides qui présente une bosse de ce type, et nous n'avons pas d'explication pour sa présence.

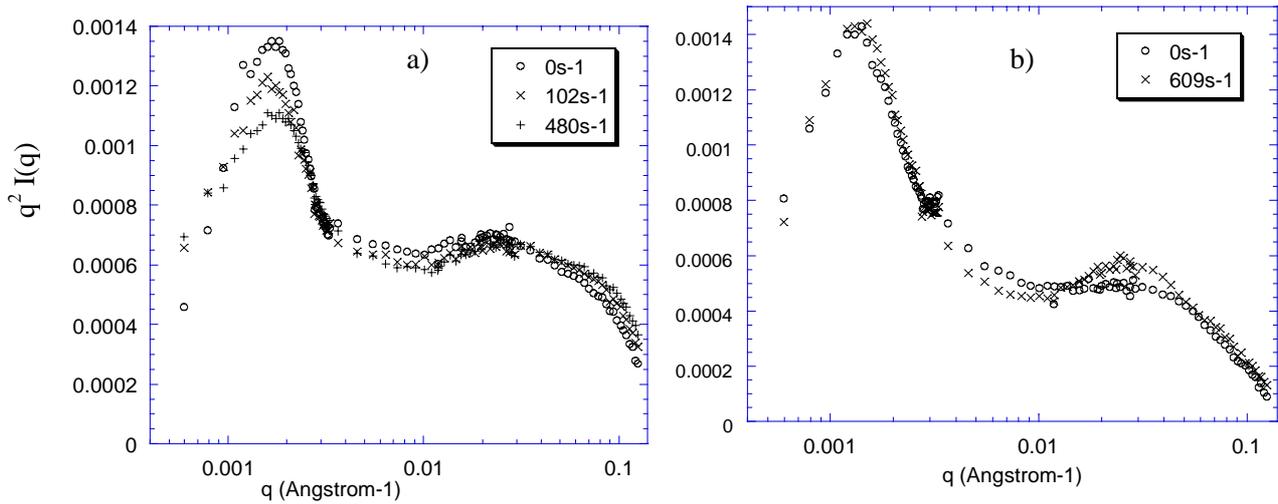


Figure 5-14 : Spectres $q^2 I(q)$ a) des vésicules de tensioactifs de rayon initial $R_i=103\text{nm}$ avant cisaillement, et après cisaillement à 102s^{-1} et 480s^{-1} et b) des vésicules EPC100 avant et après cisaillement $\dot{\gamma} = 609\text{s}^{-1}$

Expériences in-situ

Dans un deuxième temps nous avons voulu mesurer les changements structuraux des vésicules, in-situ, pendant le cisaillement. Ces expériences ont été réalisées au LLB sur PAXY, avec Alain Lapp et à l'ILL sur D11 par C. Postel et avec P. Lindler. Les vésicules sont cisillées grâce à un rhéomètre de Couette transparent aux neutrons, placé sur le trajet du faisceau. Les spectres en deux dimensions obtenus par diffusion de neutrons, pendant le cisaillement, rendent compte de l'anisotropie des objets au fur et à mesure que le taux de cisaillement est augmenté. Cette anisotropie est représentée par la forme d'ellipse que prend le spectre (cf Figure 5-15), et on la quantifie en mesurant le paramètre de déformation de l'ellipse:

Eq 5-3

$$D = \frac{a-b}{a+b}$$

a et b sont respectivement les longueurs de l'axe majeur et mineur de l'ellipse. D est représenté en fonction de $\dot{\gamma}$ pour des vésicules de tensioactifs de différents rayons initiaux sur la Figure 5-16, et pour des vésicules de lipides (DLPC100 et DOPC100) sur la Figure 5-17. Concernant les vésicules de tensioactifs, les valeurs mesurées à l'ILL sont similaires à celles obtenues au LLB, mais la précision est meilleure. Pour toutes les vésicules de tensioactifs étudiées, on observe une augmentation du paramètre de déformation D jusqu'à une valeur maximale D_{max} obtenue pour un taux de cisaillement $\dot{\gamma}_{max}$. Au-delà de $\dot{\gamma}_{max}$, D diminue. Ce qui peut s'expliquer par une diminution de la taille des vésicules (Figure 5-13 b)), car plus les vésicules sont grosses et plus leur déformation est importante. Sur la Figure 5-16 b), on remarque en effet que D_{max} augmente lorsque la taille initiale des vésicules

varie de 60nm à 74nm. En revanche on ne remarque aucune dépendance particulière de $\dot{\gamma}_{\max}$ en fonction de R_i . La conclusion importante à retenir est que les vésicules de tensioactifs se déforment et se cassent pour des taux de cisaillements qui sont facilement atteints lors des extrusions à travers des pores de rayons 100 et 50nm. Le rôle du cisaillement pendant l'extrusion de vésicules de tensioactifs aux « grands » pores n'est pas négligeable.

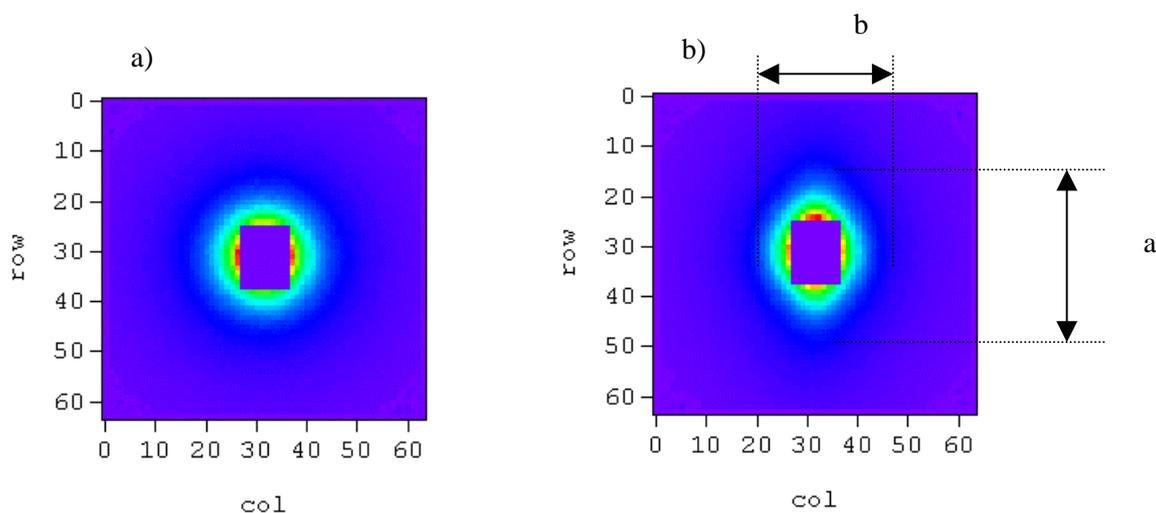


Figure 5-15 : Spectre deux dimensions de l'intensité diffusée par des neutrons par un échantillon de vésicules TA 60' soumis à un cisaillement a) : $\dot{\gamma} = 730 \text{ s}^{-1}$, ou b) $\dot{\gamma} = 2373 \text{ s}^{-1}$

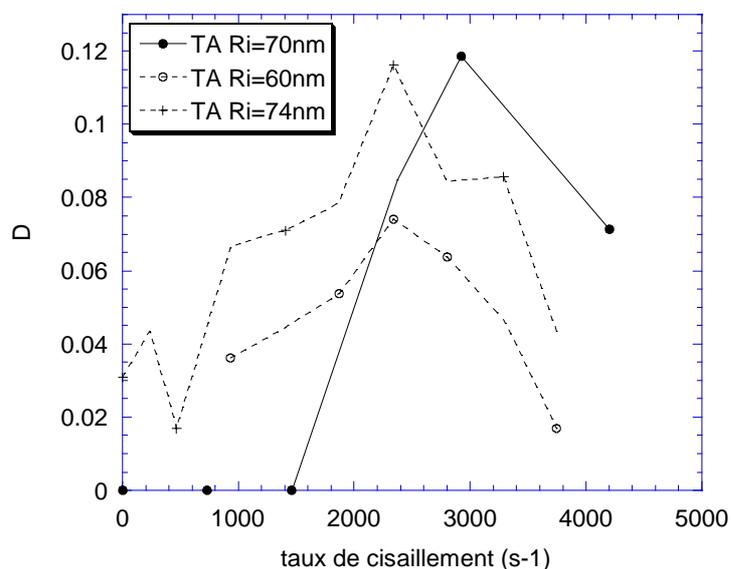


Figure 5-16 : Paramètre de déformation des vésicules de tensioactifs, de différents rayons initiaux, en fonction du taux de cisaillement.

Concernant les vésicules de lipides purs DLPC100 et DOPC100, les valeurs du paramètre de déformation sont deux fois plus faibles que ceux des vésicules de tensioactifs pour les mêmes taux de cisaillement, et pour des rayons initiaux similaires (Figure 5-16). On observe une légère augmentation

pour DOPC100 et presque aucune évolution pour DLPC100. Pourtant ces deux types de vésicules ont la même taille initiale. Pour les vésicules DOPC100 la déformation se fait à taille constante puisqu'on n'observe pas de changement de taille après cisaillement par mesure du rayon hydrodynamique. En revanche pour les vésicules DLPC100 son rayon diminue de 78nm à 70.4nm, sans déformation apparente. Dans les deux cas on n'observe pas d'évolution de la polydispersité.

En réalité on s'attendrait à une plus grande déformabilité pour les vésicules de DLPC100. En effet la bicouche d'une vésicule de DLPC (C12 :0/0) ($L \approx 3.3$ nm) est plus mince que celle d'une vésicule de DOPC (C18 :0/1) ($L \approx 4.1$ nm). Ce qui doit donner d'après la relation Eq 5-3, qui est vérifiée par l'expérience [Rawicz, Biophys. J. 2000], un module de courbure plus faible pour le DLPC. Le module de courbure des vésicules de DLPC devrait donc être environ égal à la moitié de celui du DOPC.

Eq 5-4

$$\kappa_c = \mu_{ext} (L-1)^2 / c_e$$

c_e est une constante de normalisation, L l'épaisseur de la bicouche en nm

Il est possible que les vésicules de DLPC100 aient été rompues pour un certain taux de cisaillement. Une fois reformées avec un rayon plus faible, les vésicules seraient plus difficiles à déformer, ce qui expliquerait un paramètre de déformation assez faible.

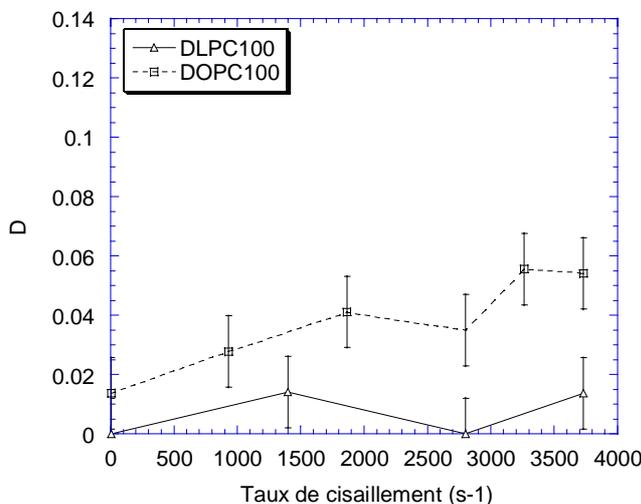


Figure 5-17 : Paramètre de déformation des vésicules DLPC100 et DOPC100, en fonction du taux de cisaillement. Les expériences ont été réalisées au LLB sur PAXY, et à l'ILL sur D11.

Conclusion

Dans le cas de vésicules de tensioactifs comme dans celui des lipides, si les paramètres de déformation des spectres bidimensionnels reflètent ceux des vésicules elles-mêmes, alors on en déduit que ces vésicules sont très faiblement déformées par le cisaillement seul. En comparaison, pour des taux de cisaillement similaires, la déformation des vésicules confinées dans des pores de 50nm de rayon calculée pour un sphérocyindre de longueur 96nm est de $D=0.49$. La déformation des vésicules

de tensioactifs est supérieure à celles de lipides, ce qui s'explique par une plus grande flexibilité des premières. L'écoulement de Couette peut induire la réduction de taille des vésicules par rupture, au moins en ce qui concerne les vésicules de tensioactifs.

b) Forts cisaillements

Distinction entre l'effet du rayon des pores et celui du taux de cisaillement.

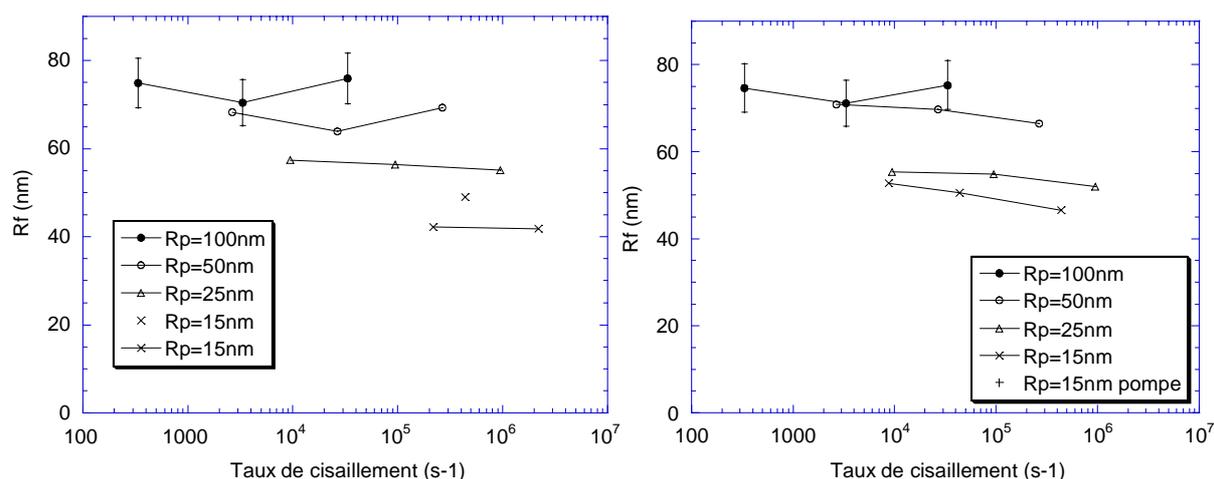


Figure 5-18 : Rayons hydrodynamiques des vésicules en fonction du taux de cisaillement après extrusions à travers des pores de rayons R_p , à différents débits, pour a) des vésicules initiales EPC100 ($R_i=90\text{nm}$) b) des vésicules initiales de tensioactifs ($R_i=74\text{nm}$).

Ces expériences ont été réalisées pour les deux types de vésicules et les résultats sont reportés sur la Figure 5-18. Les vésicules de tensioactifs ont un rayon initial de $R_i=90\text{nm}$ et pour les vésicules lipidiques, $R_i=74\text{nm}$. A rayon de pores fixé, le rayon des vésicules lipidiques est indépendant du taux de cisaillement dans la gamme étudiée. En revanche, pour des taux de cisaillement similaires, le rayon final diminue avec le rayon des pores, malgré des barres d'erreurs importantes. Pour les vésicules lipidiques, l'effet du confinement est donc prépondérant. Pour les vésicules de tensioactifs, une légère diminution de R_f est observée lorsque le débit augmente pour les rayons de pores 50nm et 15nm. A taux de cisaillement similaire, la diminution de R_f avec R_p est particulièrement marquée lorsqu'on passe de $R_p=50\text{nm}$ à $R_p=25\text{nm}$, mais pratiquement inexistante quand on compare $R_p=100$ et 50nm, ou $R_p=25$ et 15nm. Pour les vésicules de tensioactifs, la prépondérance de l'effet de confinement est moins marquée, du moins à première vue.

Pour en être certain, nous cherchons à quantifier la dépendance de R_f en fonction du taux de cisaillement à rayon de pore fixé d'une part, et sa dépendance en fonction de R_p à taux de cisaillement fixé d'autre part. La Figure 5-19 a) présente les mêmes résultats que la Figure 5-18 b), mais en valeurs logarithmiques. Les droites obtenues pour chaque rayon de pore sont paramétrées de façon à quantifier

la dépendance du rayon final en fonction du taux de cisaillement seul. De $R_p=100\text{nm}$ à $R_p=15\text{nm}$, la pente varie de 0.001 à -0.03 . Au passage on remarque que ces variations de R_f sont très différentes de celle observée par Diat et col. et qui donnerait ici une pente en -0.5 . Par opposition, on a tracé de $\text{Ln}(R_f)$ en fonction de $\text{Ln}(R_p)$ à taux de cisaillement constant sur la Figure 5-19 b). Pour cela extrapolé les courbes de R_f données sur la Figure 5-19 a), pour chaque rayon de pores, à $\text{Ln}(\dot{\gamma}) = 10$. Les valeurs de $\text{Ln}(R_f)$ reportées en fonction de $\text{Ln}(R_p)$ donnent une pente égale à 0.207. Elle est environ dix fois plus forte que celle en fonction de $\text{Ln}(\dot{\gamma})$, à rayon de pores fixé. Ce qui signifie que même pour les vésicules de tensioactifs, plus sensibles au cisaillement que les vésicules de lipides, le confinement seul a (variation de R_p à $\dot{\gamma}$ fixé) un effet plus important que le cisaillement seul (variation de $\dot{\gamma}$ à R_p donné).

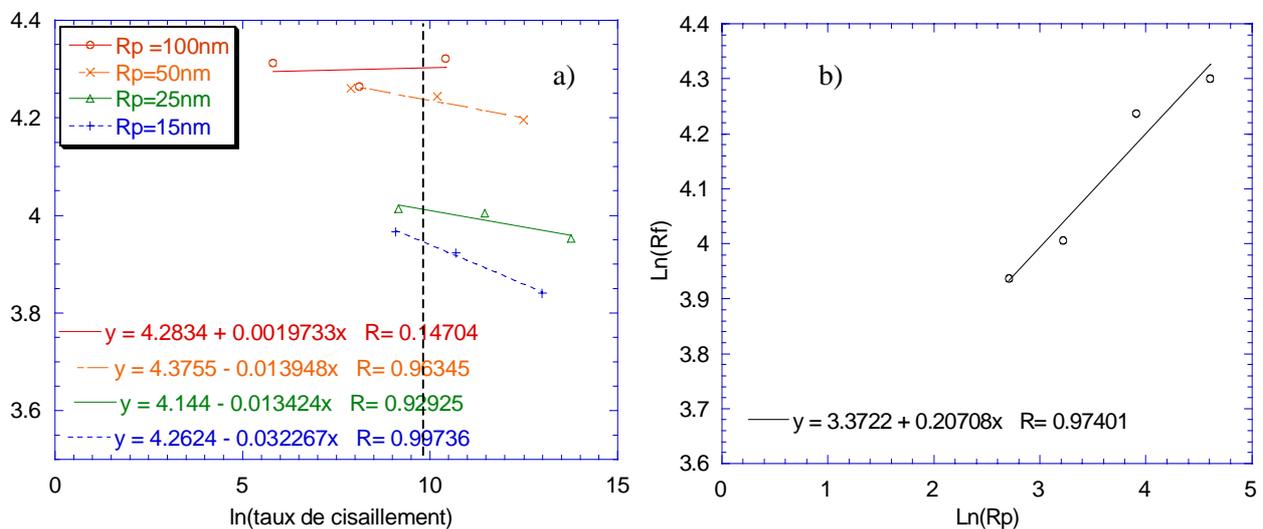


Figure 5-19 : $\text{Ln}(R_f)$ des vésicules de tensioactifs ($R_i=90\text{nm}$). a) en fonction de $\text{Ln}(\dot{\gamma})$, chaque série correspond à un rayon de pores donné, b) à taux de cisaillement constant, en fonction de $\text{Ln}(R_p)$.

D'un point de vue théorique, grâce à un calcul simple on peut évaluer la potentialité des vésicules à être déformées par les contraintes visqueuses en calculant le rapport entre la contrainte visqueuse $\sigma_v = \eta \dot{\gamma}$ et la pression de courbure ΔP_c . Avec les débits et les membranes que nous avons utilisés pour ces expériences, la valeur maximale du rapport de σ_v sur ΔP_c est égale à 0.5. De même le rapport de σ_v sur ΔP_r est au maximum égal à 0.015. En conclusion la contrainte visqueuse n'est peut-être pas suffisamment élevée pour courber les bicouches et encore moins pour les rompre. Il est donc plausible que le taux de cisaillement n'ait aucun effet sur le rayon final des vésicules.

Conclusion

Les droites de la Figure 5-19 sont paramétrées sur très peu de points, malgré cela on peut en tirer quelques grandes tendances. Le rayon final des vésicules dépend surtout du rayon des pores, et très peu de l'effet de cisaillement hydrodynamique, même pour les vésicules de tensioactifs. En outre, on remarque que dans aucun des cas on ne retrouve le comportement $R_f \propto \dot{\gamma}^{-1/2}$ observé par Diat et col. (Chapitre 2.). Ceci signifie que le mécanisme de formation des LUV par extrusion est différent du mécanisme de formation des oignons par cisaillement de Couette, basé sur la rupture des vésicules par l'effet de la contrainte visqueuse.

5.1.5 Corrélation entre la rupture et le changement de taille des vésicules

Nous venons de mettre en évidence le rôle déterminant de la rupture dans le changement de taille des vésicules après extrusion. Si cette idée paraît triviale, il est beaucoup moins évident de prédire la valeur de R_f car la rupture est généralement mal comprise et plusieurs mécanismes peuvent avoir lieu en même temps. Nous proposerons quelques mécanismes de rupture induisant un changement de taille. Mais la rupture peut aussi être réversible et ne pas générer de changement de structure, nous aborderons aussi cette hypothèse.

a) Rupture avec changement de taille

On suppose que la vésicule étirée dans le pore se scinde en n petites vésicules de même taille. Par conservation de surface on peut calculer le rayon de ces n petites vésicules identiques $R_{rupt}(n)$:

Eq 5-5 :
$$R_{rupt}(n) = \frac{1}{\sqrt{n}} R_i$$

Nous reprenons les valeurs de R_f des vésicules de DOPC 100 et de tensioactifs ($R_i=107\text{nm}$), et nous les comparons aux rayons $R_{rupt}(n)$, n variant de 2 à 4. Ces valeurs sont présentées sur la Figure 5-20 a) pour les vésicules de lipides, et sur la Figure 5-20 b) pour les vésicules de tensioactifs.

Sur chacune de ces figures, on voit que dans la gamme de rayons de pores correspondant à $R_p / R_i < 0.5$ chaque valeur de R_f correspond à une valeur de $R_{rupt}(n)$. Par exemple pour les vésicules lipidiques (Figure 5-20 a)), les rayons finaux pour $R_p = 25$ et 15nm sont approximativement égaux à $R_{rupt}(2)$, tandis que ceux obtenus pour $R_p = 7.5$ et 5nm correspondent respectivement à $n=3$ et $n=4$. L'augmentation du nombre de vésicules formées lorsque R_p diminue est logique puisqu'elle correspond à une augmentation de la longueur du sphérocyindre dans le pore. Plus la vésicules est étirée dans le pore et plus elle a de chances d'être « coupées en morceaux ». Ce raisonnement nous amène alors logiquement vers l'hypothèse d'une rupture pilotée par les instabilités de Rayleigh. L'augmentation du nombre de vésicules formées par vésicule initiale devrait donner une augmentation

de la quantité de vésicules après extrusion, mesurable par les techniques de diffusion. Mais c'est effet n'a pas été mesuré, certainement à cause du phénomène de rétention.

On remarque que les rayons finaux des vésicules de tensioactifs concordent avec des ruptures plus importants : $n=3$ dès $R_p=50\text{nm}$ ($R_p=0.5 R_i$). Ce résultat s'explique par la plus grande fragilité de vésicules plus flexibles et plus grandes que les vésicules DOPC100. Il montre aussi encore une fois le rôle prépondérant de R_p par rapport à R_i sur le changement de structure des vésicules.

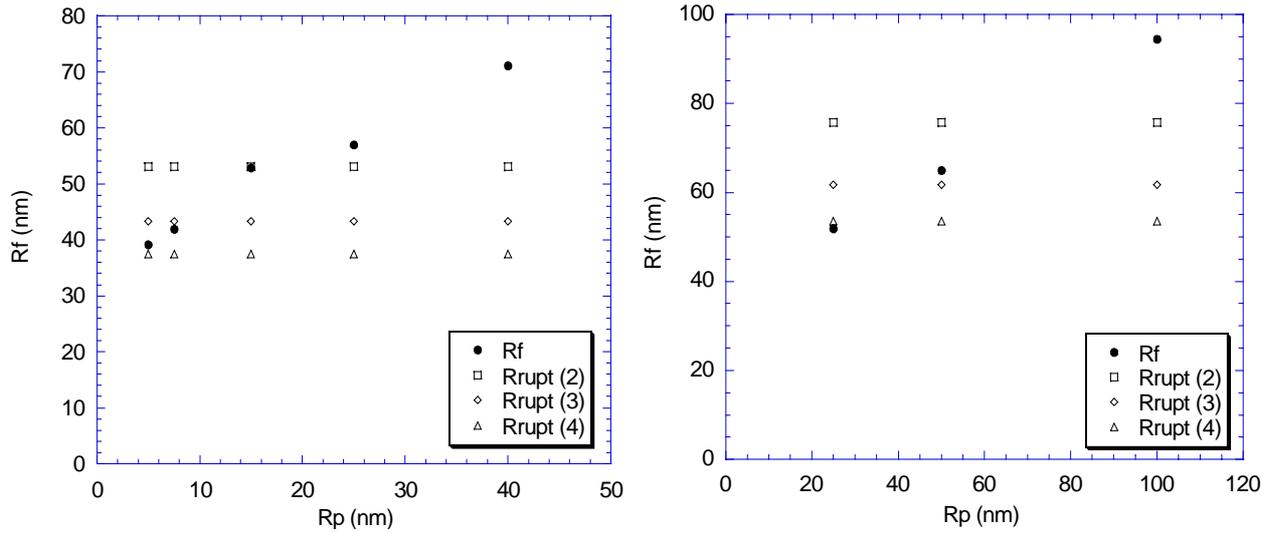


Figure 5-20 : Rayons finaux R_f mesurés en fonction de R_p et rayons $R_{rupt}(n)$ calculés pour $n= 2,3$ et 4 pour a) les vésicules de DOPC 100 ($R_i = 75\text{nm}$), et pour b) les vésicules de tensioactifs ($R_i = 107\text{nm}$).

Instabilités de Rayleigh

Considérons l'hypothèse envisagée par Clerc et Thomson (98), selon laquelle la rupture de vésicules entraînées dans des pores serait causée par des instabilités de Rayleigh. Les vésicules plus larges que les pores y sont étirées sous la forme de sphérocyndres, qui sont susceptibles d'être soumis à des oscillations péristaltiques pouvant entraîner sa cassure en plusieurs petites sphères. Pour que ces instabilités apparaissent, il suffit que le sphérocyndre soit sous tension, et c'est le cas ici : La surface de la vésicule est soumise à une tension (13) Si r est le rayon du cylindre, alors la longueur d'onde de ces ondes péristaltiques est $\lambda = 2\pi r$.

Pour une vésicule de rayon R_i entrée sans cassure dans un pore de rayon R_p , on peut calculer facilement la longueur du sphérocyndre de même surface L^* (Eq 4-3). Si on compare cette valeur à λ , donnée pour chaque rayon de pores, on peut savoir si des instabilités pourront se développer et quel nombre de petites vésicules n pourront être générées au maximum. On peut déduire des valeurs λ le rayon minimal des vésicules issue de cette rupture : R_f^λ théorique. Toutes ces valeurs sont

calculée pour un rayon initial de 75nm dans le Tableau 5-4. Les valeurs R_f^λ y sont comparées au rayon final expérimental issues de la Figure 5-3 a).

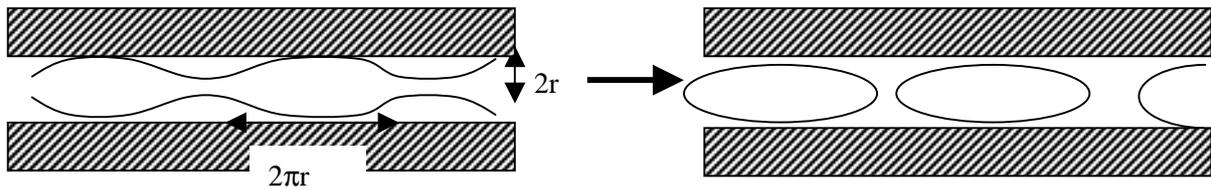


Figure 5-21 : Déstabilisation d'une vésicule étirée en petites perles.

R_f^λ est beaucoup plus grand que R_f pour $R_p > 25\text{nm}$ et beaucoup plus petit pour $R_p < 25\text{nm}$. Le nombre de vésicules formées n n'est donc pas déterminé par le phénomène d'instabilité de Rayleigh. D'ailleurs pour les pores les plus petits, $R_p < 15\text{nm}$, les rayons théoriques sont trop petits pour des vésicules de lipides. Mais il est tout-à-fait possible que la rupture soit initiée par ces instabilités, même si le nombre de vésicules au final est inférieur au nombre de périodes des oscillations péristatiques. En tous cas pour les petits pores, car pour $R_p = 100\text{nm}$ la diminution de taille, observée pour les vésicules de tensioactifs (Figure 5-2), ne peut être induite par les instabilités de Rayleigh puisque dans ce cas R_f^λ est supérieur à R_f . Il doit donc exister d'autres mécanismes de rupture.

R_p (nm)	100	50	25	15	7,5	5
L^*		156	462	823	1691	2550
λ	628	314	157	94,2	47,1	31,4
n	1	1	2	8	35	81
R_f^λ	203.5	88,7	44,3	26,6	13,3	8,87
R_f TA	77.5	65.3	54.9	44.5	48.5	
R_f EPC100	75	63.9	56.5	45.5	35	43

Tableau 5-4 : Valeurs théoriques de la longueur d'onde λ des instabilités de Rayleigh et du rayon des vésicules cassées en sortie R_f . Ces valeurs de rayon final sont comparées aux valeurs expérimentales pour les vésicules de tensioactifs.

Rupture à l'entrée des pores

Ce modèle nous a été inspiré par l'observation d'un écoulement de vésicules géantes dans des micropipettes (82). Il est basé sur le fait que, c'est à l'entrée des pores que les vésicules ont le plus de chances de se rompre car c'est là que la pression est maximale et les effets de courbure les plus importants. Prenons le cas d'une vésicule à moitié entrée dans un pore. La vésicule retenue à l'entrée du pore digite sous l'action des contraintes hydrodynamiques, une vésicule fille est créée et avance dans le pore, rattachée à la vésicule mère par un mince filament. L'écoulement du doigt induit une tension importante au niveau du filament. Si la tension est suffisamment forte et si le filament est suffisamment fin, l'énergie de l'ouverture d'une ligne le long de sa circonférence ne sera pas trop élevée, et la bicouche pourra se rompre à cet endroit. Elle se referme ensuite instantanément et deux vésicules plus petites sont formées.

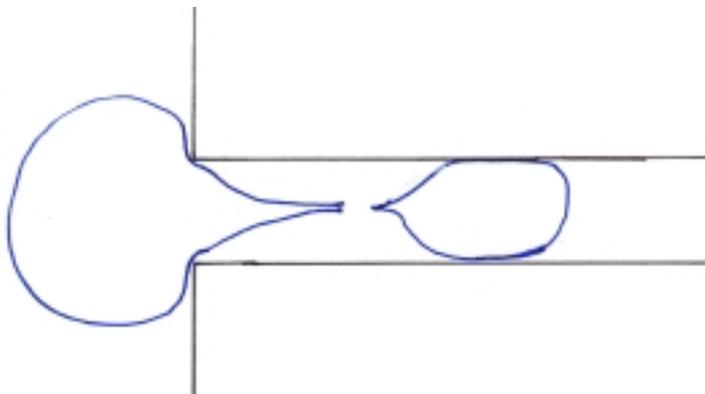


Figure 5-22 : Bourgeonnement d'une vésicule fille, suivi de la rupture du filament qui la retient à la vésicules mère, bloquée à l'entrée du pore.

b) Rupture sans changement de taille

On peut aussi envisager le cas d'une rupture « réversible », sans changement de taille. Il est possible qu'en se rompant, la bicouche forme un grand pore stationnaire susceptible de se refermer ensuite. Par exemple, à l'entrée d'un pore, la bicouche peut se rompre à l'extrémité de sa partie avant, là où la pression est censée être la plus importante. La « vésicule cassée » est alors beaucoup plus déformable, et elle peut aisément suivre l'écoulement et rentrer dans le pore. Elle peut glisser dans le pore ou encore se retourner comme une chaussette comme cela est illustré sur la Figure 5-23. Elle se referme ensuite avec le même rayon, soit à l'intérieur du pore, soit à la sortie. Cette idée a été suggérée par J. L. Rigaud, d'après ces expériences sur la bactériorhodopsine, une protéine membranaire, dont on peut déterminer l'orientation lorsqu'elle est ancrée dans la bicouche de vésicule lipidiques (113).

Pour mettre en évidence ce types de rupture il faudrait étudier le relargage de marqueurs fluorescents de taille modulables, comme les dextrans marqués. Il faudrait se placer dans la gamme de

rayon de pores critique $0.5R_i < R_p < R_i$, un peu à la limite entre les deux régimes de courbure et de rupture. Nous n'avons pas eu le temps de réaliser ces expériences.

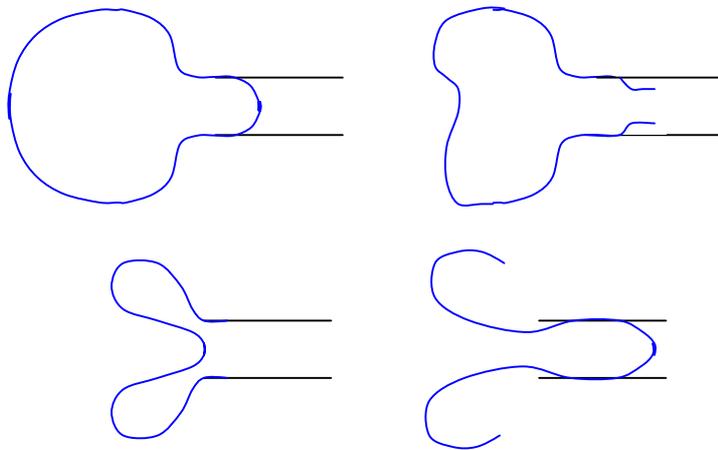


Figure 5-23 : Cassure et retournement d'une vésicule à l'entrée d'un pore.

5.2 Effet de l'extrusion sur la perméation des vésicules. Etude du relargage de marqueurs encapsulés

Les résultats de l'étude structurale précédente ont mis en évidence les deux principaux effets de l'extrusion sur les vésicules : la rétention et la rupture des vésicules. Seul le phénomène de rétention a été quantifié. Pour caractériser la rupture, nous nous sommes tournés vers une technique différente, permettant de mesurer la perméation des vésicules. Il s'agit de l'étude du relargage de marqueurs fluorescents, préalablement encapsulés (114).

Après avoir présenté le principe général et le protocole que nous avons utilisé, nous discuterons les valeurs de perméation et aussi de rétention mesurées par cette méthode.

5.2.1 Présentation de la méthode d'encapsulation, et de son utilisation

a) Principe général

L'une des méthodes les plus utilisées pour mesurer la perméabilité des vésicules aux petites molécules est l'étude du relargage de la 5(6)-carboxyfluoresceine (CF). Ce marqueur fluorescent possède la propriété particulière "d'éteindre" sa fluorescence lorsqu'il est fortement concentré (114). Lorsque ce fluorophore est encapsulé à forte concentration (0,1M) dans des LUV, sa fluorescence est totalement éteinte et la suspension est rouge sombre. La solution extérieure de 5(6)-carboxyfluoresceine est ensuite échangée avec une solution aqueuse de même osmolarité, par passage de la suspension de vésicules chargées dans un gel Sephadex. Les vésicules très concentrées en marqueurs mais diluées

(0,1% de lipides) donnent alors une coloration orangée à la suspension. Lorsque des marqueurs sont relargués par les vésicules, après rupture ou formation de pores transitoires, leur concentration dans la solution extérieure est au maximum égale à $120\mu\text{M}$, puis à $7\mu\text{M}$ après dilution. A cette concentration, l'extinction n'a pas lieu et l'intensité de fluorescence est proportionnelle à la concentration en marqueurs. La solution apparaît alors jaune-vert et légèrement fluorescente. Pour obtenir le pourcentage de fluorophores relargués (et donc la fraction volumique de solution expulsée par la vésicule), il suffit de mesurer le rapport de l'intensité de fluorescence de l'échantillon considéré, sur l'intensité maximale pour un relargage total.

b) Application à l'étude de l'extrusion de vésicules.

Nous cherchons à connaître l'augmentation de perméation des LUV pendant l'extrusion. Nous avons donc décidé d'appliquer la méthode de Weinstein à nos expériences d'extrusion. Le mode opératoire est représenté sur la Figure 5-23. Le premier cadre correspond à l'instant initial, c'est-à-dire juste après la préparation de l'échantillon initial. Dans cet échantillon initial, la concentration totale c_T^0 en CF est maximale, et ces molécules sont encore toutes encapsulées dans les vésicules. La concentration des marqueurs relargués dans la solution externe est donc nulle: $c_F^0 = 0$. Lorsque l'échantillon est extrudé à travers des pores étroits, certaines vésicules passent à travers ces pores, et d'autres sont retenues en amont du filtre, si bien que la concentration totale de CF dans l'échantillon final c_T , peut être inférieure à c_T^0 . Cette concentration c_T est reliée à la concentration initiale c_T^0 par un facteur de proportionnalité noté E , et appelé **élution**, qui représente le pourcentage de vésicules

éluées pendant l'extrusion: $c_T = \frac{E \times c_T^0}{100}$. Si des vésicules sont rompues, une concentration c_F de

marqueurs est relarguée dans la solution. Cette concentration c_F est proportionnelle à la concentration des marqueurs initialement encapsulés, et le facteur de proportionnalité est noté P et appelé **perméation**. Il s'agit du pourcentage de fraction volumique évacuée par les vésicules pendant leur rupture, ou encore du pourcentage de vésicules cassées pendant l'extrusion, si on suppose qu'elles sont parfaitement monodisperses. On obtient: $c_F = \frac{P \times c_T}{100}$. Le but de ces expériences est donc de mesurer

E et P . Rien n'est plus simple puisque les techniques de mesures d'absorbance dans le visible et de fluorescence sont censés donner les valeurs c_T^0 , c_F^0 , c_T et c_F .

En pratique ce n'est pas aussi simple. Les mesures de fluorescence ont été faites au Laboratoire de Recherche sur les Polymères de Thiais, plusieurs heures après la préparation des échantillons au LLB. Or, au repos les vésicules ne sont pas totalement imperméables à la 5(6)-Carboxyfluorescein, et il faut tenir compte de leur relargage naturel pendant ce laps de temps. Ceci est décrit dans le cadre de la Figure 5-24 correspondant à cet instant t , plusieurs heures après la préparation de l'échantillon initial.

Les valeurs auxquelles nous avons réellement accès sont $c_T^0(t)$, $c_F^0(t)$, $c_T(t)$ et $c_F(t)$. Les concentrations totales ne changent pas en fonction du temps et restent égales à c_T^0 et c_T . On en déduit donc très facilement:

Eq 5-6

$$E = \frac{c_T}{c_T^0} \times 100$$

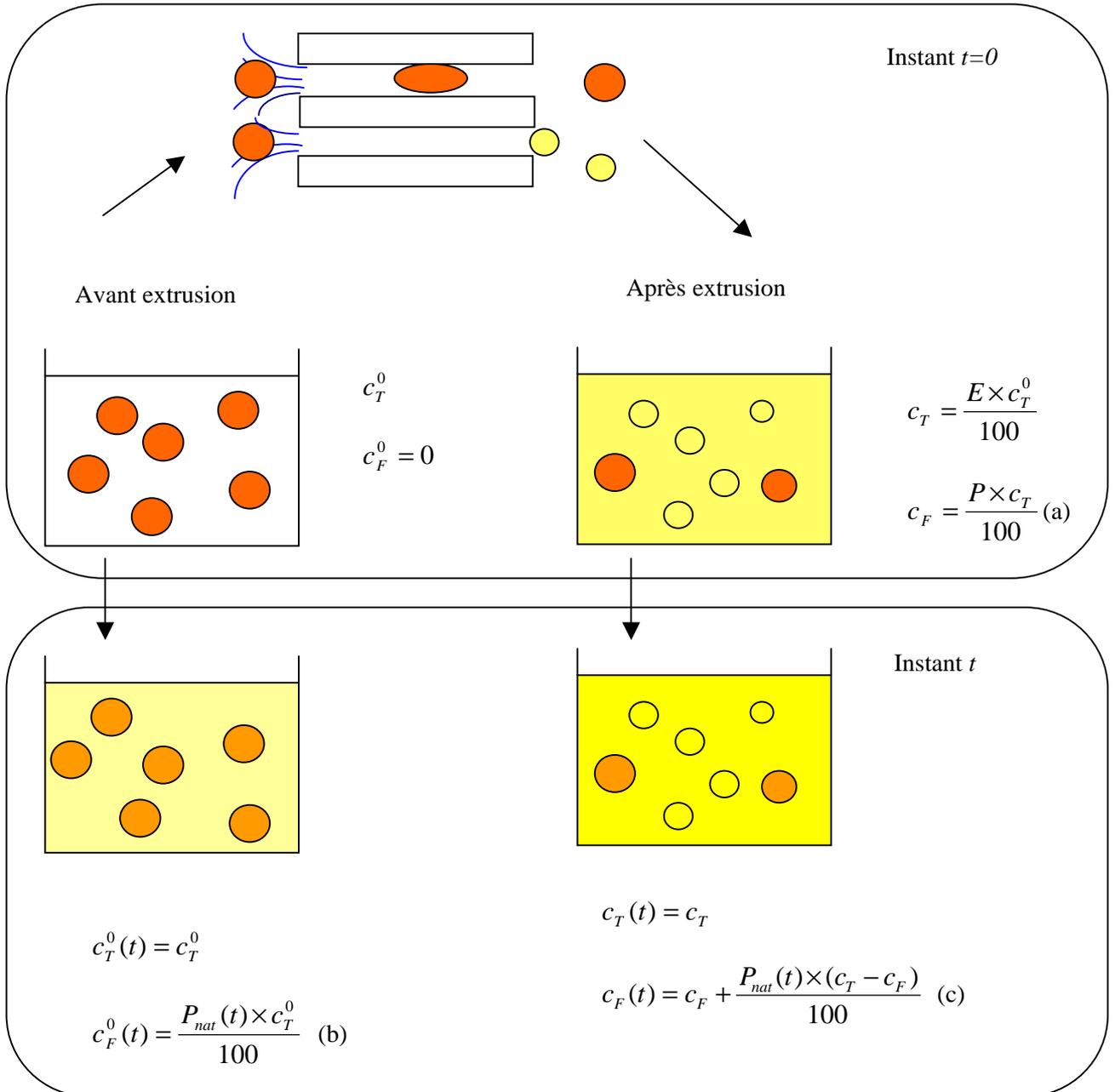


Figure 5-24 : Les différentes étapes de l'extrusion des vésicules encapsulées, à partir du temps $t=0$ de l'encapsulation.

En revanche le relargage naturel s'ajoute à la perméabilité due à l'extrusion. La concentration de marqueurs relargués naturellement est notée $c_{nat}(t)$ et est proportionnelle à la concentration de marqueurs encapsulés à l'instant dans chacun des échantillons à $t=0$: $c_T - c_F$.

$$\text{Eq 5-7} \quad c_{nat}(t) = \frac{P_{nat}(t) \times (c_T - c_F)}{100}$$

Le pourcentage de perméation naturelle $P_{nat}(t)$ est connu pour des durées de l'ordre de l'heure [Needham, 1998 #10], nous l'avons mesurée pour une durée comprise entre 4 et 5h (cf Annexe 3). On suppose qu'il ne dépend que du temps t . En l'éliminant entre les deux relations (b) et (c) (cadre Instant t), on obtient:

$$\text{Eq 5-8} \quad \frac{c_F(t) - c_F}{c_T - c_F} = \frac{c_F^0(t)}{c_T^0}$$

En utilisant l'équation (a) du premier cadre, P est donné en fonction de paramètres mesurables:

$$\text{Eq 5-9} \quad P = \frac{c_F(t) - c_F^0(t)}{c_T - c_T^0(t)} \times 100$$

5.2.2 Protocole expérimental

a) Encapsulation des marqueurs

La 5(6) Carboxyfluoresceine (CF) a été fournie par Fluka, le tampon Tris par Sigma, les membranes $R_p=50$ et 15nm par SPI et $R_p=25$ et 100nm par Nucléopore. La CF est diluée dans une solution de Tris 10mM avec de la soude à 1mM jusqu'à une concentration finale de 100mM . Le pH est ensuite ajusté à $7,5$ par ajout d'acide chlorhydrique. Des vésicules de EPC sont préparés dans cette solution par extrusion à travers des membranes Nucléopore $R_p=50\text{nm}$. La concentration en lipides est de $0,14\%$. Cette suspension de $2,5\text{mL}$ est ensuite éluée dans une colonne Sephadex G-25 M (Pharmacia biotech) avec une solution tampon (Tris 10mM) équi-osmolaire (NaCl 140mM). La suspension de $3,5\text{mL}$ récupérée juste après le volume mort contient les vésicules remplies d'une solution CF 100mM dans une solution extérieure sans marqueur. La concentration en lipides est environ $0,1\%$. Cette suspension est appelée échantillon initial par opposition aux échantillons obtenus après extrusion.

b) Echantillons

Les échantillons sont obtenus après une extrusion de l'échantillon initial à travers une membrane de rayon de pore donné, et avec un débit fixé. le dispositif qui a été choisi est le pousse seringue et lle

porte-filtre Avestin. L'intérêt de ce porte-filtre est de pouvoir aisément fixer une seringue en verre en sortie et ainsi de contrôler directement le volume de l'échantillon désiré. Le défaut du pousse-seringue est de restreindre la gamme de taille de pores, car en-dessous de 30nm la pression devient trop forte pour le moteur; mais lorsque ces expériences ont été réalisées nous ne disposions pas encore de la pompe. Pour chacun des quatre rayons de pores disponibles, quatre séries d'échantillons sont obtenues avec les quatre débits suivants: $Q= 0,02-0,04-0,1$ et $0,2\text{mL/mn}$. Les bornes inférieures et supérieures du débit sont fixées par les limites expérimentales. Pour un débit inférieur à $0,02 \text{ mL/mn}$ le temps d'extrusion dépasse l'heure pour l'extrusion de 1mL . Au-delà de $0,1\text{mL/mn}$, et a fortiori de $0,2\text{mL/m}$, la pression atteint rapidement les 20bars pour $R_p=15\text{nm}$, et l'extrusion devient impossible. L'éluion des vésicules chargées en CF est suivi comme dans une expérience de chromatographie standard: des échantillons sont recueillis pour différents volumes d'éluion v_e variant entre $0,2\text{mL}$ et 1mL (la précision et le volume maximale de la seringue de sortie fixent ces limites). Chaque échantillon est enfin dilué 20 fois avec le tampon Tris, NaCl, $\text{pH}=7,5$.

c) Mesures de concentrations de marqueurs

On connaît la concentration totale c_T en CF en mesurant l'absorbance de l'échantillon à 492nm à l'aide d'un spectromètre UV-visible Varian Cary 50 et en utilisant la loi de Beer-Lambert:

Eq 5-10
$$\ln(I/I_0) = \varepsilon \times l \times c_T ,$$

Le coefficient d'extinction molaire est mesuré $\varepsilon=16050\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (cf Annexe 2).

On déduit aussi la concentration en marqueurs libérés dans la solution extérieure c_f en mesurant l'intensité de fluorescence émise à 540nm lorsque l'échantillon est excité à 450nm grâce à un fluorimètre SLM Aminco. Les courbes de calibration pour ces deux techniques sont présentées en Annexe 2 et 3.

5.2.3 Résultats

Les valeurs de E et P sont présentées en fonction des trois paramètres caractérisant chaque échantillon: le rayon des pores R_p , le débit Q et le volume d'éluion v_e . En réalité, les concentration c_T et c_F ne dépendent presque pas de v_e . Seules les valeurs mesurées pour $v_e= 200\mu\text{L}$ sont significativement différentes des valeurs correspondant aux volumes d'éluion supérieures. Nous présenteront donc pour chaque grandeur, une valeur pour ce volume d'éluion $v_e= 200\mu\text{L}$ et une autre valeur qui sera la moyenne de toutes les valeurs pour $200\mu\text{L} < v_e < 1\text{mL}$.

a) Rétention

Le pourcentage de vésicules éluées à travers les pores est représenté sur la Figure 5-25 en fonction du débit pour les quatre taille de pore étudiées : $R_p = 100\text{nm}$, 50nm , 25nm et 15nm .

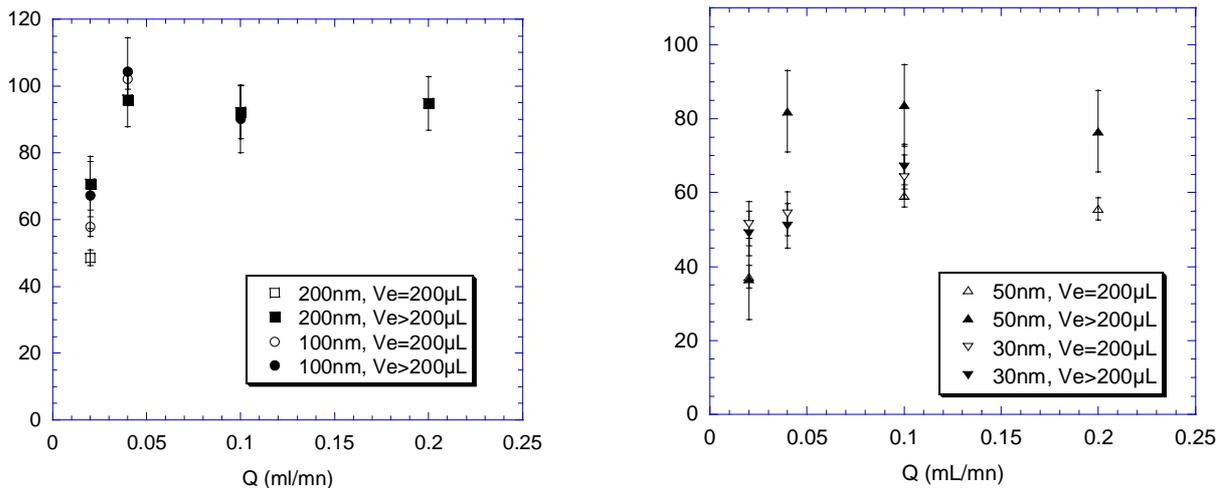


Figure 5-25: Valeurs de E pour les vésicules EPC 50 ($R_i = 65\text{nm}$) en fonction du débit a) pour les grands pores $R_p = 100\text{nm}$ et $R_p = 50\text{nm}$, et b) pour les petits pores $R_p = 25\text{nm}$ et $R_p = 15\text{nm}$.

Pour les pores larges $R_p = 100\text{nm}$ et 50nm , c'est-à-dire $R_p / R_i > 0.5$ on obtient exactement les mêmes résultats (Figure 5-24). La totalité des vésicules passent à travers les pores lorsque le débit est supérieur à $0,02\text{mL/mn}$. Ces résultats complètent les mesures de rétention réalisées avec les techniques de diffusion car nous n'avions pas parcouru cette gamme de pores pour les vésicules de lipides.

Pour un même débit (par exemple $Q=0.1\text{mL/mn}$) l'élution diminue avec le rayon des pores ($E=80\%$ pour $R_p=25\text{nm}$ et $E=65\%$ pour $R_p=15\text{nm}$). Ce résultat confirme ceux obtenus avec les techniques de diffusion.

Enfin, dans tous les cas, l'élution est beaucoup plus faible pour le plus petit débit $Q=0.02\text{mL/mn}$. Entre la valeur de E pour le débit le plus élevée et celle mesurée à $Q=0.02\text{mL/mn}$, on mesure une diminution de l'élution d'environ 30% pour $R_p = 100\text{nm}$ et 50nm , 40% pour $R_p = 25\text{nm}$ et 20% pour $R_p = 15\text{nm}$. On peut raccorder ce résultat à la notion de pression seuil. Au Chapitre 4 nous avons pris comme hypothèse qu'en dessous d'une certaine pression, et donc d'un certain débit, les vésicules ne peuvent pas passer à travers les pores. On ne voit pas, sur la Figure 5-24, une variation brutale de l'élution E de 0 à 100% ; néanmoins ces résultats vérifient bien une diminution significative du pourcentage de vésicules éluées à travers les pores en-dessous d'un certain débit.

b) Perméation

La Figure 5-26 présente les valeurs de perméation pour les différents rayons de pores, en fonction du débit. Les comportements sont très différents entre les petits et les grands pores. Nous discutons

d'abord les résultats avec les petits pores pour lesquelles les effets sont quasiment indépendants du débit et très simples à analyser.

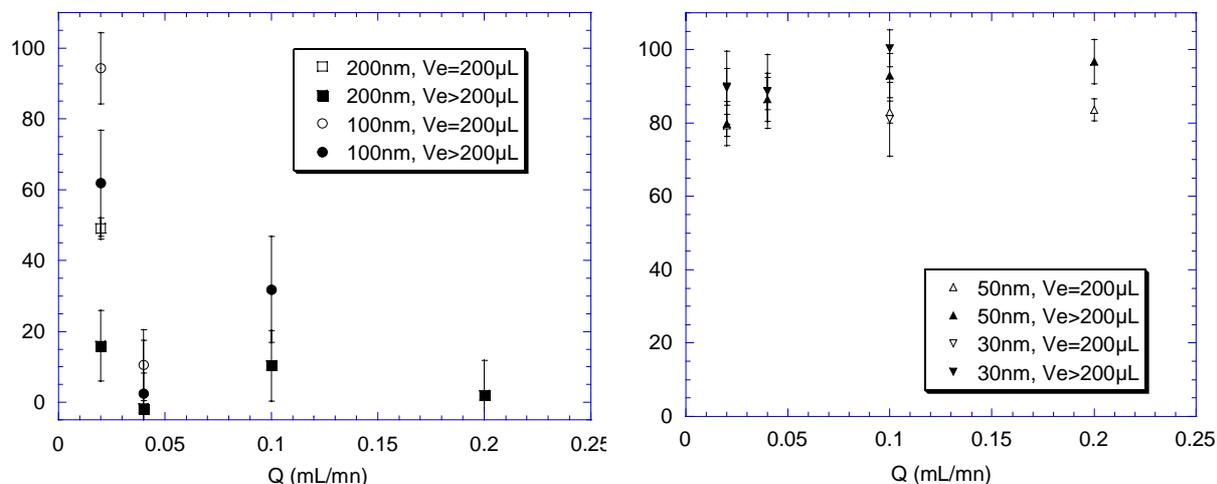


Figure 5-26: Perméation des vésicules de EPC 50 pendant l'extrusion a) à travers des pores de rayon 100 et 50nm, et b) 25 et 15, nm, à des débits variés.

Résultats des petits pores

Les valeurs de P pour les petits pores sont représentés sur la Figure 5-26 b). Comprises entre 80 et 100%, elles montrent la prédominance du phénomène de rupture pour des rapports $R_p / R_i = 0.38$ et 0.23. La perméation augmente légèrement lorsque le débit augmente et lorsque le rayon des pores diminue.

Ces résultats balayent les doutes qui auraient pu subsister après la lecture du chapitre 4 : la rupture de la bicouche est prouvée directement cette fois-ci, dans la gamme $R_p / R_i < 0.5$. Le taux de rupture augmente légèrement avec le taux de cisaillement et lorsque la taille des pores diminue. Ce qui signifie que le comportement du taux de rupture est corrélé à celui du rayon final des vésicules.

Résultats des pores larges

La Figure 5-26 a) présente les pourcentages de marqueurs relargués après une extrusion à travers les pores "larges". Pour les débits supérieurs à 0,02mL/mn (c'est-à-dire dans les conditions d'élution totale), les valeurs de perméation sont très faibles. A part une valeur à 30% pour $R_p=100\text{nm}$, P ne dépasse jamais 10%. En revanche à faible débit, P varie entre 20 et 95%.

Si on regarde la concentration libre de marqueurs c_F pour $R_p=100\text{nm}$ et $Q=0.02\text{mL/mn}$, représentées sur le Tableau 5-5, on s'aperçoit qu'elle augmente de 10% lorsque le volume d'élution augmente de $v_e= 200$ à $500\mu\text{L}$. La concentration totale en marqueurs c_T , quant à elle, augmente de

50%. C'est cette augmentation de c_T , à c_F presque constant, qui est responsable de la diminution de la perméation P de 50% à 15% lorsque v_e augmente de 200 à 500 μ L, dans les mêmes conditions (Figure 5-25 a)). Ainsi la forte perméation mesurée pour les grands pores à faible débit n'est pas un signe de la rupture des bicouches mais plutôt d'une rétention importante ($E=50\%$ pour $R_p=100\text{nm}$ et $Q=0.02\text{mL/mn}$).

v_e (μ L)	c_T (μ M)	c_T^0	c_F	c_F^0
200	3.02	6.23	2.21	2.93
500	4.41	6.23	2.44	2.93

Tableau 5-5 : Concentration de marqueurs totale c_T et libres c_F , après extrusion à travers les pores de rayon $R_p=100\text{nm}$, à $Q=0.02\text{mL/mn}$, comparées aux concentrations équivalentes dans l'échantillon initial c_T^0 et c_F^0 .

5.3 Conclusion

- La structure des vésicules n'est apparemment pas modifiée par l'extrusion lorsqu'elles ne sont pas confinées $R_i < R_p$. En revanche, lorsqu'elles sont extrudées en milieu confiné ($R_i > R_p$), leur taille est réduite ($R_f < R_i$). La variation de la taille des vésicules avec celle des pores est indépendante de la nature de la bicouche, et donc de ses propriétés physiques. Deux phénomènes a priori peuvent expliquer la diminution de taille des vésicules : la rétention des vésicules les plus grosses en amont des pores, et la rupture des vésicules suivie de la reformation de plusieurs vésicules plus petites.
- La rupture est le phénomène le plus marquant ici. L'étude du relargage de marqueurs fluorescents montre que le taux de rupture augmente de 10% environ à plus de 80% lorsque le rayon des pores bascule de la gamme $R_p / R_i > 0.5$ à $R_p / R_i < 0.5$. Dans cette dernière gamme de taille de pore, la rupture est corrélée à la diminution de taille des vésicules. Le nombre de ruptures, ou plutôt le nombre de vésicules reformées à partir d'une seule vésicule, augmente lorsque le rayon des pores diminue. L'effet du confinement est d'ailleurs prépondérant sur le cisaillement dans la diminution de taille des vésicules. Ce rôle déterminant du rayon des pores pour la rupture met en avant deux mécanismes possibles: la fission à l'entrée des pores, et les instabilités de Rayleigh dans les pores. Le dernier mécanisme est quasiment impossible à mettre en évidence, alors que la fission a souvent été visualisée au cours des expériences d'aspiration de vésicules géantes dans des micropipettes (82).
- Nous avons mesuré une rétention de 20 à 30% aussi bien pour les vésicules de tensioactifs que pour les vésicules de lipides. Cette observation contredit les mesures de diminution de perméabilité de la membrane poreuses après le passage de vésicules de lipides (cf chapitre 4). La rétention ne semble pas non plus dépendre de façon significative du rayon des pores, et sa variation en fonction du rayon

des pores n'est pas corrélée avec celle du rayon final des vésicules. Même si la rétention peut expliquer en partie la diminution du rayon des vésicules, cet effet est négligeable par rapport à la rupture, surtout pour les petits pores.

➤ On remarque que, dans les cas de confinement, le rayon final est toujours supérieur au rayon de pores ($R_f > R_p$). On en déduit que les vésicules sont déformées dans les pores. Le paramètre de déformation des vésicules est calculé d'après les valeurs de R_f , et on observe qu'il augmente très fortement lorsque le rayon des pores diminue. A taux de cisaillements comparables, l'élongation des vésicules (b/a) est deux fois plus importante dans les pores que lorsque la vésicule est déformée par un cisaillement de Couette. Ce qui est dû à l'effet de confinement et aussi au type d'écoulement dans les pores. Enfin il est possible que les vésicules de tensioactifs restent déformées à la sortie des pores. Effectivement, l'écart mesuré entre le rayon de gyration et le rayon hydrodynamique, après une extrusion à travers une membrane $R_g=7.5\text{nm}$ et $R_h = 5\text{nm}$, correspond à une forme ellipsoïdale dont le paramètre de déformation atteint 0.6.

6 Passage de vésicules géantes à travers des canaux de PDMS: vision directe au microscope.

6	<u>PASSAGE DE VESICULES GEANTES A TRAVERS DES CANAUX DE PDMS: VISION DIRECTE AU MICROSCOPE.....</u>	151
6.1	INTRODUCTION	155
6.2	REALISATION EXPERIMENTALE.....	155
6.3	OBSERVATIONS	157
6.3.1	ENTREE DES GRANDES VESICULES DANS LES CANAUX	157
6.3.2	RUPTURE DU FILAMENT.....	160
6.4	DISCUSSION ET CONCLUSION	162
6.4.1	PASSAGE DE VESICULES GEANTES A TRAVERS DES CANAUX ETROITS DE PDMS	162
	a) Forces hydrodynamiques.....	162
	b) Déformation des vésicules	163
6.4.2	ANALOGIE AVEC L'EXTRUSION DES VESICULES DANS LES NANOPORES.....	164

6.1 Introduction

La microscopie optique a joué un rôle fondamental dans l'étude expérimentale des propriétés physiques des globules rouges, puis des vésicules géantes. Historiquement, les premières expériences ont permis de calculer le module de courbure d'érythrocytes à partir des mesures d'amplitude des ondulations thermiques de leur membrane. L'observation de vésicules géantes par microscopie de fluorescence ou de contraste (Nomarsky, phase) est ensuite devenue systématique pour la mesure de leurs constantes élastiques (module élastique, de courbure...), avec notamment le développement de la technique des micropipettes (110). En plus de la déformation des bicouches (85), (79), l'observation en microscopie optique permet aussi d'étudier les effets de perméabilité, d'adhésion (71), de rupture (82) des vésicules géantes, pour n'en citer que quelques-uns. Dans le milieu médical, l'observation de cellules sous écoulement a trouvé des applications avec la cytométrie de flux et le tri cellulaire.

Dans notre cas, nous avons cherché à étudier l'écoulement de vésicules géantes à travers des pores micrométriques pour faire l'analogie avec l'extrusion des petites vésicules. Ces expériences permettent de visualiser directement les déformations des vésicules lorsqu'on les force à passer à travers des canaux étroits. Ces visualisations directes ont l'avantage de révéler immédiatement certains mécanismes possibles de passage. Cependant elles sont loin d'être quantitatives, de plus nous devons discuter des dangers que représente le transfert d'interprétation vers les petites vésicules.

J'ai rencontré Olivier Rossier au cours d'une conférence où il présentait ses travaux de thèse sur l'écoulement d'ADN à travers des canaux de PDMS, parallèles et micrométriques. Je l'ai alors convaincu de réaliser les mêmes expériences en utilisant des vésicules géantes à la place des molécules d'ADN. Andrea Fery et Pierre-Henri Puech, qui travaillaient alors également dans l'équipe de Françoise Brochard, sur les vésicules géantes, sont venus prêter main forte pour la réalisation du projet.

6.2 Réalisation expérimentale

Les vésicules géantes de DOPC ont été préparées par Andréa Fery par électroformation. Cette méthode consiste à appliquer un champ alternatif de basse fréquence et de quelques volts entre deux lamelles conductrices séparées par une suspension aqueuse de lipides. Ce mécanisme de formation des vésicules géantes est mal compris et le protocole est établi de façon empirique, cependant il s'agit d'une des méthodes les plus efficaces pour obtenir des vésicules géantes (115).

Les canaux ont été préparés en chambre blanche par Olivier Rossier, par moulage de PDMS sur un réseau microgravé (116). Les canaux sont rectangulaires et parallèles et mesurent 4 à 5 μm de largeur sur 2 μm de hauteur, et 1 à 2cm de longueur. Ils adhèrent à une lamelle en verre sur une des surfaces, et c'est à travers cette lamelle que l'on pourra visualiser les vésicules dans les pores. La surface des

canaux est traitée par de la BSA pour éviter l'adhésion des lipides. La suspension de vésicules géantes est placée dans le compartiment A. La solution aqueuse pénètre dans les canaux par capillarité, et les vésicules sont entraînées par le flux. Pour augmenter la vitesse de pénétration il suffit de rajouter de la suspension dans le compartiment A, et d'augmenter ainsi la pression hydrostatique. Techniquement il est impossible de contrôler le débit précisément, mais on peut mesurer la vitesse des vésicules au microscope.

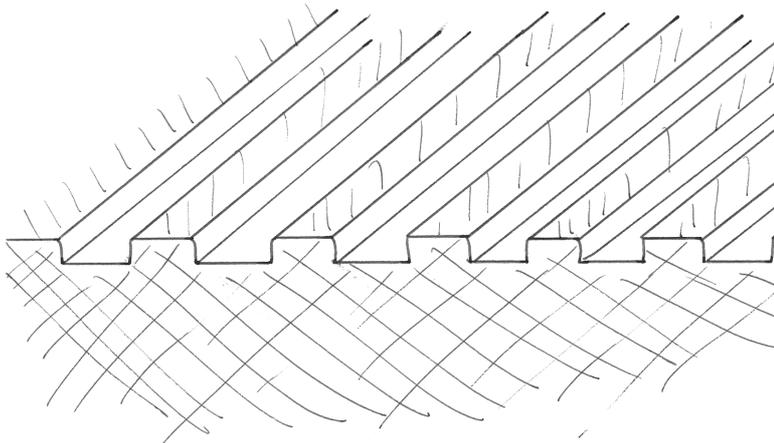


Figure 6-1: Canaux de PDMS

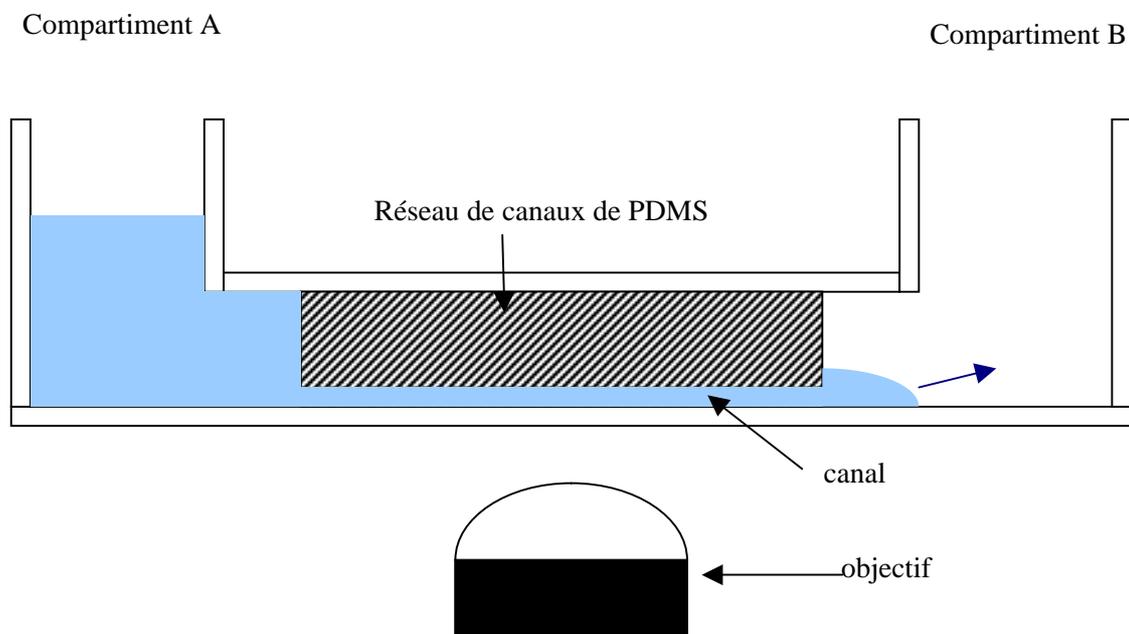


Figure 6-2: Schéma de la visualisation des canaux au microscope.

Les expériences de microscopie ont été réalisées par Olivier Rossier, avec un microscope de fluorescence inversé Leica. Il a réalisé un film d'une heure environ, où on peut voir des centaines de vésicules à l'entrée ou à l'intérieur de dizaines de pores. Nous souhaitons réaliser d'autres expériences en faisant varier le débit sur une gamme plus étendue, mais nous n'en avons pas eu le temps.

6.3 Observations

Pendant toute la durée de l'expérience la vitesse de l'écoulement varie entre $1\mu\text{m/s}$ et $30\mu\text{m/s}$, le cisaillement varie donc entre 0.25s^{-1} et 7s^{-1} . La vitesse de l'écoulement est généralement estimée en mesurant la vitesse d'une petite vésicule (de taille très inférieure à celle du canal) entraînée par le flux. En fonction du débit 1 à 10% des vésicules sont entraînées ou déformées par l'écoulement. On voit donc un effet de bouchage très important, à la fois en amont des pores où la plus grande partie des vésicules sont retenues pendant toute la durée du film (une heure), et aussi dans les pores puisque les vésicules y sont réparties de façon très inhomogènes et sont très concentrées au voisinage de l'entrée des pores.

Les petites vésicules (les vésicules moins larges que les canaux : $2R_i < D$) sont généralement agglutinées en petits paquets dans les pores, et adhèrent plus ou moins aux parois. Par moment une petite vésicule se détache d'un chapelet et est entraînée par l'écoulement jusqu'à ce qu'elle soit bloquée par d'autres vésicules. Les grosses vésicules sont bloquées soit à l'entrée, soit à l'intérieur des canaux. Elles ne progressent dans les canaux que par digitation. La partie qui digite dans le canal est appelée "**vésicule fille**". Elle se détache de la grosse vésicule et circule dans le pore, entraînée par le flux. Elle reste attachée à la **vésicule mère** par un filament qui mesure plusieurs dizaines et parfois quelques centaines de μm . On n'a observé une seule fois la rupture de ce filament. Il ne se produit que lorsque la vitesse de l'écoulement est suffisamment élevée (ici $28\mu\text{m/s}$).

Pour faire l'analogie avec l'extrusion de vésicules à travers des pores fins, on s'intéresse uniquement au cas des vésicules plus larges que les canaux. On étudie en particulier l'entrée de ces vésicules à l'intérieur des canaux, et la rupture de leur membrane, qui n'a été observé qu'une seule fois.

6.3.1 Entrée des grandes vésicules dans les canaux

Les vésicules progressent dans les pores essentiellement par effet de « bourgeonnement » ou « digitation ». Nous présentons ce phénomène, d'une part lorsque les vésicules sont immobiles, et d'autre part lorsque la vésicule fille est en mouvement et avance dans le pore. On distingue encore un troisième cas : quand la vésicules entre en entier dans le pore, sans former de vésicule fille

Digitation-état statique

Sur ce film, l'écoulement est estimé en suivant des agrégats de lipides fluorescents qui se propagent le long des filaments des vésicules. On trouve une vitesse de $0.9\mu\text{m/s}$. Les vésicules restent immobiles pendant les 7s de film. Sept vésicules (dont les diamètres sont compris entre 5.6 et $9.6\mu\text{m}$) sont bloquées à l'entrée de sept canaux différents. Chaque vésicule mère digite dans un pore, et forme une vésicule fille centrée à une distance éloignée de 10 à $46\mu\text{m}$ de l'entrée. Elles sont rattachées aux vésicules mères par un filament dont la largeur est comprise entre 0.4 et $1.6\mu\text{m}$. Pour l'une d'entre elle (vésicule n°1), la vésicule est en fait entrée à moitié à l'intérieur du canal : diamètre externe : $5.6\mu\text{m}$, goulot d'étranglement : $4\mu\text{m}$, diamètre interne : $4.8\mu\text{m}$.

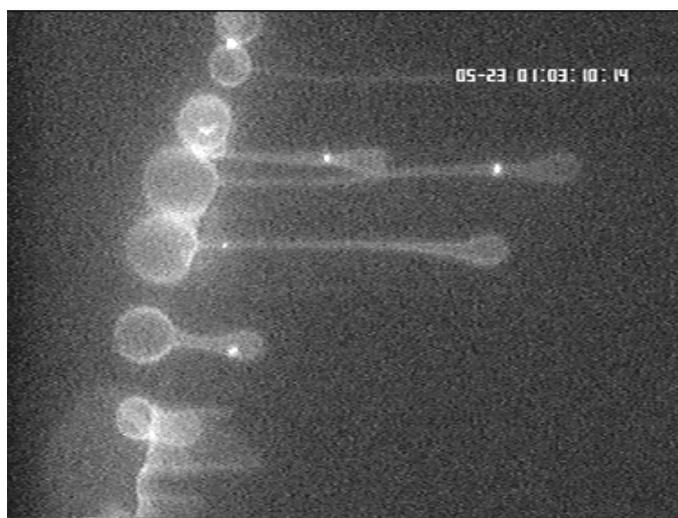


Figure 6-3: Grandes vésicules bloquées à l'entrée des canaux, au début de l'écoulement. Film1 : 01h03m08s18 à 01h03m14s22

Digitation: progression de la vésicule

Ici, il n'y a aucun moyen d'évaluer la vitesse de l'écoulement. Beaucoup de grandes vésicules sont bloquées à l'entrée des canaux. Une grosse tâche très fluorescente est visible, sans qu'il soit possible de distinguer les différentes vésicules. Dans un canal, une vésicule fille (vésicule n°1) est située à $11\mu\text{m}$ de l'entrée, immobiles et rattachée à la vésicule mère par un filament à peine visible ($0.22\mu\text{m}$). Une deuxième vésicule fille se détache de l'amas de fluorescence et se faufile sous la vésicule n°1 pour avancer et se retrouver à $29\mu\text{m}$ plus loin 15s plus tard ($2.1\mu\text{m/s}$). Au cours de sa course la vésicule fille passe d'un diamètre de $3.3\mu\text{m}$ à $2.4\mu\text{m}$, et perd ainsi 61% de son volume. Le filament, quant à lui, garde la même largeur ($0.89\mu\text{m}$) alors qu'il s'allonge de $32.2\mu\text{m}$, ce qui représente un gain en volume égal à trois fois le volume perdu par la vésicule fille. Lorsque la vésicule fille se faufile entre l'autre vésicule et la paroi du canal, elle doit amincir sa tête : un petit appendice de $1.3\mu\text{m}$ de largeur et de $2.2\mu\text{m}$ de longueur reste visible pendant 2s après le passage, avant de résorber totalement.

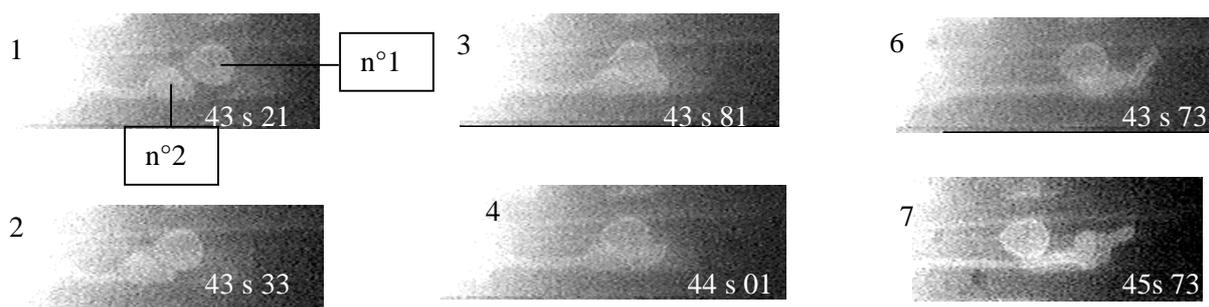


Figure 6-4: Progression du doigt d'une vésicule, déformation et étirement du filament. Film n°3 : 00h15m41s89 à 00h16m00s53

Entrée d'une vésicule entière dans un canal

Pour mesurer la vitesse de l'écoulement on suit une vésicule encore plus petite ($0.8\mu\text{m}$ de diamètre) qui roule sur elle-même sans toucher les parois du canal.

A l'instant initial, une grande vésicule est partiellement entrée dans un pore. La partie extérieure est aplatie par d'autres vésicules contre l'entrée du canal, sous une forme pseudo-ellipsoïdale ($a=7.8\mu\text{m}$, $b=6.7\mu\text{m}$). L'extrémité avant de la vésicule déjà à l'intérieur, est à $11.1\mu\text{m}$ de l'entrée. L'extrémité la plus avancée dans le pore occupe toute la largeur du canal. Cette partie avant de la vésicule ressemble aux autres vésicules filles déjà observées (Figure 6-3), mais avec un filament de plus épais: $1.3\mu\text{m}$ là où il est le plus fin. A l'entrée, le goulot d'étranglement est accentué par la présence d'une petite vésicule (diamètre $2\mu\text{m}$) qui gêne le passage de la grosse.

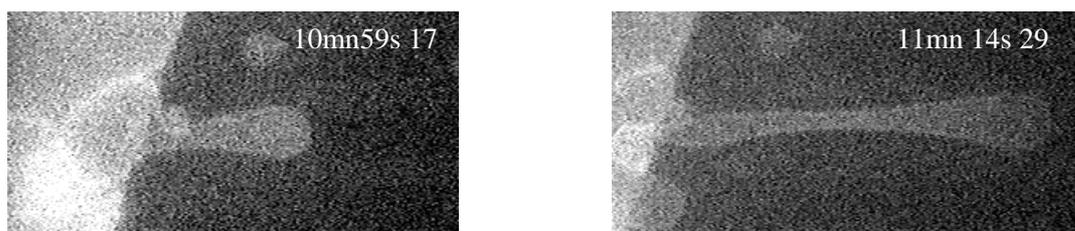


Figure 6-5: Entrée d'une vésicule entière dans un canal. Film n°4 : 00h10m57s89 à 00h10mn16s97

La Figure 6-6 représente la vitesse de la vésicule fille et la vitesse de l'écoulement. Nous remarquons que les deux vitesses sont proportionnelles et que, à chaque instant, la vitesse de la vésicule fille est de 20% environ plus faible que celle de l'écoulement. Ceci nous montre que la grosse vésicules est bien entraînée par l'écoulement ; elle est sûrement un peu freinée par les effets dissipatifs de courbure de la bicouche.

Lorsque la vésicule est entièrement entrée dans le pore, elle forme un tube allongé dont le diamètre varie de $1.8\mu\text{m}$ à $4\mu\text{m}$. A la fin, le paramètre de déformation de la vésicule varie entre 0.80 et 0.90.

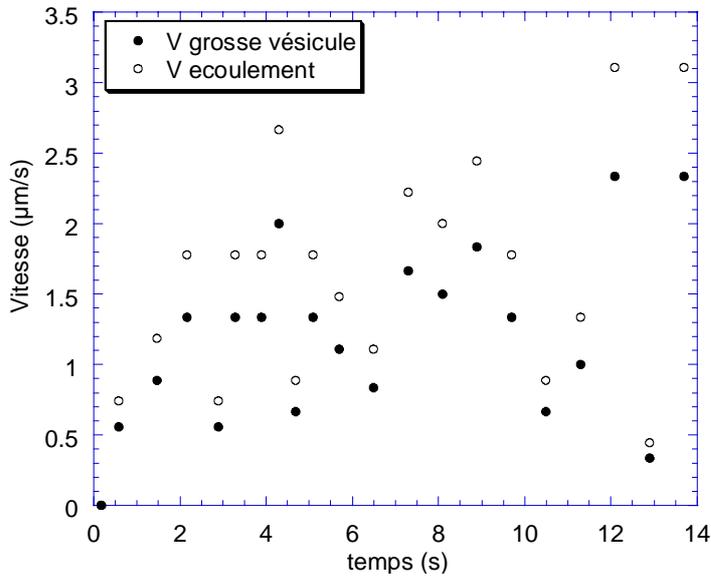


Figure 6-6 : Vitesse de la vésicule pénétrant dans le pore, et vitesse de l'écoulement, mesurée grâce au mouvement d'une petite vésicule dans un canal voisin.

6.3.2 Rupture du filament

Une vésicule fille de largeur $4\mu\text{m}$ et de longueur de $20\mu\text{m}$ est entraînée par l'écoulement. Elle est rattachée à une vésicule mère, située en-dehors du champ de la caméra, par un filament d'épaisseur environ $0.5\mu\text{m}$. La vitesse de l'écoulement est plus élevée que d'habitude: $15\text{-}30\mu\text{m/s}$, et la vésicule fille est difficile à suivre avec la caméra. Les vitesses mesurées avant et après la rupture sont les suivantes :

Temps :00h29mn	Vitesse de la vésicule	Vitesse de l'écoulement	
09s 66 à 13s24	$15.6\mu\text{m/s}$	$15.3\mu\text{m/s}$	Début
13s24 à 15s04	$17.4\mu\text{m/s}$	$17.8\mu\text{m/s}$	Accélération avant rupture
15s04 à 20s04	$17.4\mu\text{m/s}$	$16.7\mu\text{m/s}$	Accélération avant rupture
20s04 à 21s04	$15.1\mu\text{m/s}$	$10\mu\text{m/s}$	Juste avant rupture, le filament est hyper tendu
21s04 à 24s56		$21.5\text{-}28.7\mu\text{m/s}$	Disparition à l'écran
24s56 à 26s44	$28.3\mu\text{m/s}$	$22.4\mu\text{m/s}$	Rupture
26s44 à 26s64	$25.2\mu\text{m/s}$	Impossible à suivre	Juste après la rupture
26s64 à 27s04	$22.6\mu\text{m/s}$	Impossible	

Tableau 6-1: Vésicules de la vésicule et de l'écoulement avant, pendant et après la rupture.

On ne « voit » pas la rupture du filament, mais on la devine à sa forme, avant et après rupture. Avant la rupture, le filament est très tendu. Juste après, le filament commence à osciller faiblement,

puis l'amplitude de ces oscillations augmentent de plus en plus : jusqu'à 2.6 en largeur et 4.3 μm en longueur. La longueur totale du filament (de largeur environ 0.5 μm) est alors estimée à 27.8 μm , en réalité elle évolue avec le temps car le filament s'élargit vers la base de la vésicule fille. De 25s04 à 26s44 la partie rigide près de la base augmente en longueur et en largeur et à partir de 26s 64 elle diminue, le filament se rapproche de la base en oscillant pour disparaître définitivement dans la vésicule fille. Le cisaillement approximatif de l'écoulement est de 3.8s⁻¹, estimé avec la vitesse des vésicules dans les canaux : 15.3 $\mu\text{m/s}$. Cisaillement au moment de la rupture : 7s⁻¹

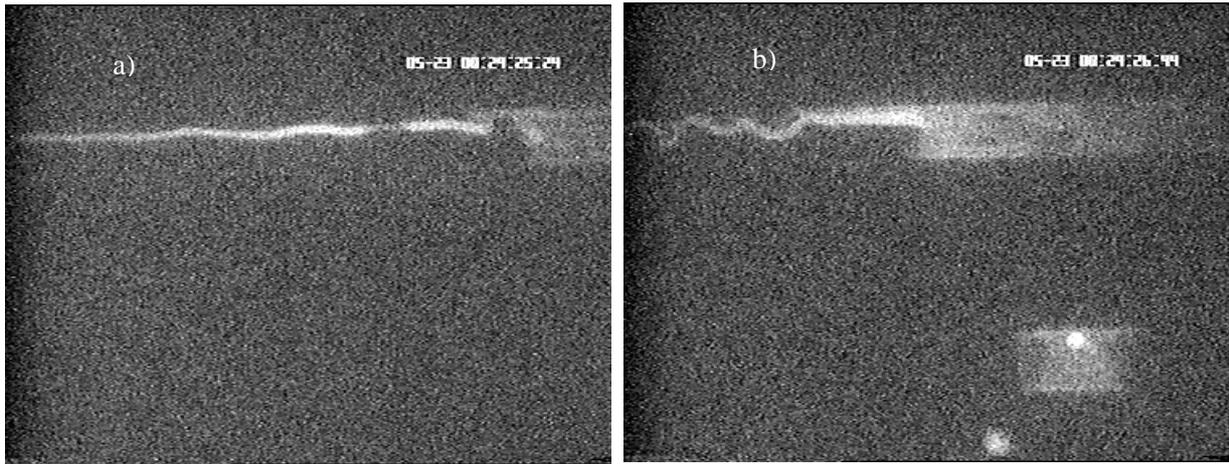
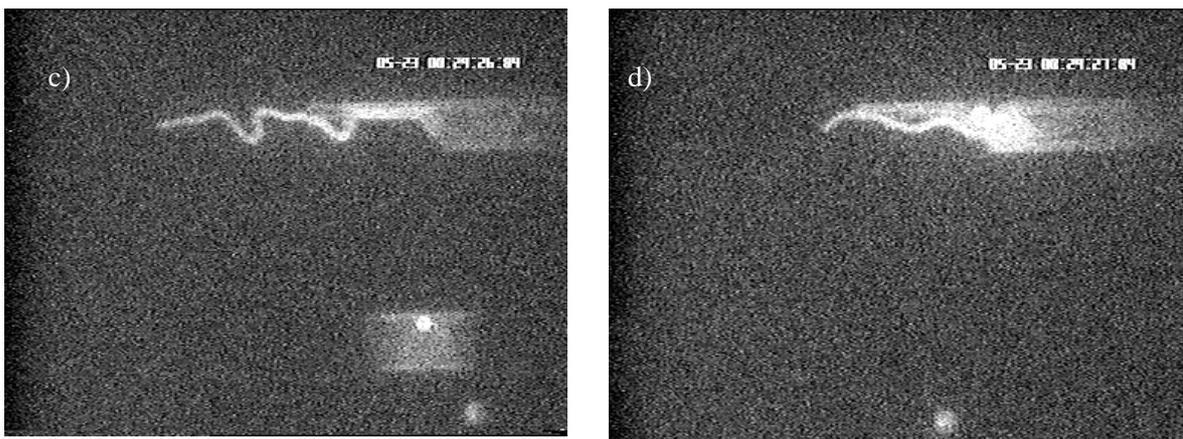


Figure 6-7: la vésicule avant (a)) et après b) rupture. Le filament c) oscille puis d)se rétracte après rupture. Film n°2 : 00h29m09s66 à 00h29m29s56



6.4 Discussion et conclusion

6.4.1 Passage de vésicules géantes à travers des canaux étroits de PDMS

a) Forces hydrodynamiques

Régime statique ou dynamique

Les taux de cisaillement de quelques s^{-1} sont ici plus faibles de plusieurs ordres de grandeurs que dans les pores nanométriques. Mais le temps de relaxation des vésicules sur des échelles micrométriques est beaucoup plus élevé que pour des vésicules d'une centaine de nm de diamètre. Pour savoir si on est en régime statique ou dynamique nous devons comparer l'inverse du taux de cisaillement $1/\dot{\gamma}$ au temps de relaxation τ . Ici $\tau \approx \frac{\eta D^3}{\kappa_c}$, ce qui équivaut à 0.6 environ. Avec des taux de cisaillement variant de 0 à $7s^{-1}$ nous sommes juste à la limite entre les deux régimes. Cette estimation est cohérente avec nos observations. Pour les écoulements les plus faibles (presque nuls), la plupart des vésicules restent immobiles (Figure 6-3), alors que pour un taux de cisaillement de quelques s^{-1} , nous avons observé une partie de vésicule qui semblait avancer très vite et a même été rompue (Figure 6-6). Pour des taux de cisaillements intermédiaires ($\dot{\gamma} \approx 1s^{-1}$) environ un dixième des vésicules pénètrent et progressent dans les pores.

Il y a une quinzaine d'années, Meier a étudié la rupture de cellules sanguines à l'aide de la technique des micropipettes. La vitesse de la cellule fille après rupture est constante et comprise entre 0.15 et $1.2\mu m/s$, ce qui correspond à un taux de cisaillement de 0.06-0.5 s^{-1} . Cette rupture aurait été observée lorsque la pression d'aspiration est augmentée de 20 à 800Pa. Sur le film nous avons observé une rupture d'une vésicule pour des taux de cisaillement un peu plus élevée. Nous allons maintenant évaluer la pression.

Evaluation de la pression à l'entrée du pore

La pression peut être déduire de la vitesse de l'écoulement si on connaît les dimensions des canaux. Les canaux sont de section rectangulaire $2\mu m \times 5\mu m$ et de longueur de l'ordre du cm. L'expression du gradient de pression le long d'un canal ellipsoïdal pour un débit Q est :

$$\text{Eq 6-1} \quad Q = \frac{\pi \Delta P}{4\eta L_p} \times \frac{a^3 b^3}{a^2 + b^2}$$

On trouve que pour un taux de cisaillement de l'ordre de $1 s^{-1}$ on a une pression hydrostatique 4000Pa.

Si on considère que l'on est dans des conditions hydrostatiques, cette pression peut être comparée aux pressions d'aspirations de vésicules dans des micropipettes. Dans ces expériences on retrouve effectivement des pressions de l'ordre du millier de Pascal (82).

b) Déformation des vésicules

Entrée des vésicules par courbure de la bicouche – vérification des calculs de Gompper et Kroll

Lorsqu'on visionne le film en entier on observe que les effets d'entrées sont prédominants dans cette gamme de débit. La déformation d'une vésicule fluctuante entraînée dans un pore étroit a été décrite par les simulations de Gompper et Kroll (62). On peut comparer ces simulations aux clichés obtenus de vésicules pénétrant dans les canaux (Figure 6-8). Sur nos photos, les vésicules sont relativement tendues par la tension lumineuse et les vésicules prennent plutôt une forme sphérique à l'extérieur du pore. Lorsque leur forme n'est pas sphérique, c'est le cas pour la vésicule qui pénètre entièrement dans le pore (Figure 6-5), c'est la pression des vésicules voisines qui impose sa forme.

En ce qui concerne la forme de la partie avant de la vésicule (on l'appelle ici vésicule fille), à l'intérieur du canal, un filament mince qui relie la vésicule mère à la vésicule fille est déjà présent sur les simulations de Gompper et Kroll, mais là encore il apparaît plus tendu sur les clichés expérimentaux. La formation, la stabilité de ce filament fait l'objet de nombreuses études actuellement.

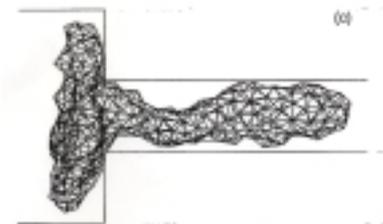
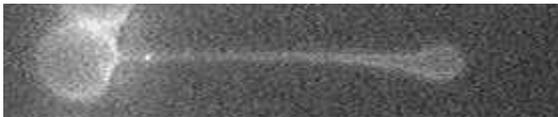


Figure 6-8 : Comparaison entre la photo d'une vésicule géante qui entre dans un canal de PDMS et les résultats des simulations de Gompper et Kroll.

Déformation des vésicules dans les canaux – test de la théorie de Bruinsma

Une fois rentrée à l'intérieur du canal, la vésicule fille prend la forme d'une ellipsoïde ou d'un sphérocyindre de même largeur que le canal. Dans tous les cas sa longueur excède rarement le double de la largeur du canal. On a observé quelques fois (1 à 10%) des sphérocyindres isolés en mouvement, comme cela est décrit par les calculs de Bruinsma. Contrairement aux prédictions de Bruinsma, ils ne changent pas de forme, sauf lorsqu'ils heurtent un obstacle. Il y a plusieurs raisons possibles. Soit ils ne sont pas en mouvement pendant suffisamment longtemps, soit la pression

hydrostatique n'a pas atteint la valeur critique qui correspondrait à une succession de transitions de phase pour la partie arrière de la vésicule.

Filament

Les filaments reliant vésicule mère fille peuvent être très longs (de l'ordre du mm), et donc un paramètre de déformation très important par rapport à une forme sphérique initiale ($b/a \approx 100$), et à une perte en volume très importante aussi (de l'ordre de 80%). Cette perte en volume est calculée à partir de la forme sphérique correspondant à la même surface.

Observations d'instabilités de Rayleigh ?

A aucun moment nous n'avons observé d'instabilités de Rayleigh, quelle que soit la largeur des vésicules étirées et des filaments. Pourtant les tubes de lipides contenus dans les pores sont soumis à une tension (pression hydrostatique, contrainte visqueuse). Cette tension n'est certainement pas suffisamment élevée.

6.4.2 Analogie avec l'extrusion des vésicules dans les nanopores

Depuis les calculs de renormalisation de l'énergie de la membrane par les ondulations thermiques, on sait que les petites vésicules sont moins sensibles à l'effet thermique. Le réservoir de surface que représente les fortes ondulations thermiques des GUV leur permet de se déformer très fortement sous la forme de tubules. Dans le cas des LUV, ces fortes déformations sont impossibles car elles ne disposent pas de la surface nécessaire. On s'attend donc toujours à ce que, contrairement aux vésicules géantes, les petites vésicules aient une tension de surface non nulle à l'équilibre, mais cette tension n'a jamais été quantifiée. En outre, on sait que l'énergie de courbure devient infini lorsqu'on tente de courber une bicouche avec un rayon de courbure de l'ordre de l'épaisseur de la bicouche. Le module de courbure n'est plus indépendant R_p , lorsque celui-ci est égale à quelques nanomètres.

Pour toutes ces raisons, la physique des petites vésicules peut être très différente de celle des vésicules géantes. Il peut être exagéré de penser que l'écoulement de vésicules géantes dans des canaux micrométriques est une représentation agrandie de l'extrusion de vésicules dans des pores nanométriques. Par exemple les filaments qui s'étirent à partir des vésicules géantes ont des largeurs de l'ordre de quelques centaines de nm. Que dire de l'existence de filaments similaires pour des vésicules dont la taille est inférieure à la centaine de nm? En revanche, la prédominance des effets d'entrées et le blocage des vésicules à l'entrées des canaux semblent cohérent avec les mesures de pression effectuées pour les petites vésicules de lipides.

6.5 Conclusion

Ces observations sont très qualitatives. Elles mériteraient d'être confrontées à des calculs qui prédiraient les déformations des vésicules, un peu comme l'avait fait E. Evans (60) pour l'aspiration de globules rouges dans une micropipette.

Mais surtout, ces expériences ont été réalisées à très faibles débits et les vésicules sont faiblement entraînées dans les pores. Il serait très intéressant de voir si, comme dans les nanopores, la majorité des vésicules se cassent à débits plus élevés. L'avantage ici, serait de pouvoir visualiser le mécanisme de rupture à l'intérieur des pores. Dans ce régime de forts débits nous verrions peut-être apparaître des instabilités de Rayleigh sur la surface des vésicules, ou au contraire, les vésicules prendraient la forme d'un sphérocyindre asymétrique prédit par Bruinsma sans se rompre.

7 Conclusions et perspectives

Pour étudier la déformation et la rupture des vésicules lorsqu'elles sont extrudées à travers des pores étroits, nous avons associé plusieurs techniques complémentaires : mesures macroscopiques de courbes débit-pression, étude de structure, mesure de fluorescence et microscopie de fluorescence. L'étude hydrodynamique (courbes débit-pression) est basée sur un montage original dont l'amélioration a été poursuivie tout au long de la thèse.

Les mesures hydrodynamiques ont mis en évidence deux régimes d'écoulement : d'une part le régime aux bas débits révélateur des mécanismes d'entrée, et d'autre part le régime aux forts débits décrivant l'écoulement hydrodynamique des vésicules dans les pores. D'après ces expériences et celles de microscopie avec les vésicules géantes, il apparaît que les effets d'entrée sont prépondérants. C'est sur cette étape de l'extrusion que nous avons obtenu le plus d'informations quant aux mécanismes mis en jeu. Au-delà de la détermination des mécanismes d'entrée, les mesures de pression s'avèrent être une technique efficace pour caractériser les constantes élastiques des petites vésicules, notamment la rigidité de courbure et la tension de lyse. Pour les pores de rayons supérieurs à la moitié du rayon moyen des vésicules ($R_p / R_i > 0.5$) le mécanisme d'entrée est la courbure de leur bicouche. Ce mécanisme est contrôlé par la rigidité de courbure, et les mesures de pression seuil ont permis de trouver des valeurs de κ_c en accord avec les données de la littérature. La gamme de rayons de pores $R_p / R_i < 0.5$ correspond à un régime d'entrée des vésicules par rupture. Les mesures de pression seuil nous ont donné une valeur σ_L proche de celles de la littérature pour les vésicules de lipides. Pour la première fois, nous avons mesuré une tension de lyse pour des vésicules de tensioactifs : $\sigma_L = 1.4 \pm 1$ mN/m, soit cinq fois moins que celles des lipides. La rupture des vésicules est aussi directement prouvée et quantifiée par l'étude du relargage de marqueurs fluorescents, et la caractérisation structurale des vésicules montre qu'elle est corrélée à la diminution de taille des vésicules. La rétention doit aussi intervenir dans ces changements de taille, mais ses effets sont négligeables. La rupture est engendrée majoritairement par les effets de confinement et de pression, et l'effet du cisaillement est minoritaire. Ces observations sont compatibles avec le mécanisme de rupture par fission à l'entrée des pores, observé dans les expériences d'aspiration de vésicules géantes dans des micropipettes (82)

Une fois rentrées dans les pores, les vésicules y sont déformées et leur paramètre de déformation, obtenu d'après les mesures de rayons hydrodynamiques, augmente fortement lorsque la taille des pores diminue. Le rapport du rayon de gyration sur le rayon hydrodynamique semble montrer que les vésicules de tensioactifs restent déformées à la sortie des pores. Les effets de bouchage et de rupture

sont sûrement importants aussi dans les pores. Les quelques expériences d'observation directe des vésicules géantes, réalisées à faible débit, le montre dans un cas.

A la fois les mesures de pression et les techniques de diffusion ont montré l'existence d'un phénomène important de rétention par accumulation en amont des pores et/ou par adsorption des lipides. Le taux de rétention mesuré par diffusion de lumière et de neutrons est à peu près la même pour les deux types de vésicules. Pourtant l'augmentation de pression qui en découle n'est observée que pour les vésicules de lipides. Cette différence est peut-être due à leur plus grande rigidité et à leur plus faible perméabilité à l'eau. Une couche de vésicules de lipides freinerait donc plus l'écoulement que des vésicules de tensioactifs. Une autre raison pourrait être que le bouchage des pores soit principalement dû à l'adsorption des lipides.

Le bouchage des pores pose surtout de gros problèmes pour l'interprétation des courbes débit-pression. L'adsorption des lipides semble jouer un rôle très important dans ces effets de bouchage, aussi il serait très intéressant de répéter les mêmes expériences avec des membranes préalablement traitées avec de la BSA. Une autre façon d'obtenir des résultats précis sur la partie linéaire des courbes débit-pression serait d'explorer des gammes beaucoup plus étendues de débit et de pression. La pompe de chromatographie permet d'atteindre des valeurs dix fois plus élevées de débit et de pression que celles que nous avons utilisées. Il suffit donc de préparer de plus grands volumes d'échantillons, avec un extrudeur mécanique par exemple.

Pour répondre à quelques-unes des questions que nous nous sommes posés au cours la thèse, d'autres expériences pourraient être réalisées. Pour savoir si les vésicules sont encore déformées après l'extrusion on pourrait faire des clichés de cryo-microscopie. Un des modèles de rupture à taille constante des vésicules, le retournement de la bicouche à l'entrée du pore, pourrait être quantifié. Il est possible d'incorporer certaines protéines membranaires (la bactériorhodopsine) orientées dans un seul sens dans la bicouche des vésicules (113), il suffirait alors de mesurer l'orientation des protéines en sortie des pores pour savoir si les vésicules ont retourné leur bicouche. En ce qui concerne plus généralement la rupture sans changement de taille, il est possible d'évaluer la taille des pores dans la bicouche en suivant le relargage de polymères fluorescents de taille contrôlable.

L'utilisation de la nouvelle technique mise au point pour mesurer les constantes élastiques des petites vésicules mériterait d'être approfondie. On pourrait faire varier la tension de lyse et la rigidité de courbure plus finement par l'incorporation de plus de cholestérol dans la bicouche, de sels biliaires pour la rendre plus flexibles, lipides plus variés (DLPC...).

Dans une perspective plus large, on peut trouver d'autres améliorations pour ce montage. Par exemple on pourrait utiliser les expériences d'extrusion de la même façon qu'une technique de

chromatographie. Par exemple, la mesure de la pression en fonction du temps, lorsqu'on utilise la boucle d'injection, nous donnerait le temps réel que met un certain volume de suspensions vésiculaires pour passer à travers les pores. D'autres types de détecteurs en ligne, comme un photomultiplicateur ou un spectromètre de fluorescence, nous permettraient de mesurer la variation de la taille, ou du relargage de marqueurs fluorescents en fonction du temps d'élution. Un moyen de simplifier l'écoulement hydrodynamique à travers des pores serait d'utiliser un champ différent du gradient de pression, comme un champ électrique par exemple.

Il serait aussi très intéressant de faire passer d'autres systèmes dans ces membranes poreuses et de tester leurs propriétés élastiques: polymères, émulsions, mousses... Enfin, il est envisageable aussi de suivre le passage d'une seule vésicule dans un pore unique grâce à des mesures de résistivité ultra sensibles ou de fluorescence. Ce type d'expérience a déjà été réalisé mais uniquement pour des particules colloïdales (20).

Références

1. A. D. Bangham, M. M. Standish, J. C. Watkins, *J. Mol. Biol.* **13**, 238 (1965).
2. D. D. Lasic, *Liposomes: from Physics to Applications* (Elsevier science, 1993).
3. B. M. Disher *et al.*, *Science* **284**, 1143-1145 (1999).
4. O. Diat, D. Roux, F. Nallet, *J. Phys. II France* **3**, 14271452 (1993).
5. J. B. A. F. Smeulders, J. Mellema, C. Blom, *Phys. Rev. A* **46**, 7708-772 (1992).
6. E. Neumann, S. Kakorin, K. Toensing, *Farrad. Discuss.* **111**, 111-125 (1998).
7. J.-C. Bradley, M.-A. Guedeau-Boudeville, G. Jandeau, J.-M. Lehn, *Langmuir* **13**, 2457-2462 (1997).
8. F. Szoka *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta.* **601**, 559-571 (1980).
9. M. J. Hope, M. B. Bally, G. Webb, P. R. Cullis, *Biochim. Biophys. Acta* **812**, 55-65 (1985).
10. L. D. Mayer, M. J. Hope, P. R. Cullis, *Biochim. Biophys. Acta* **858**, 161-168 (1986).
11. D. G. Hunter, B. J. Frisken, *Biophys. J.* **43**, 27-30 (1998).
12. B. J. Frisken, C. Asman, Patty, *Langmuir* **16**, 928-933 (2000).
13. R. Bruinsma, *Physica A* **234**, 249-270 (1996).
14. F. P. Bretherton, *J. Fluid. Mech* **10**, 166-188 (1961).
15. P.-G. de Gennes, *Scaling Concepts in Polymer Dynamics* (Cornell University Press, 1979).
16. C. Quéguinier, D. Barthès-Diesel, *J. Fluid. Mech.* **348**, 349-376 (1997).
17. T. W. Secomb, R. Skalak, N. Ozkaya, J. F. Gross, *J. Fluid. Mech.* **163**, 405-423 (1986).
18. P. B. Price, R. M. Walker, *Phys. Rev. Let.* **8**, 217-219 (1962).
19. R. W. de Blois, C. P. Bean, , R. K. A. Wesley, *J. Col. Int. Sci.* **61**, 323-334 (1977).
20. C. P. Bean, M. V. Doyle, G. Entine, *J. Col. Int. Sci.* **41**, 1454-1459 (1970).
21. T. P. Hoar, N. F. Mott, *J. Chem. Phys.* **9**, 97-99 (1959).
22. D. Zaho *et al.*, *Science* **279**, 548 (1998).
23. J. Li *et al.*, *Nature* **412**, 166-169 (2001).

24. J. C. Hulteen, C. R. Martin, in *Nanoparticles and Nanostructured Films* J. H. Fongler, Ed. (Wiley-VCH, 1998).
25. A. Katchalsky, P. F. Curran, *Non Equilibrium Thermodynamics in Biophysics* (Harvard University Press, 1965).
26. A. J. Staverman, *Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas* **70**, 344-352 (1951).
27. G. Guillot, Thèse (1986).
28. E. M. Renkin, *J. Gen. Physiol.* **38**, 225 (1954).
29. C. P. Bean. (Marcel Dekker, 1972).
30. J. Happel, H. Brenner, *Low reynolds Number Hydrodynamics* (Prentice-Hall, N. J., 1965).
31. P. L. Paine, P. Scherr, *Biophys. J.* **15**, 1087-1091 (1975).
32. R. E. Beck, J. E. Schultz, *Biochim. Biophys. Acta* **255**, 273-303 (1972).
33. C. K. Colton, C. N. Satterfield, *AIChE J.* **21**, 289-298 (1975).
34. D. S. Cannell, F. Rondelez, *Macromolecules* **13**, 1599-1602 (1980).
35. M. P. Bohrer, *Ind. Eng. Chem. Fundam.* **22**, 72-78 (1983).
36. E. F. Cassassa, *J. Poly. Sci. B* **5**, 773-778 (1967).
37. M. Daoud, P. G. de Gennes, *J. Phys.* **38**, 85-93 (1977).
38. F. Brochard, P. G. de Gennes, *J. Chem. Phys.* **67**, 52-56 (1977).
39. L. Movileanu, H. Bayley, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 10137-10141 (2001).
40. J. L. Anderson, D. M. Malone, *Biophys. J.* **14**, 957-981 (1974).
41. J. L. Anderson, *J. Theor. Biol.* **90**, 405-426 (1981).
42. S. Daoudi, F. Brochard, *Macromolecules* **11**, 751-758 (1978).
43. W. Munch, L. P. Zestar, J. L. Anderson, *J. Memb. Sci.* **5**, 77-102 (1979).
44. T. D. Long, J. L. Anderson, *J. Poly. Sci.* **22**, 1261-1281 (1984).
45. C. Vinches, C. Coulon, D. Roux, *J. Phys. II France* **2**, 453-469 (1992).
46. U. Seifert, *Adv. Phys.* **46**, 13-137 (1997).
47. U. Seifert, R. Lipowsky, in *Handbook of Biological Physics* R. Lipowsky, E. Sackmann, Eds. (Elsevier Science, 1995).
48. R. Lipowsky, *Nature* **349**, 475-481 (1991).
49. M. Rosoff, *Vesicles* (Marcel dekker, 1996).

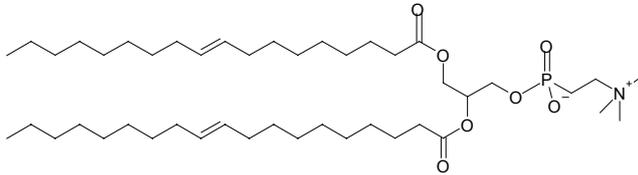
50. J. Israelachvili, in *Intermolecular and surfaces Forces*. (Academic Press, San Diego, 1991) pp. 366-394.
51. S. A. Safran, P. A. Pincus, D. Andelman, F. C. MacIntosh, *Phys. Rev. A* **43**, 1071-1078 (1991).
52. W. Helfrich, *Naturforsch Z.* **28**, 693-703 (1973).
53. W. Helfrich, *J. Phys. France* **47**, 321-329 (1986).
54. F. Auguste, Thèse (Bordeaux) (1993).
55. W. Helfrich, R.-M. Servuss, *Il Nuovo Cimento* **3**, 137-151 (1984).
56. L. Peliti, S. Leibler, *Phys. Rev. Lett.* **54**, 1690-1693 (1985).
57. P.-G. de Gennes, C. Taupin, *J. Phys. Chem.* **86**, 2294-2304 (1982).
58. J. Oberdisse *et al.*, *Langmuir* **12**, 1212 (1996).
59. T. M. Fisher, M. Stöhr-Liesen, H. Schmid-Schönbein, *Science* **202**, 894-896 (1978).
60. E. Evans, *Biophys. J.* **43**, 27-30 (1983).
61. E. Evans, D. Needham, *J. Phys. Chem.* **91**, 4219-4228 (1987).
62. G. Gompper, D. M. Kroll, *Phys. Rev. E* **52**, 4198-4208 (1995).
63. K. H. de Haas, C. Blom, D. van den Ende, M. H. G. Dhuits, J. Mellema, *Phys. Rev. E* **56**, 7132-7137 (1997).
64. M. Kraus, W. Wintz, U. Seifert, R. Lipowsky, *Phys. Rev. Lett.* **77**, 3685-3688 (1966).
65. N. Shahidzadeh, D. Bonn, O. Aguerre-Chariol, J. Meunier, *Phys. Rev. Lett.* **81**, 4268-4271 (1998).
66. J. B. A. F. Smeulders, C. Blom, J. Mellema, *Phys. Rev. A* **42**, 3483-3498 (1990).
67. M. Bergmeier, M. Gradzielski, H. Hoffmann, *J. Phys. Chem. B* **102**, 2837-2840 (1998).
68. R. Weigel, J. Läger, W. Richtering, P. Lindner, *J. Phys. II France* **6**, 529-542 (1996).
69. O. Diat, D. Roux, *J. Phys. II France* **3**, 9-14 (1993).
70. P. Panizza, A. Colin, C. Coulon, D. Roux, *Eur. Phys. J. B* **4**, 65-74 (1998).
71. I. Cantat, C. Misbah, *Phys. Rev. Lett.* **83**, 880-883 (1999).
72. U. Seifert, *Phys. Rev. Lett.* **83**, 876-879 (1999).
73. B. Lorz, R. Simson, E. Sackmann, *Europhys. Lett.* **51**, 468-474 (2000).
74. M. Abkarian, C. Lartigue, A. Viallat, *Phys. Rev. E* **63**, 1-7 (2001).

75. G. Cevc, in *Phospholipids Handbook* G. Cevc, Ed. (Marcel Dekker, New York, 1993).
76. W. Harbich, W. Helfrich, *Naturforsch Z.* **34a**, 1063-1065 (1979).
77. D. Zhelev, D. Needham, *Biochim. Biophys. Acta.* **1147**, 89-104 (1979).
78. F. Brochard-Wyart, P. G. de Gennes, O. Sandre, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2000).
79. O. Sandre, Paris 6 (2000).
80. P. Sens, S. A. Safran, *Europhys. Lett.* **43**, 95-100 (1998).
81. R. P. Rand, *Biophys. J.* **4**, 303-316 (1964).
82. W. Meier, D. Lerche, M. O. Wendt, M. Paulitschke, *Biorheology* **24**, 287-296 (1987).
83. C. Taupin, M. Dvolaitzky, C. Sauterey, *Biochemistry* **14**, 4771-4774 (1975).
84. B. L.-S. Mui, P. R. Cullis, E. Evans, T. Madden, *Biophys. J.* **64**, 443-453 (1993).
85. A.-L. Bernard, Thèse (Paris 6) (1999).
86. V. P. Zhdanov, B. Kasemo, *Langmuir* **17**, 3518-3521 (2001).
87. G. Cevc, G. Blume, *Biochim. Biophys. Acta.* **1104**, 226-232 (1992).
88. G. Cevc, D. Gebauer, J. Stieber, A. Schätzlein, C. Blom, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembranes.* **1368**, 201-215 (1998).
89. R. L. Juliano, D. Stamp, *Biochem. Biophys. Rev. Commun.* **63**, 651-658 (1975).
90. H. K. Kimelberg, *Biochim. Biophys. Acta.* **448**, 531-550 (1976).
91. C. A. Hunt, Y. M. Rustm, E. Mayhem, D. Papahadjopoulos, *Drug. Metab. Disposition* **7**, 124-128 (1979).
92. R. R. C. New, *Liposomes: Practical Approach*. D. Rickwood, B. D. Hames, Eds., Practical Approach Series (Oxford University Press, Oxford 1989).
93. Y. Barenholz, S. Amselem, D. Lichtenberg, *FEBS Letters* **99**, 210-214 (1979).
94. R. Nayar, M. J. Hope, P. R. Cullis, *Biochim. Biophys. Acta* **986**, 200-206 (1989).
95. F. Szoka, D. Papahadjopoulos, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**, 4194-4198 (1978).
96. R. Bar-Ziv, E. Moses, *Phys. Rev. Lett.* **73**, 1392-1395 (1994).
97. P. Nelson, E. Powers, *Phys. Rev. Lett.* **74**, 3384-3387 (1995).
98. T. G. Clerc, T. E. Thomson, *Biophys. J.* **67**, 475 (1994).
99. R. Joannic, Thèse (Paris 11) (1997).
100. R. Joannic, L. Auvray, D. D. Lasic, *Phys. Rev. Lett.* **78**, 3402-3405 (1997).

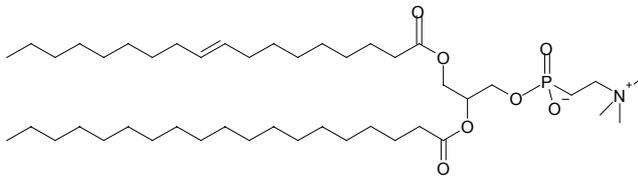
101. D. E. Koppel, *J. Chem. Phys.* **57**, 4814-4820 (1972).
102. D. Needham, R. S. Nunn, *Biophys. J.* **58**, 997 (1990).
103. K. Olbrich, W. Rawicz, D. Needham, E. Evans, *Biophys. J.* **79**, 321-327 (2000).
104. R. M. Servuss, W. Harbich, W. Helfrich, *Biophys. Acta* **436**, 900 (1976).
105. I. Sakurai, Y. Kawamura, *Biophys. Acta* **735**, 189 (1983).
106. M. B. Schneider, J. T. Jenkins, *Biophys. J.* **45**, 891 (1984).
107. H. P. Duwe, J. Kaes, E. Sackmann, *J. Phys. France* **51**, 945-962 (1990).
108. W. Rawicz, K. Olbrich, T. McIntosh, D. Needham, E. Evans, *Biophys. J.* **79**, 328-339 (2000).
109. E. Evans, W. Rawicz, *Phys. Rev. Lett.* **64**, 2094-2097 (1990).
110. D. Needham, D. V. Zhelev, in *Vesicles* M. Rosoff, Ed. (Marcel Dekker, New-York, Basel, Hong-Kong, 1996), vol. 62.
111. B. J. Berne, R. Pecora, *Dynamic Light Scattering* (Wiley-Interscience, New-York, 1976).
112. A. J. Jin, D. Huster, K. Gawrisch, R. Nossal, *Eur. Biophys. J.* **28**, 187-199 (1999).
113. M. Seigneuret, J.-L. Rigaud, *FEBS* **228**, 79-84 (1988).
114. J. N. Weinstein, S. Yoshikami, P. Henkart, R. Blumenthal, W. A. Hagins, *Science* **195**, 489-491 (1977).
115. M. I. Angelova, D. S. Dimitrov, *Farraday Discuss. Chem. Soc.* **81** (1986).
116. R. J. Jackman, J. L. Wilbur, G. M. Whitesides, *Science* **269**, 664-666 (1995).

Annexe 1 : Constituants des bicouches lipidiques

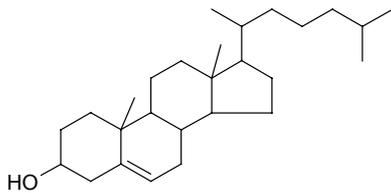
DOPC : dioléoyl L- α -phosphatidylcholine



SOPC : stéaroyl oléoyl L- α -phosphatidylcholine

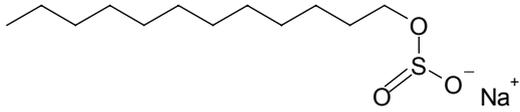


Cholestérol

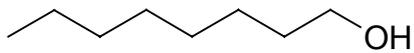


Annexe 2 : Constituants des bicouches de tensioactifs

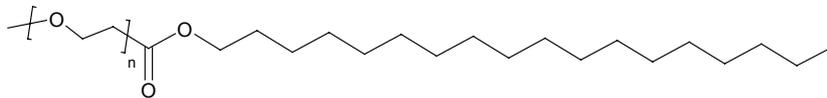
SDS : Sodium dodécyl sulfate



Octanol



Myrij 59 : POE_{n=100} stéarate



Annexe 3 : Rhéomètres de Couette

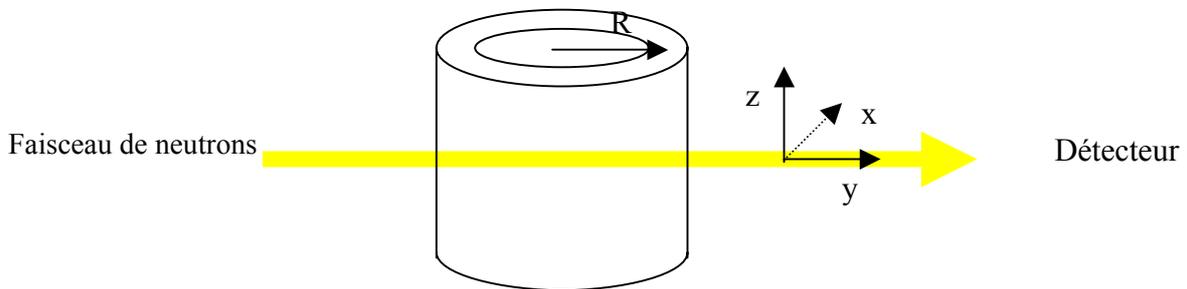


Ex-situ

L'appareil de Couette utilisé au SPEC est un ViscoTech, de marque Rhéologica. L'expérience consiste à imposer une contrainte pendant un certain temps, et de mesurer le cisaillement et la viscosité dynamique du système à l'équilibre. On augmente ainsi la contrainte pour obtenir le cisaillement maximal, jusqu'à ce que l'écoulement devienne instable. Avec nos systèmes $\dot{\gamma}_{\max} \approx 1000\text{s}^{-1}$. On étudie comparativement les structures des vésicules avant et après cisaillement, avec les techniques habituelles.

In-situ

Les expériences de cisaillement dans le faisceau ont été réalisées d'une part au LLB sur PAXY avec Alain Lapp, et d'autre part à l'Institut Laue-Langevin (ILL) sur D11 par Caroline Postel. Au LLB, le rhéomètre a les dimensions suivantes () et le cisaillement maximal est de 3750s^{-1} . A l'ILL, le rhéomètre a les dimensions suivantes: le rayon entre les deux cylindres $R_C=23.5\text{cm}$ et l'écartement des cylindres: $l=0.5\text{cm}$, le cisaillement maximal est de 4000s^{-1} . Avec une longueur d'onde de 6\AA et une distance échantillon-détecteur de 13m , on couvre la gamme de q suivante [$0.004-0.03\text{\AA}^{-1}$].



X: direction de l'écoulement
Y: gradient de vitesse
Z: neutral direction

Annexe 4 : Mesures d'absorbance - calibration

La 5,6-carboxyfluorescein est une molécule aromatique qui absorbe fortement à 492nm. Nous avons vérifié la loi de Beer-Lambert et mesuré le coefficient d'extinction molaire ϵ pour ce composé à 25°C, dans les conditions de pH expérimentales. Les mesures d'absorbance ont été réalisées à l'aide d'un spectromètre UV-visible Varian Cary 50:

Eq A4-1
$$DO = \ln(I/I_0) = \epsilon \times l \times c_T,$$

I_0 est l'intensité émise par le spectromètre à 492nm, et I est l'intensité à la même longueur d'onde, après passage à travers la cuve remplie par l'échantillon. La largeur des cuves l est de 1cm

On trace la densité optique DO en fonction de la concentration c_T des marqueurs dans chaque échantillon et la droite obtenue (Graphique Annexe 2) nous donne la valeur du coefficient d'extinction molaire.

$$\epsilon = 16050 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

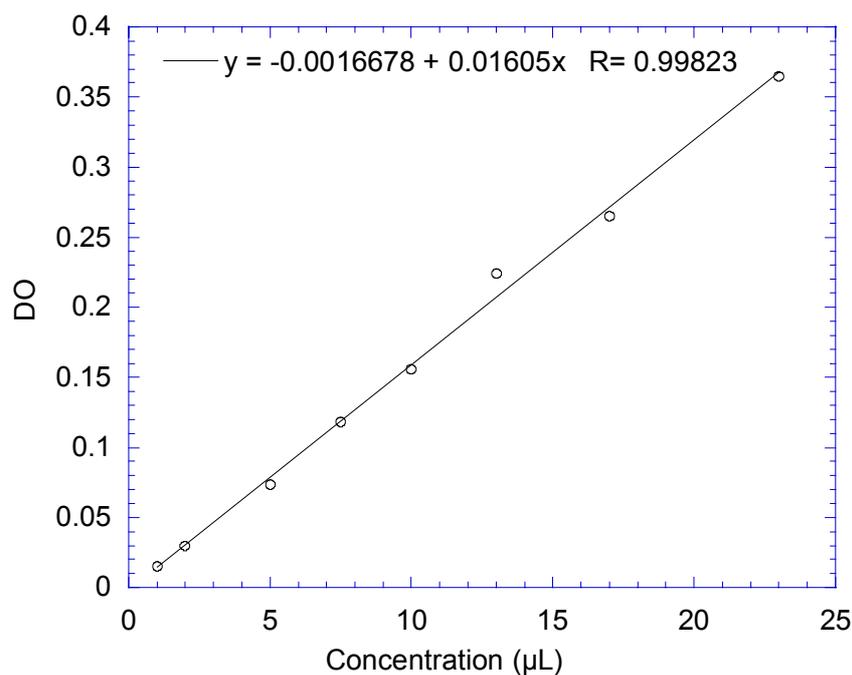


Figure A4-1 : Courbe de calibration des mesures d'absorbance pour la carboxyfluoresceine.

Annexe 5 : Mesures de fluorescence - calibration

Lorsqu'elles sont excitées par onde lumineuse à 450nm, les molécules de carboxyfluorescéine qui ne sont pas quenchées émettent une onde fluorescente à 540nm. L'intensité de fluorescence mesurée doit être multipliée par un facteur d'atténuation qui correspond à l'intensité lumineuse excitatrice, absorbée au milieu de la cuve $f = \log^{-1}(DO/2)$.

Nous vérifions que l'intensité de fluorescence est bien proportionnelle à la concentration en marqueurs dans la gamme de concentration utilisée.

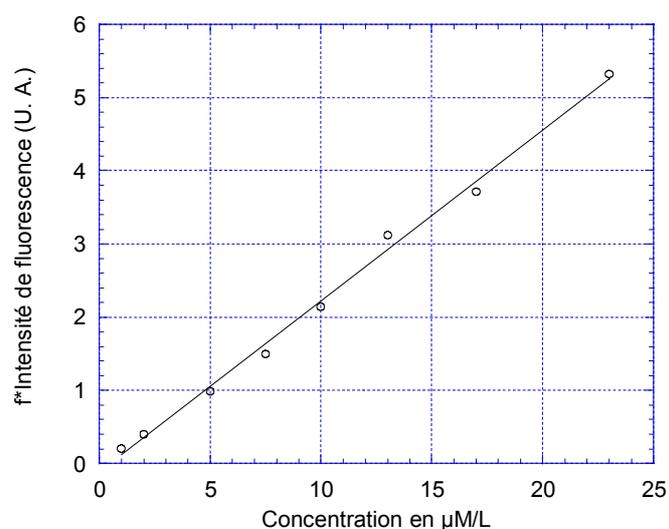


Figure A5-1 : Vérification de la proportionnalité entre la concentration des marqueurs et l'intensité de fluorescence dans la gamme utilisée (la concentration total des marqueurs est de l'ordre de 7µmol/L).

La fuite naturelle des marqueurs par les vésicules EPC100 est suivie par mesure d'intensité de fluorescence pendant plus de 4 heures.

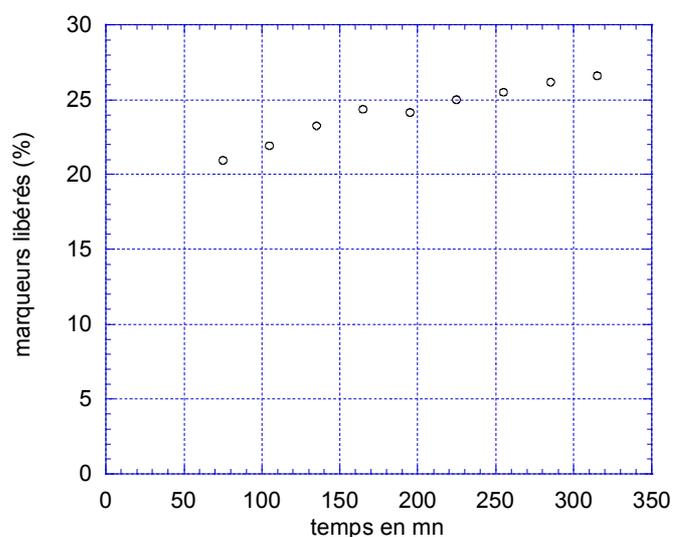


Figure A5-2 : Pourcentage de marqueurs libérés à un certain temps, après l'encapsulation.

Résumé

Notre but est de mieux comprendre la déformation et la rupture de vésicules lorsqu'on les contraint à passer dans des pores étroits. Pour cela, nous choisissons d'étudier un procédé déjà très utilisé pour la préparation des vésicules monodisperses : l'extrusion de vésicules à travers une membrane poreuse, dont les pores sont cylindriques, uniformes, et de taille sub-micrométrique. Nous étudions deux types de vésicules de composition et de rigidité très différentes.

La caractérisation de cette extrusion se divise en deux parties. Une première partie rhéologique, où l'on mesure la pression en fonction du débit imposé. L'écart de la courbe obtenue par rapport à la loi de Poiseuille est révélateur des phénomènes d'entrée et de transport des vésicules dans les pores. La deuxième partie consiste en une caractérisation structurale des vésicules, avant et après l'extrusion. Des expériences d'encapsulation de marqueurs fluorescents permettent de caractériser directement la rupture des vésicules après l'extrusion.

Ainsi, l'étude rhéologique nous montre l'existence d'une pression seuil d'extrusion. Cette pression est proportionnelle à la pression nécessaire pour courber la bicouche des vésicules lorsque le rayon des pores est supérieur à la moitié du rayon des vésicules, et elle est égale à la pression de rupture des bicouches pour des rayons de pores inférieurs.

La rupture des vésicules pendant leur extrusion dans des pores étroits est confirmée par la diminution de leur rayon hydrodynamique moyen, et surtout par le relargage presque total des marqueurs fluorescents préalablement encapsulés. L'étude structurale des vésicules, avant et après extrusion, montre aussi que vingt à trente pour cent des vésicules sont retenues en amont de la membrane, et que les vésicules sont déformées dans les pores. La rétention augmente lorsque le rapport rayon des pores sur celui de vésicules diminue, et lorsque le débit d'extrusion décroît. La déformation augmente très fortement quand le rayon des pores diminue.

Enfin, nous avons visualisé directement le passage de vésicules géantes à travers des canaux micrométriques de PDMS. Les films réalisés à l'Institut Curie montrent une déformation très importante des vésicules dans les pores et une forte rétention en amont des pores. La rupture n'est observée qu'une seule fois, lorsque le débit est maximal.