

dm 11. 3088. 7

Université de Montréal

Étude par microscopie à force atomique de la séparation de phase latérale de
monocouches Langmuir-Schaefer de DPPC/DLPC

Par
Jacqueline Sanchez
Département de chimie
Faculté des arts et des sciences

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Maître ès sciences (M. Sc.)
en chimie

Mai 2003

© Jacqueline Sanchez, 2003



QD

3

U54

2003

v.033

Direction des bibliothèques

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Étude par microscopie à force atomique de la séparation de phase latérale de
monocouches Langmuir-Schaefer de DPPC/DLPC

Présenté par :

Jacqueline Sanchez

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Directeure de recherche

Badia, Antonella

Membre du jury

Lafleur, Michel

Membre du jury

Giasson, Suzanne

Mémoire accepté le : _____

Sommaire

L'analyse des isothermes π - A de monocouches Langmuir de dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC)/dilauroylphosphatidylcholine (DLPC) a montré une déviation positive due à un comportement de mélange critique à des pressions de surface ≤ 32 mN/m. L'imagerie par microscopie à force atomique (AFM) de ces monocouches mixtes déposées sur des surfaces d'or modifiées d'alcanethiols par la technique de Langmuir-Schaefer (LS) a été employée pour étudier la formation de domaines dans un mélange binaire. La séparation de phase dans le système DPPC/DLPC résulte d'une différence dans la longueur des chaînes alkyles des phospholipides. Nous avons établi comment la structure (forme et taille) des domaines condensés dépend de la pression de surface et de la composition en phospholipide. La compression latérale de la monocouche mixte à des pressions supérieures à la pression de transition de phase liquide-étendue à liquide-condensée (LE à LC) du mélange (~ 8 - 16 mN/m) induit une séparation entre des domaines condensés riches en DPPC et une matrice fluide de DLPC. Ces structures condensées observées ressemblent à celles rapportées pour les monocouches pures de DPPC dans la région de coexistence LE/LC. À une pression équivalente à celle d'une bicouche membranaire (32 mN/m), les domaines condensés existent entre $x_{\text{DPPC}} \sim 0.25$ et ~ 0.80 à 20°C , comme dans les dispersions aqueuses de DPPC/DLPC. La compression de 32 à 40 mN/m résulte soit en une déformation saisissante de la forme des domaines de DPPC ou en une dissolution des domaines microscopiques de DPPC dans un réseau d'îles

nanoscopiques (à une fraction molaire plus élevée de DPPC), reflétant probablement un comportement de mélange critique. Les résultats de cette étude fournissent un cadre fondamental pour la compréhension et le contrôle de la formation de structures latérales de domaines dans les monocouches mixtes de phospholipides.

Mots clefs: Microscopie à force atomique (AFM), Langmuir-Schaefer (LS), monocouche phospholipidique, séparation de phase, DPPC, DLPC, loi additive, énergie libre de mélange en excès, loi de phase en surface, monocouche auto-assemblée

Abstract

The π - A isotherms analysis of dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC)/dilauroylphosphatidylcholine (DLPC) Langmuir monolayers exhibit a positive deviation from ideal mixing behavior at surface pressures ≤ 32 mN/m. Atomic force microscopy imaging of these mixed monolayers deposited onto alkanethiol modified-gold surfaces by the Langmuir-Schaefer (LS) technique was used to investigate domain formation in a binary system where phase separation arises from a difference in the alkyl chain lengths of the phospholipids. We have established how the condensed domain structure (shape and size) in DPPC/DLPC monolayers depends on the surface pressure and lipid composition. Lateral compression to pressures greater than the liquid-expanded-to-liquid-condensed (LE-to-LC) phase transition pressure of the mixed monolayer (~ 8 - 16 mN/m) induces extensive separation into condensed DPPC-rich domains and a fluid DLPC matrix. The condensed structures observed resemble those reported for pure DPPC monolayers in the LE/LC coexistence region. At a bilayer equivalence pressure of 32 mN/m, condensed domains exist between $x_{\text{DPPC}} \sim 0.25$ and ~ 0.80 at 20°C , analogous to aqueous DPPC/DLPC dispersions. Compression from 32 to 40 mN/m results in either a striking distortion of the DPPC domain shape or a breakup of the microscopic DPPC domains into a network of nanoscopic islands (at higher DPPC mol fractions), possibly reflecting a critical mixing behavior. The results of this study provide a fundamental framework for understanding and

controlling the formation of lateral domain structures in mixed phospholipid monolayers.

Keywords: Atomic Force Microscopy (AFM), Langmuir-Schaefer (LS), phospholipid monolayer, phase separation, DPPC, DLPC, additivity rule, excess free energy of mixing, surface phase rule, self-assembled monolayer

Table des matières

Sommaire	I
Abstract	III
Table des matières	V
Liste des tableaux	VIII
Liste des figures	IX
Liste des abréviations	XVIII
Remerciements	XIX
Chapitre I	1
Introduction	1
1.1 Introduction générale	1
1.2 La DPPC et la DLPC	2
1.3 Les systèmes vésiculaires	4
1.4 Les monocouches Langmuir	8
1.5 Les monocouches déposées sur substrat plan	18
1.6 La technique de microscopie à force atomique (AFM)	22
1.7 La technique de microscopie à angle de Brewster (BAM)	29
1.8 Plan de travail	31
Chapitre II	32
Matériel et méthodes	32
2.1. Provenance des produits	32

2.2	Préparation et conservation des solutions de phospholipides.....	33
2.3	Isothermes π -A: mesures de la pression de surface en fonction de l'aire moléculaire avec le bain de monocouches Langmuir-Blodgett	34
2.4	Préparation des substrats plans hydrophobes	35
2.5	Déposition des monocouches de phospholipides par la technique Langmuir-Schaefer (LS)	37
2.6	Imagerie AFM (Atomic Force Microscopy)	38
2.7	Imagerie BAM (Brewster Angle Microscopy).....	39
2.8	Caractérisation des substrats plans hydrophobes de C ₁₄ S/Au/mica ..	39
	Chapitre III.....	42
	Résultats & discussion	42
3.1	Isothermes π -A	42
3.2	La loi de phase en surface de Crisp.....	45
3.3	La loi additive.....	49
3.4	L'énergie libre de mélange en excès (ΔG_{ex})	51
3.5	Imagerie AFM en milieu liquide de monocouches Langmuir-Schaefer (LS) mixtes.....	54
3.6	Comparaison des substrats hydrophobes de DPPE/mica et C ₁₄ S/Au/mica pour la déposition de monocouches Langmuir mixtes de DPPC/DLPC.....	55
3.7	Caractérisation des substrats plans hydrophobes de C ₁₄ S/Au/mica	59

3.8	Imagerie AFM en phase de monocouches Langmuir-Schaefer (LS) mixtes	61
3.9	Effet de la variation de composition sur les monocouches de DPPC/DLPC déposées à $\pi = 32\text{mN/m}$.....	63
3.10	L'effet de la pression de surface sur la formation des domaines.....	71
	Chapitre IV	94
	Conclusion	94
	Références	97
	Annexe.....	107

Liste des tableaux

- Tab. 3.1 :** Informations physiques et paramètres pouvant être obtenus à partir des isothermes π - A des monocouches Langmuir pures de DPPC et DLPC.....45
- Tab. 3.2 :** Valeurs de la pression de transition de phase LE à LC (π_{LE-LC}) et de la pression de rupture (π_c) utilisées pour les graphiques de la Fig. 3.3 pour les différentes compositions de DPPC/DLPC. (x) = isotherme π - A non présenté pour une plus grande clarté à la Fig. 3.2. 47
- Tab. 3.3 :** Résumé des analyses effectuées sur les isothermes π - A pour les monocouches Langmuir mixtes de DPPC/DLPC ($T = 20$ °C). 53
- Tab. 3.4 :** Pour le mélange 0.50/0.50 de DPPC/DLPC, les pourcentages d'aire occupée par les domaines de DPPC observés par AFM dans les monocouches LS et les pourcentages d'aire occupée par la DPPC dans les monocouches Langmuir correspondantes (calculées en utilisant les aires moléculaires de DPPC et DLPC et leurs fractions molaires dans les monocouches mixtes) pour ces différentes valeurs de π 73

Liste des figures

- Fig. 1.1 :** Molécules de la DLPC (C12) et la DPPC (C16) dont la tête polaire possède une charge négative sur le groupement phosphate balancée par une charge positive sur la fonction amine formant des phospholipides zwitterioniques à pH 7. 3
- Fig. 1.2 :** Schéma de la transition de phase d'une bicouche de l'état gel à l'état l_c . À l'état gel, l'épaisseur de la bicouche est supérieure à celle à l'état l_c . À l'état l_c , il y a un certaine distance entre les têtes polaires..... 4
- Fig. 1.3 :** Diagramme de phase pour le mélange DPPC/DLPC obtenu par calorimétrie de suspensions aqueuses. Les régions correspondent : (1) à la phase l_c (fluide), (2) à la coexistence des phases l_c et gel et (3) à la phase gel ¹¹..... 6
- Fig. 1.4 :** Schéma (a) d'une vésicule multilamellaire composée de plusieurs bicouches concentriques de phospholipides et (b) d'une vésicule unilamellaire constituée d'une seule bicouche en milieu liquide. 6
- Fig. 1.5 :** Schéma d'un bain de monocouches Langmuir constitué de barrières amovibles pour diminuer l'aire occupée par molécule et d'une balance Wilhelmy sur laquelle est déposée une plaque de platine de poids

- connu qui permet de mesurer avec précision la pression de surface (π)..... 9
- Fig. 1.6:** Schéma d'un isotherme π -A basé sur la DPPC à température constante où l'aire moléculaire diminue au profit d'un plus grand ordre dans la monocouche Langmuir en passant par les différentes transitions de phase (LE→LC et LC→SC)..... 12
- Fig. 1.7:** Schéma d'un isotherme π -A avec les différents paramètres pouvant être tirés de celui-ci et nécessaires à l'analyse thermodynamique..... 13
- Fig. 1.8:** Déposition LB d'une monocouche Langmuir de phospholipides à l'interface eau/air sur un substrat plan. Le substrat hydrophile est retiré de la sous phase d'eau pour que les têtes polaires soient adsorbées à la surface. 21
- Fig. 1.9:** Déposition LS d'une monocouche Langmuir de phospholipides à l'interface eau/air sur un substrat plan hydrophobe. Le substrat orienté parallèlement à l'interface eau/air est poussé à travers la monocouche jusque dans la sous phase. Dans ce cas, les chaînes alkyles sont orientées vers la surface hydrophobe et les têtes polaires vers l'eau dans le film déposé. Un exemple de substrat hydrophobe est une

monocouche d'alcanethiols auto-assemblée sur une surface d'or.
22

Fig. 1.10 : Schéma d'un microscope à sonde balayante (AFM) avec ses différentes composantes et la trajectoire du laser qui est réfléchi du cantilevier vers le détecteur divisé en quatre quadrants qui traduit les changements de déflexion du cantilevier. 24

Fig. 1.11 : Image obtenue par microscopie électronique à balayage (MEB) d'un cantilevier triangulaire muni d'une sonde pyramidale en nitrure de silicium. 24

Fig. 1.12 : Courbe de l'amplitude en fonction de la fréquence de résonance d'oscillation du cantilevier. La courbe de la phase est à zéro (pas de déphasage). 25

Fig. 1.13 : Amplitude d'oscillation du cantilevier à l'air libre (pas de contact avec la surface) et lorsque l'acquisition de l'image se fait pour le mode de contact intermittent (www.veeco.com). 26

Fig. 1.14 : Schéma qui représente le principe de l'imagerie en phase dont le changement dans les propriétés de surface cause un déphasage dans le signal détecté. (www.veeco.com). 27

Fig. 1.15 : Schéma du principe de la microscopie à angle de Brewster (BAM).. 30

Fig. 3.1 : (a) Isothermes π - A des monocouches Langmuir pures de DPPC et DLPC à 20 °C. (b) Agrandissement de la région de transition de phase LE à LC pour l'isotherme π - A de la DPPC..... 44

Fig. 3.2 : Isothermes π - A pour les différents mélanges binaires de DPPC/DLPC à 20 °C. Ces isothermes se situent exactement entre les isothermes des deux phospholipides purs (**Fig. 3.1a**). Pour une présentation plus claire, seulement quelques isothermes π - A ont été présentés. 46

Fig. 3.3 : Variation (a) de la pression de transition de phase LE à LC (π_{LE-LC}) et (b) de la pression de rupture (π_c) en fonction de la composition de DPPC/DLPC des monocouches Langmuir à 20°C. 48

Fig. 3.4 : Graphiques des aires moléculaires moyennes de DPPC/DLPC en fonction de la fraction molaire de DLPC pour les pressions de surface (π) de : (a) 5 mN/m, (b) 10 mN/m, (c) 20 mN/m, et (d) 32 mN/m-carré; 40 mN/m- étoile. Les droites représentent les aires moléculaires (\tilde{A}) calculées à l'aide de la loi additive (éq. 2)..... 50

Fig. 3.5: Énergie libre de mélange en excès (ΔG_{ex}) en fonction de la fraction molaire de DLPC pour différentes valeurs de pressions de surfaces.. 52

Fig. 3.6 : Schéma des deux systèmes étudiés: **(a)** la monocouche mixte de DPPC/DLPC sur le mica recouvert d'une monocouche de DPPE en milieu liquide avec les défauts (trous) se formant lors du transfert de DPPC/DLPC dû à la désorption des molécules de DPPE; **(b)** la monocouche mixte de DPPC/DLPC sur la surface d'or modifiée par le 1-tétradécanethiol en milieu liquide..... 56

Fig. 3.7 : **Gauche:** Images AFM (topographie) prises en mode contact intermittent (Tapping mode[®]) en milieu liquide. Monocouches de DPPC/DLPC (0.50 : 0.50) déposées à 32 mN/m sur **(a)** le substrat de DPPE/mica et **(b)** la surface de C₁₄S/Au. Dimensions des images = 100 µm x 100 µm. T = 20 °C. 57

Droite: Agrandissement (20 µm x 20 µm) de la région délimitée par le carré blanc et l'analyse en coupe transversale correspondante. L'analyse en coupe transversale démontre en **(a)** que les trous ont ~ 4 nm de profondeur comparativement à la matrice de fond. 57

Fig. 3.8 : Spectre PM-IRRAS montrant la région des elongations C-H du 1-tétradécanethiol adsorbé sur la surface d'or..... 60

Fig. 3.9: Photo d'une goutte d'eau pure sur une surface de 1-tétradécanethiol chimisorbé sur l'or. 60

Fig. 3.10: Images AFM d'une monocouche de DPPC/DLPC (0.50 : 0.50) déposée sur une surface de $C_{14}S/Au$ à 32 mN/m : **(a)** topographie et **(b)** phase. Dimensions des images = 100 μm x 100 μm 61

Fig. 3.11: Images AFM d'une monocouche de DLPC **(a, topographie et b, phase)** et DPPC **(c, topographie et d, phase)** sur une surface de $C_{14}S/Au$ à 32 mN/m. Dimensions des images = 25 μm x 25 μm . Agrandissement d'une zone de la surface de 5 μm x 5 μm pour les images de a à d... 62

Fig. 3.12: Images AFM en mode contact intermittent (Tapping mode[®]) en milieu liquide en phase pour des monocouches de DPPC/DLPC déposées sur une surface de $C_{14}S/Au$ à $\pi = 32$ mN/m. Fraction molaire de DPPC : **(a)** 0.25, **(b)** 0.375, **(c)** 0.625, **(d)** 0.70, **(e)** 0.80, et **(f)** 0.90. Dimensions des images = 100 μm x 100 μm . Agrandissement d'une zone de la surface de 5 μm x 5 μm pour l'image **(a)**.....65

Fig. 3.13 : **(a)** Graphique de la fraction d'aire des domaines solides observés par AFM dans les monocouches LS en fonction de la fraction d'aire occupée par la DPPC dans les monocouches Langmuir correspondantes (calculée en utilisant les aires moléculaires de DPPC et DLPC et leurs fractions molaires dans les monocouches mixtes) à π

= 32 mN/m. **(b)** Graphique de l'aire occupée par la phase LE en fonction de la fraction molaire de DPPC dans les monocouches de DPPC/DLPC à $\pi = 32$ mN/m (éq. 8). L'aire occupée par la phase LE pour chaque composition a été calculée à partir du produit de $(1-\varphi_c)$ et de l'aire moléculaire moyenne de la monocouche mixte (\tilde{A}) obtenue à partir des isothermes π -A. La fraction d'aire occupée par la phase plus épaisse dans les images AFM a été employée pour φ_c . Les barres d'erreur représentent des écarts type. Les lignes représentent l'ajustement des moindres carrés linéaire aux données. (a) pente = 1,08, coefficient de corrélation $r = 0,996$; (b) coefficient de corrélation $r = 0,998$ 68

Fig. 3.14: Images AFM en phase de monocouches de DPPC/DLPC (0.50/0.50) sur un substrat de $C_{14}S/Au$ après 30 min à $\pi = 32$ mN/m où la vitesse de compression (normalement de $1 \text{ \AA}^2 \text{ molécule}^{-1} \text{ min}^{-1}$) a été variée: **(a)** $0.5 \text{ \AA}^2 \text{ molécule}^{-1} \text{ min}^{-1}$ et **(b)** $2.5 \text{ \AA}^2 \text{ molécule}^{-1} \text{ min}^{-1}$. Dimensions des images = $100 \text{ \mu m} \times 100 \text{ \mu m}$ 71

Fig. 3.15: Images AFM en phase pour des monocouches de DPPC/DLPC (0.50/0.50) déposées sur un substrat de $C_{14}S/Au$ à une pression de surface (π) de : **(a)** 10 mN/m, **(b)** 15 mN/m, **(c)** 20 mN/m, **(d)** 32 mN/m et **(e)** 40 mN/m. Dimensions des images = $100 \text{ \mu m} \times 100 \text{ \mu m}$.

L'échelle de l'agrandissement en (a) 10 μm , (b) 5 μm , (c) 10 μm74

Fig. 3.16 : Images AFM en phase de monocouches de DPPC/DLPC (0.70/0.30) déposées sur un substrat de $\text{C}_{14}\text{S}/\text{Au}$ à une pression de surface de : (a) 10 mN/m et (b) 15 mN/m. Dimensions des images : (a) 15 μm x 15 μm et (b) 100 μm x 100 μm 75

Fig. 3.17: Images AFM en phase de monocouches de DPPC/DLPC sur un substrat de $\text{C}_{14}\text{S}/\text{Au}$ après 30 min à $\pi = 40$ mN/m. Fractions molaires de DPPC : (a) 0.375 et (b) 0.625. Dimensions des images = 100 μm x 100 μm . L'échelle de l'agrandissement en (b) est de 2 μm 75

Fig. 3.18 : Images AFM en topographie acquise à l'air de monocouches de DSPC/DLPC déposées sur une surface de mica à $\pi = 32$ mN/m. Fraction molaire de DSPC : (a) 0.50, (b) 0.75. $T = 20$ °C. Dimensions des images : (a) 70 μm x 70 μm et (b) 15 μm x 15 μm 80

Fig. 3.19 : Images AFM en phase de monocouches de DPPC/DLPC déposées sur un substrat de $\text{C}_{14}\text{S}/\text{Au}$. Fraction molaire de DPPC : (a) 0.625 et (b) 0.25. Les monocouches ont été transférées à une π de 32 mN/m après un temps de stabilisation de (a) 30 min et (b) 13.5 h. Dimensions des images : (a) 25 μm x 25 μm et (b) 100 μm x 100 μm 83

Fig. 3.20 : Images AFM en phase de monocouches de DPPC/DLPC (0.50: 0.50) sur un substrat de C₁₄S/Au. Les monocouches ont été transférées à une $\pi = 40$ mN/m après un temps de stabilisation de **(a)** 3 h et **(b)** 6 h. Dimension des images : **(a)** 50 μm x 50 μm et **(b)** 100 μm x 100 μm 85

Fig. 3.21 : Images BAM de la morphologie d'une monocouche mixte de DPPC/DLPC (0.50/0.50) formée à l'interface eau/air à différentes pressions de surface : **(a)** 18.4 mN/m ; **(b)** 19 mN/m ; **(c)** 21 mN/m ; **(d)** 24.3 mN/m ; **(e)** 30.1 mN/m ; **(f)** 32 mN/m ; **(g)** 35 mN/m ; **(h)** 39.8 mN/m ; **(i)** 41.7 mN/m. T = 20 °C. Dimensions des images = 539 μm x 428 μm 91

Liste des abréviations

\tilde{A}	Aire moléculaire moyenne
AFM	<i>Atomic Force Microscopy</i> – Microscopie à Force Atomique
A_{lim}	Aire moléculaire limite
A_0	Aire de commencement
BAM	<i>Brewster Angle Microscopy</i> – Microscopie à Angle de Brewster
C_s^{-1}	Module d'élasticité
DLPC	Dilauroylphosphatidylcholine
DPPC	Dipalmitoylphosphatidylcholine
DPPE	Dipalmitoylphosphatidyléthanolamine
ΔG_{ex}	Energie libre de mélange en excès
GUVs	<i>Giant Unilamellar Vesicles</i> – Vésicules Géantes Unilamellaires
L_α	Phase lamellaire désordonnée
LB	Langmuir-Blodgett
LC	Phase liquide-condensée
l_c	Phase liquide-cristalline
l_d	Phase liquide-désordonnée
LE	Phase liquide-étendue
LS	Langmuir-Schaefer

L_{β}	Phase lamellaire partiellement ordonnée et non inclinée
L_{β}'	Phase lamellaire partiellement ordonnée et inclinée
MEB	Microscopie Électronique à Balayage
NSOM	<i>Near-Field Optical microscopy</i> – Microscopie Optique à Champ Proche
PC	Phosphatidylcholine
PE	Phosphatidyléthanolamine
PM-IRRAS	<i>Polarization Modulation Infrared Reflection Absorption Spectroscopy</i> – Spectroscopie Infrarouge de Réflexion Absorption en Modulation de Polarisation
PS	Phosphatidylsérine
π	Pression de surface
π_{LE-LC}	Pression de transition de phase liquide-étendue à liquide-condensée
π_c	<i>Collapse pressure</i> – pression de rupture
RMS	<i>Root Mean Square</i> - racine des moindres carrées
SAM	<i>Self-Assembled Monolayer</i> – monocouche auto-assemblée
SC	Phase solide-condensée
T_m	Température de transition de phase
x_{DLPC}	Fraction molaire de DLPC
x_{DPPC}	Fraction molaire de DPPC

Remerciements

Avec ce mémoire, un chapitre important de ma vie se conclue. J'ai passé un peu plus de deux ans dans un groupe chaleureux où règne l'amitié, l'entraide et l'enthousiasme pour la recherche. Je peux dire que j'ai beaucoup appris, autant du point de vue scientifique que personnel. Je remercie Antonella Badia de m'avoir donné cette opportunité de travailler avec elle dans son "nanomonde". Tu m'as donné tous les outils nécessaires pour réussir et surtout, tu m'as montré comment les utiliser pour évoluer dans ce milieu. Ce fût une expérience où la volonté, la patience et la persévérance étaient les mots clés pour réussir, même si les conditions de travail étaient idéales.

Je remercie ma famille (papa, maman, Jean-Pierre et Catherine) qui a toujours été là pour m'encourager, même lorsque je pouvais être découragée. Surtout un gros merci à papa et maman qui m'ont permis de faire des études tout en prenant soin de moi.

Une dernière personne de la famille à remercier et non la moindre : mon fiancé, Stefano, qui est la patience incarnée. Merci pour toutes les fois que tu m'as attendu dans la voiture. Tu connaissais la raison de ce retard : discuter de mon projet avec Antonella. Merci d'avoir respecté ces moments qui ont été cruciaux.

À Patricia Moraille, merci pour ton sens de l'humour qui ne laisse personne indifférent, ton amitié et tes précieux conseils.

Finalement, je remercie Isabelle Pelletier du groupe du professeur Michel Pézolet et le CERSIM de l'Université Laval pour l'utilisation du microscope à angle de Brewster.

**"Dans la vie rien n'est à craindre tout est à
comprendre."**

Marie Curie

À mes parents,
Merci de m'avoir montré le bon chemin.

Chapitre I

Introduction

1.1 Introduction générale

Les membranes biologiques sont formées de bicouches lipidiques et de protéines membranaires. Les bicouches lipidiques sont composées de plusieurs centaines de lipides de différentes espèces. Une question se pose : de quelle façon la composition en lipide et la structure latérale est établie dans une membrane biologique ? Une approche expérimentale à cette question est d'étudier les mélanges simples de lipides dans les monocouches Langmuir ¹. Les monocouches Langmuir qui sont des systèmes à deux dimensions permettent d'établir un lien avec des systèmes plus complexes comme les membranes cellulaires. Pour cette raison, plusieurs scientifiques se sont intéressés aux transitions de phase de ces systèmes ². La présente étude vise donc la compréhension fondamentale de la formation de domaines dans un mélange binaire de dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) et dilauroylphosphatidylcholine (DLPC). Ces phospholipides possèdent les propriétés thermiques adéquates pour mimer le comportement de phase de membranes biologiques ^{3,4}. Plus précisément, l'étude porte sur l'effet de la pression de surface et de la composition en phospholipides sur la structure de la monocouche mixte. Dans ce système, la séparation de phase

latérale résulte d'une différence dans la longueur des chaînes alkyles des phospholipides. Nous cherchons également à comprendre comment les propriétés et les transitions de phase dans une monocouche de DPPC/DLPC sont liées à celles d'une monocouche pure de DPPC (bien documentée dans la littérature) et d'une *bicouche* de vésicules géantes de DPPC/DLPC dont la taille est semblable à celle des cellules.

1.2 La DPPC et la DLPC

Les lipides les plus répandus au niveau des membranes biologiques sont les glycérolipides, les sphingolipides et les stérols. Les glycérolipides comprennent la phosphatidylcholine (PC), la phosphatidyléthanolamine (PE) et la phosphatidylsérine (PS). La PC est un important constituant des membranes plasmiques et elle est typiquement le glycérolipide le plus abondant ⁵. Son appellation triviale est la lécithine. La structure chimique des glycérolipides est construite à partir du glycérol, dont deux fonctions alcool sont estérifiées par des acides gras qui forment la zone hydrophobe de la molécule. La troisième fonction alcool porte un groupement polaire qui constitue la tête polaire du lipide. Il s'agit généralement de l'acide phosphorique (d'où le nom de phospholipide), lui-même estérifié par différents groupements, souvent azotés ⁶. Pour la PC, sa nomenclature systématique est 1,2-dialkyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine. La **Fig. 1.1** présente les molécules de la DPPC comportant l'acide gras *palmitoyl* avec 16 carbones et la DLPC comportant l'acide gras *lauroyl* avec 12 carbones. La DPPC

et la DLPC sont deux phospholipides saturés. La séparation de phase entre deux phospholipides saturés possédant la même tête polaire requiert une différence dans les chaînes hydrophobes d'au moins quatre carbones et que l'un des constituants se trouve en phase gel (chaînes alkyles hautement ordonnées) à la température étudiée⁷⁻¹⁰. Les températures de transition de phase (T_m) sont de 41 °C pour la DPPC et de -1 °C pour la DLPC¹¹. La DPPC et la DLPC forment un mélange de faible miscibilité¹¹⁻¹⁴.

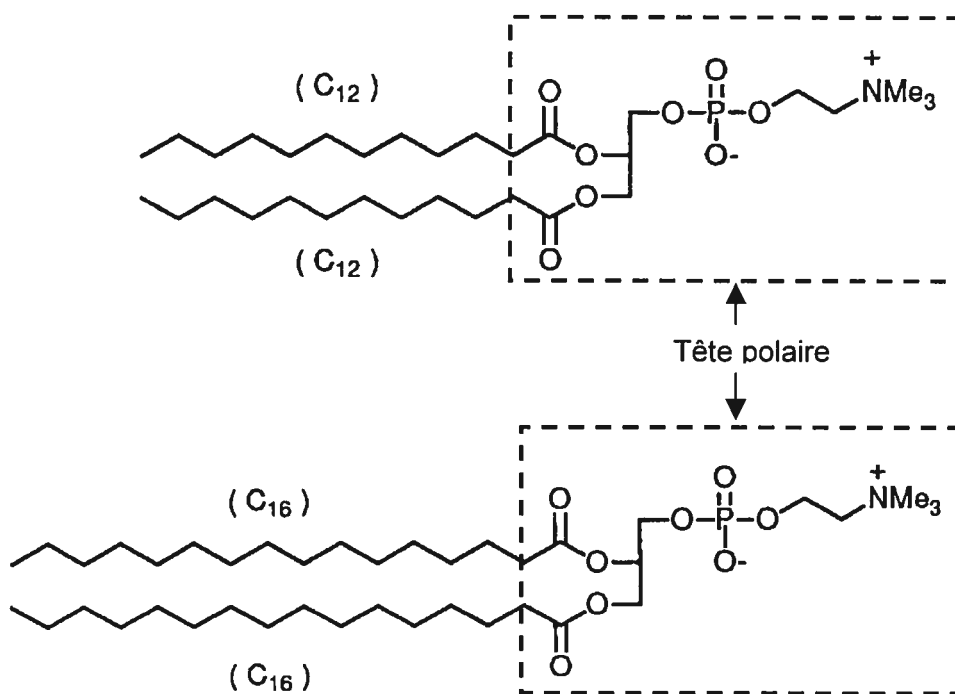


Fig. 1.1 : Molécules de la DLPC (C₁₂) et la DPPC (C₁₆) dont la tête polaire possède une charge négative sur le groupement phosphate balancée par une charge positive sur la fonction amine formant des phospholipides zwitterioniques à pH 7.

1.3 Les systèmes vésiculaires

1.3.1 Les transitions de phase dans les dispersions aqueuses de phospholipides

Essentiellement, au-dessus d'une certaine température caractéristique à chaque système ou sous une influence combinée de température et du milieu aqueux, les chaînes alkyles d'un phospholipide subissent une transition de phase d'un état gel à un état fluide (**Fig. 1.2**). L'état gel peut impliquer soit une conformation lamellaire partiellement ordonnée et non inclinée (L_{β}) (c.-à-d. des chaînes parallèles à la normale de la bicouche) ou partiellement ordonnée et inclinée ($L_{\beta'}$)¹⁵. Dans leur phase gel, les chaînes alkyles sont rigides et complètement étendues. L'arrangement latéral est compact et hautement ordonné. L'état fluide implique une phase lamellaire désordonnée (L_{α}). Dans la littérature, les termes liquide-cristallin (l_c) ou liquide-désordonnée (l_d) sont aussi utilisés pour qualifier la phase fluide¹⁶. Ces trois états de phase se caractérisent donc par des chaînes alkyles désordonnées. Contrairement à la phase gel, l'arrangement latéral des chaînes alkyles est desserré. Il y a typiquement une expansion dans l'aire moléculaire interfaciale de 15 à 30% (cf. phase gel)¹⁵.

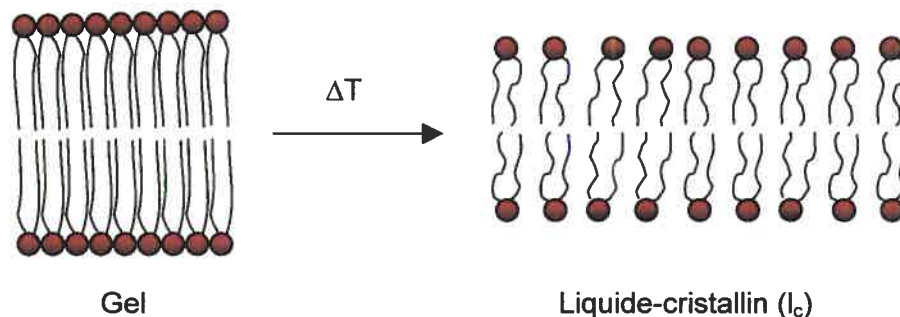


Fig. 1.2 : Schéma de la transition de phase d'une bicouche de l'état gel à l'état l_c . À l'état gel, l'épaisseur de la bicouche est supérieure à celle à l'état l_c . À l'état l_c , il y a une certaine distance entre les têtes polaires.

1.3.2 Le diagramme de phase de dispersions aqueuses de DPPC/DLPC

Les connaissances actuelles de la coexistence de phase dans les mélanges binaires et ternaires de lipides viennent principalement des diagrammes de phase construits à partir d'études calorimétriques et spectroscopiques des propriétés de phase de dispersions aqueuses de lipides^{11,17}. La première information trouvée sur le mélange binaire DPPC/DLPC a été un diagramme de phase de suspensions multilamellaires élaboré à partir d'une étude par calorimétrie^{9,11} (**Fig. 1.3**). Ce diagramme de température-composition en phospholipides montre trois régions distinctes. À une température constante de 20°C pour toutes les compositions, la région (1) s'étend jusqu'à une fraction molaire de DPPC (x_{DPPC}) de ~ 0.25 indiquant que les vésicules multilamellaires sont dans une phase l_c (fluide) et homogène. La région (2), pour des x_{DPPC} entre 0.25 et 0.80-0.85, présente la séparation des phases l_c et gel où des chaînes alkyles désordonnées de DLPC coexistent avec des chaînes ordonnées de DPPC. La région (3) montre le retour vers une phase homogène, mais les vésicules multilamellaires se trouvent à l'état gel.

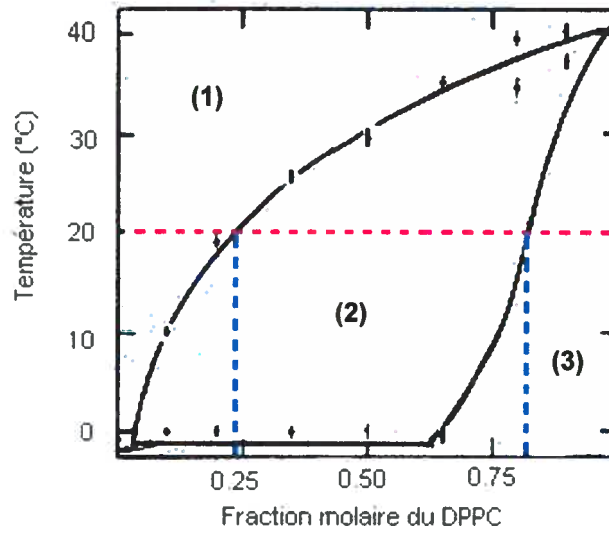


Fig. 1.3 : Diagramme de phase pour le mélange DPPC/DLPC obtenu par calorimétrie de suspensions aqueuses. Les régions correspondent : (1) à la phase l_c (fluide), (2) à la coexistence des phases l_c et gel et (3) à la phase gel ¹¹.

Les phospholipides étant insolubles dans l'eau peuvent adopter une forme vésiculaire qui peut être multilamellaire (**Fig. 1.4a**) comme pour le diagramme de phase précédent ou unilamellaire (**Fig. 1.4b**).

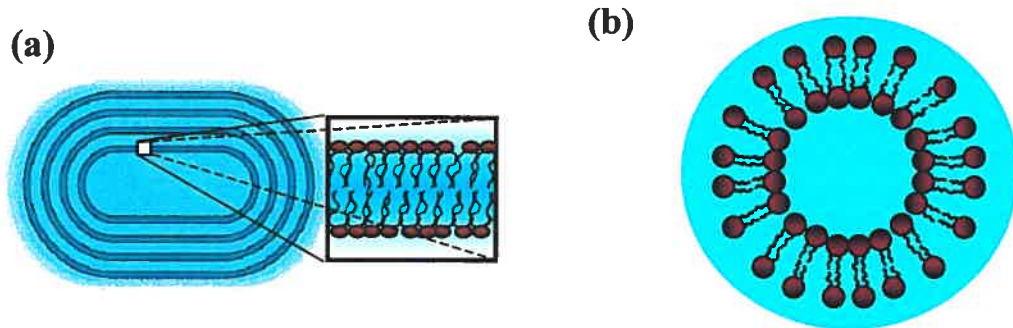


Fig. 1.4 : Schéma (a) d'une vésicule multilamellaire composée de plusieurs bicouches concentriques de phospholipides et (b) d'une vésicule unilamellaire constituée d'une seule bicouche en milieu liquide.

Bien que les diagrammes de phase fournissent une indication du degré de miscibilité des lipides et la région de température-composition de coexistence des phases gel et l_c , ils ne fournissent aucune information sur la morphologie et la dynamique des domaines de phase de lipides. Seulement très récemment, des domaines de coexistence de phase de lipides ont été directement visualisés par des techniques avancées de microscopie à fluorescence dans les vésicules unilamellaires géantes (GUVs : *Giant Unilamellar Vesicles*) formées de mélanges binaires de phospholipides et ternaires de phospholipides/cholestérol^{12,13,18-20}. Ces diagrammes de phase nous limitent pour une étude en fonction de la pression de surface étant donné que les suspensions aqueuses possèdent une pression de surface de 30-35 mN/m, semblable à celle des membranes cellulaires²¹. Donc, il n'existe pas de diagramme de phase pour prédire le comportement de phase en fonction de la pression de surface. Le point auquel les diagrammes de phase obtenus pour les dispersions aqueuses de lipides sont applicables à la formation bidimensionnelle de domaines dans les monocouches Langmuir et dans les films Langmuir-Blodgett (LB) ou Langmuir-Schaefer (LS) demeure une question en suspens.

1.4 Les monocouches Langmuir

1.4.1 *Les avantages du bain de monocouches Langmuir*

À cet égard, la formation des structures de phase condensées dans la région biphasée de coexistence de monocouches de lipides à l'interface eau/air a fourni une richesse d'information sur la croissance en 2D des domaines à l'échelle du micromètre²²⁻³¹. Ceci est principalement dû à la densité moléculaire et l'état de phase de ces monocouches Langmuir qui peuvent être déterminés par l'intermédiaire des isothermes π - A . La densité moléculaire et l'état de phase peuvent aussi être aisément contrôlés en changeant l'aire par molécule, la température de la sous phase, et les conditions ioniques dans un bain de monocouches Langmuir. Un tel contrôle de l'aire moléculaire et de la phase du lipide n'est pas possible avec des bicouches de vésicules ou des bicouches sur support solide formées par la fusion de vésicules de lipides³².

1.4.2 *Le diagramme de phase pour un système bidimensionnel*

Un autre diagramme de phase et une autre nomenclature s'appliquent pour décrire les transitions de phase dans les monocouches Langmuir. La première étape pour l'élaboration d'un film de phospholipides par les techniques LB ou LS est de former une monocouche Langmuir à l'interface eau/air à l'aide d'un bain de monocouches. Les phospholipides sont dissous dans un solvant organique et déposés (goutte à goutte à l'aide d'une microseringue) sur la surface d'eau. Suite

à l'évaporation du solvant, la monocouche Langmuir est formée. Les molécules sont dispersées de telle sorte que leurs interactions sont faibles. La monocouche a donc très peu d'effet sur la tension de surface de l'eau. L'aire moléculaire de la monocouche est contrôlée à l'aide de barrières amovibles qui compriment le film phospholipidique. Lors de cette compression, l'aire par molécule étant réduite, les molécules commencent à exercer des forces répulsives entre elles. Il en résulte un analogue à deux dimensions de la pression appelé la pression de surface (π) donnée par la relation suivante :

$$\Pi = |\gamma_0 - \gamma| \quad (1)$$

où γ_0 est la tension de surface de la sous phase (eau pure) et γ est celle de la sous phase en présence de la monocouche Langmuir. La pression de surface est mesurée à l'aide d'une balance Langmuir munie d'une plaque de Wilhelmy comme à la Fig. 1.5.

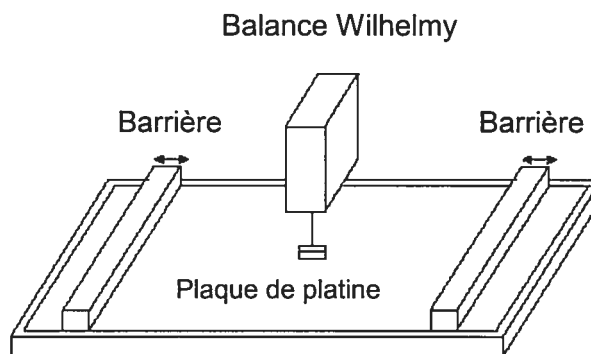


Fig. 1.5 : Schéma d'un bain de monocouches Langmuir constitué de barrières amovibles pour diminuer l'aire occupée par molécule et d'une balance Wilhelmy sur laquelle est déposée une plaque de platine de poids connu qui permet de mesurer avec précision la pression de surface (π).

Ces forces répulsives créées entre les molécules par la diminution de l'aire de surface disponible entraînent ainsi des transitions de phase qui correspondent à des changements de structure dans la monocouche Langmuir^{33,34}. La Fig. 1.6 présente un diagramme de phase général pour une monocouche Langmuir communément appelé isotherme π - A , où la pression de surface est donnée en fonction de l'aire par molécule. À une grande aire moléculaire, les phospholipides subissent très peu de compression et se trouvent dans la phase liquide-étendue (LE). Cette phase se caractérise par des chaînes alkyles qui commencent à se soulever, mais demeurent désordonnées³⁵. En continuant la compression, les molécules traversent la transition de phase liquide-étendue à liquide-condensée (LE à LC) marquée ensuite par un plateau de coexistence des phases LE/LC. Des changements se produisent au niveau de l'ordre et de la compressibilité des molécules de phospholipides³⁶. La phase LC est également connue comme condensée-inclinée. Les molécules sont plus ordonnées qu'à l'état LE dans un arrangement latéral hexagonal²². Malgré l'appellation de cette phase, elle n'est pas liquide. Dans la phase LC, le degré d'alignement des chaînes et le nombre de conformations *trans* sont supérieurs comparativement à l'état LE³⁵. À une plus grande compression, les molécules entrent dans une phase solide-condensée (SC) aussi appelée condensée-non inclinée. Les molécules gardent le même ordre qu'à la phase LC, mais l'inclinaison des chaînes alkyles est presque perpendiculaire à la surface. En conséquence, le film devient plus rigide et plus apte à subir la pression de rupture (π_c). Cette pression survient lorsque le film ne peut plus être comprimé et se défait. Le phénomène est généralement constaté par une

diminution rapide de la pression de surface ou par une rupture horizontale dans l'isotherme si la monocouche est à l'état liquide. Un exemple est la DPPC qui possède une grande tête polaire $[(\text{CH}_3)_3\text{N}^+]$ faisant en sorte qu'elle demeure inclinée à de très hautes pressions. Par conséquent, une monocouche de DPPC est moins apte à la rupture que d'autres monocouches de phospholipides ³⁶, ce qui explique pourquoi la DPPC peut être comprimée à des pressions de surface supérieures à 70 mN/m. La phase SC possède aussi un arrangement latéral hexagonal des molécules avec un facteur de compressibilité de trois fois supérieur à celui à l'état LC ¹⁵. Des similitudes ressortent en comparant les transitions de phase des phospholipides dans les dispersions aqueuses et dans les monocouches Langmuir. Il est possible de faire une analogie de phase comme étant la phase liquide-cristalline des vésicules qui ressemble à la phase LE dans les monocouches à l'interface eau/air. La phase gel est plutôt l'équivalent de la phase SC dans les monocouches Langmuir.

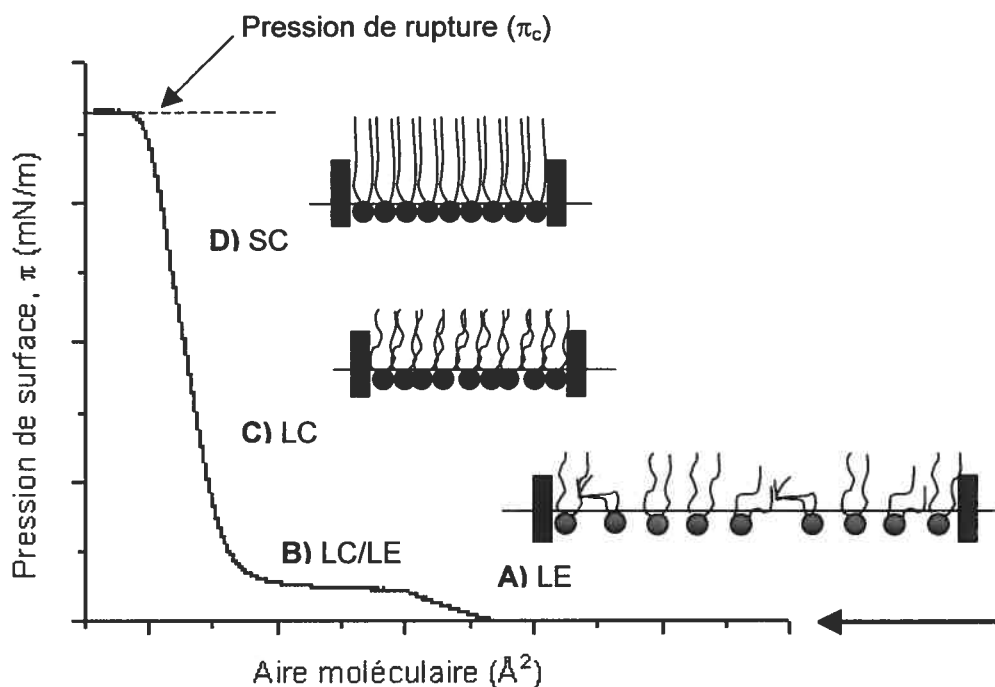


Fig. 1.6: Schéma d'un isotherme π -A basé sur la DPPC à température constante où l'aire moléculaire diminue au profit d'un plus grand ordre dans la monocouche Langmuir en passant par les différentes transitions de phase (LE \rightarrow LC et LC \rightarrow SC).

1.4.3 Théorie de la thermodynamique de surface des monocouches Langmuir

À l'aide des isothermes π -A acquis, l'étendue des interactions et de la miscibilité de la DPPC et la DLPC dans des monocouches mixtes a été analysée en utilisant la loi additive, l'énergie libre de mélange en excès (ΔG_{ex}) et la loi de phase en surface de Crisp. La **Fig. 1.7** présente les paramètres pertinents à cette étude théorique.

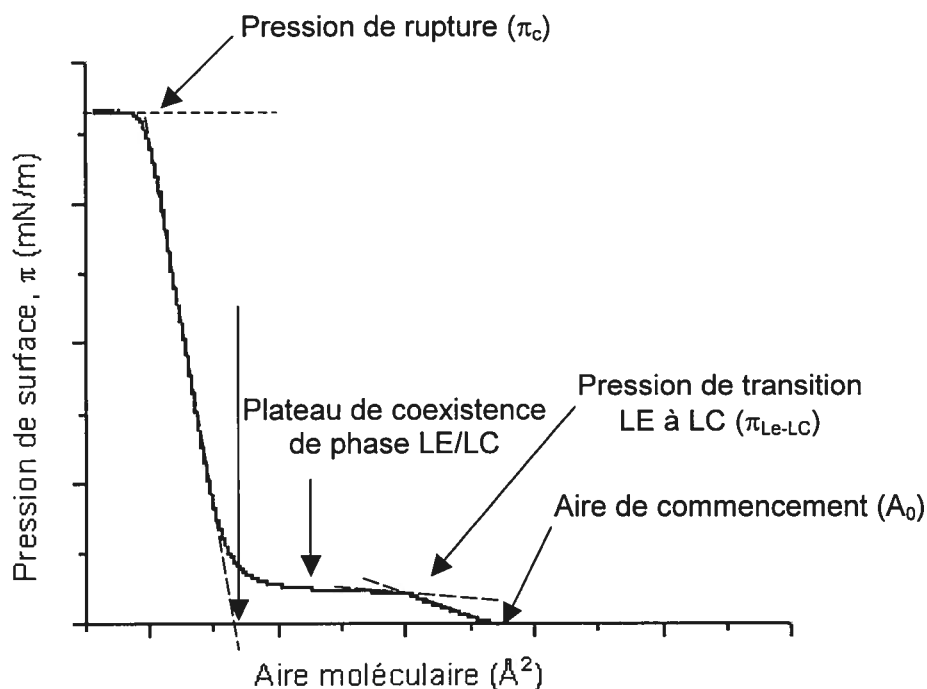


Fig. 1.7: Schéma d'un isotherme π - A avec les différents paramètres pouvant être tirés de celui-ci et nécessaires à l'analyse thermodynamique.

L'aire d'une monocouche à deux constituants à une pression de surface donnée peu être comparée avec celle résultant de l'addition de chacun des constituants purs à la même pression de surface par la relation suivante^{33,37}:

$$\tilde{A} = x_1 A_1 + x_2 A_2 \quad (2)$$

où \tilde{A} est l'aire moléculaire moyenne de la monocouche, x_1 et x_2 représentent les fractions molaires des constituants 1 et 2 de la monocouche mixte et A_1 et A_2 sont les aires moléculaires des constituants 1 et 2 dans les monocouches pures. La loi

d'additive prédit l'aire moléculaire dans un mélange binaire en supposant qu'aucune interaction chimique ni physique entre les constituants n'a lieu. Deux systèmes peuvent obéir à l'équation (2) : soit un mélange homogène idéal ou un mélange où les constituants sont complètement immiscibles³⁸. Les interactions entre les constituants peuvent mener à des aires moléculaires qui sont considérablement différentes de celles prédites par la loi d'additive. De plus, toute déviation de la relation linéaire prédite par la loi additive entre l'aire moléculaire moyenne et la fraction molaire de l'un ou de l'autre des constituants fait preuve de miscibilité partielle dans la monocouche^{33,37,39}. Pour connaître la fraction d'aire de surface occupée par l'un des deux constituants, il faut appliquer l'équation (3) suivante pour une pression de surface donnée :

$$\% A_{\text{total}}(1) = \frac{x_1 A_1}{x_1 A_1 + x_2 A_2} \times 100 \quad (3)$$

où le $\% A_{\text{total}}(1)$ est la fraction d'aire de surface occupée par le constituant (1).

Pour que 2 constituants forment réellement un film mixte, plutôt qu'un film avec séparation de phase à une certaine pression de surface, il faut que l'énergie libre de mélange en excès (ΔG_{ex}) soit ≤ 0 ³³. Les isothermes obtenus expérimentalement ont été utilisés pour calculer l'énergie libre en excès de mélange (ΔG_{ex}) du mélange binaire DPPC/DLPC à différentes pressions de surface^{33,39}. Dans le cas où les deux constituants dans une monocouche mixte

sont miscibles et suivent le comportement idéal dans la limite d'une pression de surface nulle, alors

$$\Delta G_{ex} = \int_0^{\pi} (\tilde{A} - x_1 A_1 - x_2 A_2) d\pi \quad (4).$$

Si $\Delta G_{ex} = 0$, le mélange est idéal. Des valeurs positives de ΔG_{ex} indiquent que les interactions entre les deux constituants sont plus faibles que les interactions entre les molécules des constituants purs. Ceci dit qu'il y a au moins un constituant dont sa tendance est de s'auto-associer afin de former des agrégats bidimensionnels ³⁹. Par ailleurs, des valeurs négatives de ΔG_{ex} indiquent l'existence d'une attraction mutuelle entre les constituants formant la monocouche.

Une autre méthode communément utilisée pour observer la miscibilité (ou l'immiscibilité) des constituants d'une monocouche est la loi de phase en surface développée par Crisp ^{33,37}. Si la température et la pression atmosphérique sont gardées constantes, alors le nombre de degrés de liberté (F) de la monocouche est donné par l'équation suivante :

$$F = C^B + C^S - P^B - q + 1 \quad (5)$$

où C^B est le nombre de constituants dans le système, C^S est le nombre de constituants confinés à la surface, P^B est le nombre de phases existantes dans le

système et q est le nombre de phases à l'interface eau/air en équilibre^{33,37}. Pour une monocouche à deux constituants à l'interface eau/air, $C^B = 2$ (air et eau), $C^S = 2$ (constituants 1 et 2), $P^B = 2$ (gazeuse et liquide), par conséquent l'équation (6) est obtenue :

$$F = 3 - q \quad (6).$$

En principe, la loi de phase en surface devrait être appliquée à la pression de surface d'équilibre au moment de la formation de la monocouche. Cependant, elle est plus souvent appliquée à la pression de rupture (π_c) de la monocouche³⁷ ou à la pression de transition de phase (ex., la transition de phase LE à LC)³⁹. Si les deux constituants sont miscibles, deux phases homogènes (soient LE et LC ou l'état SC et de rupture) sont en équilibre l'une avec l'autre ($q = 2$) et le système possède 1 degré de liberté. Seules les pressions de rupture ou de transition de phase varieront avec la composition de la monocouche. Dans l'autre cas, si les constituants d'une monocouche sont immiscibles, trois phases de surface en équilibre ($q = 3$) coexisteront et il n'y aura aucune variable indépendante. Par conséquent, la pression de surface de transition sera constante et indépendante de la composition de la monocouche³⁹.

Le module d'élasticité de surface (C_s^{-1})³³ de monocouches Langmuir peut être déterminé à l'aide de l'équation (7) à une pression de surface donnée :

$$C_s^{-1} = (-\tilde{A}) (d\pi/d\tilde{A})_{\Pi} \quad (7)$$

où \tilde{A} est l'aire moléculaire moyenne à une certaine pression de surface ($\Pi = 32$ mN/m) et $d\pi/d\tilde{A}$ est la pente de la tangente à Π dans l'isotherme π - A . Ce paramètre renseigne sur les propriétés mécaniques de la monocouche Langmuir. C'est-à-dire que plus le module d'élasticité est grand, plus la monocouche est rigide et moins il est possible de la comprimer à l'interface eau/air.

1.4.4 Les limitations des monocouches Langmuir

Quoique beaucoup ait été appris des recherches précédentes sur les monocouches, elles tendent à fournir une vue étroite du comportement de phase des membranes de lipides. Les monocouches à un seul constituant ou les mélanges binaires de phospholipide/cholestérol dans les régions de coexistence de phase gazeuse/LE ou LE/LC (c.-à-d., à basse pression de surface) ont été le centre de plusieurs des études (par microscopie d'épifluorescence, microscopie à angle de Brewster ou microscopie à sonde balayante) rapportées jusqu'ici. Cependant, la mimétique de bicouches lipidiques exige généralement une pression de surface beaucoup plus élevée pour la monocouche (30-35 mN/m)²¹. En outre, la forme et la taille des domaines condensés dans les films de lipides à plusieurs constituants peuvent être influencées par une miscibilité finie des différents constituants dans les domaines mêmes^{8,12,13,40} et/ou par le mélange des constituants entre les phases

à l'interface des domaines ⁴¹⁻⁴⁴. Ce dernier phénomène n'est pas présent dans des systèmes à un seul constituant dans la région de coexistence de phase.

1.5 Les monocouches déposées sur substrat plan

1.5.1 La séparation de phase dans les monocouches déposées sur substrat plan

Par comparaison, il y a eu peu de recherches sur la séparation de phase et la formation de domaines dans les monocouches sur substrat plan et les bicouches composées de mélanges de lipides ^{18,45-60}. Les compositions et/ou les pressions de surface étudiées sur ces derniers ont été plutôt limitées. En outre, la répartition des marqueurs de radeaux ^{45,46,50,61,62} ou des protéines ⁶⁰ entre les différentes phases de lipides dans les radeaux de lipides et les mélanges d'agents tensioactifs pulmonaires ont été le centre d'une attention récente, plutôt que la formation de domaines. Il est difficile d'établir à quel degré et comment chacun de ces constituants affectent la structure du film observée, puisque ces mélanges contiennent différents types de lipides, du cholestérol, et dans le cas des agents tensioactifs pulmonaires, des protéines. En général, seulement une petite partie des diagrammes de phase de monocouches mixtes de lipides a été explorée; d'autres parties peuvent être pertinentes. Il y a ainsi un besoin réel d'études plus détaillées du comportement de phase en 2D de simples mélanges binaire de phospholipides et ternaire de phospholipides/cholestérol et aussi de la distribution latérale des protéines membranaires et d'autres biomolécules dans ces films à plusieurs constituants. Il est particulièrement important de comprendre les

facteurs qui régissent la formation, la structure, et la dynamique des domaines de lipides dans les monocouches sur substrat plan à la pression d'équivalence dans une bicouche.

1.5.2 Incidence de l'utilisation d'un substrat plan

Les monocouches et les bicouches de phospholipides sur substrat plan formées par le dépôt des films Langmuir sur les surfaces solides sont généralement employées en tant que systèmes modèles pour étudier des phénomènes connexes aux membranes cellulaires. L'intérêt pour ces films lipidiques est conduit par leur intégration potentielle dans les dispositifs de biodétection ^{63,64} et l'applicabilité d'une panoplie de techniques analytiques de surface (ex, microscopie à sonde balayante, ellipsométrie, réflectivité de neutron, spectrométrie de masse d'ions secondaires en temps de vol, spectroscopie électrochimique d'impédance) pour résoudre la structure et la fonction des molécules s'ancrant dans les biomembranes ^{65,66}. Par exemple, les films de phospholipides sur support solide préparés en utilisant la technique Langmuir-Blodgett (LB) ou Langmuir-Schaefer (LS) ont été employées pour étudier la formation et la structure de microdomaines de lipides ou des radeaux ^{45,61,62,67}, pour sonder les interactions peptide (ou protéine)/lipide ⁶⁸⁻⁷¹, pour produire des modèles à motifs biologiquement accessibles ^{71,72}, et pour identifier les forces qui régissent les processus d'adhésion cellulaire ^{73,74}. Les monocouches de

phospholipides déposées sur des substrats plans s'avèrent donc à être des systèmes pratiques et d'un grand intérêt scientifique ⁶⁴.

1.5.3 Méthode de déposition Langmuir-Blodgett (LB)

La technique LB implique de faire le transfert d'une monocouche de l'interface eau/air à un substrat planaire. Cette méthode de déposition conventionnelle se fait à la verticale tel qu'illustré à la **Fig. 1.8**. Elle est accomplie en "trempant" un substrat solide au travers d'une monocouche Langmuir dans deux directions : soit de la sous phase vers l'air ou de l'air vers la sous phase. La direction est déterminée par le type de transfert que l'on veut effectuer. C'est-à-dire que, si le substrat est hydrophile ce sont les têtes polaires des phospholipides qui vont s'adsorber en premier sur le substrat. Dans l'autre cas, le substrat est hydrophobe, la monocouche sera transférée avec les chaînes alkyles vers le substrat. Pendant ce processus de transfert, la pression de surface de déposition est maintenue constante par une boucle de rétroaction entre la balance Langmuir qui mesure la pression de surface et le mécanisme des barrières amovibles.

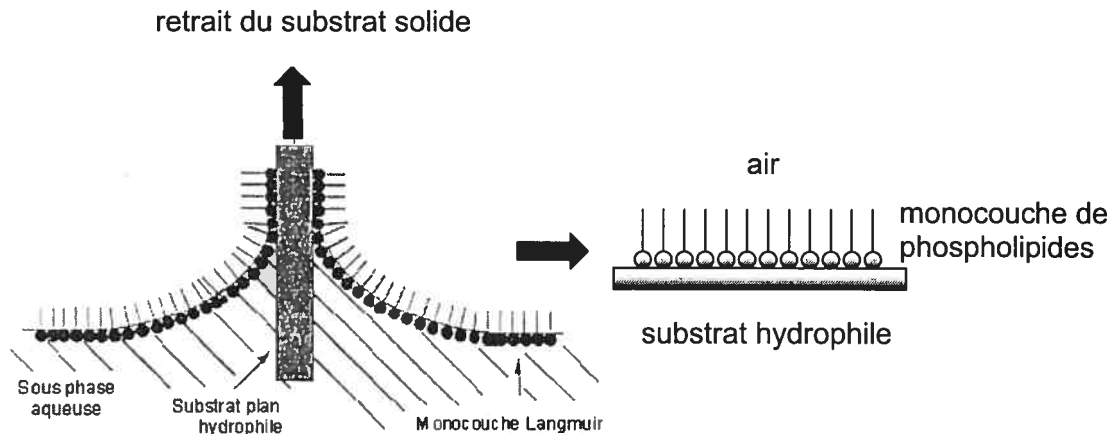


Fig. 1.8: Déposition LB d'une monocouche Langmuir de phospholipides à l'interface eau/air sur un substrat plan. Le substrat hydrophile est retiré de la sous-phase d'eau pour que les têtes polaires soient adsorbées à la surface.

1.5.4 Méthode de déposition Langmuir-Schaefer (LS)

La technique de déposition LS est une alternative au dépôt conventionnel. Le principe est le même que pour la technique LB. La seule différence est au niveau du substrat qui est placé à l'horizontal comme à la **Fig. 1.9**. L'avantage d'une telle technique est qu'elle est adéquate pour préserver la forme et la taille des domaines transférés, contrairement à la technique LB où soit la forme des domaines est plus allongée ⁷⁵ ou des nouvelles structures sont créées dues aux forces de cisaillements ⁷⁶. Ces phénomènes ont été rapportés dans les travaux de maîtrise de Patricia Moraille ⁷⁷ avec le même mélange de phospholipides

(DPPC/DLPC). Donc, l'utilisation de la technique LS représente la suite de ce projet.

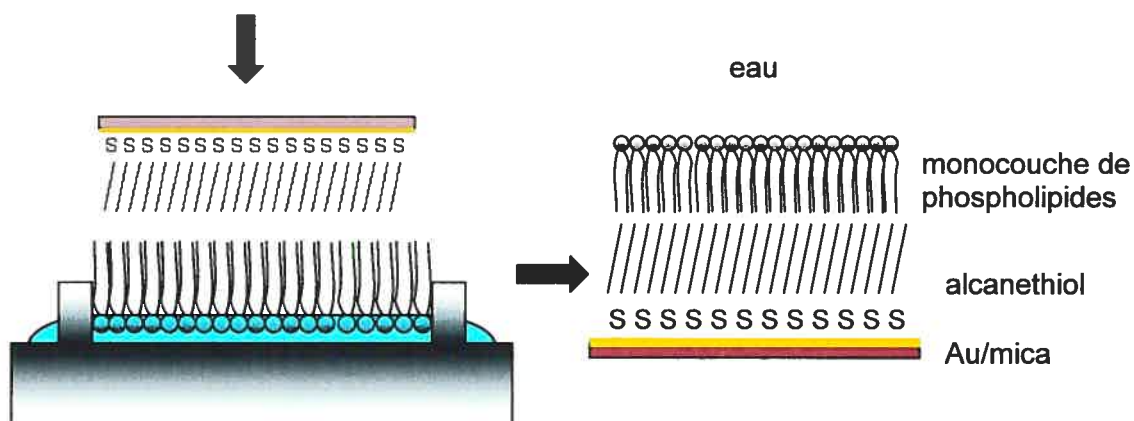


Fig. 1.9: Déposition LS d'une monocouche Langmuir de phospholipides à l'interface eau/air sur un substrat plan hydrophobe. Le substrat orienté parallèlement à l'interface eau/air est poussé à travers la monocouche jusque dans la sous-phase. Dans ce cas, les chaînes alkyles sont orientées vers la surface hydrophobe et les têtes polaires vers l'eau dans le film déposé. Un exemple de substrat hydrophobe est une monocouche d'alcanethiols auto-assemblée sur une surface d'or.

1.6 La technique de microscopie à force atomique (AFM)

1.6.1 Les avantages de la microscopie à force atomique (AFM)

La morphologie de domaines condensés dans les monocouches (à l'air) et les bicouches (en milieu liquide) de lipides déposées sur substrat solide a été étudiée en utilisant la résolution latérale de l'ordre du nanomètre de la microscopie à force atomique (AFM)^{65,78,79} et d'une technique de microscopie optique, la NSOM (*Near Field Optical Microscopy*)⁸⁰⁻⁸³. Ces études ont

démontré la capacité de l'AFM à imager les petites différences de hauteur en topographie (habituellement ≤ 1 nm) et les différences dans les propriétés de matériaux (visco-élasticité, friction, adhésion, et charge superficielle) qui distinguent la coexistence de phases de lipides, sans avoir à employer d'autres molécules comme sonde.

1.6.2 Le mode contact

En général, le microscope à sonde balayante (AFM) illustré à la **Fig. 1.10** balaie la surface sur le plan x-y de l'échantillon avec une sonde très pointue de forme pyramidale d'une longueur de quelques microns. Le rayon de la pointe est d'environ 5 à 10 nm. Cette dernière est localisée au bout d'un cantilevier de forme triangulaire qui est de 100 à 200 μm de long comme à la **Fig. 1.11**. Les forces qui s'exercent entre la pointe et la surface de l'échantillon font en sorte que le cantilevier se plie ou défléchisse. Les déflexions du cantilevier sont envoyées au détecteur en passant par le contrôleur permettant de générer une carte topographique en trois-dimensions de la surface.

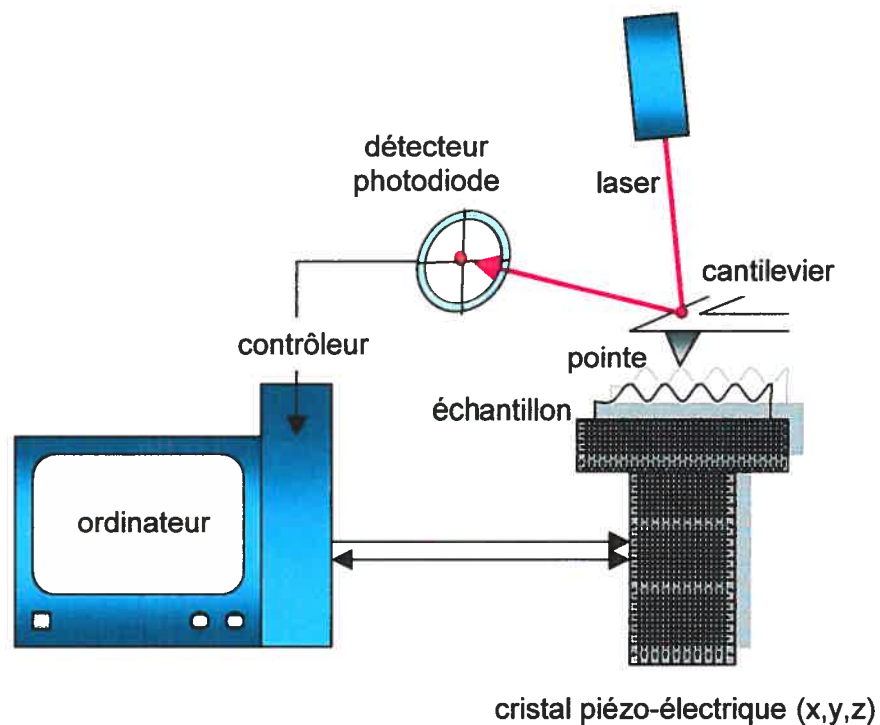


Fig. 1.10 : Schéma d'un microscope à sonde balayante (AFM) avec ses différentes composantes et la trajectoire du laser qui est réfléchi du cantilevier vers le détecteur divisé en quatre quadrants qui traduit les changements de déflexion du cantilevier.

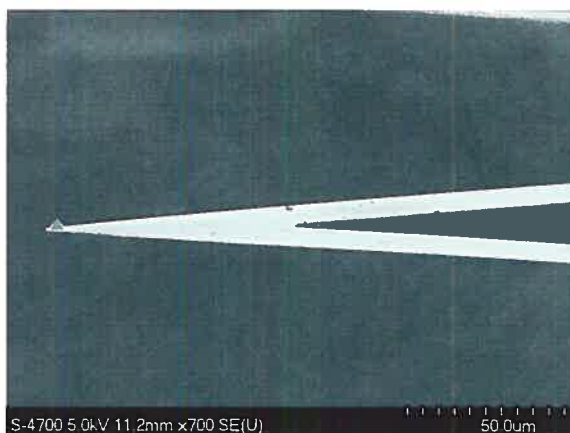


Fig. 1.11 : Image obtenue par microscopie électronique à balayage (MEB) d'un cantilevier triangulaire muni d'une sonde pyramidale en nitrure de silicium.

1.6.3 Le mode contact intermittent

La particularité du mode contact intermittent (Tapping mode[®]) est que le cristal piézoélectrique (*scanner*) conduit le cantilevier muni de la sonde à osciller verticalement (en *z*) proche de sa fréquence de résonance (**Fig. 1.12**). Lorsque la sonde n'est pas en contact avec la surface (**Fig. 1.13**), les mouvements que génère l'élément piézo-électrique font osciller le cantilevier avec une grande amplitude. Par la suite, lorsqu'elle est dirigée vers la surface et qu'elle commence légèrement à taper la surface son amplitude est réduite due à la perte d'énergie par la rencontre de la sonde avec la surface. Cette amplitude d'oscillation réduite maintenue constante par une boucle de rétroaction est utilisée comme un signal mesurant les variations topographiques de la surface d'un échantillon. Ce mode est idéal pour éviter d'endommager les échantillons et est favorisé pour les échantillons mous comme les monocouches phospholipidiques.

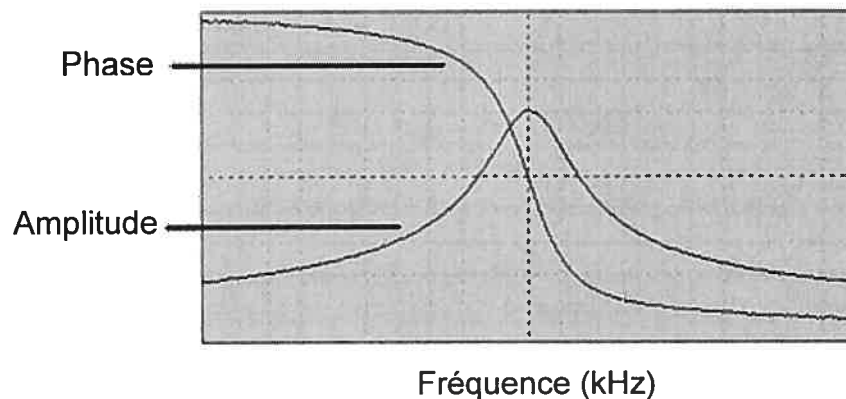


Fig. 1.12 : Courbe de l'amplitude en fonction de la fréquence de résonance d'oscillation du cantilevier. La courbe de la phase est à zéro (pas de déphasage).

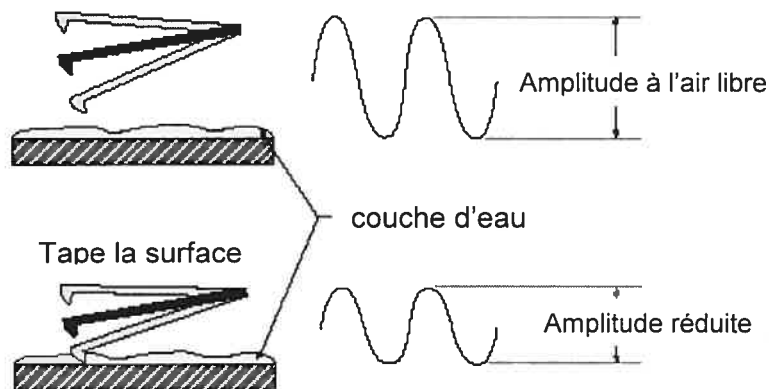


Fig. 1.13 : Amplitude d'oscillation du cantilevier à l'air libre (pas de contact avec la surface) et lorsque l'acquisition de l'image se fait pour le mode de contact intermittent (www.veeco.com).

1.6.4 *Le mode contact intermittent en phase*

L'imagerie en phase est une extension du mode contact intermittent (Tapping mode[®]) qui est utilisée pour sonder les variations dans les propriétés de surface comme la viscoélasticité, l'adhésion et la friction. L'imagerie en phase se sert du contrôleur (Fig. 1.10 et 1.14) pour enregistrer le retard (déphasage) de la phase entre le signal qui conduit le cantilevier à osciller (signal sinusoïdal en bleu) et le signal envoyé à l'élément piézo-électrique (signal sinusoïdal en noir). Les changements dans le retard de la phase reflètent des changements dans les propriétés mécaniques de la surface de l'échantillon et l'image en phase est générée simultanément avec l'image topographique. Ces changements sont dus à des variations spatiales dans les propriétés de surface de l'échantillon causant les déphasages.

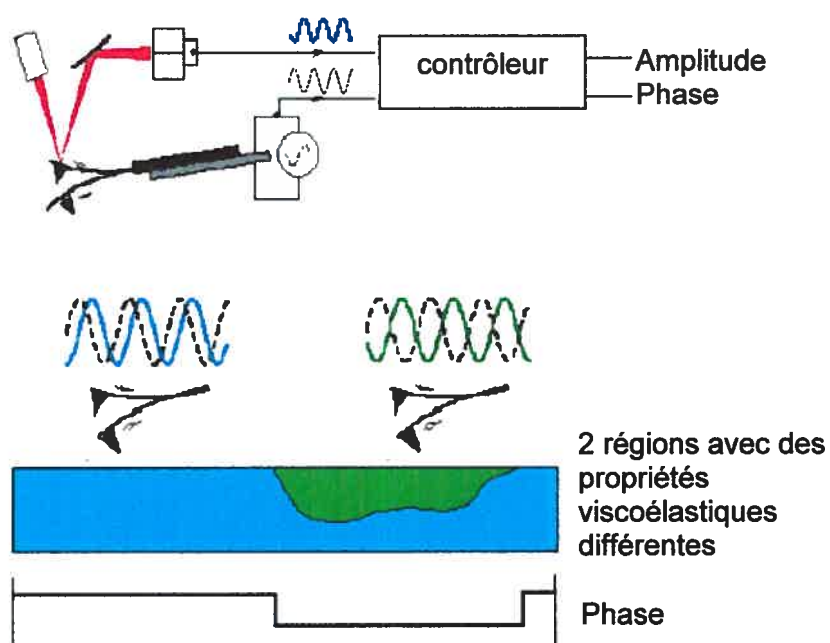


Fig. 1.14 : Schéma qui représente le principe de l'imagerie en phase dont le changement dans les propriétés de surface cause un déphasage dans le signal détecté. (www.veeco.com).

1.6.5 Théorie sur la variation de la composition des domaines condensés

La détermination de la proportion de la DPPC contenue dans la phase condensée se fait en utilisant la relation suivante⁸⁴ :

$$\phi_e \cdot \tilde{A} = (1 - \phi_c) \cdot \tilde{A} = \tilde{A}_e \cdot \frac{(x_c^i - x^i)}{(x_c^i - x_e^i)} \quad (8)$$

où ϕ_e et ϕ_c sont les fractions d'aire d'une image AFM occupées par les phases étendue et condensée, \tilde{A}_e est l'aire moléculaire moyenne de la phase étendue, x^i est

la fraction molaire totale du constituant i dans la monocouche mixte, alors que x_c^i et x_e^i sont respectivement les fractions molaires de i dans les phases condensée et étendue. Selon l'équation (8) qui masque l'équation d'une droite, il est possible de porter en graphique $\phi_c \cdot \tilde{A}$ en fonction de x^i dont la pente est $-\tilde{A}_c/(x_c^i - x_e^i)$ et l'ordonnée à l'origine est $\tilde{A}_c \cdot x_e^i / (x_c^i - x_e^i)$. Le ratio $-(\text{ordonnée à l'origine}/\text{pente})$ donne x_c^i à une certaine pression de surface.

L'aire moléculaire moyenne de la phase étendue de la DLPC (\tilde{A}_e) à une certaine pression de surface était calculée en utilisant l'équation (9) suivante^{85,86} :

$$\tilde{A}_e = \tilde{A} \frac{(1 - \phi_c)}{(1 - \phi_c (\tilde{A} / \tilde{A}_c))} \quad (9)$$

où \tilde{A}_c représente l'aire moléculaire moyenne de la phase condensée.

1.7 La technique de microscopie à angle de Brewster (BAM)

Avec cette technique, il est possible de suivre l'évolution de la morphologie de la monocouche à l'interface eau/air en fonction de la compression des barrières. Cette technique ne requiert pas l'incorporation de sonde fluorescente pour l'imagerie et donne une information détaillée sur les phases de monocouches, les transitions de phase, l'arrangement latéral des molécules et les transformations chimiques à l'interface eau/air ⁸⁷. Elle permet de distinguer des structures internes qui se forment à l'intérieur des domaines condensés qui est le phénomène d'anisotropie moléculaire ^{88,89}.

De façon générale, lorsqu'une lumière p-polarisée se propageant dans l'air (indice réfraction, n_1) atteint l'interface, une portion de la lumière est réfractée dans la sous phase (indice réfraction, n_2) et une autre est réfléchi. Mais, à l'angle de Brewster (d'incidence), α , il n'y a aucune réflexion ⁹⁰, d'où

$$\tan(\alpha) = n_2/n_1 \quad (9).$$

Par exemple, pour une $\lambda = 540$ nm, l'indice de réfraction de l'air est de $n_1 = 1.000$ ⁹¹ et celui de l'eau est de $n_2 = 1.335$ ⁹² donnant un angle $\alpha = 53.15^\circ$. Maintenant, la formation d'un mince film comme une monocouche Langmuir possédant un indice de réfraction différent de ceux des deux milieux (eau et air) altère les conditions de Brewster (Fig. 1.15). Par conséquent, à l'angle de Brewster pour l'interface propre, une partie de la lumière incidente de faible intensité est

réfléchi. Cette lumière est capturée par un détecteur (caméra CCD) permettant à la morphologie interfaciale d'être imagée. L'appareil utilisé est placé au-dessus du bain de monocouches Langmuir.

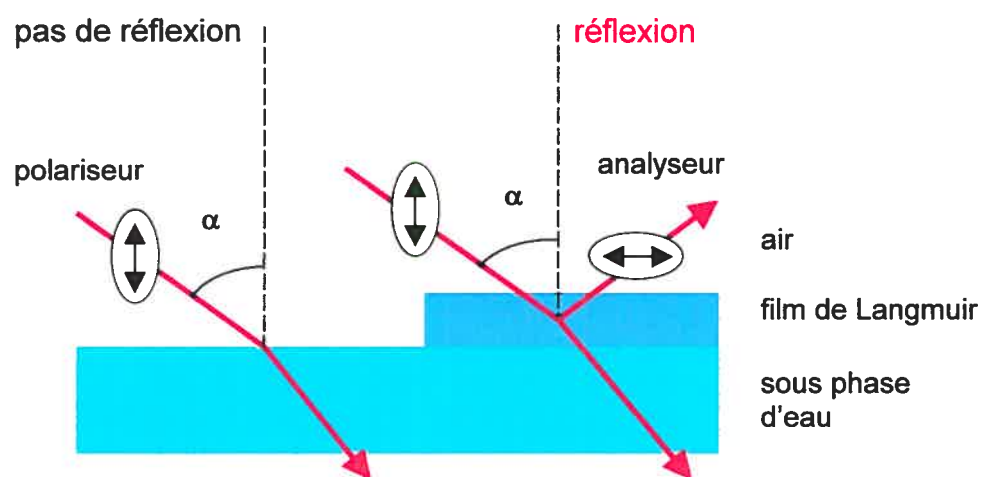


Fig. 1.15 : Schéma du principe de la microscopie à angle de Brewster (BAM).

1.8 Plan de travail

D'abord, des isothermes π - A de monocouches Langmuir de DPPC/DLPC à l'interface eau/air de différentes compositions seront acquis. Ces isothermes π - A seront ensuite utilisés pour une analyse thermodynamique à l'aide de la loi additive, l'énergie libre de mélange en excès et la loi de phase en surface de Crisp. Cette analyse permettra d'évaluer l'étendue de la miscibilité dans le mélange binaire DPPC/DLPC.

Ensuite, la technique LS sera utilisée pour déposer ces mêmes monocouches Langmuir sur un substrat plan hydrophobe constitué soit d'une monocouche auto-assemblée d'alcanethiols sur l'or ou d'une monocouche de phospholipides à l'état SC sur du mica afin de pouvoir imager leur morphologie par AFM^{93,94}. Une première étude sera effectuée à une pression de surface équivalente à celle des *bicouches* de vésicules en fonction de la composition de DPPC/DLPC. Une deuxième étude sera effectuée en gardant la composition de DPPC/DLPC constante et faisant varier la pression de surface. Ces deux études permettront d'étudier l'effet de la composition lipidique et la pression de surface sur les propriétés de phase des monocouches LS mixtes. Les résultats obtenus serviront à vérifier et/ou compléter l'analyse thermodynamique des isothermes π - A . Ces mêmes résultats ont été le sujet d'un article dans *Thin Solid Films*. Une copie de l'article se trouve en annexe.

Comme préambule à une direction future pour le projet, des résultats par BAM seront aussi présentés.

Chapitre II

Matériel et méthodes

2.1. Provenance des produits

La L- α -dilauroylphosphatidylcholine (DLPC), la L- α -dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) et la L- α -dipalmitoylphosphatidyléthanolamine (DPPE) en poudre proviennent de chez Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, É-U). Ces phospholipides (pureté > 99%) ont été utilisés tel que reçus, sans procéder à aucune purification supplémentaire. Les solutions de phospholipides ont été préparées avec du chloroforme et du méthanol de qualité spectroscopique provenant de chez A&C American Chemicals Ltée. (Montréal, Qc). Les surfaces d'or ont été modifiées avec une solution de 1 mM dans l'éthanol absolu de 1-tétradécane-thiol ($C_{14}SH$: $CH_3(CH_2)_{13}SH$; pureté > 98%) commandé chez Fluka (St. Louis, MO, É-U). L'or (pureté = 99.99%) employé pour l'évaporation thermique a été acheté chez Plasmaterials, Inc. (Livermore, CA, É-U). Le substrat plan utilisé est du mica ruby muscovite (ASTM Grade 2) provenant de chez B&M Mica Co., Inc. (Flushing, NY, É-U). L'eau déionisée (résistivité = 18.2 M Ω cm) utilisée comme sous phase du bain de monocouches Langmuir-Blodgett a été préparée en passant de l'eau purifiée par osmose inversée à travers un système Milli-Q Gradient de chez Millipore (Bedford, MA, É-U).

2.2 Préparation et conservation des solutions de phospholipides

Les phospholipides sont gardés dans le congélateur (-4 °C). Avant de préparer les solutions, ces produits sont mis sous vide pour la nuit afin d'évaporer l'humidité présente à l'aide d'une pompe mécanique. Les produits ainsi secs sont prêts pour la pesée. Les fioles volumétriques utilisées pour contenir les solutions sont préalablement nettoyées avec un mélange de chloroforme et éthanol absolu bouillant (1 :1 v/v). Les solutions de DPPC, de DLPC et des mélanges binaires sont préparés avec du chloroforme. La concentration totale en phospholipides des solutions pour le mélange binaire de DPPC/DLPC est de 1 mM. La fraction molaire de DPPC (x_{DPPC}) a été variée selon $x_{\text{DPPC}} = 0, 0.10, 0.25, 0.375, 0.40, 0.50, 0.625, 0.70, 0.80, 0.90$ et 1.00. Pour la solution 1 mM de DPPE, un mélange de chloroforme/méthanol (4 :1 v/v) est nécessaire pour dissoudre le phospholipide. Après les expériences avec le bain de monocouches, les fioles volumétriques contenant les solutions de phospholipides sont bien fermées et enveloppées avec du ruban en Teflon[®] et de la paraffine pour minimiser l'évaporation du solvant. Elles sont gardées au réfrigérateur (+4 °C) jusqu'à la prochaine utilisation. Lors de leur sortie du réfrigérateur, un certain temps d'attente est nécessaire aux solutions pour revenir à la température de la pièce avant de les utiliser. Les solutions sont utilisables jusqu'à un mois après leur préparation.

2.3 Isothermes π -A: mesures de la pression de surface en fonction de l'aire moléculaire avec le bain de monocouches Langmuir-Blodgett

Nettoyage. Avant chaque isotherme, la surface du bain constitué de Teflon[®], est nettoyée plusieurs fois avec du papier absorbant Kimwipes[®] imprégné premièrement d'éthanol absolu et ensuite de chloroforme. Les barrières de compression en Delrin[®] sont seulement nettoyées à l'éthanol absolu. La plaque de platine qui est accrochée sur la balance de Wilhelmy est rincée au méthanol et passée sous une flamme jusqu'à ce que le platine devienne rouge.

Blanc. Avant de déposer les lipides sur la surface du bain, il faut faire un isotherme de l'eau pure où la fluctuation de la pression de surface doit demeurer constante entre +0.5 et -0.5 mN/m

Procédure. Les monocouches Langmuir à l'interface eau/air, composées de DLPC, de DPPC et du mélange DPPC/DLPC, sont formées en déposant goutte à goutte à l'aide d'une seringue (Hamilton) de 100 μ L une solution lipidique à la surface de l'eau du bain de monocouches Langmuir-Blodgett KSV 3000 (KSV Instruments, Helsinki, Finlande) thermostaté à 20.0 ± 0.5 °C. L'aire de la surface du bain est de 768 cm². Suite à une attente de 20 minutes pour l'évaporation du solvant, les monocouches sont symétriquement comprimées de façon générale à une vitesse de 6 cm²/min (i.e., 1 Å² molécule⁻¹ min⁻¹), autrement la vitesse est spécifiée. La pression de surface est mesurée avec une précision de 0.1 mN/m utilisant une balance de Wilhelmy et une plaque en platine. Chaque isotherme est effectué au moins deux fois afin de vérifier la reproductibilité à une pression de

surface donnée. La différence en aire moléculaire entre les isothermes est inférieure à $0.6 \text{ \AA}^2/\text{molécule}$.

Intégration des isothermes π -A. L'énergie libre de mélange en excès (ΔG_{ex}) du mélange binaire DPPC/DLPC, qui sera déterminée à différentes pressions de surface, est calculée par intégration de l'aire sous les isothermes à partir de 0 mN/m jusqu'à la pression de surface étudiée utilisant le logiciel Microcal Origin (version 6.0).

2.4 Préparation des substrats plans hydrophobes

2.4.1 DPPE/ mica

Les substrats hydrophobes employés pour la déposition de monocouches de DLPC, de DPPC et du mélange DPPC/DLPC sont faits d'une surface de mica recouverte, soit d'une monocouche de DPPE ou d'une mince couche d'or sur laquelle s'est auto-assemblée une monocouche de 1-tétradécane-thiol. Le substrat DPPE/mica est préparé en effectuant une déposition verticale d'une monocouche de DPPE à l'état solide-condensé (SC) sur du mica fraîchement clivé. La déposition verticale est le transfert conventionnel dit Langmuir-Blodgett (LB). Il implique que le mica, qui est retenu à l'aide d'une pince, se trouve dans la sous-phase d'eau de façon perpendiculaire à l'interface eau/air. Une fois la monocouche Langmuir formée à l'interface eau/air à la pression de surface désirée, le substrat traverse la sous-phase et la monocouche Langmuir à l'aide

d'un mécanisme le déplaçant à 5 mm/min. De sorte que les têtes polaires du phospholipide qui se trouvaient sur le lit d'eau se trouvent maintenant sur le mica. Les barrières de compression maintiennent la pression de surface constante tout au long du dépôt. Le dépôt est réalisé à une pression de surface de 40 mN/m (aire moléculaire de 39 \AA^2)^{46,95,96}.

2.4.2 *C₁₄S/Au/mica*

Les substrats *C₁₄S/Au/mica* sont préparés en déposant de l'or sur des feuillets de mica (2.5 cm x 3.5 cm) fraîchement clivés en utilisant un évaporateur thermique de métaux VE-90 muni d'un moniteur de déposition en cristal quartz (Thermionics Vacuum Products, Port Townsend, WA, É-U). L'épaisseur totale en or déposée est de 100 nm et l'évaporation se fait à une vitesse de 0.1 nm/s. Les bateaux servant de support pour l'or sont en molybdène recouverts d'une couche d'alumine et proviennent de chez Kurt J. Lesker Canada Inc. (Richmond Hill, Ontario). L'évaporation de l'or est menée à terme à une pression de base de $< 1 \times 10^{-7}$ Torr. Suivant l'évaporation, les feuillets de mica recouverts d'or sont immédiatement incubés dans une solution de 1 mM de *C₁₄SH* dans l'éthanol absolu pour au moins 3 heures⁹⁷. Suite à l'auto-assemblage, les substrats sont retirés de la solution, rincés généreusement avec de l'éthanol 100%, séchés à l'azote gazeux et gardés à l'air dans un pétri en verre propre jusqu'à la prochaine utilisation. Ces substrats peuvent être utilisés pour des analyses jusqu'à deux semaines après leur préparation.

2.5 Déposition des monocouches de phospholipides par la technique Langmuir-Schaefer (LS)

Les monocouches constituées de DLPC, de DPPC et du mélange DPPC/DLPC sont transférées de l'interface eau/air à un substrat hydrophobe en utilisant la technique Langmuir-Schaefer (LS)^{32,94}. Cette dernière consiste à faire un dépôt de façon horizontale contrairement au dépôt conventionnel qui est vertical. Pour le transfert des monocouches Langmuir mixtes sur les substrats DPPE/mica ou C₁₄S/Au/mica, les différents mélanges de DPPC/DLPC sont comprimés jusqu'à la pression de surface désirée à 6 cm²/min. Après une stabilisation des barrières et de la pression de surface de 30 minutes, (le temps est spécifié pour l'étude de la séparation de phase du système DPPC/DLPC en fonction du temps de stabilisation) la monocouche est déposée sur l'un des deux types de substrat. Le dépôt se fait à l'aide d'un dispositif qui retient le substrat et le descend à une vitesse de 5 mm/min de façon parallèle à l'interface eau/air. Sur cet interface se trouve la monocouche Langmuir mixte et la descente du substrat s'effectue jusqu'à traverser le film lipidique. Le tout est accompli en gardant la pression de surface constante. Par la suite, le substrat se retrouve complètement immergé dans la sous phase d'eau. La bicouche hybride résultante est transférée sous l'eau du bain de monocouches Langmuir-Blodgett à la cellule liquide en Teflon[®] utilisée pour l'imagerie AFM (confectionnée par l'atelier de mécanique, département de chimie, U de M).

2.6 Imagerie AFM (Atomic Force Microscopy)

Les bicouches hybrides préparées par le transfert LS sont imagées dans l'eau Milli-Q à température de la pièce en utilisant le microscope à sonde balayante Dimension 3100 avec un contrôleur Nanoscope IIIa (Digital Instruments, Santa Barbara, CA, É-U). L'acquisition des images obtenues en topographie et en phase se font en mode de contact intermittent (Tapping mode[®]) à une vitesse de balayage de la pointe de 0.5-1.0 Hz. La résolution des images est de 512 x 512 pixels. Les sondes employées possèdent des cantileviers de forme triangulaire en nitrure de silicium (Si_3N_4 , oxide-sharpened, Nanoprobes, Digital Instruments, Santa Barbara, CA, É-U) avec une constante de force de 0.12 N/m et une fréquence de résonance d'environ 8 kHz en milieu liquide. L'amplitude extérieure (*drive amplitude*) est normalement de 3000 mV avec une atténuation de l'oscillation (*oscillation damping*) de 70-75% de l'amplitude d'oscillation à l'air libre (*free oscillation amplitude*). Pour chaque composition de phospholipides et pression de surface, les images sont obtenues de 2 ou 3 échantillons différents et d'au moins trois positions différentes sur la surface de chaque échantillon. Les images AFM de 100 μm x 100 μm ou 50 μm x 50 μm sont analysées utilisant l'analyse d'image *bearing* du logiciel de Digital Instruments. L'analyse *bearing* permet d'obtenir une distribution d'hauteur de l'échantillon balayé à partir d'une image qui donne le pourcentage d'aire de surface occupé par les domaines plus épais et donc de déphasage plus positif.

2.7 Imagerie BAM (Brewster Angle Microscopy)

Un microscope à angle de Brewster BAM2plus (NFT, Göttingen, Allemagne) est employé pour l'observation directe des monocouches Langmuir mixtes à l'interface eau/air. Il est monté sur un bain de monocouches Langmuir (Nima Technology, Coventry, Angleterre) thermostaté à 20.0 ± 0.5 °C avec une aire de surface de 710 cm^2 . Le volume de solution lipidique injecté à l'interface est de $90 \text{ }\mu\text{L}$ et le temps d'évaporation du solvant est de 20 min. La vitesse de compression symétrique des barrières est de $8 \text{ cm}^2/\text{min}$. Le microscope est muni d'un laser vert Nd: Yag (puissance $> 20 \text{ mW}$; 532 nm), d'un polariseur, d'un analyseur et d'une caméra CCD. L'angle de Brewster ou d'incidence est 53.17° . L'objectif utilisé de magnification 10X permet une résolution latérale de $2 \text{ }\mu\text{m}$. Le système comporte un logiciel pour le traitement des images qui corrige la déformation due à l'observation faite à l'angle de Brewster. La dimension des images est de $539 \times 428 \text{ }\mu\text{m}^2$.

2.8 Caractérisation des substrats plans hydrophobes de $\text{C}_{14}\text{S}/\text{Au}/\text{mica}$

2.8.1 *Ellipsométrie*

L'épaisseur de la SAM du 1-tétradécane-thiol est déterminée à l'aide d'un ellipsomètre de type Multiskop (Optrel, Golm, Allemagne). Il a été utilisé dans un mode dit nul à l'aide d'un laser HeNe (2 mW), d'un polariseur, d'un

compensateur et d'un arrangement d'analyseurs à un angle d'incidence de 70° . Un indice de réfraction de 1.45 est utilisé pour la monocouche de $C_{14}SH$ ^{98,99}.

2.8.2 Mesures d'angle de contact statique

L'appareil utilisé est aussi le Multiskop de Optrel qui possède une extension pour la prise de mesures d'angle de contact. Le logiciel utilisé est CAM (Contact Angle Measurement). Il permet, à l'aide d'une caméra CCD, d'analyser le contour d'une goutte en la caractérisant avec l'équation de Young-Laplace³⁸ pour obtenir l'angle de contact de la surface. La seringue utilisée est de 50 μL . Le volume des gouttes d'eau déionisée déposées sur la surface était de 3-5 μL .

2.8.3 PM-IRRAS (Polarization Modulation Infrared Reflection Absorption Spectroscopy)

Cette technique de spectroscopie infra rouge est utilisée pour confirmer la présence d'une SAM sur la surface d'or. Le spectre a été obtenu en utilisant un spectrophotomètre FTIR Bio-Rad FTS-6000 de Digilab (Orlando, FL, É-U). Il est muni d'un détecteur mercure-cadmium-tellurique (MCT) qui est refroidi avec de l'azote liquide. L'instrument comprend aussi un modulateur photo-élastique PEM-90 de Hinds Instruments (Hillsboro, OR, É-U) opérant à 37 Hz. La lumière polarisée est focalisée sur la surface d'or à un angle d'incidence de 85° par rapport

à la normale de la surface. Le spectre est généré avec 1 balayage de 20 min contrôlé par le logiciel DSP (*Digital Signal Processing*) à une résolution spectrale de 8 cm^{-1} . Le spectre a été analysé utilisant le logiciel Grams/32 version 4.14 (Galactic Industries, Salem, NH, É-U).

Chapitre III

Résultats & discussion

3.1 Isothermes π - A

Une série d'isothermes π - A de différentes compositions de DPPC/DLPC a été réalisée pour faire une étude thermodynamique qui permettrait d'obtenir de l'information sur la miscibilité et les propriétés de phase de ces deux phospholipides selon les théories de la loi de phase en surface de Crisp^{33,37}, la loi additive^{33,37} et l'énergie libre de mélange en excès³³.

Les isothermes π - A pour les monocouches pures de DPPC et DLPC à l'interface eau/air sont présentés à la **Fig. 3.1a**. Ces isothermes ressemblent à ceux déjà parus dans la littérature¹⁰⁰⁻¹⁰². Le plateau observé à une pression de surface (π) de 4.4 mN/m dans l'isotherme du DPPC à la **Fig. 3.1b** correspond à la transition de phase liquide-étendue à liquide-condensée (π_{LE-LC})^{81,94,100}. L'aire moléculaire limite (A_{lim}) obtenue de $53.2 \pm 0.2 \text{ \AA}^2/\text{molécule}$ confirme des résultats déjà publiés^{100,102}. À une $\pi > 20 \text{ mN/m}$, la monocouche de DPPC est dans la phase solide-condensée (SC)^{81,94}, alors que la monocouche de DLPC montre un isotherme qui est caractéristique d'un état fluide, donc plus désordonné. La phase liquide-étendue (LE) est présente à toutes les pressions en-dessous de la pression de rupture (π_c) du film de DLPC. Cette phase LE

s'explique par le fait que la monocouche de DLPC était comprimée à une température (20 °C) bien au-dessus de sa température de transition de phase ($T_m = -1$ °C) ¹¹. À une pression de déposition de 32 mN/m, la DPPC et la DLPC occupent une aire moléculaire de 47.1 ± 0.1 Å² et 58.5 ± 0.2 Å² respectivement. De plus, leurs modules d'élasticité de surface (C_s^{-1}) à 32 mN/m ³³, déterminés à partir de la pente des isothermes π - A et à l'aide de l'équation (7), sont de 259 ± 5 mN/m (DPPC) et de 112 ± 6 mN/m (DLPC). Ces valeurs indiquent que la DPPC est plus rigide dans le plan horizontal que la DLPC. Sous les conditions choisies de température et compression pour cette étude, les π_c des monocouches pures de DPPC et de DLPC sont de ~ 73 mN/m ^{60,103-105} et ~ 46 mN/m respectivement. Il faut spécifier que la tension de surface de l'eau pure est de 72.8 mN/m à 20 °C ⁹¹. Une pression de rupture de ~ 73 mN/m signifie que la monocouche de DPPC à l'état SC réduit la tension de surface de l'eau à 0 mN/m. Dans la littérature, plusieurs isothermes ^{60,103-105} confirment que la DPPC peut être comprimée jusqu'à des pressions de surface supérieures à 70 mN/m. Le **Tab. 3.1** résume les paramètres importants pour la DPPC et la DLPC pour l'étude.

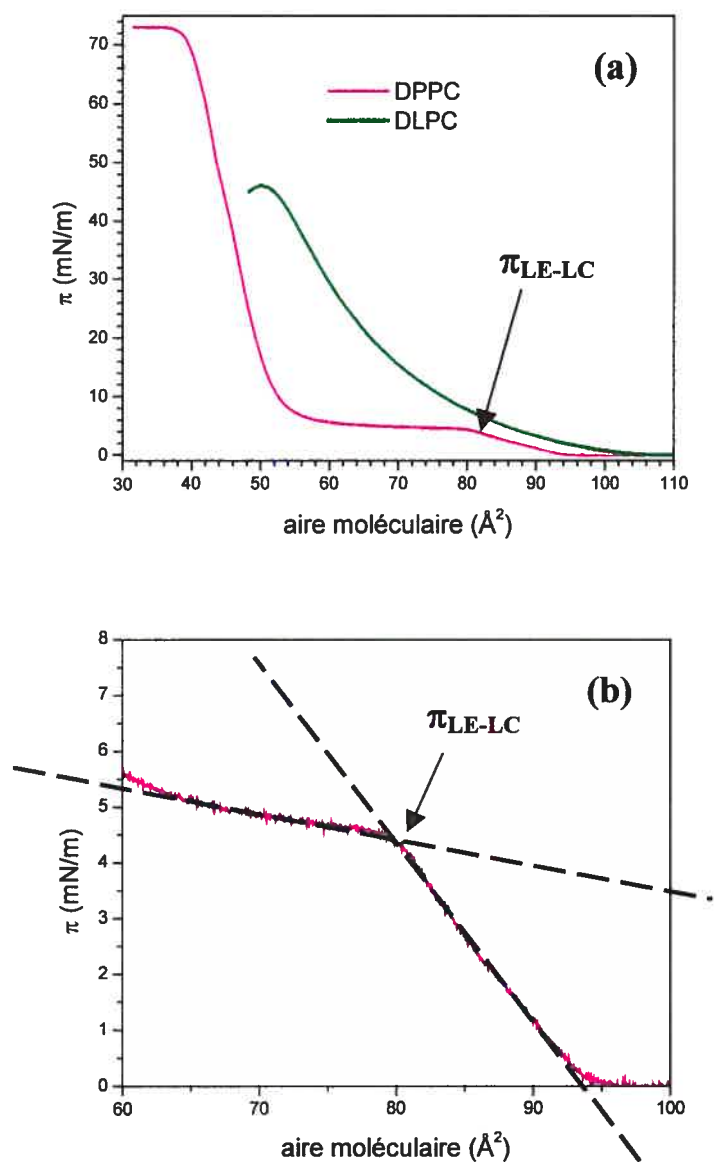


Fig. 3.1 : (a) Isothermes π - A des monocouches Langmuir pures de DPPC et DLPC à 20 °C. (b) Agrandissement de la région de transition de phase LE à LC pour l'isotherme π - A de la DPPC.

Phospholipides	DPPC (C16)	DLPC (C12)
Masse Molaire (g/mol)	734.1	621.83
T_m (°C)	41	-1
A_{lim} (Å ² /molécule)	53.2 ± 0.2	75.1 ± 0.1
Aire moléculaire (Å ²) @ $\pi = 32$ mN/m	47.1 ± 0.1	58.5 ± 0.2
C_s^{-1} (mN/m) @ $\pi = 32$ mN/m	259 ± 5	112 ± 16
π_c (mN/m)	73	46
π_{LE-LC} (mN/m)	4.4	---

Tab. 3.1 : Informations physiques et paramètres pouvant être obtenus à partir des isothermes π - A des monocouches Langmuir pures de DPPC et DLPC.

3.2 La loi de phase en surface de Crisp

3.2.1 Variation de la pression de transition de phase LE à LC (π_{LE-LC}) en fonction de la composition de la monocouche Langmuir mixte

D'après la Fig. 3.2, seuls les isothermes des monocouches mixtes avec une $x_{DLPC} \leq 0.50$ montrent un épaulement qui est l'indicateur d'une transition de phase LE à LC. Cet épaulement devient moins prononcé lorsque la x_{DLPC} augmente et même inexistant pour une $x_{DLPC} > 0.50$. Les valeurs de π_{LE-LC} sont données dans le Tab. 3.2. La Fig. 3.3a montre notamment la croissance linéaire de la π_{LE-LC} avec l'augmentation de la x_{DLPC} jusqu'à 0.50. Selon la loi de Crisp, le fait que la π_{LE-LC} varie avec la composition de la monocouche suggère que la DPPC et la

DLPC sont au moins partiellement miscibles à l'interface eau/air jusqu'à la transition de phase LE à LC³⁹. Si elles étaient miscibles, les deux phases LE et LC seraient à l'équilibre ($q = 2$: la phase LE et LC) et le système posséderait un seul degré de liberté ($F=1$) selon l'équation (6)³⁹. Ceci serait donc cohérent avec des quantités croissantes de DLPC ajoutées au mélange stabilisant la phase LE de la DPPC. Puisque la DLPC se trouve toujours dans l'état LE. La compression de la monocouche à de plus hautes pressions serait par conséquent nécessaire pour condenser la DPPC.

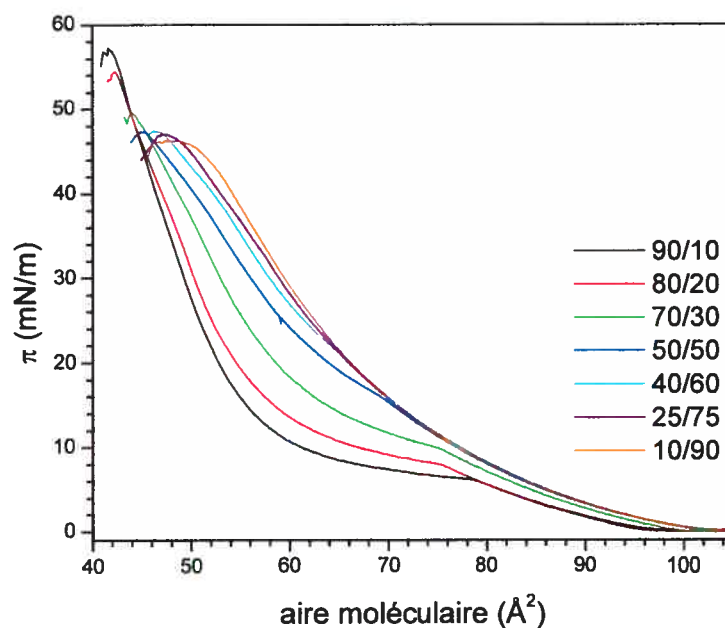


Fig. 3.2 : Isothermes π - A pour les différents mélanges binaires de DPPC/DLPC à 20 °C. Ces isothermes se situent exactement entre les isothermes des deux phospholipides purs (Fig. 3.1a). Pour une présentation plus claire, seulement quelques isothermes π - A ont été présentés.

Couleur de la courbe π - A	Figure	x_{DLPC}	π_{LE-LC} (mN/m)	π_c (mN/m)
rose	3.1a	0.00	4.4	73.1
X	3.2	0.05	5.6	57.2
noir	"	0.10	6.2	55.1
rouge	"	0.20	8.0	54.7
vert	"	0.30	10.1	50.9
X	"	0.40	12.9	49.1
bleu	"	0.50	15.8	47.0
bleu turquoise	"	0.60	---	47.4
X	"	0.70	---	46.5
mauve	"	0.75	---	47.2
X	"	0.80	---	47.0
orange	"	0.90	---	46.1
vert olive	3.1a	1.00	---	46.0

Tab. 3.2 : Valeurs de la pression de transition de phase LE à LC (π_{LE-LC}) et de la pression de rupture (π_c) utilisées pour les graphiques de la Fig. 3.3 pour les différentes compositions de DPPC/DLPC. (x) = isotherme π - A non présenté pour une plus grande clarté à la Fig. 3.2.

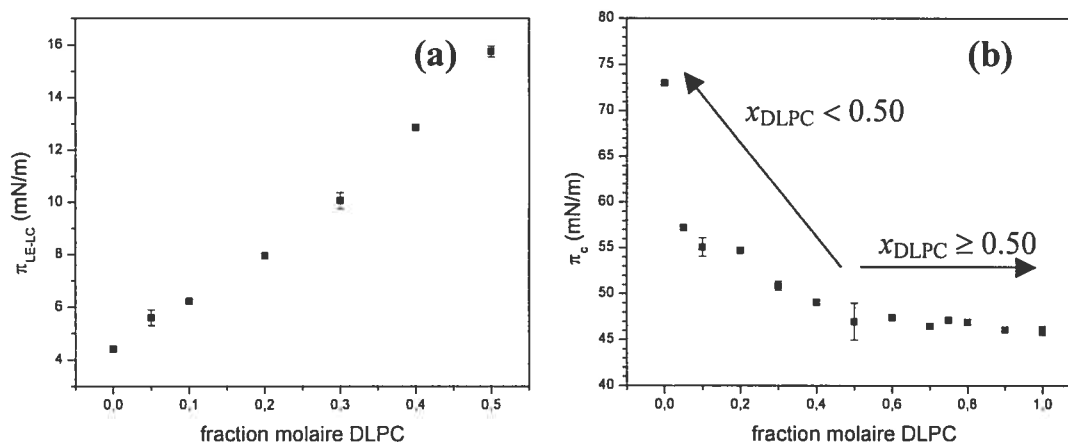


Fig. 3.3 : Variation (a) de la pression de transition de phase LE à LC (π_{LE-LC}) et (b) de la pression de rupture (π_c) en fonction de la composition de DPPC/DLPC des monocouches Langmuir à 20 °C.

3.2.2 Variation de la pression de rupture (π_c) en fonction de la composition de la monocouche Langmuir mixte

Lorsque la x_{DLPC} augmente, la monocouche de DPPC/DLPC devient de plus en plus fluide (Fig. 3.2). Le Tab. 3.2 montre que dans les mélanges binaires contenant une $x_{DLPC} \geq 0.50$, la π_c du film demeure relativement constante à 46-47 mN/m. Alors que pour une $x_{DLPC} < 0.50$, il y a une augmentation graduelle de la π_c en diminuant la x_{DLPC} . Cette constatation a été portée en graphique (Fig. 3.3b). Selon la loi de Crisp, la π_c constante observée pour les monocouches de $x_{DLPC} \geq 0.50$ peut indiquer que la DPPC et la DLPC ne sont pas miscibles lorsque la DPPC est à l'état condensé à l'interface eau/air. Ceci est le premier indice de la possibilité d'être en présence d'une séparation de phase dans les monocouches de DPPC/DLPC. Par conséquent, cela peut impliquer la présence de trois phases en

équilibre ($q = 3$: la phase LE, la phase SC et l'état de rupture) qui coexistent et le système possède alors aucun degré de liberté ($F = 0$) selon l'équation (6).

3.3 La loi additive

La Fig. 3.4 montre comment l'aire moléculaire moyenne (\tilde{A}) (équation (2)) des monocouches mixtes de DPPC/DLPC pour différentes valeurs de π varie en fonction de la x_{DLPC} . À des π de 5, 10 et 20 mN/m, une déviation positive prononcée de la loi additive est observée à toutes les compositions. L'ampleur de cette déviation diminue avec la π croissante comme dans le cas à 32 mN/m. À 40 mN/m, les valeurs d'aire moléculaire correspondent à celles de la droite calculée. Ces résultats donnent lieu à deux possibilités : la première étant la déviation positive de la loi additive à des $\pi \leq 32$ mN/m indiquant que la DPPC et la DLPC ne sont ni idéalement miscibles ni complètement non-miscibles. Puis, la compression du film de 32 à 40 mN/m engendre soit un mélange idéal ou la ségrégation complète de la DPPC et la DLPC dans la monocouche à l'interface eau/air, car les \tilde{A} suivent la droite calculée à partir de la loi additive (Fig. 3.4). C'est essentiellement pour distinguer ces deux possibilités que la ΔG_{ex} à différentes compositions et pressions de surface a été calculée.

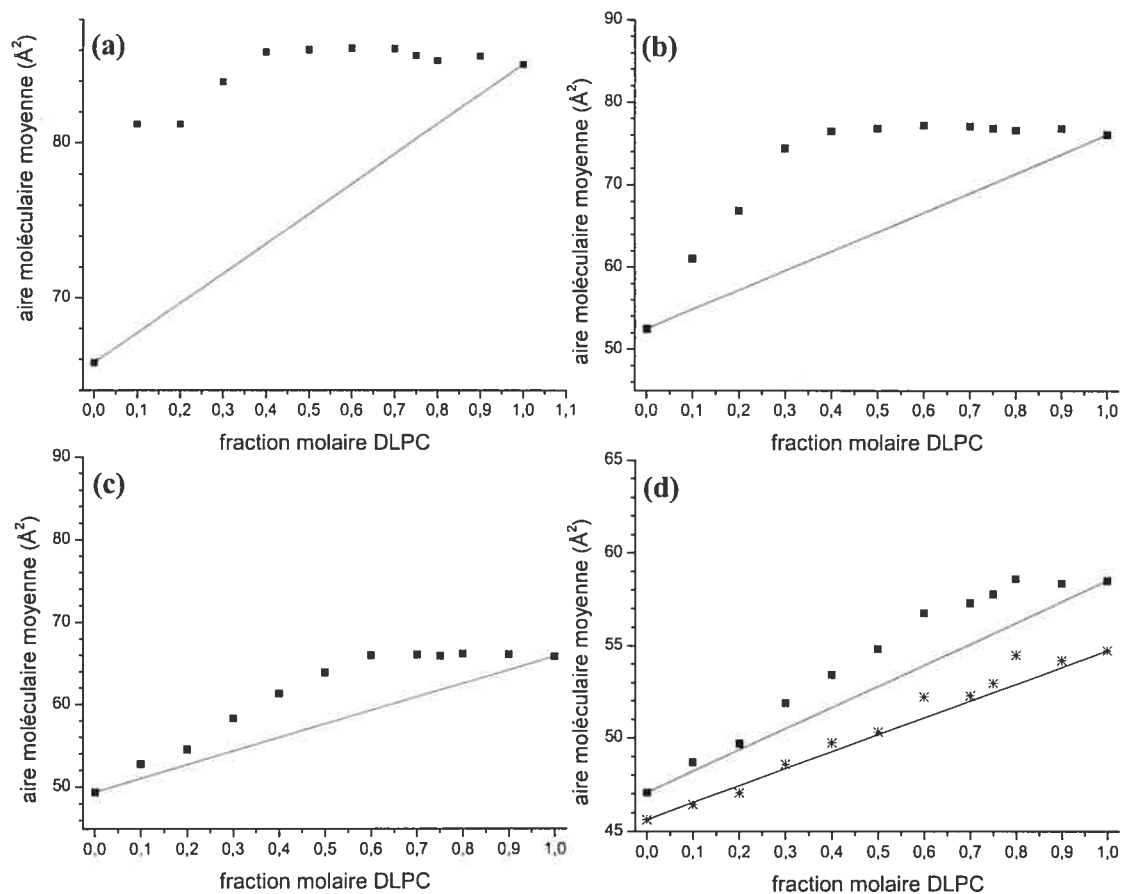


Fig. 3.4 : Graphiques des aires moléculaires moyennes de DPPC/DLPC en fonction de la fraction molaire de DLPC pour les pressions de surface (π) de : (a) 5 mN/m, (b) 10 mN/m, (c) 20 mN/m, et (d) 32 mN/m-carré; 40 mN/m- étoile. Les droites représentent les aires moléculaires (\tilde{A}) calculées à l'aide de la loi additive (éq. 2).

3.4 L'énergie libre de mélange en excès (ΔG_{ex})

La Fig. 3.5 présente les valeurs de ΔG_{ex} calculées pour les différents mélanges binaires à plusieurs valeurs de π . Les valeurs de ΔG_{ex} ont été déterminées par intégration des isothermes π - A de DPPC/DLPC de $\pi = 0$ mN/m jusqu'à la pression de surface étudiée d'après l'équation (4). À de faibles pressions (5 et 10 mN/m), les valeurs de ΔG_{ex} obtenues sont négatives ou presque nulles pour toutes les compositions de DPPC/DLPC étudiées, indiquant ainsi que la DPPC et la DLPC sont miscibles à faible pression. Les déviations positives, contrairement à un cas de mélange idéal ($\Delta G_{ex} = 0$ J/mol), observées à $\pi = 15$ -40 mN/m pointent en faveur d'un état de séparation de phase et suggèrent que la compression du film à des pressions plus hautes induit la séparation de phase latérale¹⁰⁴. Pour une composition donnée de DPPC/DLPC, l'énergie libre de mélange en excès devient de plus en plus positive au fur et à mesure que la monocouche mixte est comprimée à de plus grandes valeurs de π . En effet, les plus grandes valeurs de ΔG_{ex} obtenues sont pour les $x_{DLPC} \approx 0.3$ -0.5 à 32 et 40 mN/m. Le Tab. 3.3 résume la théorie des analyses effectuées sur les isothermes π - A et les résultats obtenus expérimentalement pour les monocouches de DPPC/DLPC.

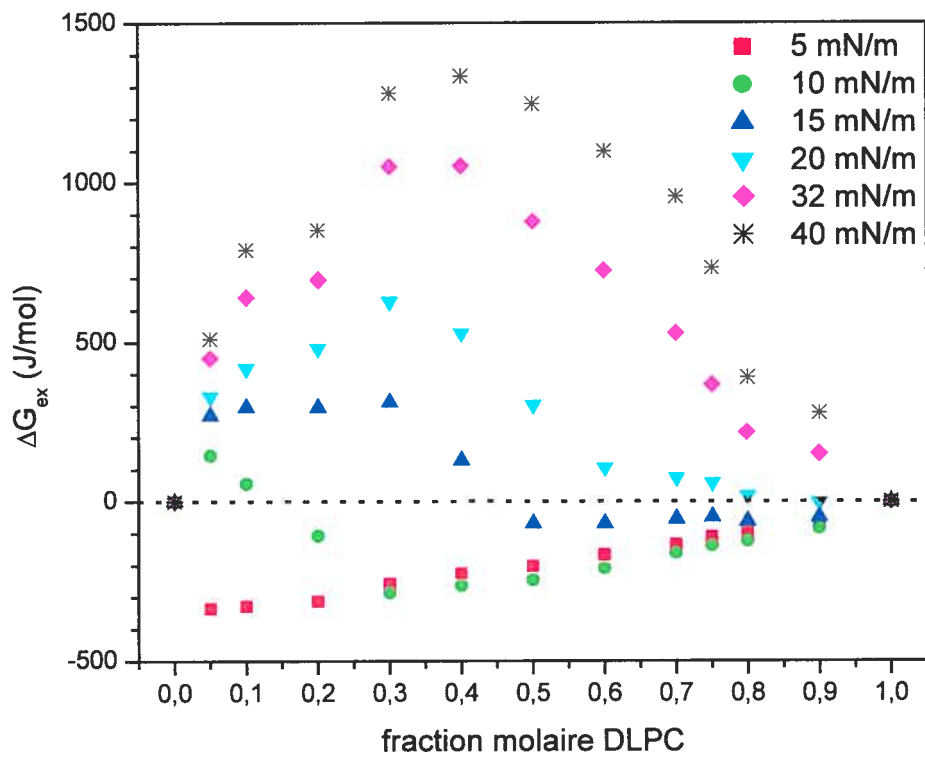


Fig. 3.5: Énergie libre de mélange en excès (ΔG_{ex}) en fonction de la fraction molaire de DLPC pour différentes valeurs de pressions de surfaces.

		Théorie	Résultats pour les monocouches de DPPC/DLPC
Loi de Crisp	Fig. 3.3	<p>Si π_c ou π_{LE-LC} varie avec x_{DLPC} : $F = 1$ et il y a miscibilité entre les 2 constituants</p> <p>Si π_c ou π_{LE-LC} demeure constante avec x_{DLPC} : $F = 0$ et les 2 constituants sont non-miscibles (séparation de phase)</p>	<p>▪ $x_{DLPC} < 0.50$ $\Rightarrow \pi_c \uparrow$ lorsque $x_{DLPC} \downarrow$ Conclusion : DPPC et DLPC sont miscibles.</p> <p>▪ $x_{DLPC} \geq 0.50$ $\Rightarrow \pi_c$ demeure cte Conclusion : DPPC et DLPC sont non-miscibles lorsque la DPPC se trouve dans la phase condensée.</p> <p>Fig. 3.3a confirme la miscibilité de DPPC et DLPC dans la phase LE</p>
Loi additive	Fig. 3.4	<p>2 cas obéissant à la loi additive :</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ mélange idéal des 2 constituants ▪ immiscibilité complète des 2 constituants <p>Toute déviation de la loi additive indique un mélange non-idéal avec miscibilité partielle</p>	<p>▪ $\pi \leq 32$ mN/m \Rightarrow déviation positive des valeurs de \tilde{A} de la loi additive Conclusion : miscibilité partielle entre DPPC et DLPC</p> <p>▪ $\pi = 40$ mN/m \Rightarrow valeurs de \tilde{A} suivent la loi additive Conclusion : Mélange idéal de DPPC et DLPC ou séparation de phase?</p>
Énergie libre de mélange en excès (ΔG_{ex})	Fig 3.5	<p>Si $\Delta G_{ex} = 0$, il s'agit d'un mélange idéal</p> <p>Si $\Delta G_{ex} < 0$, les 2 constituants sont miscibles</p> <p>Si $\Delta G_{ex} > 0$, il y a séparation de phase</p>	<p>▪ $\pi = 5$ et 10 mN/m $\Rightarrow \Delta G_{ex} < 0$ Conclusion : DPPC et DLPC sont miscibles</p> <p>▪ $\pi = 15-40$ mN/m $\Rightarrow \Delta G_{ex} > 0$ Conclusion : séparation de phase entre DPPC et DLPC</p>

Tab. 3.3 : Résumé des analyses effectuées sur les isothermes π -A pour les monocouches Langmuir mixtes de DPPC/DLPC ($T = 20$ °C).

3.5 Imagerie AFM en milieu liquide de monocouches Langmuir-Schaefer (LS) mixtes

La morphologie des monocouches Langmuir de DPPC/DLPC de différentes compositions a été étudiée par imagerie AFM en mode de contact intermittent (Tapping mode[®]) en milieu liquide des films Langmuir-Schaefer correspondants. La technique LS (dépôt horizontal) a été utilisée de façon à minimiser la déformation des structures des domaines présents à l'interface eau/air pendant le transfert sur le substrat plan^{75,100}. De façon générale, les monocouches étaient déposées sur des substrats hydrophobes à une pression de surface physiologiquement équivalente à celle d'une bicouche qui est de 32 mN/m²¹. De plus hautes et plus basses pressions de surface de déposition ont aussi été employées, afin d'étudier l'effet de la pression de surface sur la morphologie du film et la séparation de phase latérale. Puis, il s'agira aussi de confirmer et même de comparer les résultats des analyses d'isothermes π - A avec les résultats obtenus par AFM.

3.6 Comparaison des substrats hydrophobes de DPPE/mica et C₁₄S/Au/mica pour la déposition de monocouches Langmuir mixtes de DPPC/DLPC

Cette étude a commencé en comparant une monocouche de phospholipides à l'état SC^{46,56,83,96} et une monocouche chimisorbée d'alcanethiols¹⁰⁷⁻¹⁰⁹ qui serviraient de substrat hydrophobe plan pour réaliser la déposition par la technique LS d'une monocouche mixte de DPPC/DLPC. Pour le premier système, le phospholipide choisi est la DPPE qui a montré une aire moléculaire de 39 Å² à $\pi = 40$ mN/m⁴⁶, comparativement à la DPPC qui est de 46 Å² à la même pression. Même si les deux phospholipides peuvent accéder à l'état SC, il n'en demeure pas moins que la DPPE à cette pression présente la possibilité d'avoir une monocouche plus compacte (la tête polaire d'une phosphatidyléthanolamine (PE) est plus petite que celle d'une phosphatidylcholine (PC)) et par conséquent avec moins de défauts (trous)⁹⁵. Alors, la monocouche de DPPE est déposée par la technique LB (dépôt vertical) où les têtes polaires sont orientées face à la surface hydrophile de mica et les chaînes alkyles ressortant de la surface. Pour le deuxième système, la monocouche auto-assemblée d'alcanethiols est formée par incubation de la surface d'or dans une solution de 1-tétradécane-thiol 1 mM. Dans les deux cas, les molécules de phospholipides de la monocouche mixte déposée par la technique LS forment une deuxième couche. La préparation et l'imagerie de ces systèmes s'effectue en milieu liquide. Par conséquent, les têtes polaires des phospholipides de cette deuxième couche sont exposées à l'eau et les chaînes alkyles font face à la surface hydrophobe localisée en-dessous. Cette surface est formée par les chaînes alkyles soit de la monocouche auto-assemblée de thiols ou des molécules de DPPE. Les deux systèmes sont représentés à la **Fig. 3.6** dont le résultat est des bicouches hybrides asymétriques de phospholipides.

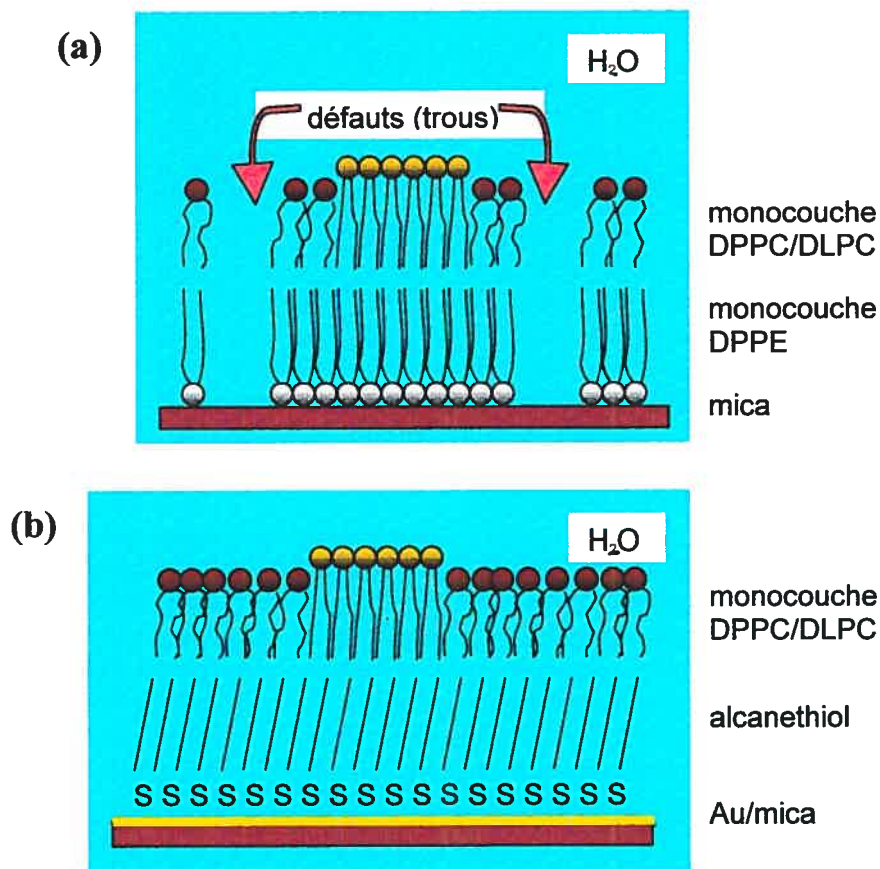


Fig. 3.6 : Schéma des deux systèmes étudiés: **(a)** la monocouche mixte de DPPC/DLPC sur le mica recouvert d'une monocouche de DPPE en milieu liquide avec les défauts (trous) se formant lors du transfert de DPPC/DLPC dû à la désorption des molécules de DPPE; **(b)** la monocouche mixte de DPPC/DLPC sur la surface d'or modifiée par le 1-tétradécane-thiol en milieu liquide.

Maintenant, ces deux systèmes observés par AFM sont présentés dans la prochaine figure. Cette dernière montre des images AFM (en topographie) des monocouches de composition 0.50:0.50 (mol/mol) de DPPC/DLPC transférées sur le substrat de DPPE/mica (**Fig. 3.7a**) et sur celui de C₁₄S/Au (**Fig. 3.7b**) à une pression de surface de 32 mN/m. Ces images sont une vue de haut du système étudié, c'est-à-dire que les domaines jaunâtres sont plus hauts et la matrice de fond brune est plus profonde. Dans le cas de la **Fig. 3.7a**, les points plus foncés

observés sont plus profonds que la matrice de fond. Donc, ce système possède trois niveaux d hauteur. L'échelle de hauteur (position en z) est présentée à la gauche de chaque image.

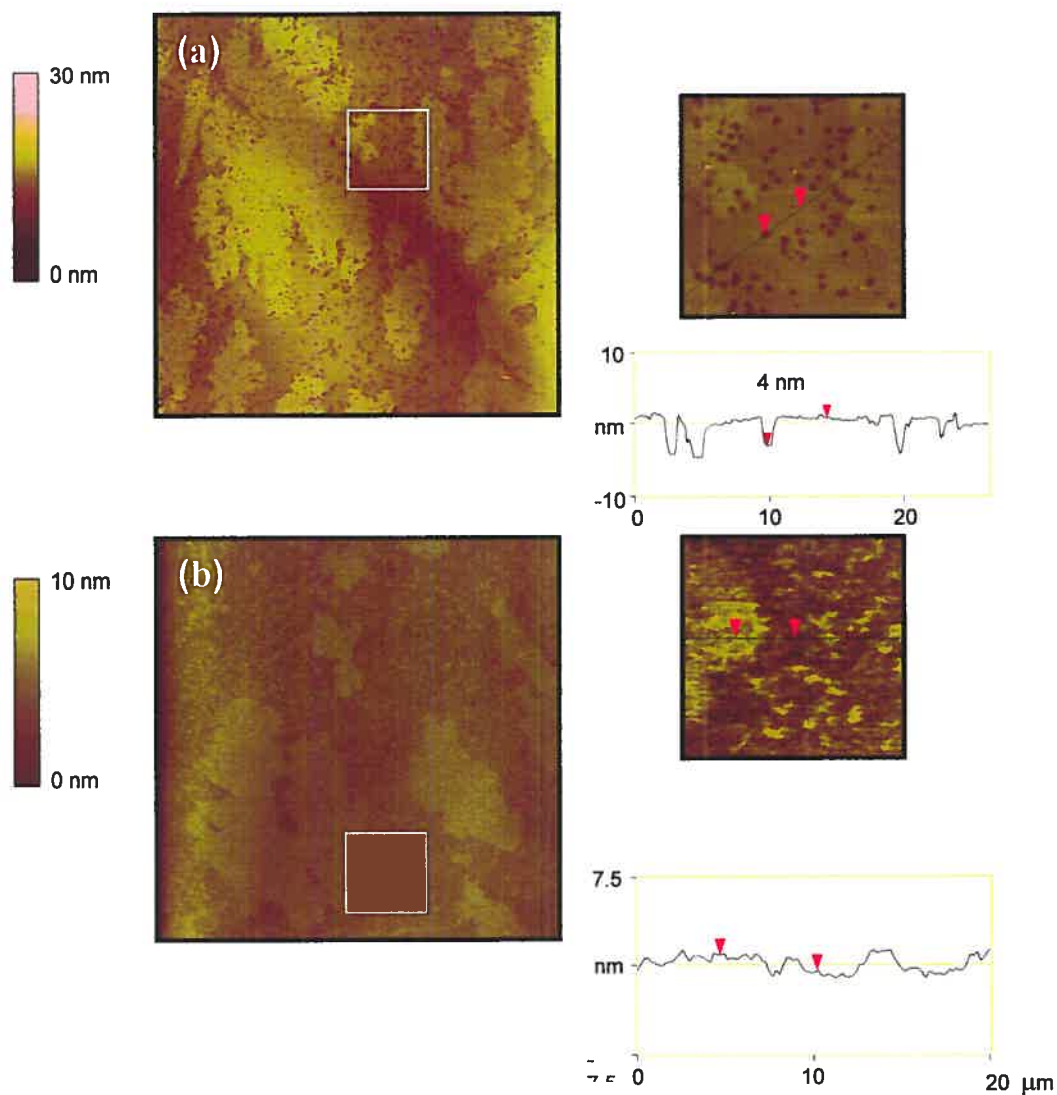


Fig. 3.7 : **Gauche:** Images AFM (topographie) prises en mode contact intermittent (Tapping mode[®]) en milieu liquide. Monocouches de DPPC/DLPC (0.50 : 0.50) déposées à 32 mN/m sur (a) le substrat de DPPE/mica et (b) la surface de C₁₄S/Au. Dimensions des images = 100 μm x 100 μm. T = 20 °C.

Droite: Agrandissement (20 μm x 20 μm) de la région délimitée par le carré blanc et l'analyse en coupe transversale correspondante. L'analyse en coupe transversale démontre en (a) que les trous ont ~ 4 nm de profondeur comparativement à la matrice de fond.

Tandis que les deux surfaces présentent des domaines plus épais en motif de fleurs et d'autres de formes plus irrégulières, la monocouche mixte transférée sur le substrat de DPPE/mica possède un nombre significatif de défauts (trous) qui ont une profondeur équivalente à l'épaisseur d'une bicouche. Plus précisément, les épaisseurs de bicouches rapportées pour les phospholipides en phase lamellaire à 25 °C sont de: 3,0 nm (DLPC), 4,7 nm (DPPC) et 5,4 nm (DPPE)^{11,95}. Les épaisseurs prévues pour les bicouches hybrides de DPPC/DPPE et de DLPC/DPPE sont donc de 5,1 nm et de 4,2 nm, respectivement. Les défauts observés sur les domaines plus hauts (jaunes) font 4.9 ± 0.5 nm de profondeur et ceux trouvés dans la matrice de fond sont de 3.6 ± 0.4 nm. Des défauts semblables dans des bicouches de phospholipides sur substrat plan préparées par la technique de Langmuir-Blodgett ont été rapportés^{48,110,111}. Ils sont attribués à la désorption de phospholipides du mica pendant le transfert de la deuxième monocouche¹¹⁰. En revanche, il n'y a aucun défaut présent dans la monocouche déposée sur la surface de C₁₄S/Au, puisque la monocouche de 1-tétradecanethiol est chimisorbée à l'or. La matrice de fond de la bicouche de DPPC/DLPC/DPPE (**Fig. 3.7a**), qui est la région entourant les domaines plus épais, ne possède pas de petits domaines (seulement des défauts). Dans la bicouche hybride de DPPC/DLPC/C₁₄S/Au (**Fig. 3.7b**) de nombreux petits domaines sont présents parmi les plus grands domaines.

En outre, une monocouche auto-assemblée d'alcanethiol chimisorbée a été employée comme substrat plan hydrophobe, au lieu d'une monocouche de phospholipides à l'état SC^{46,56}, afin d'éviter la formation de défauts, de prévenir

l'échange des phospholipides entre la première (DPPE) et la deuxième (DPPC/DLPC) monocouche et de permettre la formation de ces petits domaines. Les monocouches Langmuir sont donc déposées sur une surface de C₁₄S/Au pour le reste de l'étude de séparation de phase latérale.

3.7 Caractérisation des substrats plans hydrophobes de C₁₄S/Au/mica

Afin de s'assurer que les surfaces d'or étaient réellement modifiées avec le 1-tétradécane-thiol, la technique d'ellipsométrie a permis de déterminer l'épaisseur de la monocouche auto-assemblée qui est de 1.6 ± 0.1 nm. Cette valeur est concordante avec celles retrouvées dans la littérature^{98,99}. De plus, nous avons pris le spectre PM-IRRAS (Fig. 3.8) de cette surface pour vérifier la région des elongations CH qui possède une signature spectrale caractéristique et qui permet aussi de connaître de l'information importante sur la conformation et l'orientation des monocouches auto-assemblées d'alcanethiols. Donc, cette technique confirme aussi la présence de l'alcanethiol sur la surface étudiée. Ses pics caractéristiques pour le lien CH₃, ν_a (ip : *in-plane* : dans le plan) = 2964 cm^{-1} et ν_s (FR : *Fermi resonance* : résonance de Fermi) = 2877 cm^{-1} et pour les liens CH₂, ν_a = 2920 cm^{-1} et ν_s = 2851 cm^{-1} sont observés, en accord avec la littérature. Seuls les pics aux nombres d'onde correspondant aux liens CH₂ antisymétriques et symétriques sont caractéristiques d'une monocouche auto-assemblée dans un état ordonné¹¹².

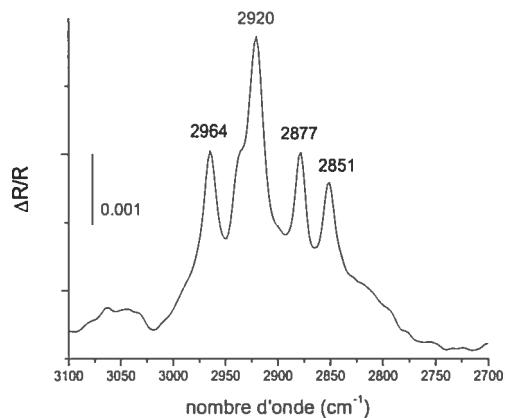


Fig. 3.8 : Spectre PM-IRRAS montrant la région des élongations C-H du 1-tétradécanethiol adsorbé sur la surface d'or.

Pour évaluer l'hydrophobicité de la surface des mesures d'angle de contact statique (**Fig. 3.9**) ont été obtenues pour une surface $C_{14}S/Au$. L'angle trouvé est de $106 \pm 5^\circ$ qui est indicatif d'une surface hydrophobe.

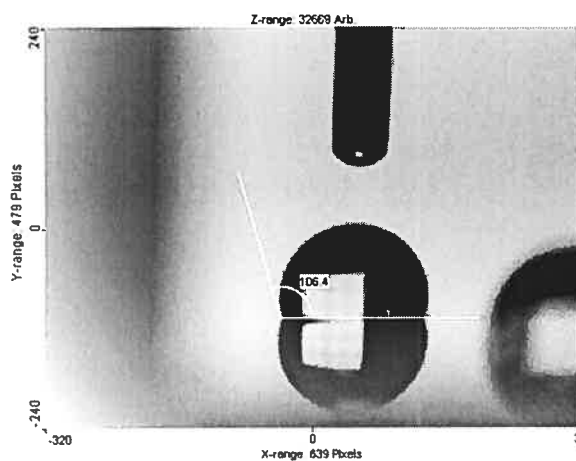


Fig. 3.9: Photo d'une goutte d'eau pure sur une surface de 1-tétradécanethiol chimisorbé sur l'or.

3.8 Imagerie AFM en phase de monocouches Langmuir-Schaefer (LS) mixtes

Une deuxième image AFM en topographie d'une monocouche (50 : 50) de DPPC/DLPC transférée à 32 mN/m sur le substrat de $C_{14}S/Au$ est montrée à la **Fig. 3.10a** et l'image en phase correspondante à la **Fig. 3.10b**. Des domaines plus hauts ressemblant à des fleurs jaunâtres sont observés. De nouveau, plusieurs petits domaines sont clairement visibles dans l'arrière plan de la matrice (**Fig. 3.10a**). L'image en phase (**Fig. 3.10b**) indique que les domaines jaunâtres plus épais montrent un déphasage plus positif contrairement à la matrice environnante. En effet, l'imagerie AFM en phase est une extension du mode de contact intermittent qui implique de suivre le retard de la phase de l'oscillation du cantilevier qui est relatif au signal le portant à osciller. Donc, l'imagerie en phase est particulièrement utile pour différencier les phases constituant des matériaux composites qui ne sont pas évidentes dans l'imagerie en topographie ¹¹³.

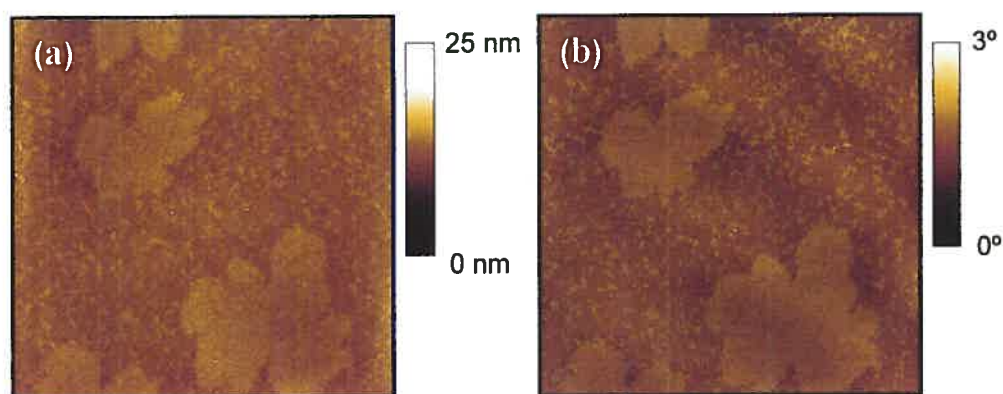


Fig. 3.10: Images AFM d'une monocouche de DPPC/DLPC (0.50 : 0.50) déposée sur une surface de $C_{14}S/Au$ à 32 mN/m : **(a)** topographie et **(b)** phase. Dimensions des images = 100 μm x 100 μm .

En raison de la rugosité RMS (*Root Mean Square* : racine des moindres carrées) de ~ 2.1 nm de la surface d'or (**Fig. 3.11a, c**), un meilleur contraste a été obtenu pour les images AFM en phase comparé à celles en topographie. Pour cette raison, seulement des images en phase sont présentées pour ces monocouches mixtes pour le reste de l'étude. Par comparaison, les monocouches de la DPPC pure et la DLPC pure déposées sur la surface de $C_{14}S/Au$ à 32 mN/m ne montrent pas de structures de domaines de phospholipides (**Fig. 3.11**). Les images topographiques et en phase d'une surface d'or avec ou sans l'alcanethiol chimisorbé ressemblent à celles ci-dessous avec la DPPC et la DLPC.

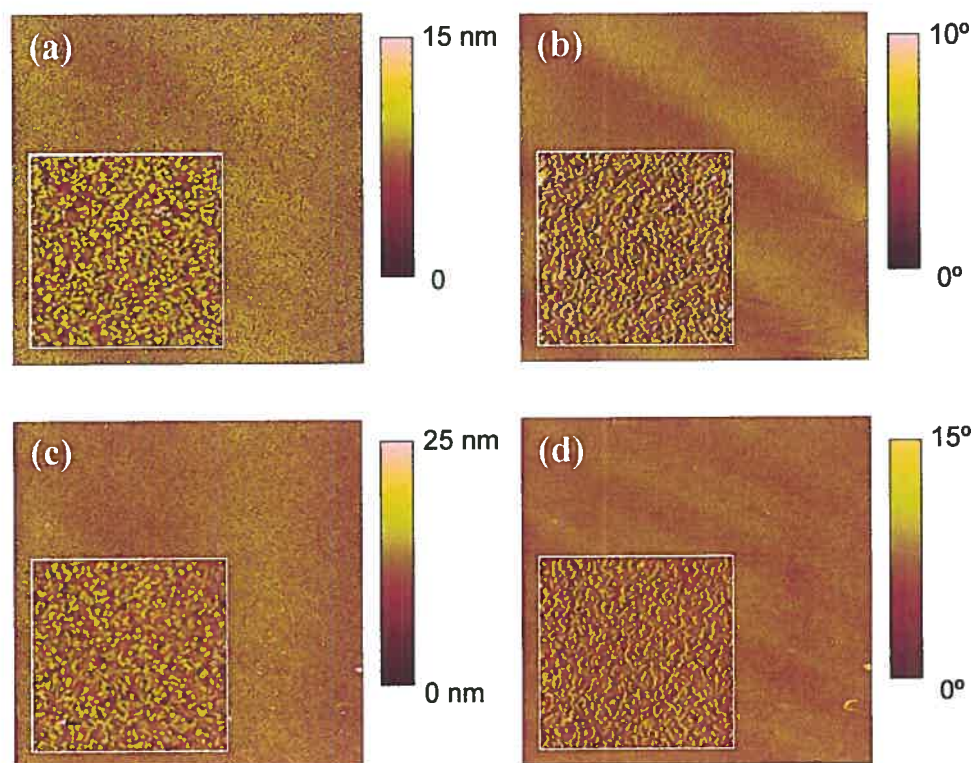


Fig. 3.11: Images AFM d'une monocouche de DLPC (**a**, topographie et **b**, phase) et DPPC (**c**, topographie et **d**, phase) sur une surface de $C_{14}S/Au$ à 32 mN/m. Dimensions des images = $25 \mu m \times 25 \mu m$. Agrandissement d'une zone de la surface de $5 \mu m \times 5 \mu m$ pour les images de a à d.

3.9 Effet de la variation de composition sur les monocouches de DPPC/DLPC déposées à $\pi = 32\text{mN/m}$

Après avoir établie les dernières conditions expérimentales discutées ci-haut, c'est-à-dire le choix d'une surface de $\text{C}_{14}\text{S}/\text{Au}$ comme substrat hydrophobe et de l'imagerie AFM en phase pour un meilleur contraste dans les images à présenter, l'imagerie AFM a été utilisée pour sonder les détails de structure des phases des monocouches de DPPC/DLPC et mettre les résultats de l'analyse des isothermes Langmuir en contexte. La morphologie des phases observées à une pression de surface de déposition de 32 mN/m sera premièrement discutée et comparée avec la structure des domaines observés dans les *bicouches* de vésicules et d'autres monocouches contenant aussi la DPPC trouvées dans la littérature. L'effet de la pression de surface sur la morphologie de monocouches mixtes sera ensuite considéré.

La **Fig. 3.12** montre des images AFM de monocouches de différentes compositions de DPPC/DLPC. Le début de la séparation de phase est observé à une $x_{\text{DPPC}} = 0.25$ et se manifeste par des domaines plus épais de déphasage plus important entourés d'une matrice de moindre déphasage. La grosseur des domaines augmente de plusieurs microns à $x_{\text{DPPC}} = 0.25$ jusqu'à $\sim 60\ \mu\text{m}$ à $x_{\text{DPPC}} = 0.70$, bien qu'une distribution des tailles des domaines ait été généralement observée pour chaque monocouche (ex., **Fig. 3.12b**). La forme des domaines varie aussi avec la composition : des domaines de formes irrégulières sont observés à $x_{\text{DPPC}} = 0.25$, des domaines en forme de fleurs existent à $x_{\text{DPPC}} = 0.375$ -

0.625, et des domaines en forme de serpentins sont présents à $x_{\text{DPPC}} = 0.70$. Un grand nombre de petites îles sont clairement visibles parmi les grands domaines de DPPC pour des fractions molaires de 0.375 à 0.80 (**Fig. 3.12b-e**). À $x_{\text{DPPC}} = 0.80$ (**Fig. 3.12e**), les domaines coalescent lorsque mis en contact et forment de plus gros domaines. Finalement, la monocouche est majoritairement dans une seule phase à $x_{\text{DPPC}} = 0.90$ (**Fig. 3.12f**), malgré qu'il existe encore des régions d'une seconde phase parmi la phase continue. Donc, pour une $x_{\text{DPPC}} < 0.25$ et > 0.90 , il n'y a pas de séparation de phase dans la monocouche mixte. La taille et la forme des domaines n'ont pas changé sur une période de quelques jours dans l'eau à température de la pièce.

De façon générale, ces monocouches transférées à 32 mN/m de différentes compositions de DPPC/DLPC (**Fig. 3.12**) démontrent une séparation latérale importante en domaines condensés riches en DPPC et une matrice liquide riche en DLPC. Des suspensions aqueuses multilamellaires^{3,9,40} et des vésicules géantes unilamellaires (*GUV: giant unilamellar vesicle*)^{14,20} formées de mélanges binaires de ces deux phospholipides démontrent une région de coexistence de phases solide/fluide entre $x_{\text{DPPC}} \sim 0.25-0.35$ et $x_{\text{DPPC}} \sim 0.80-0.85$ à une température de 20-25°C. Les images AFM présentées pour les monocouches mixtes de DPPC/DLPC de la **Fig. 3.12** confirment ce comportement de phase.

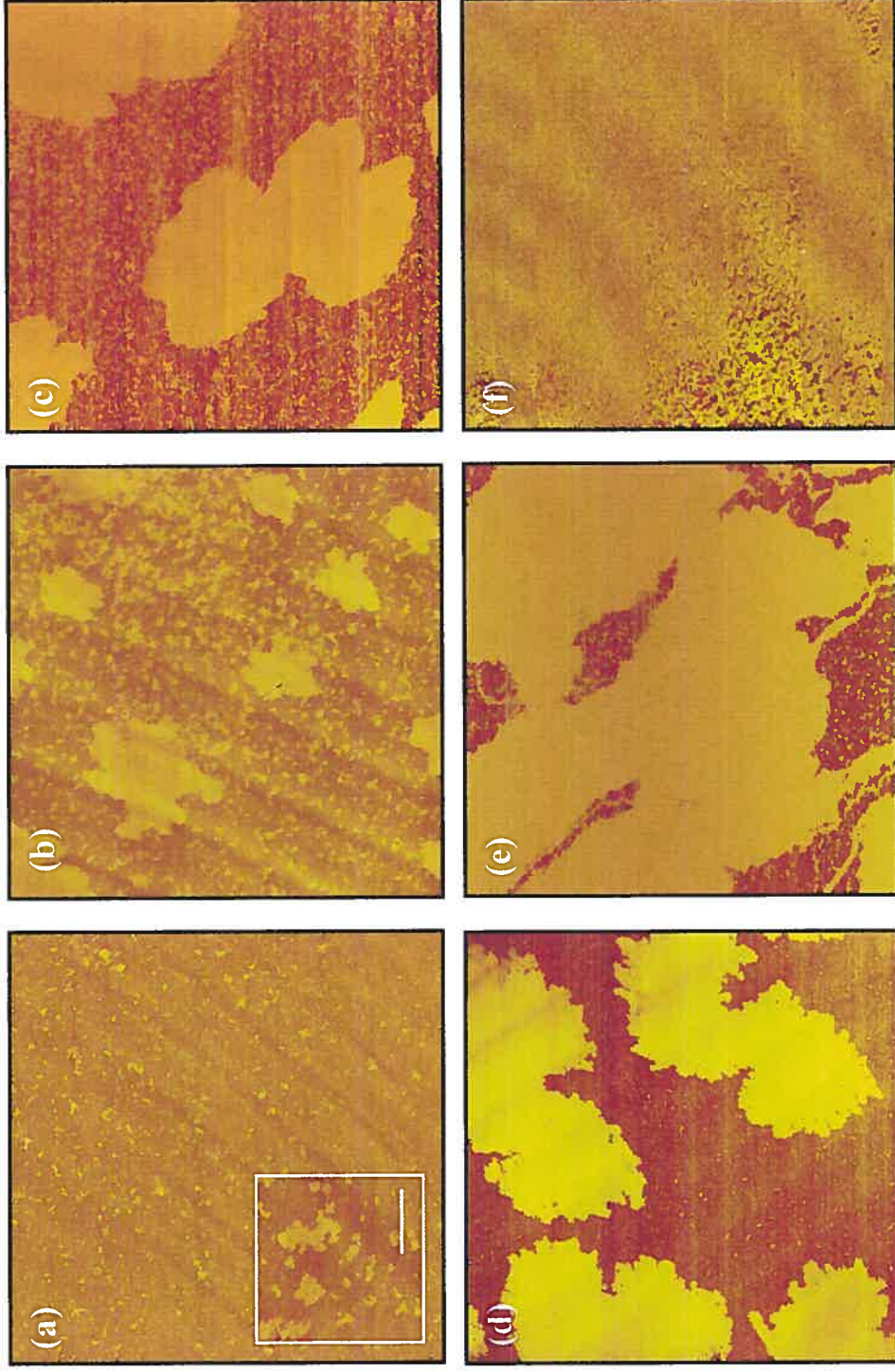


Fig. 3.12: Images AFM en mode contact intermittent (Tapping mode[®]) en milieu liquide en phase pour des monocouches de DPPC/DLPC déposées sur une surface de C₁₄S/Au à $\pi = 32$ mN/m. Fraction molaire de DPPC : (a) 0.25, (b) 0.375, (c) 0.625, (d) 0.70, (e) 0.80, et (f) 0.90. Dimensions des images = 100 μm x 100 μm. Agrandissement d'une zone de la surface de 5 μm x 5 μm pour l'image (a).

3.9.1 *La composition des domaines*

Comme il a été dit au début, à une pression de surface de 32 mN/m la DPPC existe dans une phase SC^{81,94} et la DLPC dans une phase LE (**Fig. 3.1**). Maintenant, les résultats de la **Fig. 3.12** corroborent avec les résultats dans la littérature pour ce qui est des suspensions aqueuses multilamellaires et des GUVs. De plus, l'imagerie AFM en phase permet aussi d'affirmer que les domaines plus épais et de déphasage plus positif, observés à une pression de surface de déposition de 32 mN/m, sont assignés à une phase condensée riche en DPPC et la matrice environnante à une phase LE riche en DLPC (**Fig. 3.10 et 3.12**). Mais, ces attributions se basent surtout sur d'autres faits plus convaincants. Premièrement, la différence de hauteur attendue entre les domaines en phase solide de DPPC et fluide de DLPC dans ces monocouches est de 0.85 nm en se basant sur la moitié des valeurs d'épaisseur mesurées par diffraction de rayons-X pour les bicouches de DPPC et de DLPC en phase lamellaire à 25 °C¹¹. Malheureusement, dans notre cas, la rugosité RMS de 2,1 nm du substrat de C₁₄S/Au exclue toute mesure précise de la différence de hauteur entre les deux phases de DPPC et DLPC. Une différence de hauteur de 0.8 ± 0.1 nm a été obtenue pour une monocouche de DPPC/DLPC déposée directement sur le mica (surface plane à l'échelle atomique) par la technique LB et imagée à l'air⁷⁶. Cette valeur se rapproche de la valeur théorique de 0.85 nm. Deuxièmement, la **Fig. 3.13a** montre que la fraction d'aire occupée par les domaines solides plus épais augmente linéairement avec l'augmentation de la fraction molaire de DPPC (pour $x_{\text{DPPC}} = 0.25-0.80$), comme

prévu si ces domaines étaient composés de DPPC. Il y a, en effet, une corrélation 1 :1 entre la fraction d'aire couverte par la phase solide dans les images AFM et la fraction d'aire de la DPPC dans la monocouche mixte calculée utilisant les aires moléculaires de 47.1 \AA^2 pour la DPPC pure et 58.5 \AA^2 pour la DLPC à 32 mN/m . À partir du graphique de l'aire occupée par la phase LE en fonction de la fraction molaire de la DPPC (Fig. 3.13b), une valeur de $99 \pm 4 \%$ a été obtenue pour le contenu de la phase solide en DPPC.

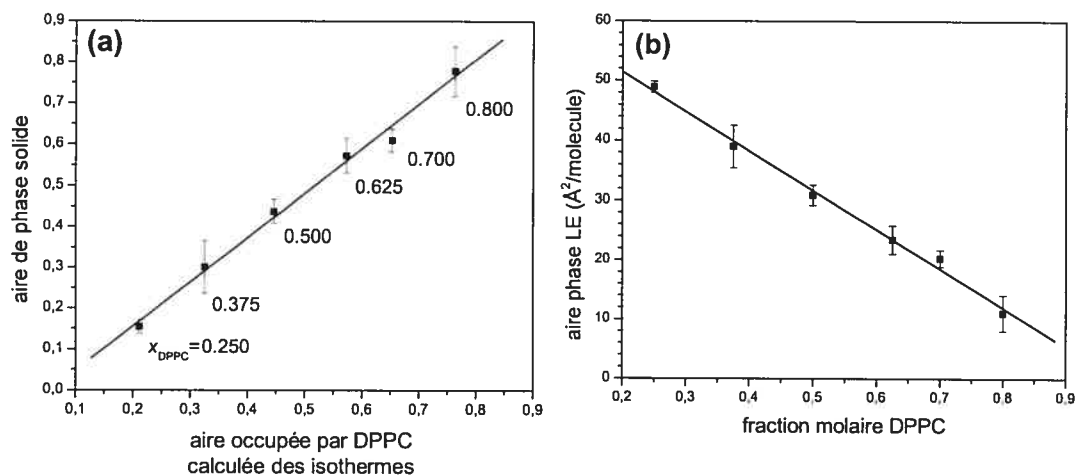


Fig. 3.13 : (a) Graphique de la fraction d'aire des domaines solides observés par AFM dans les monocouches LS en fonction de la fraction d'aire occupée par la DPPC dans les monocouches Langmuir correspondantes (calculée en utilisant les aires moléculaires de DPPC et DLPC et leurs fractions molaires dans les monocouches mixtes) à $\pi = 32 \text{ mN/m}$. (b) Graphique de l'aire occupée par la phase LE en fonction de la fraction molaire de DPPC dans les monocouches de DPPC/DLPC à $\pi = 32 \text{ mN/m}$ (éq. 8). L'aire occupée par la phase LE pour chaque composition a été calculée à partir du produit de $(1-\varphi_c)$ et de l'aire moléculaire moyenne de la monocouche mixte (\bar{A}) obtenue à partir des isothermes π -A. La fraction d'aire occupée par la phase plus épaisse dans les images AFM a été employée pour φ_c . Les barres d'erreur représentent des écarts type. Les lignes représentent l'ajustement des moindres carrés linéaire aux données. (a) pente = 1,08, coefficient de corrélation $r = 0,996$; (b) coefficient de corrélation $r = 0,998$.

3.9.2 Miscibilité de la DPPC et la DLPC dans d'autres systèmes

Il est important de motiver que les domaines sont majoritairement formés de DPPC, mais il faut aussi tenir compte de la miscibilité entre la DPPC et la DLPC, car elle existe dans le système étudié. Précédemment, il a été constaté que la déviation positive des aires moléculaires calculées utilisant la loi additive (Fig. 3.4d) suggère qu'il y a miscibilité partielle entre la DPPC et la DLPC dans les monocouches ségréguées à 32 mN/m. De plus, le diagramme de phase des vésicules multilamellaires de DPPC/DLPC provenant d'une étude calorimétrique⁹ et en spectroscopie infrarouge³ montre que la température de transition de phase (T_m) de la DLPC demeure essentiellement constante jusqu'à $x_{DPPC} \approx 0.60$, tandis que pour la DPPC, elle varie avec la composition. Ceci indique que dans sa phase gel, la DPPC est seulement peu soluble dans la DLPC, tandis que la DLPC est significativement plus soluble avec la DPPC. La même conclusion a été obtenue par Mabrey et Sturtevant⁸ pour le système binaire de DLPC/distéaroylphosphatidylcholine (DSPC, chaîne de 18 carbones). Des mesures de fluorescence avec des vésicules multilamellaires⁴⁰ et des études de microscopie de fluorescence à deux photons de GUVs^{12,13} ont aussi montré que les domaines solide et fluide observés dans les mélanges DPPC/DLPC ne possèdent pas de caractéristiques de phase pure, c'est-à-dire gel et liquide-cristallin. La différence dans les propriétés de fluorescence entre les domaines solide et fluide coexistant dans les vésicules de DPPC/DLPC et la phase correspondante dans les vésicules à un seul constituant a été attribuée à la légère présence de la DLPC dans la phase solide des domaines de DPPC et à la présence

possible de la DPPC dans la phase fluide de la DLPC^{12,13,40}. Dans le cas présent des monocouches mixtes étudiées, la présence de molécules de DLPC dans la phase de DPPC serait propice à induire du désordre, résultant dans un état plus étendu. Pourtant, l'état SC de la DPPC pure est constaté. La quantité de DLPC présente dans les domaines de DPPC condensés est petite à 32 mN/m, sachant que l'étendue de l'expansion du film se situe de 1-5 % (cf. mélanges idéaux de DPPC/DLPC) et que l'aire totale des domaines plus épais (pour $x_{\text{DPPC}} = 0.25-0.80$) est comparable aux valeurs attendues si les domaines étaient de la DPPC pure (**Fig. 3.13a**). En effet, le contenu des domaines plus épais de DPPC a été estimé à 99 %.

3.9.3 L'effet de la vitesse de compression des barrières sur la taille et forme des domaines

Les monocouches de DPPC/DLPC (0.50/0.50) ont été comprimées jusqu'à une pression de surface de 32 mN/m à différentes vitesses allant de 0.5 à 2.5 Å² molécule⁻¹ min⁻¹. La forme et la taille moyenne des domaines de DPPC sont essentiellement les mêmes pour toutes les vitesses de compression (**Fig. 3.10** et **3.14**). Cependant, les contours des domaines apparaissent plus arrondis et lisses à une vitesse de compression plus élevée et des contours plus dentelés résultent d'une plus petite vitesse de compression, contrairement au comportement reporté pour une monocouche de phospholipides à un seul constituant à la région de coexistence de phases LE/LC^{114,115}. De petits agrégats sont observés entre les domaines plus grands à toutes les vitesses de compression étudiées.

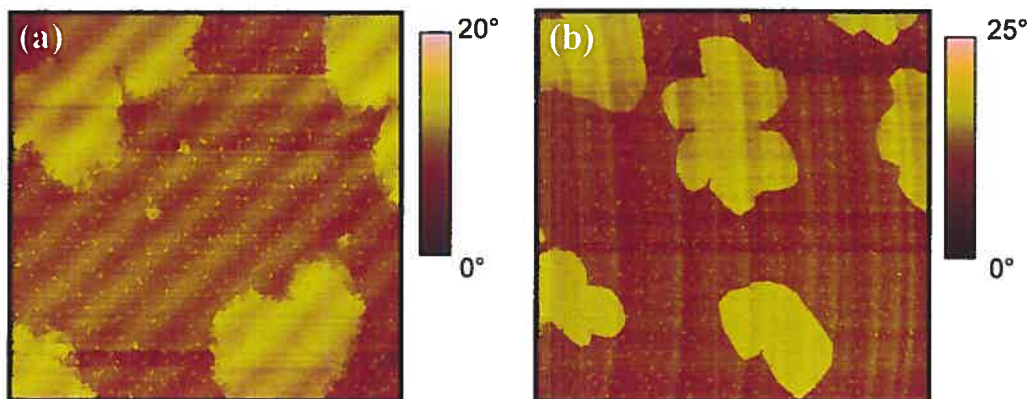


Fig. 3.14: Images AFM en phase de monocouches de DPPC/DLPC (0.50/0.50) sur un substrat de $C_{14}S/Au$ après 30 min à $\pi = 32$ mN/m où la vitesse de compression (normalement de $1 \text{ \AA}^2 \text{ molécule}^{-1} \text{ min}^{-1}$) a été variée: **(a)** $0.5 \text{ \AA}^2 \text{ molécule}^{-1} \text{ min}^{-1}$ et **(b)** $2.5 \text{ \AA}^2 \text{ molécule}^{-1} \text{ min}^{-1}$. Dimensions des images = $100 \text{ \mu m} \times 100 \text{ \mu m}$.

3.10 L'effet de la pression de surface sur la formation des domaines

Pour cette partie de l'étude, le mélange 0.50/0.50 de DPPC/DLPC a été utilisé pour la formation de monocouches LS à différentes valeurs de π . À la Fig. 3.15a, à une faible pression de 10 mN/m, il y a un grand nombre de petits domaines qui sont de la taille de quelques microns. Ces domaines plus épais de déphasage plus positif couvrent 16 ± 3 % de l'aire de surface totale, qui est significativement inférieure à la valeur théorique prévue (41%) si toutes les molécules de DPPC se trouvaient dans ces domaines. Cette valeur théorique est en fait la fraction de l'aire de surface occupée par la DPPC calculée à l'aide de l'équation (3). Ceci signifie qu'à une π de 10 mN/m, quelques unes des molécules de DPPC sont présentes dans la phase de déphasage moins important, riche en DLPC. Il faut spécifier, en se référant à la Fig. 3.4, que pour les monocouches de

DPPC/DLPC à des $\pi \leq 32$ mN/m l'aire moléculaire moyenne est plus grande que celle calculée avec l'équation (2) utilisant l'aire par molécule de la DPPC pure et la DLPC pure à la valeur de π désirée. Par conséquent, une comparaison de l'aire de surface totale (AFM) occupée par les domaines de DPPC dans les films LS avec la valeur calculée est approximative. Plus particulièrement, à $\pi \leq 20$ mN/m où la déviation de la loi additive est plus significative. Maintenant, à 15 mN/m (**Fig. 3.15b**), à proximité de la transition LE à LC (15.7 mN/m) pour une monocouche 0.50/0.50 de DPPC/DLPC, des domaines plus grands (~ 10 μm de taille) sont dispersés parmi une grande population de domaines de taille plus petites (l'agrandissement de la **Fig. 3.15b**,). L'aire de surface totale couverte par les domaines qui est de 30 ± 5 % est supérieure à l'aire occupée par ces derniers à 10 mN/m. Cependant, elle est tout de même inférieure à l'aire théorique prévue (42 %) se basant sur le ratio aire/molécule de la DPPC à 15 mN/m. À une π de 20 mN/m (**Fig. 3.15c**), des domaines multi-lobés et en forme d'haricot ¹¹⁶ d'une grosseur variant de 25-60 μm sont observés. L'aire de surface totale occupée par ces domaines est de 43 ± 2 %, qui correspond au pourcentage de fraction d'aire prévue (43%) si toute la DPPC faisait partie de la phase condensée. Une transition semblable entre les domaines sous-microscopiques à 10 mN/m et les domaines plus larges multi-lobés à 15 mN/m a été observée pour le mélange 0.70/0.30 de DPPC/DLPC ($\pi_{\text{LE-LC}} = 10.06$ mN/m) à la **Fig. 3.16**. Comme déjà mentionné plus haut, les domaines en forme de fleurs d'une grosseur de 25-50 μm existent à 32 mN/m (**Fig. 3.15d**) pour le mélange 0.50/0.50 DPPC/DLPC. Une compression du film jusqu'à 40 mN/m produit des structures dendritiques possédant un centre

presque circulaire (**Fig. 3.15e**). L'aire de surface totale occupée par ces domaines est de 42 ± 4 %, valeur se rapprochant de la valeur estimée de 46 %. L'effet de compression du film jusqu'à 40 mN/m sur la forme des domaines riches en DPPC pour les mélanges binaires de 0.375 et 0.625 de fraction molaire de DPPC a aussi été étudié (**Fig. 3.17**). Les domaines de la monocouche contenant une fraction molaire de 0.375 de DPPC ont adopté une forme plus dendritique (**Fig. 3.12b** vs. **Fig. 3.17a**). Par contraste, en comprimant la monocouche de fraction molaire 0.625 de DPPC à 40 mN/m cela mène à la disparition des domaines en forme de fleurs (**Fig. 3.12c**), mais à l'apparition d'îles nanoscopiques comprimées de façon dense (**Fig. 3.17b**).

Figure 3.15	π (mN/m)	% aire occupée par la DPPC dans les images AFM	% aire occupée par la DPPC calculée des isothermes Langmuir
a	10	16 ± 3	41
b	15	30 ± 5	42
c	20	43 ± 2	43
d	32	44 ± 3	45
e	40	42 ± 4	46

Tab. 3.4 : Pour le mélange 0.50/0.50 de DPPC/DLPC, les pourcentages d'aire occupée par les domaines de DPPC observés par AFM dans les monocouches LS et les pourcentages d'aire occupée par la DPPC dans les monocouches Langmuir correspondantes (calculées en utilisant les aires moléculaires de DPPC et DLPC et leurs fractions molaires dans les monocouches mixtes) pour ces différentes valeurs de π .

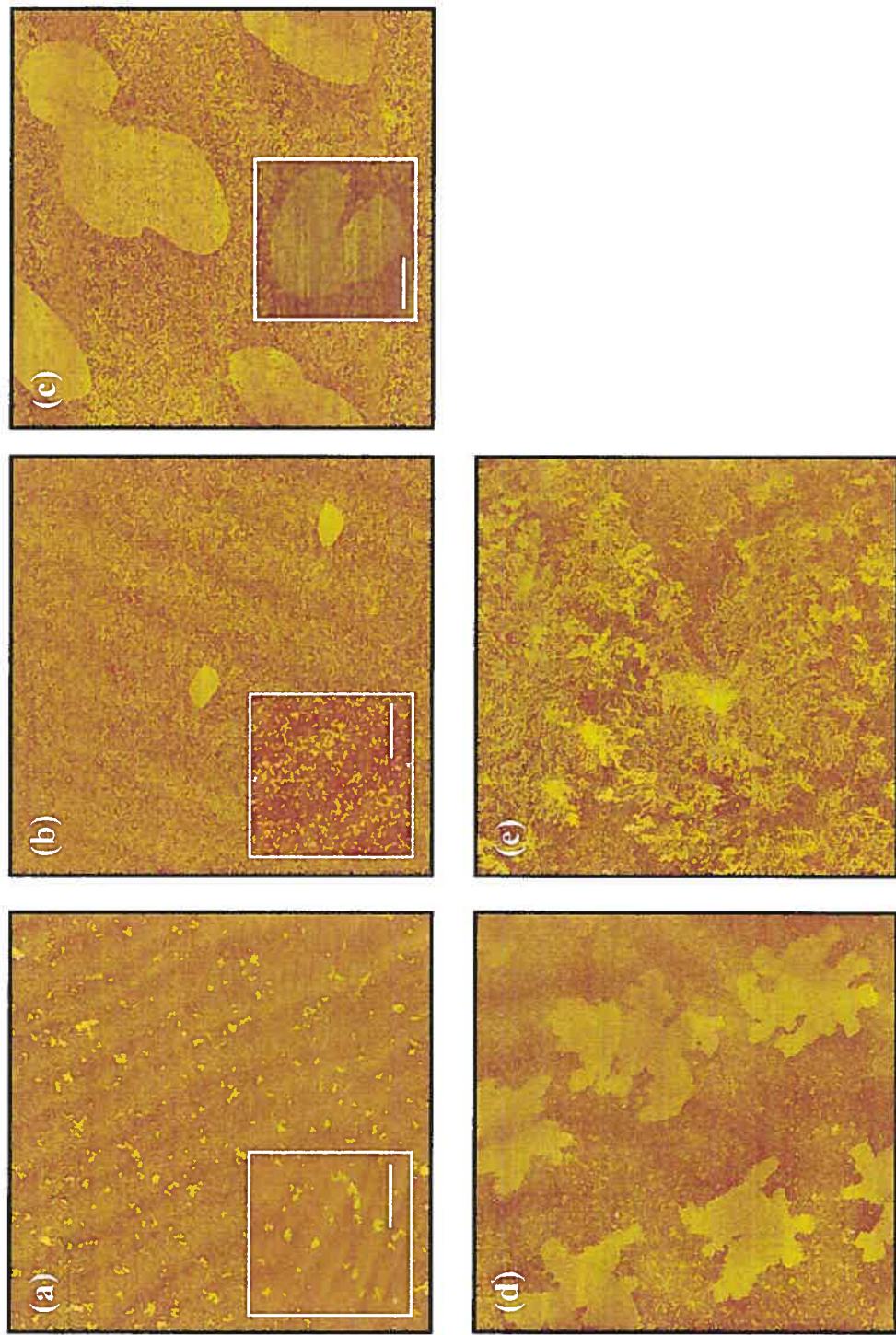


Fig. 3.15: Images AFM en phase pour des monocouches de DPPC/DLPC (0.50/0.50) déposées sur un substrat de C₁₄S/Au à une pression de surface (π) de : (a) 10 mN/m, (b) 15 mN/m, (c) 20 mN/m, (d) 32 mN/m et (e) 40 mN/m. Dimensions des images = 100 μm x 100 μm . L'échelle de l'agrandissement en (a) 10 μm , (b) 5 μm , (c) 10 μm .

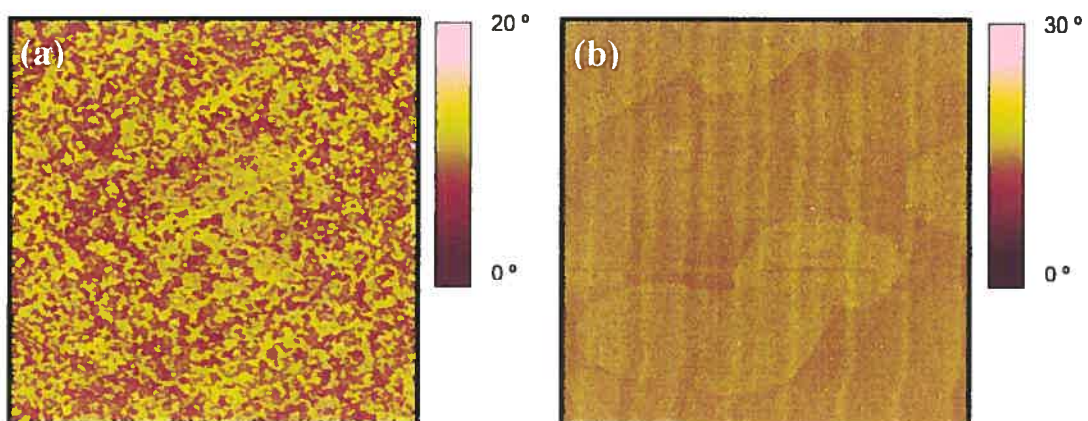


Fig. 3.16 : Images AFM en phase de monocouches de DPPC/DLPC (0.70/0.30) déposées sur un substrat de $C_{14}S/Au$ à une pression de surface de : (a) 10 mN/m et (b) 15 mN/m. Dimensions des images : (a) 15 μm x 15 μm et (b) 100 μm x 100 μm.

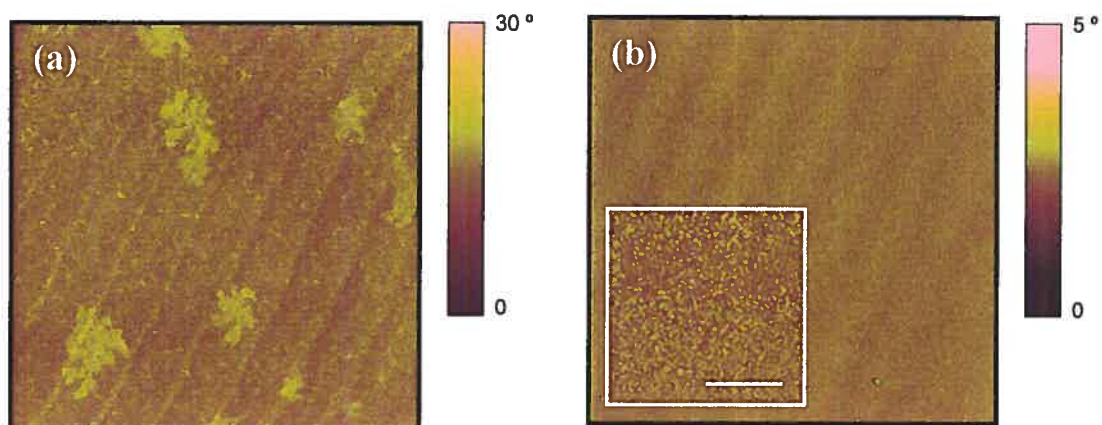


Fig. 3.17: Images AFM en phase de monocouches de DPPC/DLPC sur un substrat de $C_{14}S/Au$ après 30 min à $\pi = 40$ mN/m. Fractions molaires de DPPC : (a) 0.375 et (b) 0.625. Dimensions des images = 100 μm x 100 μm. L'échelle de l'agrandissement en (b) est de 2 μm.

Les **Fig. 3.15a** et **b**, dont les pressions de déposition sont 10 et 15 mN/m, sont des images acquises en-dessous de la π_{LE-LC} qui est de 15.7 mN/m pour le mélange 0.50/0.50. L'aire de surface totale occupée par ces domaines est significativement inférieure à celle prévue si toutes les molécules de DPPC se trouveraient dans la phase condensée (**Tab. 3.4**). Par comparaison, les monocouches transférées à une π de 20 mN/m (au-dessus de la π_{LE-LC}) montrent des domaines plus grands qui recouvrent une aire totale de la surface qui se rapproche de la valeur prédite (**Fig. 3.15c**). Ces images AFM confirment que la DPPC et la DLPC sont au moins partiellement miscibles en-dessous de la pression de transition de phase LE à LC de la monocouche mixte et que la compression jusqu'à des pressions supérieures à la π_{LE-LC} induit une condensation importante d'une phase riche en DPPC. De façon intéressante, malgré le fait que les isothermes $\pi-A$ de mélanges contenant $x_{DPPC} < 0.50$ ne montrent pas d'épaulement indicatif de la transition de phase LE à LC, des domaines ont été observés par AFM dans les monocouches ($\pi = 32$ mN/m) contenant des fractions molaires de 0.25 et 0.375 de DPPC (**Fig. 3.12a** et **b**). Ceci signifie que l'absence d'épaulement visible dans l'isotherme d'un mélange où l'un des constituants peut subir une transition de phase LE à LC ne peut nécessairement être considérée comme une preuve de miscibilité des constituants.

De plus, dans l'analyse thermodynamique, il a été montré que l'énergie libre de mélange en excès devient de plus en plus positive quand les monocouches mixtes sont comprimées à de plus hautes pressions de surface (**Fig. 3.5**),

suggérant une augmentation soit disant continue dans l'étendue de la séparation de phase avec une pression de surface croissante¹⁰⁶. Par contre, les images AFM révèlent que la compression latérale des monocouches de DPPC/DLPC induit initialement la séparation de phase, mais que les phases deviennent miscibles de nouveau à de plus hautes pressions de surface (40 mN/m). Ces résultats illustrent les limitations d'élucider les propriétés de miscibilité et le comportement de phases des monocouches mixtes de phospholipides en se basant seulement sur l'analyse traditionnelle des isothermes $\pi-A$ ¹⁰⁶.

3.10.1 Comparaison de la forme des domaines des monocouches LS et des GUVs

Des domaines riches en DPPC et en forme de filaments ont été observés par microscopie à fluorescence pour des GUVs composées de mélanges de DPPC/DLPC dans la région de coexistence de phases^{12-14,20}. Par comparaison, il a été trouvé, dans notre cas, que la taille et la forme des domaines de DPPC dans les monocouches LS varient avec la composition en phospholipides (**Fig. 3.12**), et avec la pression de surface pour une composition donnée (**Fig. 3.15**). Les domaines en forme de fleurs et serpentins étaient observés à 32 mN/m. Des formes similaires ont déjà été observées à l'interface eau/air ($\pi \geq 30$ mN/m) par microscopie à épifluorescence pour des mélanges de DPPC et dioleoylphosphatidylcholine (DOPC), qui est un phospholipide insaturé formant une phase fluide comme la DLPC⁵⁹. Les domaines riches en DPPC en forme de fleurs sont aussi formés dans des monocouches de phospholipides d'agents

tensioactifs pulmonaires (contenant 33 mol % de DPPC)^{84,117}. La différence dans les formes des domaines observés pour des monocouches et des GUVs de DPPC/DLPC se reflète probablement dans les méthodes de préparation des membranes employées. C'est-à-dire que la formation des GUVs de DPPC/DLPC exige la sonication de la suspension au-dessus de la température de transition de phase du DPPC. Pourtant, des études employant d'autres mélanges de phospholipides indiquent des similitudes entre la forme et la taille des domaines dans les monocouches et les GUVs^{18,118}. Pour avoir une comparaison significative de la structure des domaines de monocouches et de bicouches, cela exigerait des vitesses de compression/expansion (monocouches) et des gradients de température pour le réchauffement/refroidissement (GUVs) semblables.

3.10.2 La formation des domaines

Maintenant, les domaines en forme d'haricot et multi-lobés existent à de plus basses pressions de surface (**Fig. 3.15c**). De telles formes de domaines ont été observées dans des monocouches préparées avec des molécules chirales (L-DPPC et R-DPPC) à la région de coexistence de phases qui est, en fait, à la pression de transition de phase LE à LC^{116,119,120}. La transition entre la forme multi-lobée ou haricot ($\pi = 15\text{-}20$ mN/m) et la forme de fleur ou serpent ($\pi = 32$ mN/m) pour le mélange DPPC/DLPC est attribuable à des différences dans la tension de surface et les densités des dipôles des phospholipides induites par une différence de pression de surface^{27,29,42,116}. Les interactions répulsives dipôle-

dipôle liées aux densités plus élevées des dipôles des phospholipides dans les domaines condensés de DPPC à de plus hautes pressions peuvent déstabiliser les frontières des domaines et mener à des domaines en forme de fleurs et de serpentins comme ceux observés dans notre cas ^{29,120}. Si ce sont des structures à l'équilibre, il est difficile de s'en assurer puisqu'elles ne possèdent pas une forme géométrique définie. En addition aux effets de la tension de surface et des répulsions dipôle-dipôle, il est possible de croire, dans notre cas, que l'étendue de la miscibilité entre les phospholipides (c.-à-d., étendue de la non idéalité) et la composition du mélange de phospholipides aux frontières des domaines jouent aussi un rôle important dans la détermination de la forme (et la dynamique de la forme) des domaines de la phase condensée dans les mélanges binaires de phospholipides comme DPPC/DLPC ^{12,41,43,44}. Cette hypothèse est soutenue par le fait que nous avons observé des domaines circulaires pour des monocouches de DSPC/DLPC (c.-à-d., une plus grande non idéalité que pour le mélange DPPC/DLPC) à 32 mN/m. Des domaines circulaires ont été observés pour des monocouches de DSPC/DLPC déposées sur du mica à 32 mN/m par la technique Langmuir-Blodgett (LB) ou déposées sur un substrat hydrophobe de C₁₄S/Au par la technique LS pour des fractions molaires de DSPC de 0.50 et 0.75 à la **Fig. 3.18**. Deuxièmement, il y a aussi la forme des domaines solides observée dans les GUVs formées par le mélange de la phase fluide de la DLPC et de la phase gel de différentes dialkylphosphatidylcholines, dont la longueur des chaînes était variée de C₁₆ à C₂₀ qui soutient cette hypothèse ¹². Concernant ceci, des simulations théoriques de mélanges binaires de phospholipides prévoient un ordre interfacial

local de la phase fluide d'un des phospholipides par la phase gel de l'autre phospholipide; un phénomène qui est induit par la disparité dans les longueurs des chaînes hydrophobes ^{41,43,44}. L'étendue de l'ordre local augmente avec l'augmentation de la différence dans la longueur des chaînes du phospholipide. Puisque ce phénomène d'ordre interfacial a un effet sur la tension de surface aux frontières des domaines solides, il peut expliquer la variété de formes de domaines observés pour des mélanges avec différentes longueurs de chaîne. Ces résultats mettent en évidence la différence importante entre la formation de domaines dans la région de coexistence de phases de monocouches phospholipidiques à un constituant (ce qui a été largement étudié) et dans des monocouches mixtes formées de mélanges binaires de phospholipides.

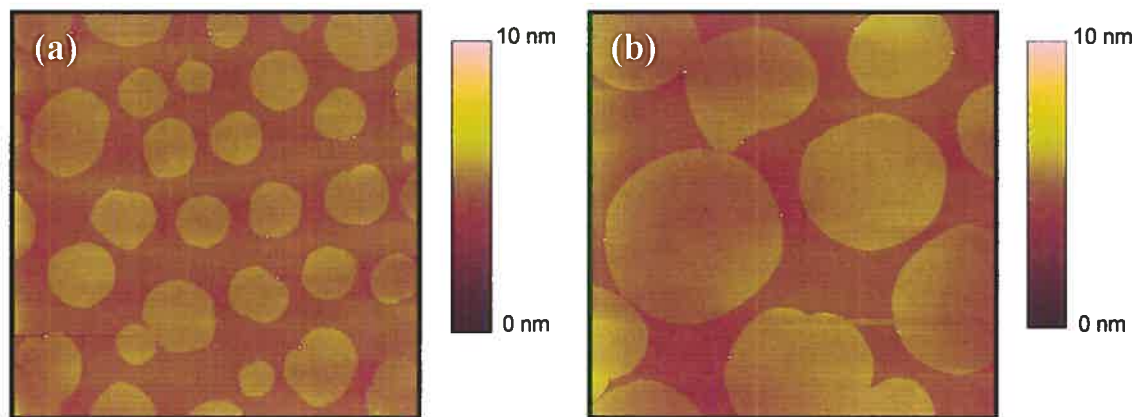


Fig. 3.18 : Images AFM en topographie acquise à l'air de monocouches de DSPC/DLPC déposées sur une surface de mica à $\pi = 32$ mN/m. Fraction molaire de DSPC : **(a)** 0.50, **(b)** 0.75. $T = 20^\circ\text{C}$. Dimensions des images : (a) $70\ \mu\text{m} \times 70\ \mu\text{m}$ et (b) $15\ \mu\text{m} \times 15\ \mu\text{m}$.

3.10.3 L'origine des petits domaines microscopiques

Les **Fig. 3.15 a** et **b** soulèvent une question quant à l'origine des petits domaines microscopiques observés en-dessous de la transition de phase LE à LC. Il n'est pas très clair si ces domaines existent à l'interface eau/air ou bien s'ils sont formés pendant ou après le transfert de la monocouche sur le substrat de $C_{14}S/Au$ due à la condensation induite par le substrat⁷⁵ ou à des processus de démouillage^{80,82}. Maintenant, la supposition suivante est considérée : les valeurs de ΔG_{ex} calculées à partir des isothermes π - A des différents mélanges de DPPC/DLPC de la **Fig. 3.5** sont indicatrices de l'état de miscibilité à l'interface eau/air. Cela impliquerait qu'aucune séparation de phase ne devrait avoir lieu avec des valeurs négatives (-69 à -204 J/mol) obtenues pour une $x_{DPPC} = 0.50$ aux $\pi = 5, 10$ et 15 mN/m, quoique des petits domaines microscopiques soient observés par AFM à 10 et 15 mN/m (**Fig. 3.15a et b**). Le même comportement est obtenu pour $x_{DPPC} = 0.70$. Les valeurs de ΔG_{ex} à $\pi = 5$ mN/m (-260 J/mol) et 10 mN/m (-288 J/mol) mettent l'accent sur la miscibilité de la DPPC et la DLPC à ces pressions. Par contraste, les monocouches LS composées de 0.70/0.30 DPPC/DLPC se trouvent à montrer des domaines sous-microscopiques à $\pi = 10$ mN/m (**Fig. 3.16a**). Ces observations suggèrent que selon les valeurs de ΔG_{ex} , les domaines condensés se trouvant dans les monocouches sur support solide en-dessous de la transition de phase LE à LC peuvent vraiment résulter du transfert.

Cependant, cela ne semble pas être le cas pour les petits agrégats condensés trouvés dans la phase de la DLPC à 32 mN/m (**Fig. 3.10 et 3.12**). En regardant un agrandissement fait sur une frontière d'un domaine condensé de DPPC tel que présenté à la **Fig. 3.19a**, on peut constater que de plus grands domaines se forment par la coalescence de petits agrégats aux frontières. Un tel mécanisme de croissance est compatible avec une vitesse de compression de la monocouche lente qui donne comme résultat des bordures de domaines dentelées (**Fig. 3.14**) et une plus longue stabilisation de la monocouche Langmuir produisant de plus grands domaines de DPPC pour le mélange 0.25/0.75 (**Fig. 3.12a**, 30 min vs. **Fig. 3.19b**, 13.5 h). Ces résultats appuient la présence d'agrégats plus petits et de plus grands domaines de phase condensée à l'interface eau/air. En fait, la coexistence de grands et petits agrégats établie que les monocouches de DPPC/DLPC ne sont pas à l'équilibre lorsque déposées sur les substrats solides, car l'équilibre est plutôt présenté par de grands agrégats d'une seule taille. Malgré ce fait, il est clair que la séparation de phase quant à elle est complétée, étant donné qu'une corrélation 1 :1 a été trouvée entre la fraction d'aire couverte par les grands domaines et les petits agrégats dans les images AFM et la fraction d'aire de DPPC dans les monocouches mixtes calculée en assumant une séparation de phase totale (**Fig. 3.13 a**).

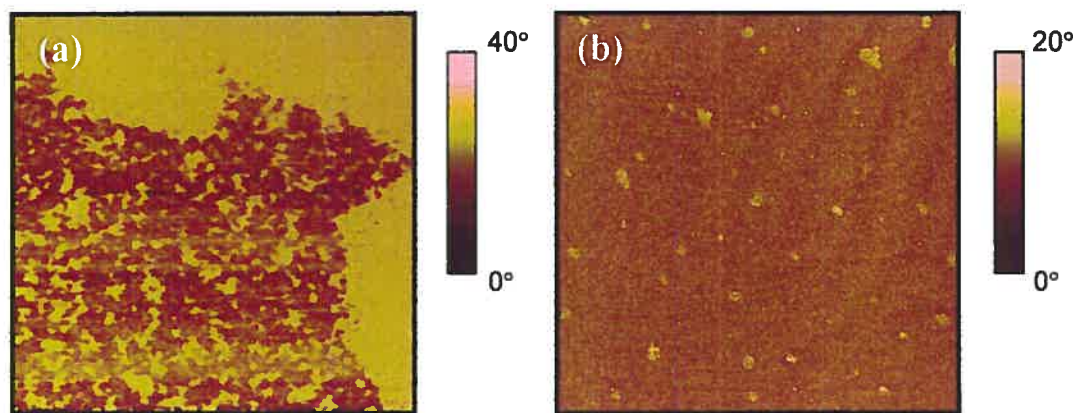


Fig. 3.19 : Images AFM en phase de monocouches de DPPC/DLPC déposées sur un substrat de $C_{14}S/Au$. Fraction molaire de DPPC : (a) 0.625 et (b) 0.25. Les monocouches ont été transférées à une π de 32 mN/m après un temps de stabilisation de (a) 30 min et (b) 13.5 h. Dimensions des images : (a) 25 μm x 25 μm et (b) 100 μm x 100 μm .

3.10.4 Comportement de mélange critique entre la DPPC et la DLPC à haute pression de surface

La trouvaille la plus intéressante lors de cette étude est le changement drastique de la morphologie des monocouches de DPPC/DLPC suivant une compression de 32 à 40 mN/m. Premièrement, la morphologie de ces monocouches mixtes tout comme celles obtenues à 32 mN/m dépend de la fraction molaire de DPPC (Fig. 3.15e et 3.17). Pendant qu'un aspect plus dendritique était observé pour une $x_{DPPC} = 0.375$, l'augmentation de la x_{DPPC} à 0.50 a eu comme conséquence de donner une morphologie radialement embranchée. Lorsque la monocouche Langmuir de composition 0.50/0.50 de DPPC/DLPC a été stabilisée à une pression de 40 mN/m pour de plus longues périodes (3 h et 6 h) avant d'en faire le transfert sur le substrat hydrophobe, les

structures radialement dendritiques (0.5 h) ont évolué en des domaines aléatoirement embranchés (**Fig. 3.20**). Il y a seulement une légère diminution de l'aire de surface totale couverte par ces domaines embranchés avec le temps (c.-à-d., $42\pm 2\%$ pour 3 h et $36\pm 3\%$ pour 6 h). Pour une $x_{\text{DPPC}} = 0.625$, les grands domaines en forme de fleurs observés à 32 mN/m (**Fig. 3.12c**) sont remplacés par un dense réseau de domaines sous-microscopiques (**Fig. 3.17b**) à 40 mN/m. Ce mélange interfacial croissant, auquel nous assistons, résulte de la rupture des domaines microscopiques condensés. Cela est due à la pression de surface qui se rapproche de la pression de rupture (π_c) où le film est détruit. Ce phénomène pourrait expliquer le changement dans la pression de rupture de la monocouche mixte en fonction de la composition en phospholipides pour des $x_{\text{DPPC}} \geq 0.60$ (**Fig. 3.3b**). Initialement, l'augmentation continue de l' ΔG_{ex} avec la pression de surface et le comportement suivant la loi additive pour toutes les compositions étudiées de DPPC/DLPC à 40 mN/m pointaient vers un état plus grand de séparation de phase. Maintenant, nos résultats AFM indiquent clairement qu'un énorme changement dans les propriétés de miscibilité des phases riches en DPPC et DLPC survient à cette pression de surface.

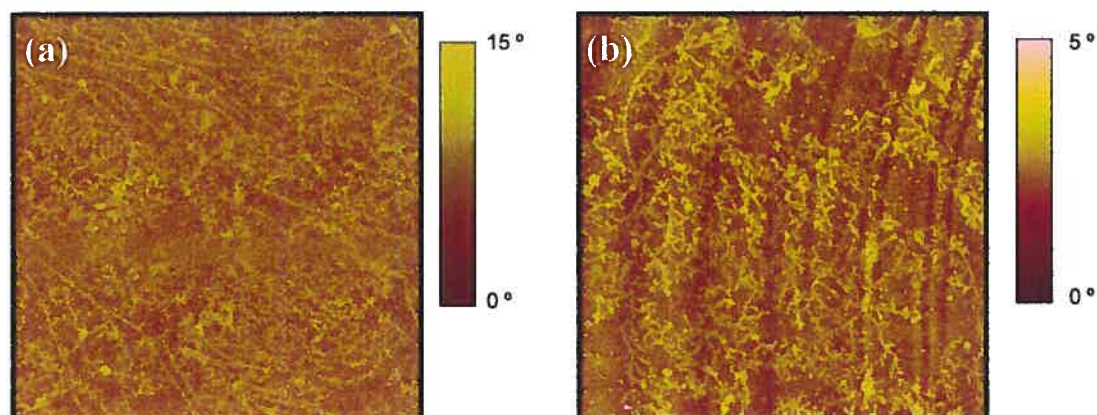


Fig. 3.20 : Images AFM en phase de monocouches de DPPC/DLPC (0.50: 0.50) sur un substrat de $C_{14}S/Au$. Les monocouches ont été transférées à une $\pi = 40$ mN/m après un temps de stabilisation de (a) 3 h et (b) 6 h. Dimension des images : (a) $50 \mu\text{m} \times 50 \mu\text{m}$ et (b) $100 \mu\text{m} \times 100 \mu\text{m}$.

De grande pertinence, est la diminution dramatique dans la taille et/ou la disparition des domaines condensés riches en DPPC qui ont été observés par épifluorescence et/ou par microscopie à angle de Brewster (BAM) à une $\pi > 35$ mN/m pour des monocouches Langmuir ségréguées de DPPC/DOPC⁵⁹ et d'agents tensioactifs pulmonaires (mélange complexe de protéines, phospholipides et cholestérol)^{85,121,122}. Cette diminution dans la taille des domaines a été interprétée comme un changement induit par la pression soit dans les propriétés de répartition de la sonde fluorescente utilisée pour l'épifluorescence⁵⁹ ou dans les propriétés de mélange des lipides^{59,85,121}. Les changements observés dans la morphologie par AFM pour des monocouches de DPPC/DLPC sans l'utilisation de sonde fluorescente et par microscopie à angle de Brewster pour les monocouches d'agents tensioactifs pulmonaires (riches en

DPPC) appuient l'explication suivante : la diminution de la taille des domaines observée pour la monocouche plus simple de DPPC/DOPC peut également procéder par l'évolution d'embranchements dendritiques qui peuvent être imagés par AFM, mais qui sont beaucoup trop fin pour être vus par microscopie optique dont la résolution latérale est de 2 μm .

Les domaines condensés riches en DPPC dans les monocouches d'agents tensioactifs pulmonaires se sont avérés à se mélanger de nouveau avec la phase étendue par la dissipation soudaine de la frontière interfaciale des deux phases plutôt que par une diminution progressive de leur taille ¹²¹. La forme circulaire des domaines devient également fortement déformée en forme allongée immédiatement avant de se mélanger de nouveau. Ce changement de forme aussi bien que la plage étroite de pression de surface ($< 2 \text{ mN/m}$) durant laquelle les domaines condensés deviennent miscibles avec la phase environnante ont suggéré un phénomène de mélange critique ¹²¹, tout comme celui observé à la coexistence des phases fluides de différents mélanges binaires de phospholipide/cholestérol ^{1,55,123,124}. Le changement de structure des domaines observé pour les monocouches de DPPC/DLPC sous une compression de 32 à 40 mN/m peut aussi être un indicateur de comportement de mélange critique. En premier lieu, des changements dans la morphologie des domaines condensés ont été observés dans une plage de seulement 8 mN/m dans ces monocouches. Cette plage peut être plus petite, étant donné que des pressions de surface entre 32 et 40 mN/m n'ont pas été étudiées. En second lieu, la pression de surface d'une transition critique de

mélange dépend également de la composition de la monocouche ^{1,55,124}. Pour différentes compositions de DPPC/DLPC, soit la disparition des domaines microscopiques en forme de fleurs ou leur évolution en domaines plus allongés de forme plus dendritique ont été observés à 40 mN/m. Le fait que l'ampleur des changements dans la forme des domaines de DPPC et les propriétés de miscibilité de DPPC/DLPC à une pression fixe de 40 mN/m varient avec la fraction molaire de DPPC, est en accord avec une pression de transition critique dépendante de la composition. En troisième lieu, la persistance des domaines dendritiques après plusieurs heures à 40 mN/m (**Fig. 3.20**) peut refléter un ralentissement critique dans le mélange dû à des propriétés similaires des deux phases ¹²¹. Bien qu'il soit connu que le cholestérol joue un rôle critique dans le mélange des phases séparées dans les agents tensioactifs pulmonaires ¹²¹, les résultats présentés ici pour le mélange DPPC/DLPC et ceux obtenus pour le DPPC/DOPC dans la littérature indiquent que le mélange des phospholipides induit par la pression peut se produire en absence d'agents tensioactifs comme le cholestérol.

Les propriétés de deux phases distinctes deviennent similaires à proximité du point critique jusqu'à ce qu'elles fusionnent ^{121,124}. Le mélange des constituants dans le mélange des agents tensioactifs pulmonaires provient de la diminution dans la différence entre la densité des deux phases basée sur la diminution calculée de l'aire moléculaire et de l'augmentation mesurée dans l'épaisseur optique de la phase fluide environnante durant la compression du film comparé à l'épaisseur optique relativement constante des domaines condensés de

DPPC⁸⁵. Les calculs de l'aire moléculaire de la matrice de DLPC entourant les domaines de DPPC en fonction de la pression de surface appuient cette possibilité. En assumant une aire moléculaire de $49 \text{ \AA}^2/\text{molécule}$ pour la DPPC dans les domaines condensés, l'aire moléculaire de la DLPC dans la matrice environnante diminue de ~ 83 à $\sim 51 \text{ \AA}^2/\text{molécule}$ durant la compression de 20 à 40 mN/m. La fraction d'aire occupée par les domaines condensés demeure relativement constante ($\varphi_c = 0.42-0.43$) de 20 à 40 mN/m. Il a donc été supposé que l'aire moléculaire de la DPPC dans les domaines condensés demeure également constante pendant la compression de 20 à 40 mN/m. L'aire moléculaire de la DPPC à 20 mN/m ($49 \text{ \AA}^2/\text{molécule}$) a été utilisée pour le paramètre \tilde{A}_c dans l'équation (9) pour calculer l'aire moléculaire de la phase étendue de DLPC. Ainsi, la transformation de phase observée à haute pression dans les monocouches de DPPC/DLPC peut être due aux densités similaires des phases condensée et LE. La similitude dans les densités de ces deux phases devrait réduire la tension de surface permettant des frontières plus prolongées des formes dendritiques ou la disparition des domaines en forme de fleurs observés à 40 mN/m. Une comparaison entre la forme et la taille des domaines dans les monocouches déposées à plusieurs pressions entre 32 mN/m et la pression de rupture de la monocouche mixte, comme aussi sur la vitesse de compression et leur dépendance à la température, aidera à clarifier la nature de ces changements de phase. Une recherche sur la morphologie des monocouches de DPPC/DLPC et d'autres mélanges de phospholipides de phase gel/fluide en utilisant l'AFM et l'épifluorescence ou microscopie à angle de Brewster devrait également fournir un

plus grand discernement dans les changements de la structure condensée de domaines qui se produisent à de pressions de surfaces élevées.

3.10.5 Imagerie BAM de monocouches Langmuir mixtes

Pour terminer cette étude, il a été possible de faire de la microscopie à angle de Brewster (BAM) à l'interface eau/air pour une composition de 0.50/0.50 de DPPC/DLPC en passant par toutes les pressions de surface étudiées lors de la compression de la monocouche et de voir en temps réel la formation des domaines riches en DPPC et leur déformation à haute pression. La **Fig. 3.21a** a été acquise à une pression de 18.4 mN/m où des domaines sont déjà présents. Avant cette pression rien n'est observable par la BAM. Donc, avant la transition de phase LE à LC (15.7 mN/m) et jusqu'à 18.4 mN/m aucune séparation de phase n'a été enregistrée. Par contre, les images AFM de la **Fig. 3.15a** et **b** démontrent la présence de domaines à des pressions de 10 et 15 mN/m. Ceci peut être attribuable soit à la résolution de l'appareil (2 μm) qui n'est pas suffisante pour observer ces domaines ou suivant l'hypothèse que ces domaines sont formés par la condensation que crée le substrat lors du transfert⁷⁵. Les **Fig. 3.21b** (19 mN/m) et **c** (21 mN/m) montrent des domaines légèrement plus grands que ceux de la **Fig. 3.21a**. Il est donc possible de voir la croissance des domaines sous l'effet de la compression. Par comparaison avec les images AFM de la **Fig. 3.15c** à 20 mN/m la forme des domaines n'est pas aussi claire, mais la résolution latérale pour cette technique est de 2 μm , comme il a déjà été dit plus haut et les

dimensions des images sont beaucoup plus grandes (AFM : 100 μm x 100 μm vs BAM : 539 μm x 428 μm). Aux **Fig. 3.21d** (24.3 mN/m), **e** (30.1 mN/m), et **f** (32 mN/m), les domaines en forme de fleurs riches en DPPC sont visibles comme dans l'image AFM de la **Fig. 3.15d**. Sous l'effet de compression, la quantité de domaines augmente. À la **Fig. 3.21g** (35 mN/m) les domaines en forme de fleurs sont toujours présents à l'interface eau/air. La **Fig. 3.21h** (39.8 mN/m) se rapproche de la pression de rupture du film pour cette composition ($\pi_c = 47$ mN/m) et la déformation des domaines est notable. Leur aspect est plus embranché et dendritique avec un centre plus dense. À la **Fig. 3.21i** (41.7 mN/m), les domaines sont flous et le centre qui était plus dense n'existe plus. Encore ici, il est possible d'émettre l'hypothèse que la monocouche de DPPC/DLPC procède à une évolution d'embranchements dendritiques comme vu par AFM (**Fig. 3.15e**), mais la résolution latérale de l'appareil apporte une limite. Cette étude de BAM montre que les domaines en forme de fleurs transférés sur la surface de $\text{C}_{14}\text{S}/\text{Au}$ et observés par AFM existent réellement à l'interface eau/air et permet de confirmer que le choix de la technique Langmuir-Schaefer était adéquat pour minimiser la déformation des structures des domaines pendant le transfert sur le substrat plan.

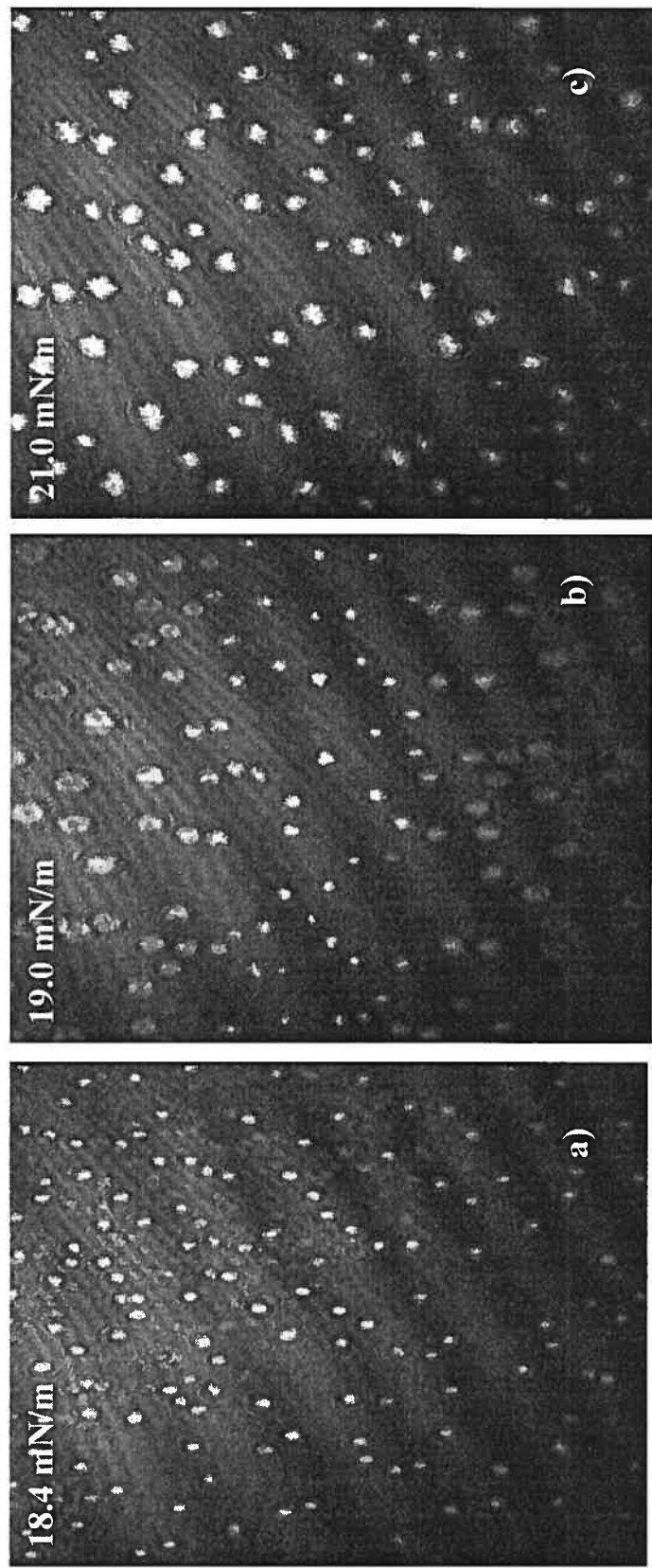
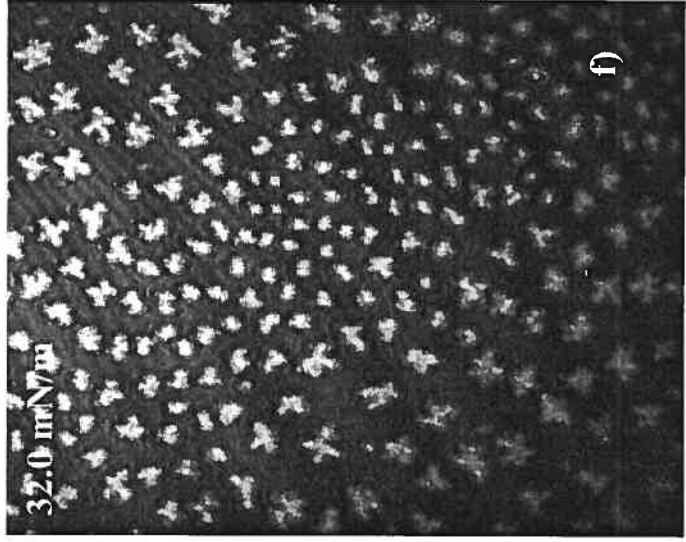
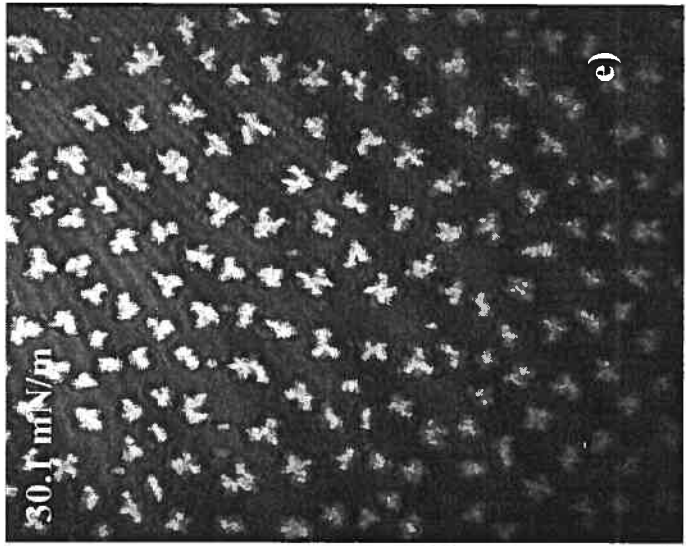
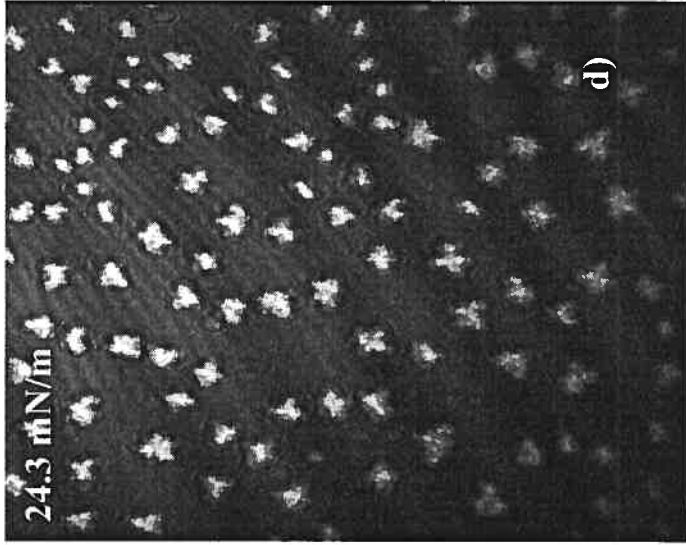
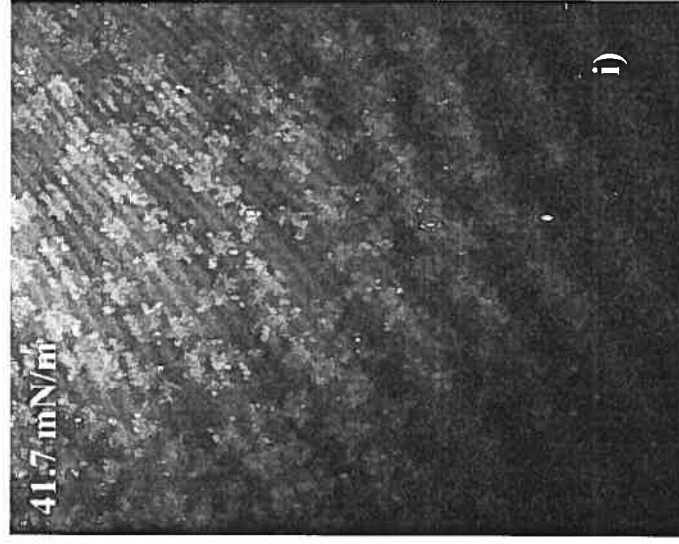
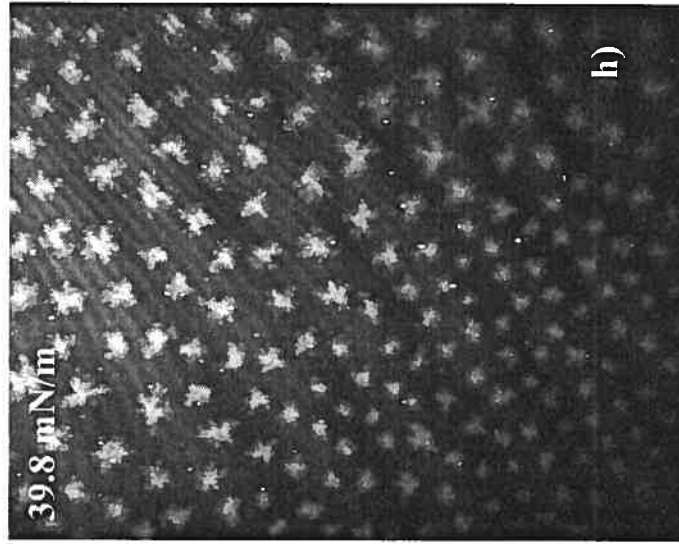
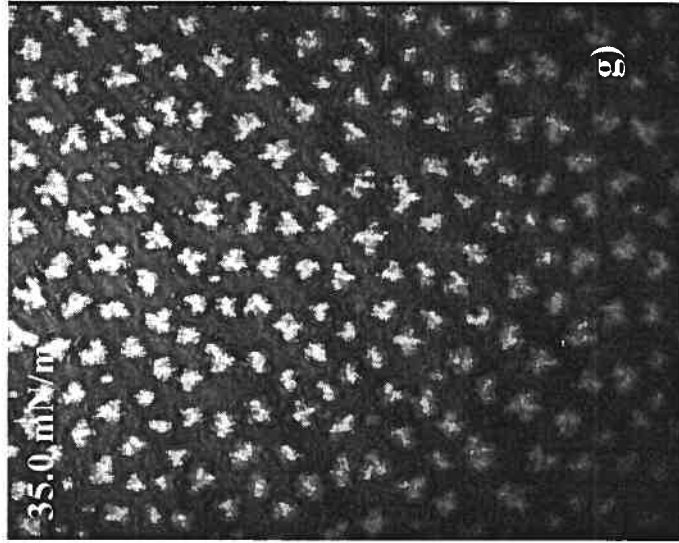


Fig. 3.21 : Images BAM de la morphologie d'une monocouche mixte de DPPC/DLPC (0.50/0.50) formée à l'interface eau/air à différentes pressions de surface : **(a)** 18.4 mN/m ; **(b)** 19 mN/m ; **(c)** 21 mN/m ; **(d)** 24.3 mN/m ; **(e)** 30.1 mN/m ; **(f)** 32 mN/m ; **(g)** 35 mN/m ; **(h)** 39.8 mN/m ; **(i)** 41.7 mN/m. $T = 20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Dimensions des images = $539\text{ }\mu\text{m} \times 428\text{ }\mu\text{m}$.





Chapitre IV

Conclusion

Le substrat plan hydrophobe constitué d'une monocouche auto-assemblée d'alcanethiols a été employé pour son arrangement latéral compact donnant lieu à une bicouche hybride complète et sans défauts. L'analyse thermodynamique des isothermes π - A a été une approche complémentaire à l'étude par AFM sur l'étendue de la miscibilité entre la DPPC et la DLPC. Nous avons fait l'expérience des limites que comportent une telle étude.

Essentiellement, nous avons présenté une cartographie détaillée de la morphologie de phase de monocouches LS de DPPC/DLPC en fonction de la pression de surface et de la composition en phospholipides. Nous avons déterminé comment la structure des domaines condensés dans ces monocouches mixtes dépend de la composition en phospholipides et de la pression de surface. Aux pressions inférieures à la π_{LE-LC} , les formes des domaines de DPPC (haricot et multi-lobée) ressemblent à celles observées dans les monocouches pures de DPPC dans la région de coexistence de phase LE/LC. À une pression équivalente à celle d'une bicouche (32 mN/m), les monocouches montrent la coexistence des phases gel et fluide aux compositions correspondant au diagramme de phase des dispersions aqueuses de DPPC/DLPC. Les domaines condensés en forme de fleur et de serpentins observés peuvent résulter d'une miscibilité entre la DPPC et

la DLPC dans les domaines et/ou se mélangeant à la frontière des phases. Les formes et les tailles des domaines des monocouches sont différentes de celles observées dans les GUVs de DPPC/DLPC. Si on accepte l'hypothèse que la taille et l'environnement des GUVs ressemblent à ceux des cellules, ceci implique que les monocouches de phospholipide à l'interface eau/air ou sur support solide miment seulement certains aspects des propriétés de phase des biomembranes.

Un énorme changement dans les propriétés de phase entre la DPPC et la DLPC s'est produit à 40 mN/m, qui rappelle un phénomène de mélange critique. Le mélange critique a été étudié ultérieurement dans les régions de coexistence de phase LE/LC de mélanges de cholestérol/phospholipide. Maintenant, les résultats présentés suggèrent que la pression induisant le mélange des phases solide et liquide dans les monocouches mixtes de phospholipides peut se produire en l'absence du cholestérol.

Les résultats de cette étude démontrent l'importance de caractériser le comportement de phase en 2D dans les monocouches Langmuir modèles. Elle a apporté une meilleure compréhension des propriétés interfaciales des microdomaines de phospholipides et des changements de phase induits par la pression de surface impliqués dans certains processus biologiques (ex. la respiration pulmonaire), ainsi que dans la construction de surfaces biomimétiques latéralement organisées.

Les avenues futures de ce projet pourraient impliquer l'ajout d'un nouveau constituant et la variation de la température pour le mélange DPPC/DLPC. Le nouveau constituant pourrait être le cholestérol qui compléterait la composition lipidique modèle pour mimer les membranes biologiques. Il faut rappeler que le mélange DPPC/DLPC miment seulement la composition en phospholipides et qu'il est adéquat à cause de ses propriétés thermiques (DPPC : haute T_m et DLPC : basse T_m)^{3,4}. Il est connu dans des systèmes comme les GUVs constituées de DPPC/DLPC/cholestérol que le cholestérol réduit la taille des domaines en des domaines "nanoscopiques"²⁰. Par contre, la résolution latérale de la microscopie à fluorescence confocale limite l'étude à des domaines dont la taille est $> 200-300 \text{ nm}$ ²⁰. Il serait donc intéressant de voir l'action du cholestérol sur la morphologie de phase dans des mélanges ternaires de DPPC/DLPC/cholestérol en utilisant la résolution de l'AFM qui est habituellement $\leq 1 \text{ nm}$. L'effet de la température sur le mélange permettrait d'explorer d'autres régions du diagramme de phase des suspensions aqueuses (Fig. 1.3). L'utilisation de la microscopie à angle de Brewster comme technique complémentaire à l'AFM (ce qui a déjà été amorcé) permettrait une étude sur la morphologie de phase *directement* à l'interface eau/air à de plus hautes pressions de surface. Comme il a été dit, la plupart des études ont été réalisées à des pressions allant seulement jusqu'à la coexistence de phase LE/LC. Elle permettrait de vérifier le phénomène de mélange critique entre la DPPC et la DLPC et ce, sans avoir à transférer la monocouche sur un substrat plan.

Références

- (1) Keller, S. L.; Anderson, T. G.; Mc Connell, H. M. *Biophys. J.* **2000**, *79*, 2033-2042.
- (2) Albrecht, O.; Gruler, H.; Sackmann, E. *J. Physique* **1978**, *39*, 301-313.
- (3) Silvius, J. R.; del Giudice, D.; Lafleur, M. *Biochemistry* **1996**, *35*, 15198-15208.
- (4) Brown, D. A.; London, E. *J. Membr. Biol.* **1998**, *164*, 103-114.
- (5) Hadley, N. F. *The Adaptive Role of Lipids in Biological Systems*; J. Wiley & Sons, Inc.: New York, 1985.
- (6) Delattre, J.; Couvreur, P.; Puisieux, F.; Philippot, J.-R.; Schuber, F. *Les Liposomes Aspects technologiques, biologiques et pharmacologiques*; Les éditions INSERM: Paris, 1993.
- (7) Sackmann, E. *FEBS Lett.* **1994**, *346*, 3-16.
- (8) Mabrey, S.; Sturtevant, J. M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1976**, *73*, 3862-3866.
- (9) van Dijck, P. W. M.; Kaper, A. J.; Oonk, H. A. J.; de Gier, J. *Biochim. Biophys. Acta* **1977**, *470*, 58-69.
- (10) Lee, A. G. *Biochim. Biophys. Acta* **1977**, *472*, 285-344.
- (11) Marsh, D. *Handbook of Lipid Bilayers*; CRC Press: Boca Raton, FL, 1990.
- (12) Bagatolli, L. A.; Gratton, E. *Biophys. J.* **2000**, *79*, 434-447.

- (13) Bagatolli, L. A.; Gratton, E. *Biophys. J.* **2000**, *78*, 290-305.
- (14) Korlach, J.; Schwille, P.; Webb, W. W.; Feigenson, G. W. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 8461-8466.
- (15) Cevc, G. *Phospholipids Handbook*; Marcel Dekker, Inc. ed.: Munich, 1993.
- (16) Brown, D. A.; London, E. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 17221-17224.
- (17) Koynova, R.; Caffrey, M. *Chem. Phys. Lipids* **2002**, *115*, 107-219.
- (18) Dietrich, C.; Bagatolli, L. A.; Volovyk, Z. N.; Thompson, N. L.; Levi, M.; Jacobson, K.; Gratton, E. *Biophys. J.* **2001**, *80*, 1417-1428.
- (19) Samsonov, A. V.; Mihalyov, I.; Cohen, F. S. *Biophys. J.* **2001**, *81*, 1486-1500.
- (20) Feigenson, G. W.; Buboltz, J. T. *Biophys. J.* **2001**, *80*, 2775-2788.
- (21) Marsh, D. *Biochim. Biophys. Acta* **1996**, *1286*, 183-223.
- (22) Kaganer, V. M.; Möhwald, H.; Dutta, P. *Rev. Mod. Phys.* **1999**, *71*, 779-819.
- (23) Vollhardt, D. *Adv. Colloid Interface Sci.* **1996**, *64*, 143-171.
- (24) Möhwald, H. In *Structure and Dynamics of Membranes*; Lipowsky, R., Sackmann, E., Eds.; Elsevier Science B.V.: Amsterdam, 1995, pp 161-211.
- (25) Möhwald, H.; Dietrich, A.; Böhm, C.; Brezesinski, G.; Thoma, M. *Mol. Membr. Biol.* **1995**, *12*, 29-38.

- (26) Knobler, C. M.; Desai, R. C. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **1992**, *43*, 207-236.
- (27) McConnell, H. M. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **1991**, *42*, 171-195.
- (28) Weis, R. M. *Chem. Phys. Lipids* **1991**, *57*, 227-239.
- (29) Möhwald, H. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **1990**, *41*, 441-476.
- (30) Knobler, C. M. *Adv. Chem. Phys.* **1990**, *77*, 397-449.
- (31) Flörsheimer, M.; Möhwald, H. *Chem. Phys. Lipids* **1989**, *49*, 231-241.
- (32) Kalb, E.; Frey, S.; Tamm, L. K. *Biochim. Biophys. Acta* **1992**, *1103*, 307-316.
- (33) Gaines Jr., G. L. *Insoluble monolayers at liquid-gas interfaces*; Wiley-Interscience: New York, 1966.
- (34) Gennis, R. B. *Biomembranes: Molecular Structure and Function*; Springer Verlag: New York, 1989.
- (35) Knobler, C. M. *Science* **1990**, *249*, 870-874.
- (36) Weidemann, G.; Vollhardt, D. *Biophys. J.* **1996**, *70*, 2758.
- (37) Petty, M. C. *Langmuir-Blodgett Films: An Introduction*; Cambridge University Press, 1996.
- (38) Adamson, A. W.; Gast, A. P. *Physical Chemistry of Surfaces*; 6th ed. ed.; J. Wiley & Sons, Inc.: New York, 1997.
- (39) Maget-Dana, R. *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, *1462*, 109-140.
- (40) Parasassi, T.; Ravagnan, G.; Rusch, R. M.; Gratton, E. *Photochem. Photobiol.* **1993**, *57*, 403-410.

- (41) Jørgensen, K.; Klinger, R.; Biltonen, R. L. *J. Phys. Chem. B* **2000**, *104*, 11763-11773.
- (42) McConnell, H. M.; De Koker, R. *Langmuir* **1996**, *12*, 4897-4904.
- (43) Jørgensen, K.; Mouritsen, O. G. *Biophys. J.* **1995**, *95*, 942-954.
- (44) Jørgensen, K.; Sperotto, M. M.; Mouritsen, O. G.; Ipsen, J. H.; Zuckermann, M. J. *Biochim. Biophys. Acta* **1993**, *1152*, 135-145.
- (45) Vié, V.; Mau Van, N.; Lesniewska, E.; Goudonnet, J. P.; Heitz, F.; Le Grimellec, C. *Langmuir* **1998**, *14*, 4574-4583.
- (46) Yuan, C.; Johnston, L. J. *Biophys. J.* **2001**, *81*, 1059-1069.
- (47) Ross, M.; Steinem, C.; Galla, H.-J.; Janshoff, A. *Langmuir* **2001**, *2001*, 2437-2445.
- (48) Schneider, J.; Dufrière, Y. F.; Barger, J., W.R.; Lee, G. U. *Biophys. J.* **2000**, *79*, 1107-1118.
- (49) Kuramori, M.; Uchida, N.; Suehiro, K.; Oishi, Y. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2000**, *73*, 829-835.
- (50) Yuan, C.; Johnston, L. J. *Biophys. J.* **2000**, *79*, 2768-2781.
- (51) Radhakrishnan, A.; Anderson, T. G.; McConnell, H. M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 12422-12427.
- (52) DeWolf, C.; Leporatti, S.; Kirsch, C.; Klinger, R.; Brezesinski, G. *Chem. Phys. Lipids* **1999**, *97*, 129-138.
- (53) Ekelund, K.; Sparr, E.; Engblom, J.; Wennerström, H.; Engström, S. *Langmuir* **1999**, *15*, 6946-6949.

- (54) Sparr, E.; Ekelund, K.; Engblom, J.; Engström, S.; Wennerström, H. *Langmuir* **1999**, *15*, 6950-6955.
- (55) Keller, S. L.; Pitcher III, W. H.; Huestis, W. H.; McConnell, H. M. *Phys. Rev. Lett.* **1998**, *81*, 5019-5022.
- (56) Dufrêne, Y. F.; Barger, W. R.; Green, J.-B. D.; Lee, G. U. *Langmuir* **1997**, *13*, 4779-4784.
- (57) ten Grotenhuis, E.; Demel, R. A.; Ponec, M.; Boer, D. R.; van Miltenburg, J. C.; Bouwstra, J. A. *Biophys. J.* **1996**, *71*, 1389-1399.
- (58) Solletti, J. M.; Botreau, M.; Sommer, F.; Duc, T. M.; Celio, M. R. *J. Vac. Sci. Technol. B* **1996**, *14*, 1492-1497.
- (59) Nag, K.; Keough, K. M. W. *Biophys. J.* **1993**, *65*, 1019-1026.
- (60) Ruano, M. L. F.; Nag, K.; Worthman, L.-A. D.; Casals, C.; Pérez-Gil, J.; Keough, K. M. W. *Biophys. J.* **1998**, *74*, 1101-1109.
- (61) Menke, M.; Künneke, S.; Janshoff, A. *Eur. Biophys. J.* **2002**, *31*, 317-322.
- (62) Yuan, C.; Furlong, J.; Burgos, P.; Johnston, L. J. *Biophys. J.* **2002**, *82*, 2526-2535.
- (63) Cornell, B. A.; Maksvytis-Braach, V. L. B.; King, L. G.; Osman, P. D. J.; Raguse, B.; Wieczorek, L.; Pace, R. J. *Nature* **1997**, *387*, 580-583.
- (64) Sackmann, E. *Science* **1996**, *271*, 43-48.

- (65) Dufrière, Y. F.; Lee, G. U. *Biochim. Biophys. Acta* **2000**, *2000*, 14-41.
- (66) Plant, A. L. *Langmuir* **1999**, *15*, 5128-5135.
- (67) Milhiet, P.-E.; Domec, C.; Giocondi, M.-C.; Van Mau, N.; Heitz, F.; Le Grimmellec, C. *Biophys. J.* **2001**, *81*, 547-555.
- (68) Takamoto, D. Y.; Lipp, M. M.; von Nahmen, A.; Lee, K. Y. C.; Waring, A. J.; Zasadzinski, J. A. *Biophys. J.* **2001**, *81*, 153-169.
- (69) Flanders, B. N.; Vickery, S. A.; Dunn, R. C. *J. Microsc.* **2001**, *202*, 379-385.
- (70) Van Mau, N.; Vié, V.; Chaloin, L.; Lesniewska, E.; Heitz, F.; Le Grimmellec, C. *J. Membr. Biol.* **1999**, *167*, 241-249.
- (71) Moraille, P.; Badia, A. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 4303-4306.
- (72) Duschl, C.; Liley, M.; Corradin, G.; Vogel, H. *Biophys. J.* **1994**, *67*, 1229-1237.
- (73) Sivasankar, S.; Briehner, W.; Lavrik, N.; Gumbiner, B.; Leckband, D. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 11820-11824.
- (74) Yu, Z. W.; Calvert, T. L.; Leckband, D. *Biochemistry* **1998**, *37*, 1540-1550.
- (75) Leporatti, S.; Brezesinski, G.; Möhwald, H. *Colloids Surf., A* **2000**, *161*, 159-171.
- (76) Moraille, P.; Badia, A. *Langmuir* **2002**, *18*, 4414-4419.

- (77) Moraille, P. In *département de chimie*; Université de Montréal: Montréal, 2002, p 116.
- (78) Janshoff, A.; Steinem, C. *Chem. Biochem.* **2001**, *2*, 798-808.
- (79) Rinia, H. A.; de Kruijff, B. *FEBS Lett.* **2001**, *504*, 194-199.
- (80) Hollars, C. W.; Dunn, R. C. *Biophys. J.* **1998**, *75*, 342-353.
- (81) Hwang, J.; Tamm, L. K.; Böhm, C.; Ramalingam, T. S.; Betzig, E.; Edidin, M. *Science* **1995**, *270*, 610-614.
- (82) Shiku, H.; Dunn, R. C. *J. Microsc.* **1999**, *194*, 455-460.
- (83) Tamm, L. K.; Böhm, C.; Yang, J.; Shao, Z.; Hwang, J.; Edidin, M.; Betzig, E. *Thin Solid Films* **1996**, *284-285*, 813-816.
- (84) Discher, B. M.; Schief, W. R.; Vogel, V.; Hall, S. B. *Biophys. J.* **1999**, *77*, 2051-2061.
- (85) Discher, B. M.; Maloney, K. M.; Schief Jr, W. R.; Grainger, D. W.; Vogel, V.; Hall, S. B. *Biophys. J.* **1996**, *71*, 2583-2590.
- (86) Weis, R. M.; McConnell, H. M. *J. Phys. Chem.* **1985**, *89*, 4453-4459.
- (87) Möbius, D. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **1998**, *3*, 137-142.
- (88) Meine, K.; Vollhardt, D.; Weidemann, G. *Langmuir* **1998**, *14*, 1815-1821.
- (89) Weidemann, G.; Brezesinski, G.; Vollhardt, D.; Möhwald, H. *J. Phys. Chem. B* **1998**, *102*, 1224-1228.
- (90) Hénon, S.; Meunier, J. *Rev. Sci. Instrum.* **1991**, *62*, 936-939.

- (91) Meuse, C. W.; Krueger, S.; Majkrzak, C. F.; Dura, J. A.; Fu, J.; Connor, J. T.; Plant, A. L. *Biophys. J.* **1998**, *74*, 1388-1398.
- (92) Tamm, L. K.; McConnell, H. M. *Biophys. J.* **1985**, *47*, 105-113.
- (93) Hui, S. W.; Viswanathan, R.; Zasadzinski, J. A.; Israelachvili, J. N. *Biophys. J.* **1995**, *68*, 171-178.
- (94) Kuhl, T. L.; Leckband, D. E.; Lasic, D. D.; Israelachvili, J. N. *Biophys. J.* **1994**, *66*, 1479-1488.
- (95) Bain, C. D.; Troughton, E. B.; Tao, Y.-T.; Evall, J.; Whitesides, G. M.; Nuzzo, R. G. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 321-335.
- (96) Biebuyck, H. A.; Bain, C. D.; Whitesides, G. M. *Langmuir* **1994**, *10*, 1825-1831.
- (97) Colorado Jr., R.; Villazana, R. J.; Lee, T. R. *Langmuir* **1998**, *14*, 6337-6340.
- (98) McConnell, H. M.; Tamm, L. K.; Weis, R. M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1984**, *81*, 3249-3253.
- (99) Mingotaud, A.-F.; Mingotaud, C.; Patterson, L. K. *Handbook of Monolayers*; Academic Press, Inc.: San Diego, CA, 1993; Vol. 1.
- (100) Girard-Egrot, A. P.; Moréllis, R. M.; Coulet, P. R. *Langmuir* **1996**, *12*, 778-783.
- (101) Kasselouri, A.; Coleman, A. W.; Baszkin, A. *J. Colloid Interface Sci.* **1996**, *180*, 384-397.
- (102) Schief, W. R.; Hall, S. B.; Vogel, V. *Phys. Rev. E* **2000**, *62*, 6831.

- (103) Kasselouri, A.; Coleman, A. W.; Baszkin, A. *J. Colloid Interface Sci.* **1996**, *180*, 384-397.
- (104) Schief, W. R.; Hall, S. B.; Vogel, V. *Phys. Rev. E* **2000**, *62*, 6831.
- (105) Deleu, M.; Nott, K.; Brasseur, R.; Jacques, P.; Thonart, P.; Dufrêne, Y. F. *Biochim. Biophys. Acta* **2001**, *1513*, 55.
- (106) Williams, A. D.; Wilkin, J. M.; Dluhy, R. A. *Colloids Surf., A* **1995**, *102*, 231-245.
- (107) Florin, E.-L.; Gaub, H. E. *Biophys. J.* **1993**, *64*, 375-383.
- (108) Lingler, S.; Rubinstein, I.; Knoll, W.; Offenhäusser, A. *Langmuir* **1997**, *13*, 7085-7091.
- (109) Plant, A. L. *Langmuir* **1993**, *9*, 2764-2767.
- (110) Bassereau, P.; Pincet, F. *Langmuir* **1997**, *13*, 7003-7007.
- (111) Rinia, H. A.; Demel, R. A.; van der Eerden, J. P. J. M.; de Kruijff, B. *Biophys. J.* **1999**, *77*, 1683-1693.
- (112) Bertilsson, L.; Liedberg, B. *Langmuir* **1993**, *9*, 141-149.
- (113) Babcock, K. L.; Prater, C. B. "Beyond Topography," Digital Instruments, 1995.
- (114) Yang, X. M.; Xiao, D.; Xiao, S. J.; Wei, Y. *Appl. Phys. A* **1994**, *59*, 139-143.
- (115) Weidemann, G.; Vollhardt, D. *Colloids Surf., A* **1995**, *100*, 187-202.
- (116) McConlogue, C. W.; Vanderlick, T. K. *Langmuir* **1997**, *13*, 7158-7164.

- (117) Piknova, B.; Schief, W. R.; Vogel, V.; Discher, B. M.; Hall, S. B. *Biophys. J.* **2001**, *81*, 2172-2180.
- (118) Nag, K.; Pao, J.-S.; Harbottle, R. R.; Possmayer, F.; Petersen, N. O.; Bagatolli, L. A. *Biophys. J.* **2002**, *82*, 2041.
- (119) Nag, K.; Boland, C.; Rich, N.; Keough, K. M. W. *Biochim. Biophys. Acta* **1991**, *1068*, 157-160.
- (120) Kane, S. A.; Compton, M.; Wilder, N. *Langmuir* **2000**, *16*, 8447-8455.
- (121) Discher, B. M.; Maloney, K. M.; Grainger, D. W.; Sousa, C. A.; Hall, S. B. *Biochemistry* **1999**, *38*, 374-383.
- (122) Nag, K.; Perez-Gil, J.; Ruano, M. L. F.; Worthman, L. A. D.; Stewart, J.; Casals, C.; Keough, K. M. W. *Biophys. J.* **1998**, *74*, 2983-2995.
- (123) Rice, P. A.; McConnell, H. M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1989**, *86*, 6445-6448.
- (124) Subramaniam, S.; McConnell, H. M. *J. Phys. Chem.* **1987**, *91*, 1715-1718.

Annexe



Atomic force microscopy studies of lateral phase separation in mixed monolayers of dipalmitoylphosphatidylcholine and dilauroylphosphatidylcholine

Jacqueline Sanchez, Antonella Badia*

Department of Chemistry, Université de Montréal, C.P. 6128, succursale Centre-ville, Montreal, Que., Canada H3C 3J7

Received 12 December 2002; received in revised form 17 March 2003; accepted 25 March 2003

Abstract

Atomic force microscopy imaging of dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC)/dilauroylphosphatidylcholine (DLPC) monolayers deposited onto alkanethiol modified-gold surfaces by the Langmuir–Schaefer technique was used to investigate domain formation in a binary system where phase separation arises from a difference in the alkyl chain lengths of the lipids. We have established how the condensed domain structure (shape and size) in DPPC/DLPC monolayers depends on the surface pressure and lipid composition. The mixed monolayers exhibit a positive deviation from an ideal mixing behavior at surface pressures of ≤ 32 mN/m. Lateral compression to pressures greater than the liquid-expanded-to-liquid-condensed (LE-to-LC) phase transition pressure of the mixed monolayer (~ 8 – 16 mN/m) induces extensive separation into condensed DPPC-rich domains and a fluid DLPC matrix. The condensed structures observed at a few mN/m above the LE-to-LC transition pressure resemble those reported for pure DPPC monolayers in the LE/LC co-existence region. At a bilayer equivalence pressure of 32 mN/m and 20 °C, condensed domains exist between $x_{\text{DPPC}} \sim 0.25$ and ~ 0.80 , analogous to aqueous DPPC/DLPC dispersions. Compression from 32 to 40 mN/m results in either a striking distortion of the DPPC domain shape or a break-up of the microscopic DPPC domains into a network of nanoscopic islands (at higher DPPC mol fractions), possibly reflecting a critical mixing behavior. The results of this study provide a fundamental framework for understanding and controlling the formation of lateral domain structures in mixed phospholipid monolayers.

© 2003 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Keywords: Atomic force microscopy; Langmuir–Schaefer films; Monolayers; Segregation

1. Introduction

Planar-supported phospholipid monolayers and bilayers formed by the deposition of Langmuir monolayers onto solid surfaces are commonly used as model systems for studying cell membrane-related phenomena. Interest in these surface-immobilized lipid films (cf. lipid vesicles and black lipid membranes) is driven by their potential integration into biosensor devices [1,2] and the applicability of a wide range of surface analytical techniques (e.g. scanning probe microscopy, ellipsometry, neutron reflectivity, time-of-flight secondary ion mass spectrometry, electrochemical impedance spectroscopy) to resolve the structure and function of biomem-

brane-anchored molecules [3,4]. For example, solid-supported phospholipid films prepared using the Langmuir–Blodgett or Langmuir–Schaefer technique have been used to investigate the formation and structure of lipid microdomains or rafts [5–8], to probe peptide/lipid interactions [9–11], to generate biologically addressable surface patterns [12,13], and to identify the forces which govern cell adhesion processes [14,15].

Of particular relevance to such studies is the growing awareness of the role that lipid phases and phase equilibria play in the partitioning of certain proteins in lipid rafts [16–19], and in the regulation of such processes as enzyme activity [20,21], ion permeability [22], membrane budding and fusion [16,17,19,23], and pulmonary respiration [24]. The influence of lipid phases on membrane phenomena means that the design of biomimetic supported membranes for structural and

*Corresponding author. Tel.: +1-5143437057; fax: +1-5143437586.

E-mail address: [REDACTED]

functional studies and biosensor applications requires both a molecular control over the film structure and a better understanding of domain formation in mixed lipid monolayers and bilayers. Current knowledge of phase co-existence in binary and ternary lipid mixtures comes primarily from phase diagrams constructed from calorimetric and spectroscopic studies of the melting properties of aqueous lipid dispersions [25,26]. Although these equilibrium phase diagrams provide an indication of the degree of lipid miscibility and the temperature-composition region of co-existing ordered and fluid phases, they give no information on the morphology and dynamics of the lipid phase domains themselves. Only very recently have co-existing lipid phase domains been directly visualized by advanced fluorescence microscopy techniques in giant unilamellar vesicles (GUVs) formed from binary phospholipid and ternary phospholipid/cholesterol mixtures [27–32]. The extent to which phase diagrams obtained for hydrated lipid dispersions are applicable to *two-dimensional* (2D) domain formation in Langmuir monolayers and Langmuir–Blodgett or Langmuir–Schaefer films (low-dimensional systems) remains an open question.

In this regard, the formation of condensed phase structures in the two-phase co-existence region of lipid monolayers at the air/water interface have provided a wealth of information on the 2D growth of micrometer domains [33–42]. This is because the molecular density and phase state of these Langmuir monolayers can be determined via surface pressure–area (π – A) isotherms, and readily controlled by varying the area per molecule, subphase temperature and ionic conditions on a Langmuir film balance. Such exquisite control over the lipid molecular area and phase is not possible with bilayer vesicles or solid-supported bilayers formed from lipid vesicle fusion [43].

Even though much has been learned from previous monolayer investigations, they tend to provide a narrow view of the phase behavior of lipid membranes. Single-component monolayers or binary phospholipid/cholesterol mixtures in the gaseous/liquid-expanded (LE) or LE/liquid-condensed (LC) phase co-existence region (i.e. low surface pressure) have been the focus of many of the studies (by epifluorescence microscopy, Brewster angle microscopy or scanning probe microscopy) reported to date. Mimicking lipid bilayers, however, generally requires a much higher monolayer surface pressure (30–35 mN/m) [44]. Furthermore, the shape and size of the condensed phase domains in multi-component lipid films can be influenced by a finite miscibility of the different components in the domains themselves [30,31,45,46] and/or by component mixing at the interface between phases [47–50], a phenomenon that is not present in single-component systems in the phase co-existence region.

By comparison, there have been fewer investigations of phase separation and domain formation in planar lipid monolayers and bilayers composed of lipid mixtures [8,27,51–64]. The compositions and/or surface pressures examined in these have been rather limited. Furthermore, the partitioning of raft markers [5,6,8,51,55] or proteins [65] between the different lipid phases in lipid raft and pulmonary surfactant mixtures have been the focus of recent attention, rather than domain formation per se. Since these mixtures contain different types of lipids, cholesterol, and in the case of pulmonary surfactant, proteins, it is difficult to establish to what degree and how each of these components affects the observed film structure. In general, only a small part of the phase diagrams of mixed lipid monolayers has been explored; other parts may be relevant. There is thus a real need for more *detailed* studies of the 2D phase behavior of simple binary phospholipid and ternary phospholipid/cholesterol mixtures, as well as the lateral distribution of membrane proteins and other guest molecules in these multi-component films. It is particularly important to understand the factors that regulate the formation, structure and dynamics of lipid domains in phase-separated monolayers at the bilayer equivalence pressure.

To this end, we report here the results of π – A isotherm measurements and atomic force microscopy (AFM) investigations of monolayers formed from a binary phospholipid mixture of low miscibility: dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) and dilauroylphosphatidylcholine (DLPC) [26,30–32]. DPPC and DLPC are both saturated dialkylphosphatidylcholines. Phase separation in binary mixtures of saturated phospholipids possessing the same headgroup requires a chain length difference of at least four carbons, and that one of the components be in the gel (solid) state at the temperature studied [23,46,66,67]. The main gel-to-liquid crystalline phase transition temperatures of DPPC (16 carbons) and DLPC (12 carbons) are 41 and -1 °C, respectively [26]. DPPC/DLPC constitutes a convenient system for examining the effects of lipid composition and surface pressure on phase separation at room temperature.

First, the mixing behavior of DPPC and DLPC at the air/water interface was inferred from a thermodynamic analysis of the π – A isotherms acquired for different DPPC/DLPC compositions. AFM was then used to image the morphology of DPPC/DLPC monolayers deposited onto self-assembled alkanethiolate–gold monolayers by the Langmuir–Schaefer technique [68,69] (Fig. 1). The aim of this work is to investigate the effect of surface pressure and lipid composition on the mixed film structure in a system where lateral phase separation arises from a difference in the alkyl chain lengths of the phospholipids. We also seek to understand how the phase properties and transitions in a DPPC/DLPC monolayer are related to those of a pure DPPC

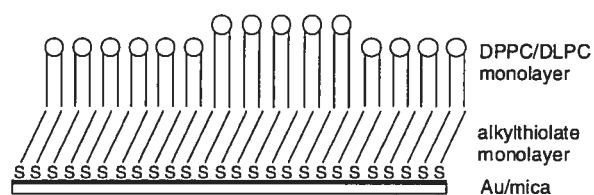


Fig. 1. Schematic drawing of the asymmetric phospholipid/alkanethiolate bilayers investigated in this study. The phospholipid molecules are oriented with the polar headgroups exposed to the water and the alkyl chains towards the underlying hydrophobic surface.

monolayer (well-documented) and DPPC/DLPC lipid bilayer vesicles whose size is similar to that of cells. While the formation of domains enriched in one component has been previously demonstrated for various mixed monolayers, this is a more comprehensive study of the 2D compositional phase diagram.

2. Experimental details

2.1. Materials

DLPC and DPPC were obtained as powders from Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL) and used as received (100% *L*- α -isomer form, chemical purity >99%). 1-Tetradecanethiol ($C_{14}SH$: $CH_3(CH_2)_{13}SH$, chemical purity >98%) was from Fluka. DPPC and DLPC were dissolved in spectrograde chloroform to prepare solutions of 1 mM total lipid concentration. Distilled water was purified with a Milli-Q Gradient System (Millipore, Bedford, MA) to produce deionized water with a resistivity of 18.2 $M\Omega$ cm. Gold shot (99.99%) was purchased from Plasmaterials, Inc. (Livermore, CA). Ruby muscovite mica (ASTM Grade 2) was from B&M Mica Co., Inc. (Flushing, NY).

2.2. Surface pressure–area measurements

DPPC, DLPC and DPPC/DLPC solutions (100 μ l) were spread on the water surface (area = 768 cm^2) of a KSV 3000 Langmuir–Blodgett trough (KSV Instruments, Finland) thermostatted at 20 ± 0.5 °C. Following solvent evaporation (20 min), the phospholipid monolayers were symmetrically compressed at a rate of 1 \AA^2 /molecule/min. The surface pressure was measured with a precision of 0.1 mN/m using a Wilhelmy balance and a platinum plate. Each π -*A* measurement was repeated at least once, and at a given surface pressure, the difference in the molecular area between isotherms was ≤ 0.6 \AA^2 /molecule.

2.3. Langmuir–Schaefer film deposition

DPPC, DLPC and DPPC/DLPC monolayers were transferred from the air/water interface onto a $C_{14}SH$ -

modified Au substrate at 20 °C using the Langmuir–Schaefer technique [69]. The phospholipids were first compressed to the target surface pressure at 1 \AA^2 /molecule/min, unless otherwise specified. After barrier and pressure stabilization (30 min, unless otherwise specified), the phospholipid monolayer was deposited onto $C_{14}S$ -Au by pushing (at a rate of 5 mm/min) the hydrophobic substrate (oriented parallel to the water surface) horizontally through the air/water interface and into the aqueous subphase while maintaining a constant surface pressure. The resulting hybrid bilayer was transferred under water from the Langmuir–Blodgett trough to the home-built, Teflon liquid cell used for AFM imaging.

$C_{14}SH$ -modified Au substrates were prepared as follows. Au was deposited at a rate of ~ 0.1 nm/s onto freshly cleaved mica sheets (2.5×3.5 cm^2) to a final thickness of 100 nm using a VE-90 thermal evaporator equipped with a quartz crystal deposition monitor (Thermionics Vacuum Products, Port Townsend, WA). Au evaporation was carried out without substrate heating at a base pressure of $< 1 \times 10^{-7}$ Torr. Following evaporation, the Au-covered mica sheets were immediately incubated in a 1 mM solution of $C_{14}SH$ in ethanol for at least 3 h [70]. After thiol self-assembly, the substrates were removed from solution, rinsed copiously with pure ethanol, blown dry with nitrogen gas, and stored in air in a clean glass Petri-dish until further use. A tetradecanethiolate film thickness of 1.6 ± 0.1 nm was measured by null ellipsometry (Multiskop, Optrel) using a refractive index of 1.45 for the monolayer, in accordance with previously reported values [71,72]. A static water contact angle of $106 \pm 5^\circ$ was obtained, indicative of the hydrophobic nature of the $C_{14}S$ -Au substrates. AFM imaging revealed the root mean squared (RMS) roughness of the bare Au and $C_{14}S$ -Au surfaces to be ~ 2.1 nm for an area of 5×5 μm^2 .

2.4. AFM imaging

The hybrid phospholipid/ $C_{14}S$ -Au bilayers were imaged in Milli-Q water at room temperature using a Dimension 3100 scanning probe microscope with Nanoscope IIIa controller (Digital Instruments, Santa Barbara, CA). Height and phase contrast images were acquired in tapping mode at scan rates of 0.5–1.0 Hz. Oxide-sharpened silicon nitride cantilevers with a nominal spring constant of 0.12 N/m and resonance frequency of ~ 8 kHz (in liquid) were used. The drive amplitude was 2000–3000 mV with a damping of 50–70% of the free oscillation amplitude. For each lipid composition and surface pressure, images were obtained from 2 or 3 independently prepared samples, and several macroscopically separated areas were imaged on each sample. Representative images are presented. To determine the area fraction occupied by the thicker domains of more

positive phase shift, image analysis was carried out on several $100 \times 100 \mu\text{m}^2$ or $50 \times 50 \mu\text{m}^2$ areas of phase images using the bearing analysis routine in the Digital Instruments software.

2.5. Evaluation of the extent of component miscibility

The extent of interaction and miscibility of DPPC and DLPC in mixed monolayers was analysed using the additivity rule, the excess free energy of mixing, and the surface phase rule.

The area of a two-component monolayer at a given surface pressure can be compared with that of the pure components at the same surface pressure [73,74]:

$$\bar{A} = x_1 A_1 + x_2 A_2 \quad (1)$$

where \bar{A} is the mean molecular area of the two-component film, x_1 and x_2 are the mol fraction of components 1 and 2 in the mixed film, and A_1 and A_2 are the molecular areas of 1 and 2 in pure monolayers. The additivity rule predicts the molecular area in an ideal binary mixture, assuming no chemical or physical interactions between components. Both ideal mixed systems and completely immiscible systems obey Eq. (1) [75]. Interactions between components can lead to molecular areas that are substantially different from those predicted by the additivity rule, and any deviation of the $\bar{A} - x_{(1 \text{ or } 2)}$ plot from ideality provides evidence for partial miscibility in the film [73,74,76].

For two components to form a true mixed film, rather than a phase separated one at a given surface pressure, the free energy of mixing must be negative [73]. The experimentally measured $\pi - A$ isotherms were used to calculate the excess free energy of mixing (ΔG_{ex}) of the binary DPPC/DLPC mixtures at different surface pressures [73,76]. If we assume that the two components in a mixed monolayer are miscible and behave ideally in the limit of zero surface pressure, then

$$\Delta G_{\text{ex}} = \int_0^\pi (\bar{A} - x_1 A_1 - x_2 A_2) d\pi \quad (2)$$

If $\Delta G_{\text{ex}} = 0$, the mixing is ideal. Positive values of ΔG_{ex} indicate that the interactions between the two components are weaker than the interactions between the pure component molecules. That is, at least one component has the tendency to self-associate to form 2D aggregates [76]. Negative ΔG_{ex} values point to the existence of a mutual attraction between the monolayer-forming components.

Another widely used method of establishing the miscibility (or immiscibility) of film components is the surface phase rule developed by Crisp [73,74]. If the temperature and external pressure are kept constant, then

the number of degrees of freedom F of the monolayer system is given by the equation:

$$F = C^{\text{B}} + C^{\text{S}} - P^{\text{B}} - q + 1 \quad (3)$$

where C^{B} is the number of components in the bulk, C^{S} is the number of components confined to the surface, P^{B} is the number of bulk phases, and q is the number of monolayer phases in equilibrium with one another [73,74]. For a two-component monolayer at the air/water interface, $C^{\text{B}} = 2$ (air and water), $C^{\text{S}} = 2$ (components 1 and 2), and $P^{\text{B}} = 2$ (gas and liquid), thus

$$F = 3 - q \quad (4)$$

Although the surface phase rule should, in principle, be applied to the equilibrium spreading pressure of a monolayer, it is more often applied to the film collapse pressure [74] or to a phase transition pressure (LE-to-LC phase transition) [76]. If the two components are miscible, two homogeneous phases (either LE and LC or condensed and collapsed state) will be present in equilibrium with each other ($q = 2$) and the system has 1 degree of freedom. Either the collapse pressure or the transition surface pressure will vary with the monolayer composition. If, on the other hand, the monolayer components are immiscible, three equilibrium surface phases ($q = 3$) will co-exist and there will be zero independent variables. In this case, the transition pressure will be constant and independent of the monolayer composition [76].

The extent to which the condensed phase observed by AFM contains DPPC was determined using the following relationship [77]:

$$\varphi_e \bar{A} = (1 - \varphi_c) \bar{A} = \bar{A}_e \frac{(x_c^i - x^i)}{(x_c^i - x_e^i)} \quad (5)$$

where φ_e and φ_c are the area fractions of the AFM image occupied by the expanded and condensed phases, \bar{A}_e is the mean molecular area within the expanded phase, x^i is the total mol fraction of component i in the mixed monolayer, while x_c^i and x_e^i are the mol fractions of i in the condensed and expanded phases, respectively. According to Eq. (5), a plot of $\varphi_e \bar{A}$ vs. x^i will have a slope of $-\bar{A}_e / (x_c^i - x_e^i)$ and a y -intercept of $\bar{A}_e x_c^i / (x_c^i - x_e^i)$. The ratio of $-(y\text{-intercept}/\text{slope})$ gives x_c^i at a given surface pressure.

The mean molecular area of the expanded DLPC phase at a given surface pressure was calculated using the equation [78,79]:

$$\bar{A}_e = \bar{A} \frac{(1 - \varphi_c)}{(1 - \varphi_c (\bar{A} / \bar{A}_c))} \quad (6)$$

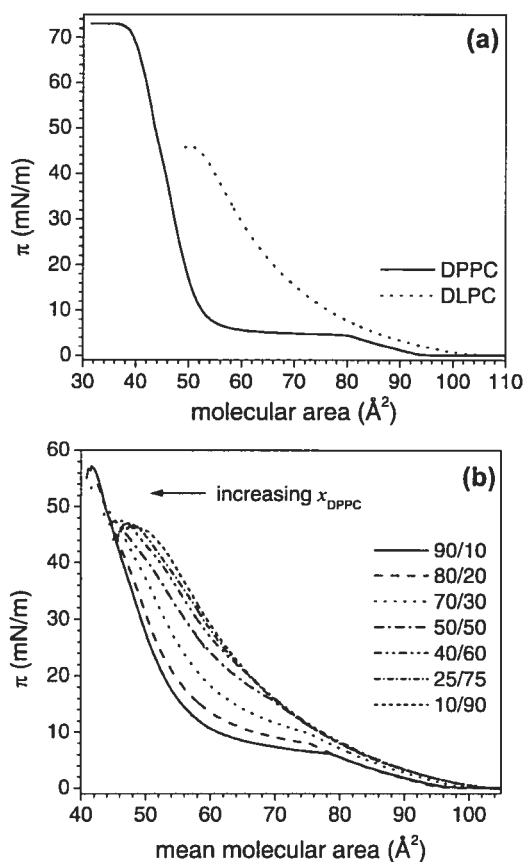


Fig. 2. π - A isotherms for (a) DPPC and DLPC and (b) DPPC/DLPC mixtures at 20 °C. For clarity of presentation, only some of the DPPC/DLPC isotherms recorded are presented in (b).

3. Results

3.1. Surface pressure–area isotherms

The π - A isotherms (20 °C) for DPPC and DLPC monolayers at the air/water interface are presented in Fig. 2a. The isotherms for the pure phospholipids resemble those previously published [80–82]. The plateau observed at $\pi \approx 4$ –5 mN/m in the DPPC isotherm corresponds to a LE-to-LC phase transition [69,80,83]. The mean limiting area found, $53.2 \pm 0.2 \text{ \AA}^2/\text{molecule}$, is in agreement with literature results [80,82]. Above 20 mN/m, the DPPC monolayer is in a solid-condensed (SC) phase [69,83]. By contrast, DLPC exhibits an isotherm characteristic of a LE (fluid) state at all surface pressures below the film collapse. This is not surprising given that the DLPC monolayer was compressed at a temperature (20 °C) well above its chain melting phase transition temperature (-1 °C) [26]. At the film deposition pressure of 32 mN/m, DPPC and DLPC occupy an area/molecule of $47.1 \pm 0.1 \text{ \AA}^2$ and $58.5 \pm 0.2 \text{ \AA}^2$, respectively, and their surface compressional moduli

[73], determined from the slope of the π - A isotherms, are $259 \pm 5 \text{ mN/m}$ (DPPC) and $112 \pm 6 \text{ mN/m}$ (DLPC). These values indicate that DPPC is stiffer in the horizontal plane than DLPC. Under our conditions of temperature and compression, the collapse pressures of DPPC and DLPC are 73 mN/m [65,84–87] and 46 mN/m, respectively.

The π - A isotherms for binary mixtures of DPPC and DLPC at 20 °C are shown in Fig. 2b. The isotherms of the mixed films fall between those of the two pure phospholipid monolayers. The DPPC/DLPC film becomes more expanded with increasing mol fraction of DLPC (x_{DLPC}). In binary mixtures containing $x_{\text{DLPC}} \geq 0.5$, the film collapse pressure remains relatively constant at 46–47 mN/m, while for $x_{\text{DLPC}} < 0.5$, there is a gradual increase of the collapse pressure with decreasing DLPC mol fraction (Fig. 3a). The constant collapse pressure value observed for $x_{\text{DLPC}} \geq 0.5$ might indicate that DPPC and DLPC are not miscible in the condensed phase above this DLPC mol fraction. This is the first indicator of a possible phase-separated state in DPPC/DLPC monolayers. Only the isotherms of mixed

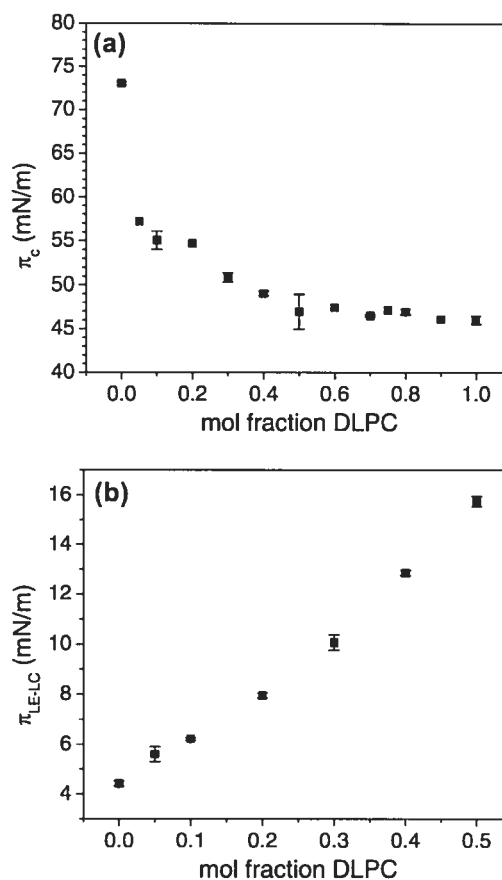


Fig. 3. Variation of the (a) collapse pressure (π_c) and (b) LE-to-LC transition pressure ($\pi_{\text{LE-LC}}$) with composition in DPPC/DLPC Langmuir monolayers at 20 °C.

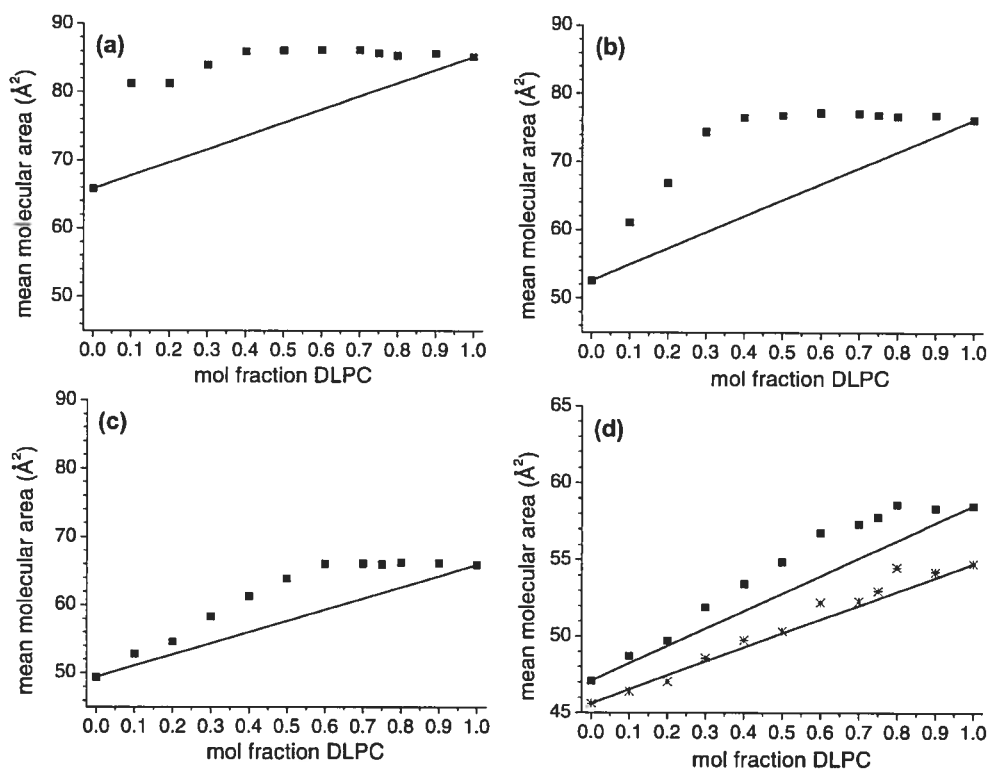


Fig. 4. Plots of the DPPC/DLPC mean molecular areas vs. DLPC mol fraction for surface pressures of: (a) 5 mN/m; (b) 10 mN/m; (c) 20 mN/m and (d) 32 mN/m—square; 40 mN/m—cross. Solid lines represent the molecular areas (\bar{A}) calculated using the additivity rule (Eq. (1)).

monolayers with $x_{\text{DLPC}} \leq 0.50$ exhibit a distinct kink or shoulder indicative of a LE-to-LC phase transition. This shoulder becomes less pronounced as x_{DLPC} increases. Moreover, the surface pressure associated with the LE-to-LC transition ($\pi_{\text{LE-LC}}$) increases with increasing x_{DLPC} (Fig. 3b). The fact that the transition pressure varies with the monolayer composition suggests that DPPC and DLPC are at least partially miscible at the air/water interface up to the LE-to-LC transition [76]. This would be consistent with increasing amounts of DLPC (i.e. an LE phase forming phospholipid) stabilizing the LE phase of DPPC. Monolayer compression to higher surface pressures (cf. pure DPPC) would, therefore, be required to condense the DPPC.

Fig. 4 shows how the mean molecular area of the DPPC/DLPC monolayer varies as a function of x_{DLPC} at different π values. At $\pi = 5, 10$ and 20 mN/m, a marked positive deviation from the additivity rule is observed at all compositions. The magnitude of this deviation decreases with increasing surface pressure (32 mN/m) and at 40 mN/m, the molecular area values fall on the calculated line. The positive deviation from the additivity rule at $\pi \leq 32$ mN/m indicates that DPPC and DLPC are neither ideally miscible nor completely immiscible at these surface pressures. Film compression

to 40 mN/m could result in either ideal mixing or the complete segregation of DPPC and DLPC.

A thermodynamic analysis of the DPPC/DLPC π - A isotherms was used to distinguish between these two possibilities. Fig. 5 presents the ΔG_{ex} values calculated

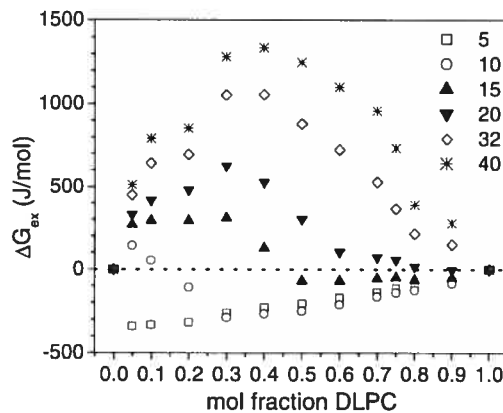


Fig. 5. Excess free energy of mixing (ΔG_{ex}) as a function of the DLPC mol fraction for different surface pressure values (indicated in mN/m inside the graph). The ΔG_{ex} values were determined by integration of the DPPC/DLPC π - A isotherms from $\pi = 0$ mN/m to the desired surface pressure (Eq. (2)).

for the binary mixtures at several π values. At low surface pressures (5 and 10 mN/m), negative or near zero values of ΔG_{ex} are obtained at all the phospholipid compositions studied, pointing towards mixing of DPPC and DLPC at these pressures. The positive deviations from ideal mixing ($\Delta G_{\text{ex}}=0$ J/mol) observed at $\pi=15$ – 40 mN/m point to a phase-separated monolayer state, and suggest that film compression to higher surface pressures induces lateral phase separation [88]. For a given DPPC/DLPC composition, the excess free energy of mixing becomes increasingly positive as the mixed monolayer is compressed to higher surface pressures, with the largest values of ΔG_{ex} obtained for $x_{\text{DLPC}} \approx 0.3$ – 0.5 at 32 and 40 mN/m.

3.2. AFM imaging of Langmuir–Schaefer films

The morphology of DPPC/DLPC Langmuir monolayers of different compositions was investigated by AFM imaging in water of the corresponding Langmuir–Schaefer films. The Langmuir–Schaefer (horizontal) technique was used in order to minimize distortions of the domain structures present at the air/water interface during deposition onto solid substrate [80,89]. Furthermore, a chemisorbed alkanethiolate monolayer was used as the hydrophobic support, instead of a SC phospholipid monolayer [51,61], to prevent the possible exchange of phospholipids between the top and bottom layers. The Langmuir films were transferred onto C_{14}S –Au substrates at a bilayer equivalence surface pressure of 32 mN/m [44]. Lower and higher deposition pressures were also used to investigate the effect of the surface pressure on the film morphology and lateral phase separation.

An AFM topography image of a DPPC/DLPC (0.50/0.50) monolayer transferred at 32 mN/m is shown in Fig. 6a. Thicker flower-like domains (light gray) are observed. Numerous smaller domains are also clearly visible in the background matrix (Fig. 6a). The corresponding phase image (Fig. 6b) indicates that the thicker domains exhibit a more positive phase shift (light gray) compared to the surrounding matrix (darker gray) [90]. By comparison, the surfaces of pure DPPC and DLPC monolayers deposited onto C_{14}S –Au at 32 mN/m do not exhibit any phospholipid domain structures (Fig. 7).

Due to the roughness of the underlying Au surface (Fig. 7a and c), a better contrast was *usually* obtained in the phase mode compared to the height mode. Phase imaging is an extension of tapping mode AFM that involves monitoring the phase lag of the cantilever oscillation relative to the signal that drives the cantilever to oscillate. The phase mode is particularly useful for differentiating between component phases of composite materials that are not apparent in topography imaging [91]. For this reason, phase images are presented from hereon for DPPC/DLPC/ C_{14}S –Au.

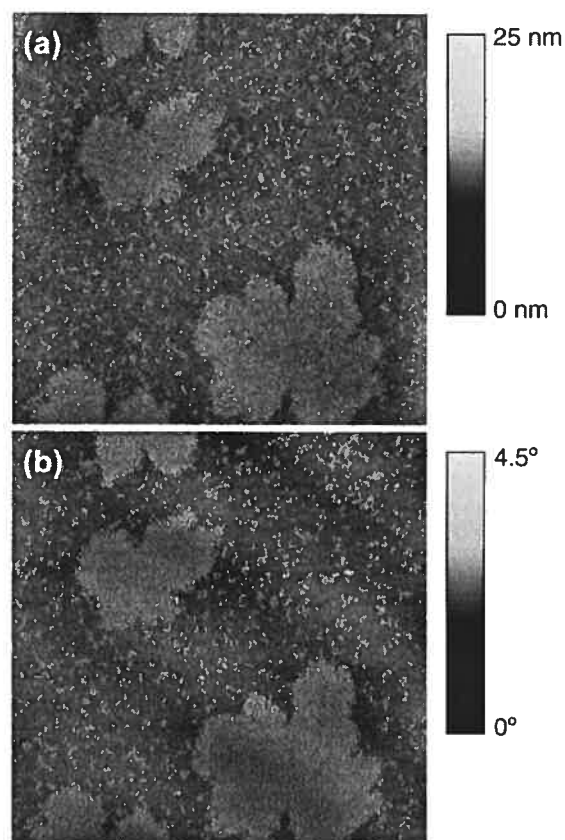


Fig. 6. Tapping mode AFM images for a DPPC/DLPC (0.50/0.50 mol/mol) monolayer deposited onto C_{14}S –Au surface at 32 mN/m: (a) height or topography and (b) phase. Image size = $100 \times 100 \mu\text{m}^2$. A z-scale is shown to the left of each image.

3.3. DPPC/DLPC monolayers of varying composition deposited at $\pi=32$ mN/m

Fig. 8 shows AFM images for monolayers of different DPPC/DLPC compositions. Phase separation is observed beginning at $x_{\text{DPPC}}=0.25$ and manifests itself as thicker domains (in height mode) of larger phase shift (in phase mode) surrounded by a matrix of lower phase shift. The size of the domains increases from several microns at $x_{\text{DPPC}}=0.25$ to $\sim 60 \mu\text{m}$ at $x_{\text{DPPC}}=0.70$, although a distribution of domain sizes was commonly observed for each monolayer (e.g. Fig. 8b). The domain shape also varies with composition: irregularly-shaped domains are observed at $x_{\text{DPPC}}=0.25$, flower-like domains exist at $x_{\text{DPPC}}=0.375$ – 0.625 , and serpentine domains are present at $x_{\text{DPPC}}=0.70$. A large number of smaller islands are clearly visible among the larger domains for DPPC mol fractions of 0.375–0.80 (Fig. 8b–e). At $x_{\text{DPPC}}=0.80$ (Fig. 8e), the domains become inter-connected. Finally, the monolayer is largely in one phase at $x_{\text{DPPC}}=0.90$ (Fig. 8f), although patches of a second phase exist amidst the continuous phase.

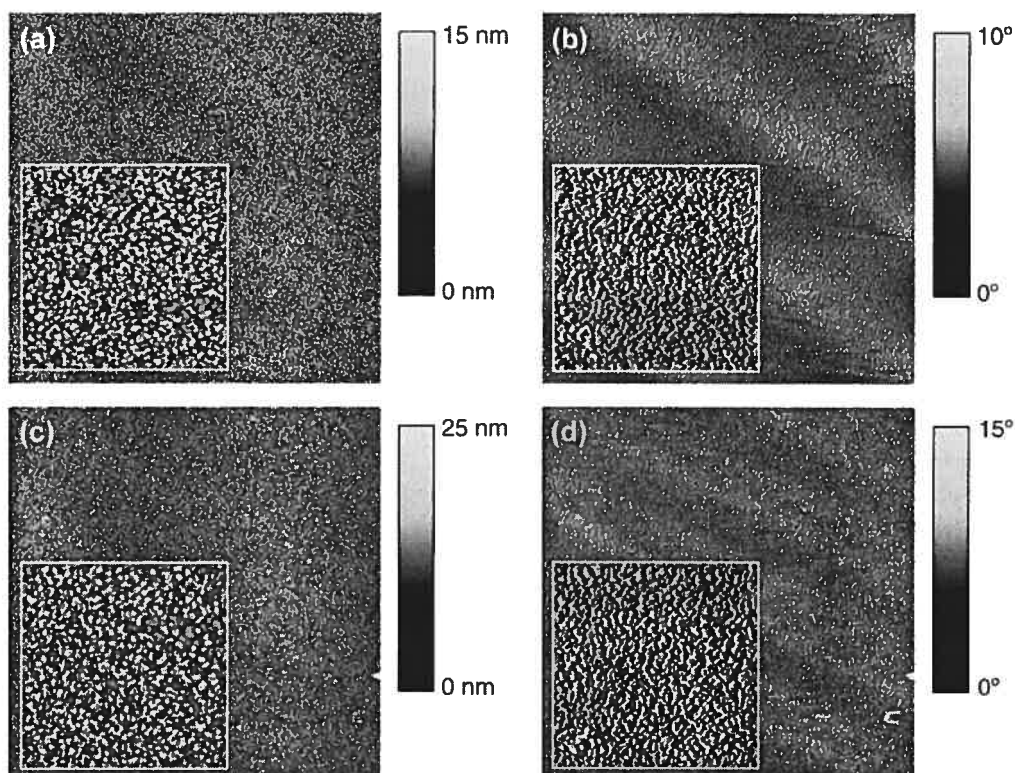


Fig. 7. Tapping mode AFM phase images for DLPC (a, height and b, phase) and DPPC (c, height and d, phase) monolayers transferred onto $C_{14}S$ -Au at 32 mN/m. Image size = $25 \times 25 \mu\text{m}^2$. Insets are higher magnification images ($5 \times 5 \mu\text{m}^2$). The height and phase images of bare and $C_{14}SH$ -modified gold resemble those of DPPC and DLPC.

The domain sizes and shapes did not visibly change over a few days in water at room temperature.

3.4. Domain composition

At a surface pressure of 32 mN/m, DPPC exists in a SC phase [69,83] and DLPC in a LE state (Fig. 2a). Based on the evidence presented below, the thicker domains of more positive phase shift observed at a deposition pressure of 32 mN/m have been assigned to a condensed DPPC-rich phase and the surrounding matrix to a LE DLPC-rich phase (Figs. 6 and 8). First, solid-like monolayer domains of DPPC are expected to be 0.85 nm thicker than fluid DLPC domains based on half the bilayer thicknesses measured by X-ray diffraction for the lamellar phases of DPPC and DLPC at 25 °C [26]. In our case, approximately 2.1 nm RMS roughness of the underlying $C_{14}S$ -Au substrate precludes any accurate measurement of the step-height difference between the thicker DPPC and lower DLPC phases [92]. Second, the area fraction of the thicker phase increases linearly with increasing DPPC mol fraction (for $x_{\text{DPPC}} = 0.25$ –0.80), as would be expected if the thicker phase was DPPC. There is, in fact, a 1:1 correlation between the area fraction covered by the

thicker domains in the AFM images and the area fraction of DPPC in the mixed film calculated using molecular areas of 47.1 \AA^2 for DPPC and 58.5 \AA^2 for DLPC at 32 mN/m (Fig. 9a). From the plot of the LE phase area vs. x_{DPPC} (Fig. 9b), a value of $99 \pm 4\%$ was obtained for the DPPC content of the thicker phase.

3.5. Effect of the film compression speed on the domain shape and size

DPPC/DLPC (0.50/0.50) monolayers were compressed to 32 mN/m at different rates (0.5 – $2.5 \text{ \AA}^2/\text{molecule}/\text{min}$). The shape and average size of the DPPC domains are essentially the same for all the compression rates (Figs. 6 and 10). However, smoother rounded edges appear at higher compression speed and rougher jagged edges result from a lower compression rate, in contrast to the behavior reported for single-component lipid monolayers in the LE/LC co-existence region [93,94]. Smaller aggregates were observed between the larger domains at all the compression rates studied.

3.6. Effect of the surface pressure on domain formation

At low surface pressure (10 mN/m), there are a large number of small domains that are a few microns in size

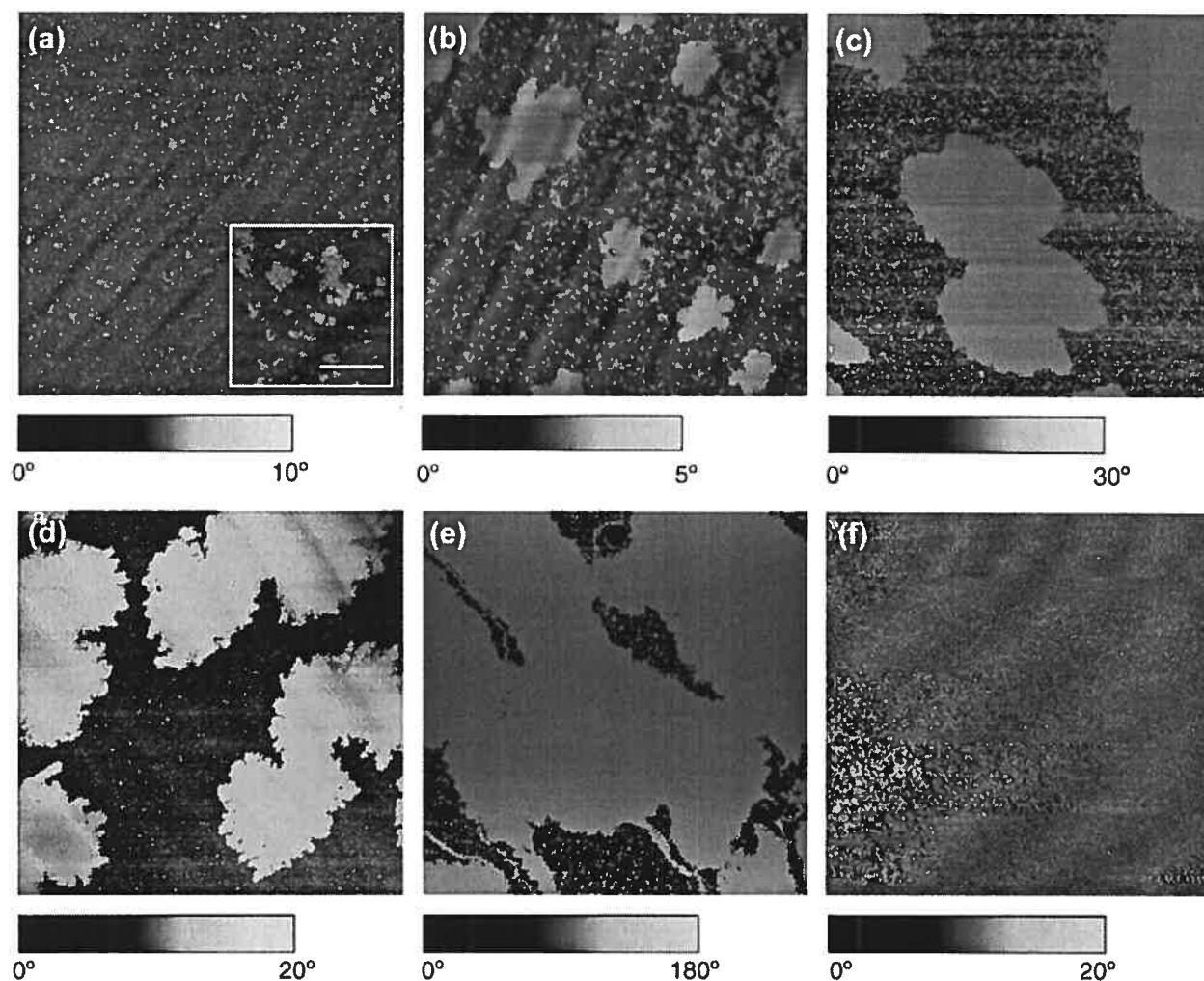


Fig. 8. AFM phase images for DPPC/DLPC monolayers transferred onto $C_{14}S$ -Au at 32 mN/m. DPPC mol fraction: (a) 0.25; (b) 0.375; (c) 0.625; (d) 0.70; (e) 0.80 and (f) 0.90. Image size = $100 \times 100 \mu\text{m}^2$. The inset in (a) is a higher magnification image (scale bar = $5 \mu\text{m}$).

in the 0.50/0.50 DPPC/DLPC monolayer (Fig. 11a). These thicker domains of more positive phase shift cover $16 \pm 3\%$ of the total surface area, which is significantly lower than that would be expected (41%) if all the DPPC molecules were found in these domains [95]. This means that at a surface pressure of 10 mN/m, some of the DPPC molecules are in the lower DLPC-rich phase. At 15 mN/m (Fig. 11b), close to the LE-to-LC phase transition pressure (15.7 mN/m) of a 0.50/0.50 DPPC/DLPC monolayer, a few larger domains ($\sim 10 \mu\text{m}$ in size) are dispersed among a large population of smaller ones (Fig. 11b, inset). The total surface area covered by the domains ($30 \pm 5\%$) at 15 mN/m is greater than the area occupied at 10 mN/m, but is still lower than that expected (42%) based on the area/molecule of DPPC at 15 mN/m. At a deposition pressure of 20 mN/m (Fig. 11c), multi-lobed and kidney bean-shaped domains [96], 25–60 μm in size, are

observed. The total surface area occupied by these domains is now $43 \pm 2\%$, which is the percentage of area fraction expected (43%) if all of the DPPC was in the thicker condensed phase. A similar transition between submicroscopic domains at $\pi = 10$ mN/m to larger multi-lobed domains at $\pi = 15$ mN/m was observed for the 0.70/0.30 DPPC/DLPC mixture ($\pi_{LE-LC} = 10.1$ mN/m). As already noted, flower-like domains (typically 25–50 μm in size) exist at 32 mN/m (Fig. 11d) for 0.50/0.50 DPPC/DLPC. Further compression to 40 mN/m produces radially dendritic structures, some of which contain near-circular centers (Fig. 11e). The total surface area occupied by these domains ($42 \pm 4\%$) is still close to the expected value (46%). The effect of film compression to 40 mN/m on the shape of the DPPC-rich domains for binary mixtures of 0.375 and 0.625 mol fraction of DPPC was also investigated (Fig. 12). The domains in the monolayer

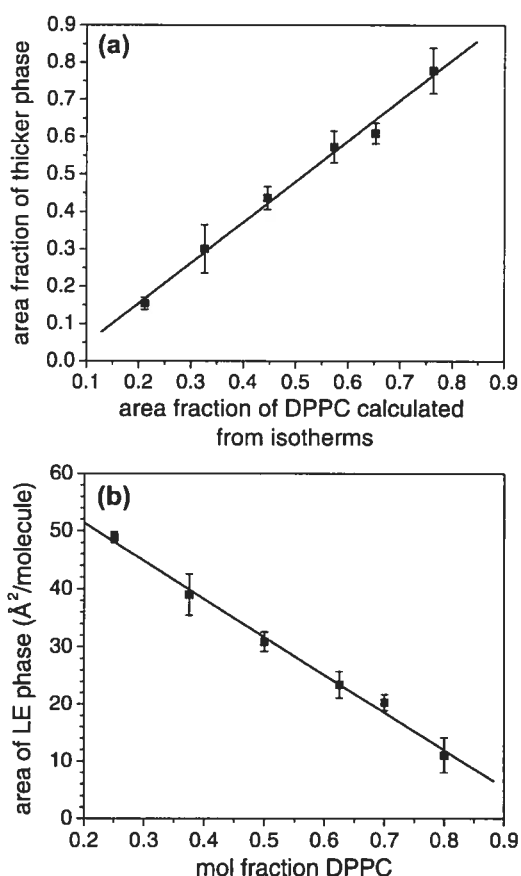


Fig. 9. (a) Area fraction of the thicker domains observed by AFM in the Langmuir–Schaefer films vs. area fraction occupied by DPPC in the corresponding Langmuir monolayers (calculated using the molecular areas of DPPC and DLPC and their mol fractions in the mixed films) at $\pi = 32$ mN/m. (b) Plot of the area of the LE phase vs. the DPPC mol fraction in DPPC/DLPC monolayers at $\pi = 32$ mN/m (Eq. (5)). The area of the LE phase for each composition was calculated from the product of $(1 - \varphi_c)$ and the mean molecular area of the mixed monolayer (\bar{A}) obtained from the π - A isotherms. The area fraction occupied by the thicker phase in the AFM images was used for φ_c . Error bars represent standard deviations. The lines represent the linear least squares fit to the data. (a) Slope = 1.08, correlation coefficient $r = 0.996$; (b) correlation coefficient $r = 0.998$.

containing 0.375 mol fraction adopted a more dendritic-like shape (Fig. 8b vs. Fig. 12a). By contrast, compressing the monolayer with 0.625 mol fraction of DPPC to 40 mN/m led to the disappearance of the large flower-like domains (Fig. 8c) and the appearance of densely packed, nanoscopic islands (Fig. 12b, inset).

4. Discussion

At surface pressures of ≤ 32 mN/m, DPPC and DLPC form non-ideal mixtures that exhibit positive deviations from ideality (Fig. 4). The variation of the LE-to-LC transition pressure with the monolayer composition (Fig.

3b) indicates that DPPC and DLPC are miscible in the LE phase. The excess free energy of mixing becomes increasingly positive as the mixed films are compressed to higher surface pressures (Fig. 5), suggesting a *continuous* increase in the extent of phase separation with increasing surface pressure [88]. Our AFM images, however, reveal that lateral compression of DPPC/DLPC monolayers initially induces phase separation, but that the phases become miscible once again at higher surface pressures. These results illustrate the limitations of elucidating the miscibility properties and phase behavior of mixed phospholipid monolayers by the traditional analysis of π - A isotherms alone [88].

AFM imaging was used to probe the details of the phase structure of DPPC/DLPC monolayer films and to put the results of the Langmuir isotherm analysis into context. The phase morphology observed at a deposition pressure of 32 mN/m will be discussed first and compared with the domain structures observed in vesicle

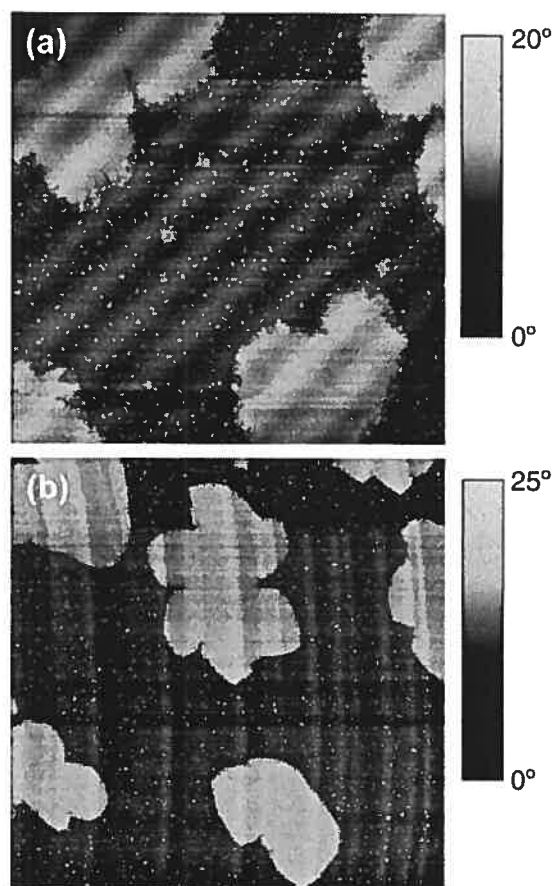


Fig. 10. Effect of the film compression speed (up to 32 mN/m) on the domain morphology of a DPPC/DLPC (0.50/0.50) monolayer: (a) $0.5 \text{ \AA}^2/\text{molecule}/\text{min}$ and (b) $2.5 \text{ \AA}^2/\text{molecule}/\text{min}$. Monolayers were transferred onto $\text{C}_{14}\text{S-Au}$ after 30 min at $\pi = 32$ mN/m. Image size = $100 \times 100 \text{ \mu m}^2$.

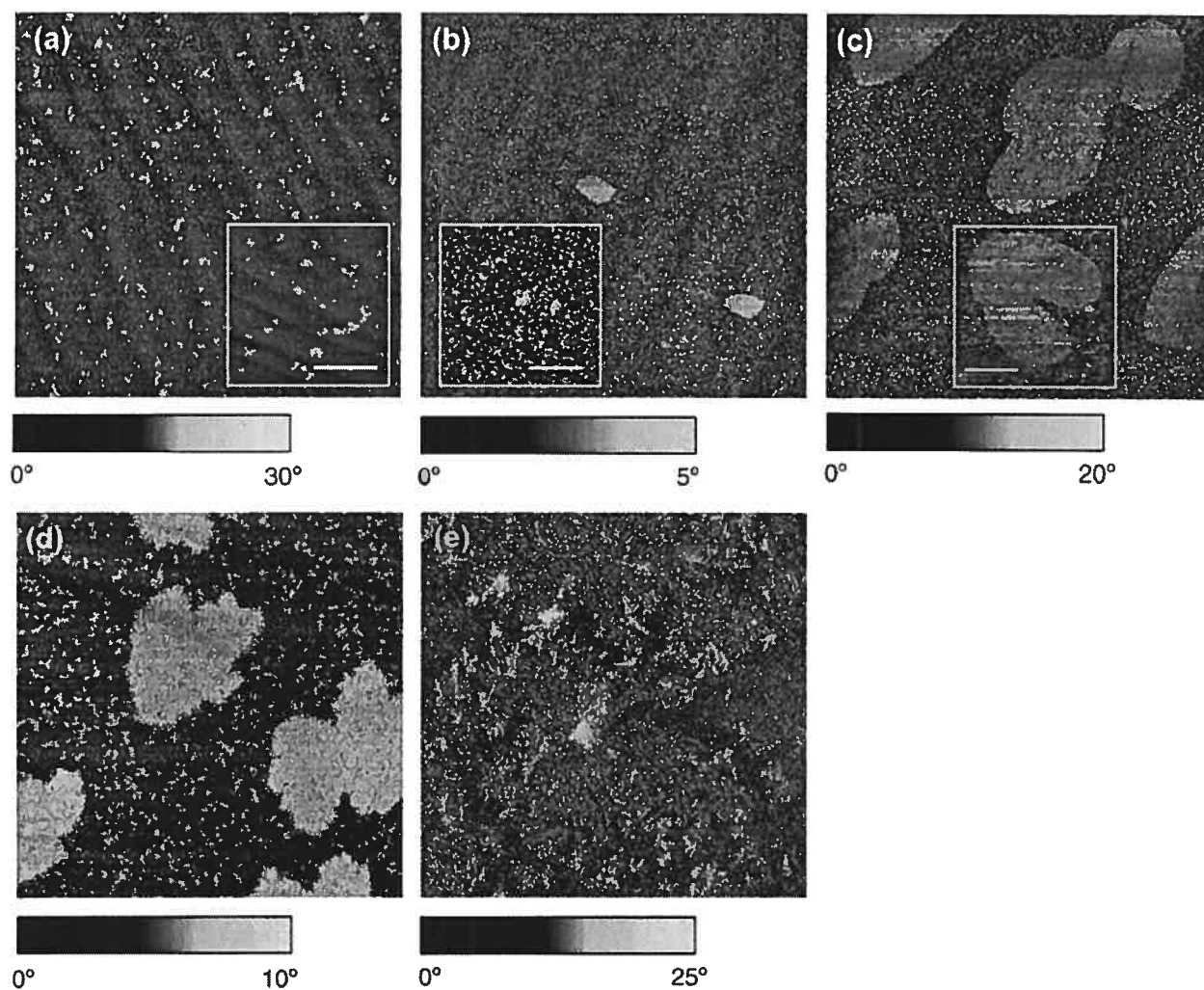


Fig. 11. AFM phase images for DPPC/DLPC (0.50/0.50) monolayers transferred onto $C_{14}S$ -Au at a surface pressure of (a) 10 mN/m; (b) 15 mN/m; (c) 20 mN/m; (d) 32 mN/m and (e) 40 mN/m. Image size = $100 \times 100 \mu\text{m}^2$. The insets in (a)–(c) are higher magnification images. Inset scale bar: (a) $10 \mu\text{m}$; (b) $5 \mu\text{m}$ and (c) $10 \mu\text{m}$.

bilayers and other DPPC containing monolayers. The effect of the surface pressure on the mixed monolayer morphology will then be considered.

Films deposited at 32 mN/m were found to exhibit extensive lateral separation into condensed DPPC-rich domains and a liquid-like DLPC-rich matrix. Multilamellar aqueous dispersions [45,66,97] and GUVs [29,32] formed from binary mixtures of these two phospholipids exhibit a region of solid/fluid phase coexistence between $x_{\text{DPPC}} \sim 0.25$ – 0.35 and $x_{\text{DPPC}} \sim 0.80$ – 0.85 at $T = 20$ – 25°C . The AFM images presented herein for mixed DPPC/DLPC monolayers (Fig. 8) are consistent with this phase behavior.

The positive deviation from the mean molecular areas calculated using the additivity rule (Fig. 4d) suggests that there is partial miscibility of DPPC and DLPC in the phase-separated monolayers at 32 mN/m. Related

to this, the phase diagram of DPPC/DLPC multilamellar vesicles derived from calorimetry [66] and IR [97] data show that the onset chain melting temperature of DLPC remains essentially constant up to $x_{\text{DPPC}} \approx 0.60$, while that for DPPC varies with composition. This indicates that in its gel phase, DPPC is only slightly soluble in DLPC, while DLPC is significantly more miscible with DPPC. The same conclusion was reached by Mabrey and Sturtevant [46] for the binary system of DLPC and distearoylphosphatidylcholine (DSPC, 18 carbon chain). Fluorescence measurements of multilamellar vesicles [45] and two-photon fluorescence microscopy studies of GUVs [30,31] have also shown that the co-existing solid and fluid domains observed in DPPC/DLPC mixtures do not possess pure gel and liquid-crystalline phase characteristics. The difference in fluorescence properties between the co-existing solid and fluid domains in

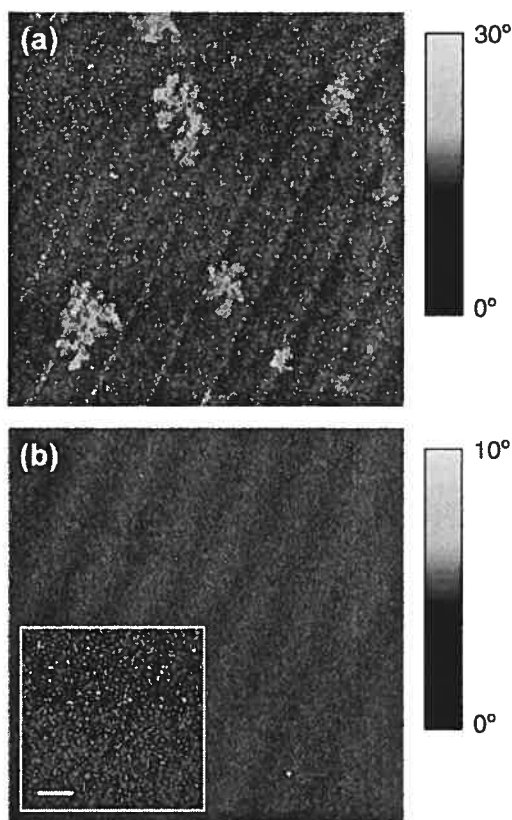


Fig. 12. AFM phase images for DPPC/DLPC monolayers transferred onto $C_{14}S$ -Au after 30 min at 40 mN/m and 20 °C. DPPC mol fraction: (a) 0.375 and (b) 0.625. Image size = $100 \times 100 \mu\text{m}^2$. The inset in (b) is a higher magnification image (scale bar = $2 \mu\text{m}$).

DPPC/DLPC vesicles and the corresponding phases in single-component vesicles has been attributed to the presence of some DLPC in the solid DPPC domains and the possible presence of DPPC in the fluid DLPC phase [30,31,45]. In the case of the mixed monolayers studied here, the presence of DLPC molecules in the DPPC phase would be expected to induce some disorder, resulting in a more expanded state (cf. pure SC DPPC). The amount of DLPC present in the condensed DPPC domains is, however, small at 32 mN/m, given that the extent of film expansion ranges from 1 to 5% (cf. ideal DPPC/DLPC mixtures) at this surface pressure, and that the total area of the thicker domains (for $x_{\text{DPPC}} = 0.25$ – 0.80) is comparable to the values expected if the domains were pure DPPC (Fig. 9a). In fact, the DPPC content of the thicker domains is estimated to be 99%.

DPPC-rich filament-shaped domains have been observed by fluorescence microscopy for GUVs of DPPC/DLPC mixtures in the phase co-existence region [29–32]. By comparison, we have found that the condensed (DPPC) domain shape and size in the DPPC/DLPC monolayer varies with the phospholipid composition (Fig. 8), and with the surface pressure for

a given composition (Fig. 11). Flower-like and serpentine domains were observed at 32 mN/m. Similar shapes have been observed at the air/water interface ($\pi \geq 30$ mN/m) by epifluorescence microscopy for mixtures of DPPC and dioleoylphosphatidylcholine (DOPC), an unsaturated fluid-phase forming lipid [64]. Flower-like, DPPC-rich domains also form in monolayers of pulmonary surfactant phospholipids (33 mol% DPPC content) [24,77]. The difference in domain shapes observed for the DPPC/DLPC monolayers and GUVs probably reflects differences in the membrane preparation methods used (i.e. DPPC/DLPC GUV formation requires sonication above the gel-to-liquid crystalline phase transition temperature of DPPC). In fact, studies using other lipid mixtures report similarities between the shape and size of domains in monolayers and free standing bilayers [27,98]. A meaningful comparison of monolayer and bilayer domain structures would require similar compression/expansion (monolayers) and heating/cooling (GUVs) rates.

Bean-shaped and multi-lobed domains exist at lower surface pressures (Fig. 11c). Such domain shapes have been seen in chiral DPPC monolayers in the LE/LC co-existence region [96,99,100]. The transition from a multi-lobe or bean shape ($\pi = 15$ – 20 mN/m) to a flower-like or serpentine shape ($\pi = 32$ mN/m) for DPPC/DLPC is attributable to pressure-induced differences in the interfacial line tension and lipid dipole densities [38,40,48,96]. The repulsive dipole–dipole interactions associated with the higher lipid dipole densities in the condensed DPPC domains at higher surface pressures can destabilize the domain boundaries and lead to the flower-like and serpentine shapes observed here [40,100]. Whether these are equilibrium structures is difficult to ascertain since they do not possess an accessible geometric descriptor (vide infra). In addition to line tension and dipole–dipole repulsion effects, we believe that the extent of lipid miscibility (i.e. extent of non-ideality) and the lipid composition at the domain borders also play an important role in determining the shape (and shape dynamics) of the condensed phase domains in binary phospholipid mixtures such as DPPC/DLPC [31,47,49,50]. This hypothesis is supported by the fact that we have observed circular domains for monolayers of DSPC/DLPC (i.e. greater non-ideality than DPPC/DLPC) at 32 mN/m [101], and by the report that the solid domain shape observed for GUVs formed from mixtures of the fluid-phase DLPC and a gel-phase dialkylphosphatidylcholine changes with the alkyl chain length difference [31]. Pertaining to this, theoretical simulations of binary phospholipid mixtures predict a local interfacial ordering of the fluid-phase lipid by the gel-phase lipid; a phenomenon that is induced by the mismatch in the hydrophobic chain lengths [47,49,50]. The extent of local ordering increases with increasing chain length difference. Since this inter-

facial ordering phenomenon has an effect on the line tension at the solid domain borders, it may explain the different domain shapes observed for mixtures with different chain length mismatches. These results highlight the important difference between domain formation in the phase co-existence region of single-component lipid monolayers (which has been extensively studied) and in monolayer films formed from binary mixtures of phospholipids.

AFM images (Fig. 11a and b) of a 0.50/0.50 DPPC/DLPC monolayer show a number of condensed domains at surface pressures of 10 and 15 mN/m (i.e. below the π_{LE-LC} value of 15.7 mN/m determined for this mixture). The total surface area occupied by these domains is significantly less than that would be expected if all the DPPC molecules were found in this thicker condensed phase. By comparison, films transferred at a surface pressure (20 mN/m) above π_{LE-LC} exhibit much larger domains that cover a total surface area that is close to the value expected from the molecular area and mol fraction of DPPC (Fig. 11c). These AFM images confirm that DPPC and DLPC are at least partially miscible below the LE-to-LC transition pressure of the mixed monolayer, and that compression to surface pressures $> \pi_{LE-LC}$ induces the extensive condensation of a DPPC-rich phase. Interestingly, although the π - A isotherms of mixtures containing $x_{DPPC} < 0.5$ show no discontinuities indicative of a LE-to-LC phase transition, domains were observed by AFM in monolayers ($\pi = 32$ mN/m) containing 0.25 and 0.375 mol fraction of DPPC (Fig. 8a and b). This means that the absence of a discernible discontinuity in the isotherm of a mixture where one of the components can undergo a LE-to-LC transition cannot necessarily be taken as proof of component miscibility.

A question arises as to the origin of the small microscopic domains observed below π_{LE-LC} . It is not clear whether these domains exist at the air/water interface or are formed during/after monolayer transfer to $C_{14}S$ -Au due to substrate-mediated condensation [89] or dewetting processes [102,103]. If one assumes that the values of ΔG_{ex} calculated from the π - A isotherms of the DPPC/DLPC mixtures (Fig. 5) are indicative of the miscibility state at the air/water interface, no phase separation would be expected from the negative values (-69 to -204 J/mol) obtained for $x_{DPPC} = 0.50$ at $\pi = 5, 10$ and 15 mN/m, even though small microscopic domains are observed by AFM at 10 and 15 mN/m (Fig. 11a and b). The same behavior was obtained for $x_{DPPC} = 0.70$. The ΔG_{ex} values at $\pi = 5$ mN/m (-260 J/mol) and 10 mN/m (-288 J/mol) point to the miscibility of DPPC and DLPC at these surface pressures. By contrast, Langmuir-Schaefer monolayers of 0.70/0.30 DPPC/DLPC were found to exhibit submicroscopic domains at $\pi = 10$ mN/m. These observations suggest that the condensed domains found in the solid-

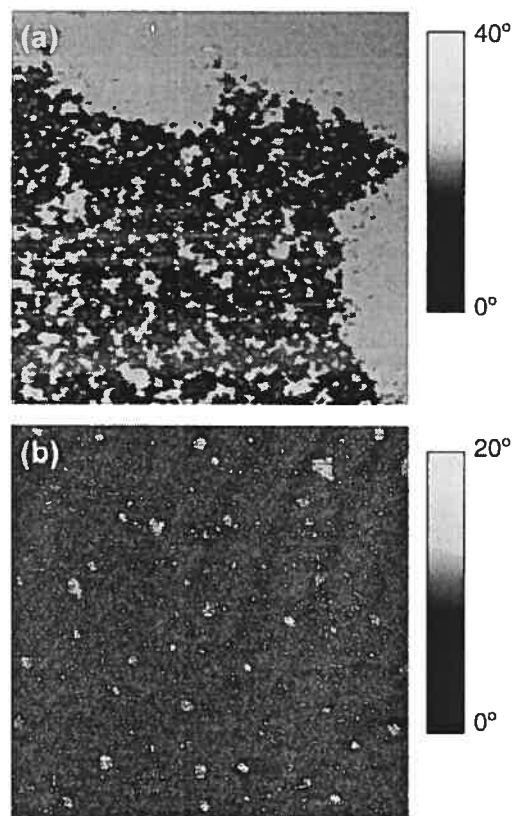


Fig. 13. AFM phase images for DPPC/DLPC monolayers deposited onto $C_{14}S$ -Au. DPPC mol fraction: (a) 0.625 and (b) 0.25. Films were transferred at 32 mN/m after a stabilization time of (a) 30 min and (b) 13.5 h. Image size: (a) $25 \times 25 \mu\text{m}^2$ and (b) $100 \times 100 \mu\text{m}^2$.

supported films below π_{LE-LC} may, in fact, result from film transfer.

It, however, does not seem likely that the smaller condensed aggregates found in the DLPC phase at 32 mN/m (Figs. 6 and 8) result from the monolayer deposition process. A close-up look at the border of a condensed DPPC domain reveals that the larger domains grow by the coalescence of the smaller aggregates to their edges (Fig. 13a). Such a growth mechanism is consistent with slower monolayer compression speeds resulting in rough domain borders (Fig. 10) and longer film stabilization times producing larger DPPC domains for the 0.25/0.75 DPPC/DLPC monolayer (Fig. 8a, 30 min vs. Fig. 13b, 13.5 h). These results support the presence of smaller aggregates and larger domains of the condensed phase at the air/water interface. The co-existence of large domains and smaller aggregates, in fact, establishes that the DPPC/DLPC films were not in equilibrium when deposited onto solid support. Despite this, it is clear that phase separation was complete since we found a 1:1 correlation between the area fraction covered by the large domains and smaller aggregates in

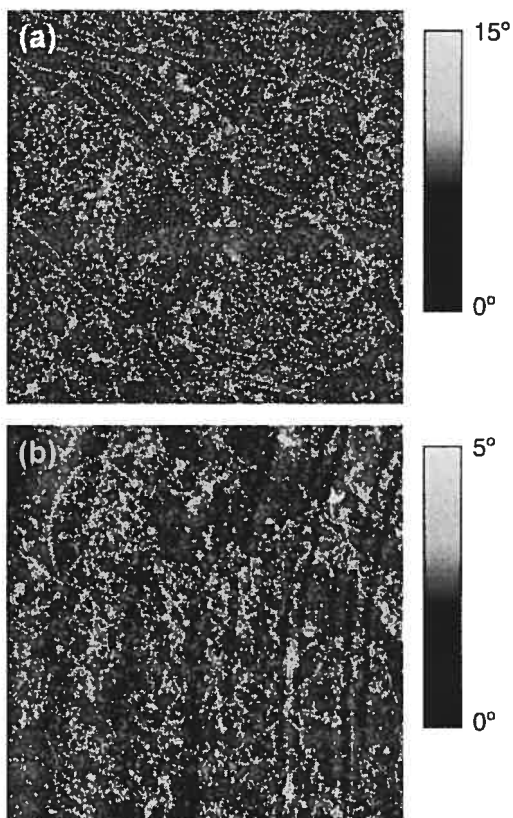


Fig. 14. AFM phase images for DPPC/DLPC (0.50/0.50) monolayers transferred onto $C_{14}S$ -Au after a period of (a) 3 h and (b) 6 h at 40 mN/m. Image size: (a) $50 \times 50 \mu\text{m}^2$ and (b) $100 \times 100 \mu\text{m}^2$.

the AFM images and the area fraction of DPPC in the mixed films calculated assuming total phase separation.

Finally, the most interesting finding is the drastic change in phase morphology of DPPC/DLPC monolayers upon compression from 32 to 40 mN/m. First, the morphology of the mixed monolayers with respect to that at 32 mN/m was found to depend on the DPPC mol fraction (Fig. 11e and Fig. 12). While a somewhat more dendritic appearance was observed for $x_{\text{DPPC}} = 0.375$, increasing the DPPC mol fraction to 0.50 resulted in a radially branched morphology. When the 0.50/0.50 DPPC/DLPC monolayer was held at 40 mN/m for longer periods of time (3 and 6 h) before transfer to $C_{14}S$ -Au, the radially dendritic structures (0.5 h) evolved into randomly branched domains (Fig. 14). There is only a small decrease in the total surface area covered by these branched domains with time (i.e. $42 \pm 2\%$ for 3 h and $36 \pm 3\%$ for 6 h). For $x_{\text{DPPC}} = 0.625$, the large flower-like domains observed at 32 mN/m (Fig. 8c) are replaced by a dense network of submicroscopic domains (Fig. 12b). The increased interfacial mixing resulting from the pressure-induced breakup of the condensed microscopic domains into

close-packed nanoscopic aggregates at $x_{\text{DPPC}} = 0.625$ would explain the variation in the film collapse pressure with lipid composition for $x_{\text{DPPC}} \geq 0.60$. Thus, while the continuous increase in ΔG_{ex} with surface pressure and the ideal behavior of DPPC/DLPC mixtures at 40 mN/m initially pointed to an increased phase-separated state, our AFM results clearly indicate that a striking change in the miscibility properties of the DPPC-rich and DLPC-rich phases occurs at this surface pressure.

Of relevance is the dramatic decrease in the size and/or disappearance of condensed DPPC-rich domains that has been observed by epifluorescence and/or Brewster angle microscopy at $\pi > 35$ mN/m for phase-separated Langmuir monolayers of DPPC/DOPC [64] and pulmonary surfactant (complex mixture of proteins, phospholipids and cholesterol) [78,104,105]. This decrease in domain size has been interpreted in terms of a pressure-induced change in either the partitioning properties of the fluorescent probe used for epifluorescence [64] or in the lipid mixing properties [64,78,104]. The morphology changes observed here by AFM for probe-free DPPC/DLPC monolayers and by Brewster angle microscopy for pulmonary surfactant monolayers support the latter explanation. Furthermore, the decrease in domain size observed for the simpler DPPC/DOPC monolayer may also proceed through the evolution of dendritic branches that can be imaged by AFM, but are too fine to be resolvable by optical microscopy (~ 2 - μm lateral resolution).

The condensed DPPC-rich domains in pulmonary surfactant monolayers have been found to remix with the expanded phase by the sudden dissipation of the interfacial boundary of the two phases rather than by a progressive decrease in their size [104]. The circular domain shape also becomes highly distorted (i.e. elongated shape) immediately prior to remixing. This shape change as well as the narrow range of surface pressures (< 2 mN/m) during which the condensed domains become miscible with the surrounding phase have suggested a critical mixing phenomenon [104], such as that observed in the co-existing fluid phases of binary phospholipid/cholesterol mixtures [60,106–108]. The change in domain structure observed for the DPPC/DLPC monolayers upon compression from 32 to 40 mN/m might also be indicative of a critical mixing behavior. First, changes in the condensed domain morphology were observed within only an 8 mN/m pressure range in these monolayers. This range may be even smaller since surface pressures between 32 and 40 mN/m were not investigated. Second, the surface pressure of a mixing–demixing critical transition also depends on the monolayer composition [60,106,108]. For different DPPC/DLPC compositions, either the disappearance of the microscopic flower-like domains or their evolution into more elongated dendritic-like shapes were observed at 40 mN/m. The fact that the extent of the changes in

the DPPC domain shape and DPPC/DLPC miscibility properties at the fixed pressure of 40 mN/m varies with the DPPC mol fraction is consistent with a composition dependent critical point transition pressure. Third, the persistence of the dendritic domains after several hours at 40 mN/m (Fig. 14) may reflect a critical slow down in mixing due to the similar properties of the two phases [104]. Although cholesterol was found to play a critical role in the remixing of the separated phases in pulmonary lung surfactant [104], the results presented here for DPPC/DLPC, and those obtained for DPPC/DOPC, indicate that the pressure-induced remixing of phospholipids can occur in the absence of lineactants such as cholesterol.

The properties of two distinct phases become similar near the critical point until they merge [104,108]. Remixing of the constituents in the pulmonary surfactant mixture was proposed to arise from a decrease in the difference between the density of the two phases based on the calculated decrease in the molecular area and the measured increase in the optical thickness of the surrounding fluid phase during film compression compared to the relatively constant optical thickness of the condensed DPPC domains [78]. Calculations of the molecular area of the DLPC matrix surrounding the DPPC domains as a function of the surface pressure support this possibility. Assuming a molecular area of 49 \AA^2 /molecule for DPPC in the condensed domains, the molecular area of DLPC in the surrounding matrix decreases from ~ 83 to $\sim 51 \text{ \AA}^2$ /molecule upon compression from 20 to 40 mN/m [109]. Thus, the phase transformation observed at high pressure in DPPC/DLPC monolayers might be due to the similar densities of the condensed and LE phases. The similarity in the densities of these two phases would be expected to reduce the interfacial line tension, allowing for the more prolonged boundaries of the dendritic shapes or the disappearance of the flower-like domains observed at 40 mN/m. A comparison of the domain shape and size in monolayers deposited at several pressures between 32 mN/m and the mixed monolayer collapse pressure, as well as their compression speed and temperature dependence, will help to clarify the nature of these phase changes. An investigation of the morphology of monolayers of DPPC/DLPC and other gel-phase/fluid-phase lipid mixtures using AFM and epifluorescence or Brewster angle microscopy should also provide further insight into the changes in the condensed domain structure that occur at high surface pressures.

5. Conclusion

We have presented a detailed composition–surface pressure map of the phase morphology of monolayers formed from a binary mixture of dialkylphosphatidylcholines. We have determined how the condensed

domain structure in DPPC/DLPC monolayers depends on the surface pressure and lipid composition. At surface pressures close to (above) π_{LE-LC} of the mixed monolayer, the DPPC domain shapes (bean and multi-lobe) resemble those observed in pure DPPC monolayers in the LE/LC co-existence region. At a bilayer equivalence surface pressure of 32 mN/m, DPPC/DLPC monolayers exhibit solid/fluid phase co-existence at compositions corresponding to the phase diagram of aqueous lipid dispersions. The condensed domain shapes (flower-like and serpentine) observed by AFM for these mixed monolayers may result from a finite miscibility of DPPC and DLPC within the domains themselves and/or mixing at the phase boundaries.

A drastic change in the condensed domain morphology and miscibility properties of DPPC/DLPC occurs at 40 mN/m, which is reminiscent of a critical mixing phenomenon. While critical mixing has been investigated for co-existing liquid phases in cholesterol/phospholipid mixtures, the results presented above suggest that the pressure-induced remixing of solid/liquid phases in mixed phospholipid monolayers occurs, and in the absence of cholesterol.

The results of this study demonstrate the importance of characterizing the 2D phase behavior in model Langmuir monolayers formed from simple binary phospholipid mixtures for gaining a better understanding of the interfacial properties of lipid microdomains and the pressure-induced lipid phase changes involved in certain biological processes, as well as for the construction of laterally structured biomimetic surfaces.

Acknowledgments

AFM measurements were carried out at the Laboratoire de caractérisation des matériaux of the Université de Montréal. This work has benefited from the previous research of P. Moraille (Université de Montréal) and was supported by NSERC (Canada), FCAR (Québec), and the Université de Montréal. A.B. is a Cottrell Scholar of the Research Corporation (USA). J.S. gratefully acknowledges fellowship support from the Groupe de recherche en technologie des couches minces.

References

- [1] B.A. Cornell, V.L.B. Maksvytis-Braach, L.G. King, P.D.J. Osman, B. Raguse, L. Wiczorek, R.J. Pace, *Nature* 387 (1997) 580.
- [2] E. Sackmann, *Science* 271 (1996) 43.
- [3] Y.F. Dufrene, G.U. Lee, *Biochim. Biophys. Acta* 1509 (2000) 14.
- [4] A.L. Plant, *Langmuir* 15 (1999) 5128.
- [5] M. Menke, S. Künneke, A. Janshoff, *Eur. Biophys. J.* 31 (2002) 317.
- [6] C. Yuan, J. Furlong, P. Burgos, L.J. Johnston, *Biophys. J.* 82 (2002) 2526.

- [7] P.-E. Milhiet, C. Domec, M.-C. Giocondi, N. Van Mau, F. Heitz, C. Le Grimmelc, *Biophys. J.* 81 (2001) 547.
- [8] V. Vié, N. Mau Van, E. Lesniewska, J.P. Goudonnet, F. Heitz, C. Le Grimmelc, *Langmuir* 14 (1998) 4574.
- [9] D.Y. Takamoto, M.M. Lipp, A. von Nahmen, K.Y.C. Lee, A.J. Waring, J.A. Zasadzinski, *Biophys. J.* 81 (2001) 153.
- [10] B.N. Flanders, S.A. Vickery, R.C. Dunn, *J. Microsc.* 202 (2001) 379.
- [11] N. Van Mau, V. Vié, L. Chaloin, E. Lesniewska, F. Heitz, C. Le Grimmelc, *J. Membr. Biol.* 167 (1999) 241.
- [12] P. Moraille, A. Badia, *Angew. Chem. Int. Ed.* 41 (2002) 4303.
- [13] C. Duschl, M. Liley, G. Corradin, H. Vogel, *Biophys. J.* 67 (1994) 1229.
- [14] S. Sivasankar, W. Briehner, N. Lavrik, B. Gumbiner, D. Leckband, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96 (1999) 11820.
- [15] Z.W. Yu, T.L. Calvert, D. Leckband, *Biochemistry* 37 (1998) 1540.
- [16] D.A. Brown, E. London, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 17221.
- [17] D.A. Brown, E. London, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 14 (1998) 111.
- [18] T. Gil, J.H. Ipsen, O.G. Mouritsen, M.C. Sabra, M.M. Sperotto, M.J. Zuckermann, *Biochim. Biophys. Acta* 1376 (1998) 245.
- [19] K. Simons, E. Ikonen, *Nature* 387 (1997) 569.
- [20] T. Hønger, K. Jørgensen, R.L. Biltonen, O.G. Mouritsen, *Biochemistry* 35 (1996) 9003.
- [21] O.G. Mouritsen, P.K.J. Kinnunen, *Biological Membranes: A Molecular Perspective from Computation and Experiment*, Birkhäuser, Boston, MA, 1996.
- [22] E. Corvera, O.G. Mouritsen, M.A. Singer, M.J. Zuckermann, *Biochim. Biophys. Acta* 1107 (1992) 261.
- [23] E. Sackmann, *FEBS Lett.* 346 (1994) 3.
- [24] B. Piknova, W.R. Schief, V. Vogel, B.M. Discher, S.B. Hall, *Biophys. J.* 81 (2001) 2172.
- [25] R. Koynova, M. Caffrey, *Chem. Phys. Lipids* 115 (2002) 107.
- [26] D. Marsh, *Handbook of Lipid Bilayers*, CRC Press, Boca Raton, FL, 1990.
- [27] C. Dietrich, L.A. Bagatolli, Z.N. Volovyk, N.L. Thompson, M. Levi, K. Jacobson, E. Gratton, *Biophys. J.* 80 (2001) 1417.
- [28] A.V. Samsonov, I. Mihalyov, F.S. Cohen, *Biophys. J.* 81 (2001) 1486.
- [29] G.W. Feigenson, J.T. Buboltz, *Biophys. J.* 80 (2001) 2775.
- [30] L.A. Bagatolli, E. Gratton, *Biophys. J.* 78 (2000) 290.
- [31] L.A. Bagatolli, E. Gratton, *Biophys. J.* 79 (2000) 434.
- [32] J. Korlach, P. Schwille, W.W. Webb, G.W. Feigenson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96 (1999) 8461.
- [33] V.M. Kaganer, H. Möhwald, P. Dutta, *Rev. Mod. Phys.* 71 (1999) 779.
- [34] D. Vollhardt, *Adv. Colloid Interface Sci.* 64 (1996) 143.
- [35] H. Möhwald, in: R. Lipowsky, E. Sackmann (Eds.), *Structure and Dynamics of Membranes*, Elsevier Science BV, Amsterdam, 1995, p. 161.
- [36] H. Möhwald, A. Dietrich, C. Böhm, G. Brezesinski, M. Thoma, *Mol. Membr. Biol.* 12 (1995) 29.
- [37] C.M. Knobler, R.C. Desai, *Annu. Rev. Phys. Chem.* 43 (1992) 207.
- [38] H.M. McConnell, *Annu. Rev. Phys. Chem.* 42 (1991) 171.
- [39] R.M. Weis, *Chem. Phys. Lipids* 57 (1991) 227.
- [40] H. Möhwald, *Annu. Rev. Phys. Chem.* 41 (1990) 441.
- [41] C.M. Knobler, *Adv. Chem. Phys.* 77 (1990) 397.
- [42] M. Flörsheimer, H. Möhwald, *Chem. Phys. Lipids* 49 (1989) 231.
- [43] E. Kalb, S. Frey, L.K. Tamm, *Biochim. Biophys. Acta* 1103 (1992) 307.
- [44] D. Marsh, *Biochim. Biophys. Acta* 1286 (1996) 183.
- [45] T. Parasassi, G. Ravagnan, R.M. Rusch, E. Gratton, *Photochem. Photobiol.* 57 (1993) 403.
- [46] S. Mabrey, J.M. Sturtevant, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73 (1976) 3862.
- [47] K. Jørgensen, R. Klinger, R.L. Biltonen, *J. Phys. Chem. B* 104 (2000) 11763.
- [48] H.M. McConnell, R. De Koker, *Langmuir* 12 (1996) 4897.
- [49] K. Jørgensen, O.G. Mouritsen, *Biophys. J.* 95 (1995) 942.
- [50] K. Jørgensen, M.M. Sperotto, O.G. Mouritsen, J.H. Ipsen, M.J. Zuckermann, *Biochim. Biophys. Acta* 1152 (1993) 135.
- [51] C. Yuan, L.J. Johnston, *Biophys. J.* 81 (2001) 1059.
- [52] M. Ross, C. Steinem, H.-J. Galla, A. Janshoff, *Langmuir* 17 (2001) 2437.
- [53] J. Schneider, Y.F. Dufrêne, W.R. Barger Jr., G.U. Lee, *Biophys. J.* 79 (2000) 1107.
- [54] M. Kuramori, N. Uchida, K. Suehiro, Y. Oishi, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 73 (2000) 829.
- [55] C. Yuan, L.J. Johnston, *Biophys. J.* 79 (2000) 2768.
- [56] A. Radhakrishnan, T.G. Anderson, H.M. McConnell, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97 (2000) 12422.
- [57] C. DeWolf, S. Leporatti, C. Kirsch, R. Klinger, G. Brezesinski, *Chem. Phys. Lipids* 97 (1999) 129.
- [58] K. Ekelund, E. Sparr, J. Engblom, H. Wennerström, S. Engström, *Langmuir* 15 (1999) 6946.
- [59] E. Sparr, K. Ekelund, J. Engblom, S. Engström, H. Wennerström, *Langmuir* 15 (1999) 6950.
- [60] S.L. Keller, W.H. Pitcher III, W.H. Huestis, H.M. McConnell, *Phys. Rev. Lett.* 81 (1998) 5019.
- [61] Y.F. Dufrêne, W.R. Barger, J.-B.D. Green, G.U. Lee, *Langmuir* 13 (1997) 4779.
- [62] E. ten Grotenhuis, R.A. Demel, M. Ponec, D.R. Boer, J.C. van Miltenburg, J.A. Bouwstra, *Biophys. J.* 71 (1996) 1389.
- [63] J.M. Solletti, M. Botreau, F. Sommer, T.M. Duc, M.R. Celio, *J. Vac. Sci. Technol. B* 14 (1996) 1492.
- [64] K. Nag, K.M.W. Keough, *Biophys. J.* 65 (1993) 1019.
- [65] M.L.F. Ruano, K. Nag, L.-A.D. Worthman, C. Casals, J. Pérez-Gil, K.M.W. Keough, *Biophys. J.* 74 (1998) 1101.
- [66] P.W.M. van Dijck, A.J. Kaper, H.A.J. Oonk, J. de Gier, *Biochim. Biophys. Acta* 470 (1977) 58.
- [67] A.G. Lee, *Biochim. Biophys. Acta* 472 (1977) 285.
- [68] C.W. Meuse, S. Krueger, C.F. Majkrzak, J.A. Dura, J. Fu, J.T. Connor, A.L. Plant, *Biophys. J.* 74 (1998) 1388.
- [69] L.K. Tamm, H.M. McConnell, *Biophys. J.* 47 (1985) 105.
- [70] C.D. Bain, E.B. Troughton, Y.-T. Tao, J. Evall, G.M. Whitesides, R.G. Nuzzo, *J. Am. Chem. Soc.* 111 (1989) 321.
- [71] H.A. Biebuyck, C.D. Bain, G.M. Whitesides, *Langmuir* 10 (1994) 1825.
- [72] R. Colorado Jr., R.J. Villazana, T.R. Lee, *Langmuir* 14 (1998) 6337.
- [73] G.L. Gaines Jr., *Insoluble Monolayers at Liquid–Gas Interfaces*, Wiley, New York, 1966.
- [74] M.C. Petty, *Langmuir–Blodgett Films: An Introduction*, Cambridge University Press, 1996.
- [75] A.W. Adamson, A.P. Gast, *Physical Chemistry of Surfaces*, sixth ed., Wiley, New York, 1997.
- [76] R. Maget-Dana, *Biochim. Biophys. Acta* 1462 (1999) 109.
- [77] B.M. Discher, W.R. Schief, V. Vogel, S.B. Hall, *Biophys. J.* 77 (1999) 2051.
- [78] B.M. Discher, K.M. Maloney, W.R. Schief Jr., D.W. Grainger, V. Vogel, S.B. Hall, *Biophys. J.* 71 (1996) 2583.
- [79] R.M. Weis, H.M. McConnell, *J. Phys. Chem.* 89 (1985) 4453.
- [80] H.M. McConnell, L.K. Tamm, R.M. Weis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81 (1984) 3249.
- [81] A.-F. Mingotaud, C. Mingotaud, L.K. Patterson, *Handbook of Monolayers*, vol. 1, Academic Press, Inc, San Diego, CA, 1993.

- [82] A.P. Girard-Egrot, R.M. Morélis, P.R. Coulet, *Langmuir* 12 (1996) 778.
- [83] J. Hwang, L.K. Tamm, C. Böhm, T.S. Ramalingam, E. Betzig, M. Edidin, *Science* 270 (1995) 610.
- [84] A. Kasselouri, A.W. Coleman, A. Baszkin, *J. Colloid Interf. Sci.* 180 (1996) 384.
- [85] W.R. Schief, S.B. Hall, V. Vogel, *Phys. Rev. E* 62 (2000) 6831.
- [86] M. Deleu, K. Nott, R. Brasseur, P. Jacques, P. Thonart, Y.F. Dufrêne, *Biochim. Biophys. Acta* 1513 (2001) 55.
- [87] The surface tension of pure water at 20 °C is 72.8 mN/m [110]. A collapse pressure of ~ 73 mN/m means that the solid-condensed DPPC monolayer reduces the surface tension of water to essentially zero. Previously published isotherms [65,84–86] confirm that DPPC can be compressed to surface pressures > 70 mN/m.
- [88] A.D. Williams, J.M. Wilkin, R.A. Dluhy, *Colloids Surf. A* 102 (1995) 231.
- [89] S. Leporatti, G. Brezesinski, H. Möhwald, *Colloids Surf. A* 161 (2000) 159.
- [90] Flower-like domains were also observed by Brewster angle microscopy at 32 mN/m for a 0.50/0.50 DPPC/DLPC monolayer at the air–water interface.
- [91] K.L. Babcock, C.B. Prater, *Beyond Topography*, Digital Instruments, Santa Barbara, CA, 1995.
- [92] A step height difference of 0.8 ± 0.1 nm (medium tapping) was obtained in air for DPPC/DLPC monolayers deposited onto atomically flat mica by the Langmuir–Blodgett vertical technique, in close agreement with the expected 0.85 nm height difference.
- [93] X.M. Yang, D. Xiao, S.J. Xiao, Y. Wei, *Appl. Phys. A* 59 (1994) 139.
- [94] G. Weidemann, D. Vollhardt, *Colloids Surf. A* 100 (1995) 187.
- [95] Since the average molecular area of the DPPC/DLPC monolayers at $\pi \leq 32$ mN/m is larger than that calculated using the area per molecule of DPPC and DLPC, a comparison of the total surface area occupied by the DPPC domains in the Langmuir–Schaefer films with the calculated value is approximate, especially at $\pi \leq 20$ mN/m, where the extent of deviation from the additivity rule is the largest.
- [96] C.W. McConlogue, T.K. Vanderlick, *Langmuir* 13 (1997) 7158.
- [97] J.R. Silvius, D. del Giudice, M. Lafleur, *Biochemistry* 35 (1996) 15198.
- [98] K. Nag, J.-S. Pao, R.R. Harbottle, F. Possmayer, N.O. Petersen, L.A. Bagatolli, *Biophys. J.* 82 (2002) 2041.
- [99] K. Nag, C. Boland, N. Rich, K.M.W. Keough, *Biochim. Biophys. Acta* 1068 (1991) 157.
- [100] S.A. Kane, M. Compton, N. Wilder, *Langmuir* 16 (2000) 8447.
- [101] Circular domains were observed for DSPC/DLPC monolayers deposited onto mica at 32 mN/m by the Langmuir–Blodgett technique or deposited onto $C_{14}S$ -Au by the Langmuir–Schaefer method for $x_{\text{DSPC}} = 0.50$ and 0.75.
- [102] C.W. Hollars, R.C. Dunn, *Biophys. J.* 75 (1998) 342.
- [103] H. Shiku, R.C. Dunn, *J. Microsc.* 194 (1999) 461.
- [104] B.M. Discher, K.M. Maloney, D.W. Grainger, C.A. Sousa, S.B. Hall, *Biochemistry* 38 (1999) 374.
- [105] K. Nag, J. Perez-Gil, M.L.F. Ruano, L.A.D. Worthman, J. Stewart, C. Casals, K.M.W. Keough, *Biophys. J.* 74 (1998) 2983.
- [106] S.L. Keller, T.G. Andersen, H.M. McConnell, *Biophys. J.* 79 (2000) 2033.
- [107] P.A. Rice, H.M. McConnell, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 (1989) 6445.
- [108] S. Subramaniam, H.M. McConnell, *J. Phys. Chem.* 91 (1987) 1715.
- [109] The area fraction occupied by the condensed DPPC domains remains relatively constant ($\varphi_c = 0.42–0.43$) from 20 to 40 mN/m. It was therefore assumed that the molecular area of DPPC in the condensed domains remains constant during compression from 20 to 40 mN/m. The molecular area of DPPC at 20 mN/m ($49 \text{ \AA}^2/\text{molecule}$) was used for \bar{A}_c in Eq. (6) to calculate the molecular area of the expanded DLPC phase.
- [110] D.R. Lide, *CRC Handbook of Chemistry and Physics*, 83rd ed., CRC Press, Boca Raton, 2002.

