



HAL
open science

Membranes hors d'équilibre : échanges et transport actif

Philippe Girard

► **To cite this version:**

Philippe Girard. Membranes hors d'équilibre : échanges et transport actif. Biophysique [physics.bioph]. Université Paris-Diderot - Paris VII, 2004. Français. NNT : . tel-00006588

HAL Id: tel-00006588

<https://theses.hal.science/tel-00006588v1>

Submitted on 27 Jul 2004

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

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

THÈSE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ PARIS 7 - DENIS DIDEROT

UFR de Physique

Spécialité :

Physique des Liquides

Présentée par :

Philippe GIRARD

pour obtenir le grade de DOCTEUR de l'UNIVERSITÉ PARIS 7

Sujet de la thèse :

Membranes hors d'équilibre :
échanges et transport actif

Soutenue le 1^{er} mars 2004 devant le jury composé de

M.	François GALLET,	Président
M.	Bertrand FOURCADE,	Rapporteur
M.	Loïc AUVRAY,	Rapporteur
M.	Jacques PROST,	Directeur de thèse
Mme	Patricia BASSEREAU,	Co-directrice de thèse
M.	Pierre FALSON	Examineur
M.	Philippe DEVAUX	Examineur

Table des matières

Avant-propos	1
I Introduction	5
I.1 Des membranes biologiques ...	5
I.1.1 Les lipides	6
I.1.2 Les protéines membranaires	7
I.1.3 De la structure à la dynamique moléculaire	8
I.1.4 Transport à travers la membrane	11
I.1.5 Le transport vésiculaire : le trafic cellulaire	15
I.2 ... aux membranes artificielles	18
I.2.1 Les liposomes	19
I.2.2 Les vésicules géantes	19
I.2.3 Les polymersomes	20
I.3 Les membranes artificielles, des systèmes modèles...	21
I.3.1 ... pour le trafic intracellulaire	21
I.3.2 ... pour les processus actifs	23
II Physique des membranes à l'équilibre	25
II.1 Description microscopique des membranes	25
II.1.1 Propriétés élastiques	25
II.1.2 Paramétrisation et Hamiltonien	30
II.1.3 Représentation de Monge	31
II.2 Fluctuations thermiques et conséquences	32
II.2.1 Energie libre	33
II.2.2 Spectre de fluctuations	34
II.2.3 Longueur de persistance	36
II.2.4 Excès d'aire	36
II.2.5 Force de Helfrich	38
II.3 Description à l'échelle macroscopique : renormalisation	39
II.3.1 Excès d'aire effectif	40

II.3.2	Rigidité et tension effectives	41
II.4	Formes des membranes	43
II.4.1	Extension du modèle de courbure	44
II.4.2	Modèle ADE	44
II.4.3	Vésicules de topologie non sphérique	46
II.4.4	Vésicules à deux composants	47
III	Membranes hors d'équilibre : aspects théoriques	51
III.1	Membranes avec des centres actifs	52
III.1.1	Description de la membrane	52
III.1.2	Equations du mouvement	55
III.1.3	Etude de stabilité	59
III.1.4	Fluctuations hors-équilibres	60
III.2	Membranes en contact avec des réservoirs de lipides	62
III.2.1	Abstract	63
III.2.2	Introduction	64
III.2.3	Membrane description	65
III.2.4	Membrane dynamics	67
III.2.5	Discussion	74
III.2.6	Appendix : Supported bilayers	75
III.2.7	Complements	76
III.2.8	Application du modèle : fusion de vésicules de charges opposées	78
IV	Modèle de membrane active	85
IV.1	Description de la pompe à calcium	86
IV.1.1	Le muscle squelettique	86
IV.1.2	Propriétés de l'ATPase-Ca ²⁺	87
IV.2	Reconstitution dans des vésicules géantes	92
IV.2.1	Intérêt de cette reconstitution	92
IV.2.2	Description de la méthode	94
IV.2.3	Caractérisation de la reconstitution dans les GUVs	99
IV.2.4	Conclusion	109
V	Mesure des fluctuations de membranes actives	111
V.1	Principe de la technique des micropipettes	112
V.1.1	Montage expérimental	112
V.1.2	Procédure expérimentale	115
V.2	Analyses des mesures de micropipettes	119
V.2.1	Vésicules purement lipidique	119
V.2.2	Effet de l'incorporation de l'ATPase-Ca ²⁺	122
V.2.3	Effet de l'activité de l'ATPase-Ca ²⁺	123
V.3	Comparaison théorie-expérience	125

V.3.1	Effet de l'incorporation de l'ATPase- Ca^{2+}	125
V.3.2	Effet de l'activité de l'ATPase- Ca^{2+}	128
V.4	Conclusion et perspectives	130
V.4.1	Différentes améliorations possibles	130
V.4.2	Conclusion	132
V.4.3	Perspectives	133
Conclusion		135
A Eléments de géométrie différentielle		139
A.1	Introduction	139
A.1.1	Définitions et notations	139
A.1.2	Dérivée covariante	142
A.1.3	Relations usuelles	143
A.2	Calculs de dérivées fonctionnelles	144
B Les phospholipides		151
B.1	Préparation des lipides	151
B.2	Lipides neutres	152
B.3	Lipides chargés	153
B.4	Lipide fluorescent	154
C Compléments sur les membranes actives		155
C.1	Résolution de l'équation de Stokes	155
C.2	Différence de pression osmotique	157
Bibliographie		159

Avant-propos

La physique de la matière molle a été ces dernières décennies, et continue d'être, un champ d'investigation intense. L'intérêt des physiciens s'est aussi très vite tourné vers les matériaux d'origine biologique. Par cet engouement, ces physiciens se sont retrouvés tout naturellement au coeur d'une sorte de métissage scientifique où ils cotoient chimistes et biologistes, chacun apportant plus de questions que de réponses. En plus des techniques d'analyse et de mesure que la biologie a su remarquablement intégrer, les physiciens disposent aussi de tout un ensemble d'outils théoriques adaptés aux ensembles constitués d'un grand nombre de molécules, par exemple la mécanique statistique. Parallèlement, la visualisation en temps réel, facilitée par les énormes progrès des moyens optiques, s'est révélée un outil essentiel. Elle permet en effet de contrôler immédiatement la présence ou l'absence d'effets indésirables et aussi de présenter le système sous différents aspects (zoom, angles d'observation, éclairage, marquages fluorescents, ...) méthodes qui permettent de rejeter ou d'accepter plus rapidement les hypothèses physiques.

La membrane cellulaire est un des thèmes d'étude privilégiés pour ces physico-chimistes de la matière molle puisque c'est un élément essentiel de la cellule et elle est le siège d'une multitude de processus indispensables pour la survie d'une cellule. De plus, les outils théoriques de la physique statistique se prêtent bien à l'étude de ce type d'objets. Pour comprendre les interactions qui régissent ces structures membranaires, ils ont utilisé des systèmes modèles, c'est-à-dire constitués d'abord d'un ou de deux types de lipides puis ont ajouté une inclusion membranaire (protéines, polymères). Nous présenterons dans le chapitre I les caractéristiques générales et moléculaires des membranes biologiques. Sur le plan conceptuel, nous verrons que leurs principales caractéristiques découlent de la structure bidimensionnelle de ces membranes (alors que nous vivons dans un espace géométrique tridimensionnel) et de la richesse de leur comportement thermodynamique. De plus, ces structures peuvent se présenter sous une grande variété de formes : membranes quasi-planes, membranes fermées (= vésicules), structures de type éponge. La bibliographie des propriétés physico-chimiques à

l'équilibre de ce type de système est très abondante. Nous consacrerons le chapitre II à des rappels sur les propriétés physico-chimiques des membranes à l'équilibre thermodynamique. Nous nous attacherons principalement aux travaux théoriques traitant des fluctuations thermiques et de leurs conséquences sur les propriétés élastiques.

En réalité, les membranes ne sont pas, en général, à l'équilibre thermodynamique puisqu'elles sont soumises à de nombreux processus et réactions chimiques irréversibles qui nécessitent de l'énergie, et de ce point de vue, constituent des sources de bruit hors-équilibre. Dans l'optique de se rapprocher de plus en plus des membranes biologiques, il est nécessaire de sortir du cadre des membranes à l'équilibre thermodynamique et d'inclure l'aspect hors d'équilibre. Pourtant, les travaux sur les membranes prenant en compte cet aspect sont relativement récents et, de fait, moins nombreux. Deux situations génériques où la dynamique de la membrane joue un rôle central seront traitées d'un point de vue théorique et en détails dans le chapitre III. Il s'agit d'une part de l'échange continu de matériels biologiques (lipides, ions, protéines, macromolécules, ...) par des processus de fusion/fission (endocytose/exocytose) rencontrés dans le trafic intracellulaire et, d'autre part, de la situation d'une membrane contenant des « centres actifs » dont l'activité produit une force qui écarte la membrane de l'équilibre. Ces processus peuvent agir aussi bien sur les propriétés d'équilibre que sur celles hors d'équilibre.

Pour illustrer de manière expérimentale la théorie sur les membranes actives, notre choix de centres actifs s'est porté sur une protéine transmembranaire, l'ATPase- Ca^{2+} qui utilise l'énergie de l'hydrolyse de l'ATP pour induire un transport d'ions calcium à travers la membrane. Après la présentation du rôle joué par cette protéine à l'intérieur des cellules et de ses principales caractéristiques (structure, cycle enzymatique, etc.), nous décrirons, dans le chapitre IV, le protocole expérimental que nous avons développé pour sa reconstitution dans la membrane de vésicules géantes unilamellaires et nous caractériserons complètement le système. Dans le chapitre V, nous utiliserons la technique de micropipettes sur ces vésicules géantes reconstituées pour observer à la fois l'effet de l'incorporation d'inclusions (les protéines) dans la membrane et les effets de l'activité des protéines sur les fluctuations de membrane pour les comparer avec les prédictions du modèle théorique.

Introduction

Tous les organismes vivants sont constitués d'une (comme les bactéries, les protozoaires) ou plusieurs cellules (50 milliards pour l'homme), véritables « usines biochimiques » extrêmement complexes dont la taille est de quelques dizaines de micromètres.

L'essentiel de ce que nous savons sur la cellule a été acquis depuis 1950 au moment de l'avènement du microscope électronique qui donne une vision nouvelle de l'ultrastructure cellulaire que la microscopie optique avait grossièrement visualisé au milieu du XIX^e siècle. C'est ainsi qu'ont pu être mis en évidence certaines sous structures de l'anatomie cellulaire appelés « organites », spécialisés dans des fonctions précises. Malgré la diversité des êtres vivants, les cellules ont des caractères anatomiques, biochimiques et fonctionnels communs ; par exemple, les cellules eucaryotes dont une représentation schématique est donnée dans la figure I.1 (voir page suivante) sont toutes composées de trois éléments fondamentaux : la membrane, le cytoplasme et le noyau (qui contient le matériel génétique). Une autre caractéristique commune à toute cellule est qu'elles mettent en jeu les mêmes types de mécanismes pour leur croissance, pour leur reproduction, pour la régulation de leurs activités.

Après son identification comme unité de la vie, les physico-chimistes de la matière molle se sont empressés de décortiquer et de disséquer cette « petite boîte noire » pour tenter de comprendre le fonctionnement de chacun de ses éléments, bien sûr sous l'oeil vigilant (et quelque peu critique) du biologiste.

I.1 Des membranes biologiques ...

La fonction des systèmes biologiques vivants (cellules, organites cellulaires et autres organismes) est essentiellement reliée à la structure des membranes biologiques puisqu'elles permettent d'isoler le contenu cellulaire ou celui d'un compartiment de la cellule du monde qui lui est extérieur. Bien qu'il existe des struc-

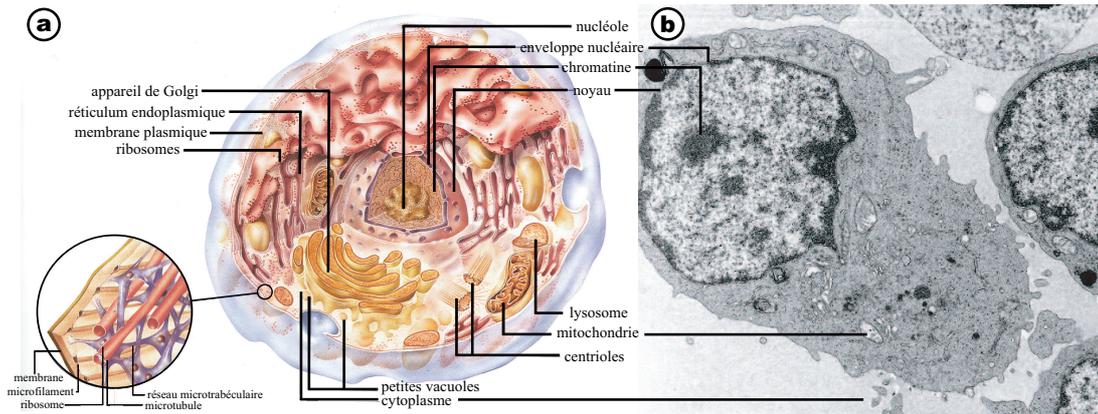


FIG. I.1 - (a) Vue schématique d'une cellule eucaryote. Elle possède une organisation interne très complexe : le noyau, le réticulum endoplasmique (RE), l'appareil de Golgi, les mitochondries constituent les principales sous-unités de la cellule. (b) Cellule du thymus vue au microscope électronique à transmission MET x 10 000 (<http://biogeol.free.fr/Cours+/cell03.htm>).

tures membranaires simples dans la plupart des cellules procaryotes, c'est dans les cellules eucaryotes qu'apparaissent toutes les potentialités de la membrane. En effet, le contenu de ces dernières est recloisonné en un grand nombre de compartiments formant les organites cellulaires qui sont bordés par une, voire deux (comme l'enveloppe nucléaire), membranes. Enfin, certains organites spécialisés dans la conversion d'énergie (mitochondries, chloroplastes) renferment un très grand nombre de membranes internes ou présentent des repliements très complexes de l'une des membranes qui les enveloppent. Mais le rôle des membranes ne se limite pas à celui d'un sac mou et inerte. Elles interviennent aussi dans une variété de processus biologiques indispensables à la vie comme les phénomènes de transport, la reconnaissance cellulaire, les processus de conversion d'énergie, etc. La membrane plasmique repose de plus sur une charpente dynamique - le cytosquelette - formée d'un réseau de filaments protéiques, qui rend possible la motilité cellulaire, contribue à maintenir la forme de la cellule et la cohésivité des tissus, et enfin, sert de guide pour le transport de molécules indispensables à l'activité cellulaire.

On ne sait pas exactement comment sont apparues les membranes et dans quel but, mais chez tous les êtres vivants, elles sont formées principalement de lipides disposés en double feuillet (Fig.I.2) de faible épaisseur (de 5 à 10 nm) et associées à des protéines.

I.1.1 Les lipides

La composition lipidique des membranes cellulaires eucaryotes est très variée, contrairement à certaines membranes plasmiques bactériennes qui sont composées

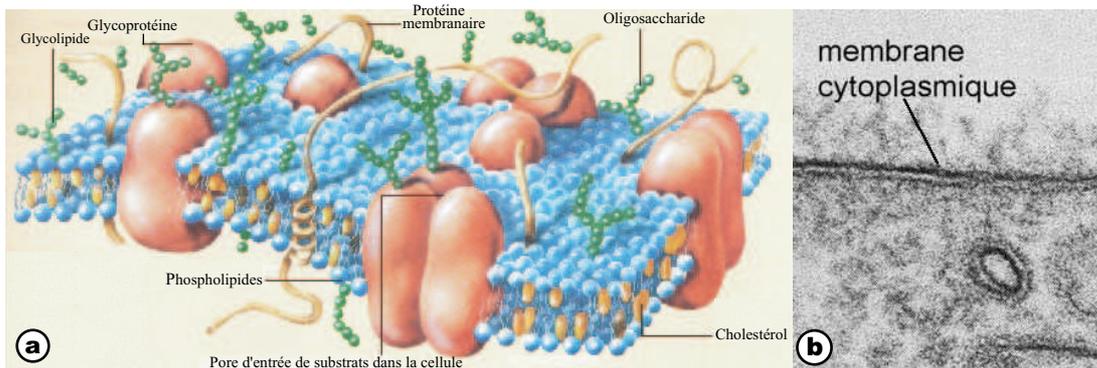


FIG. I.2 - (a) Représentation schématique de la membrane cellulaire montrant les différentes molécules constituant la membrane. La membrane est constituée d'un double feuillet phospholipidique associé à des protéines (b) Photographie en microscopie électronique (x 300.000) d'une partie d'une cellule montrant la membrane plasmique organisée en double feuillet, vue en coupe transverse. Adapté de <http://www.cu.lu/labext/rcms/cppe/cell/cellfr.html>

d'un type majeur de phospholipides (Fig. I.3.a). De plus, les lipides membranaires, formant de 30 à 50 % de la masse de la membrane selon le type d'organites, sont en majorité des *lipides amphipolaires* (Fig.I.3) : ils comportent une tête polarisable, hydrophile (par exemple, le phosphoglycérol substitué) et une ou deux queues hydrophobes formées de longs résidus d'acides gras (chaînes hydrocarbonées). Un exemple de ce type de lipides, le phosphatidyléthanolamine (PE), se trouve sur la figure I.3. Pour des raisons thermodynamiques, un mélange de lipides plongés dans un milieu aqueux s'organise spontanément en structure lyotrope séquestrant les parties hydrophobes des molécules au centre des agrégats, le contact avec les molécules d'eau étant assuré par les parties polaires (dans l'eau, la concentration micellaire critique est de l'ordre de 10^{-12} M) avec une couche d'hydratation de 10 Å environ [Israelachvili, 1994]. Il est assez remarquable que de telles structures ne fassent appel en aucune façon à des liaisons covalentes entre les molécules, mais doivent uniquement leur existence aux forces hydrophobes.

I.1.2 Les protéines membranaires

Cependant, bien que la compartimentation et donc l'existence d'une cellule (ou d'un organite) soient dévolues aux lipides membranaires, sa survie nécessite des échanges de matière et d'énergie de part et d'autre de la membrane. Ces échanges sont assurés par des protéines qui peuvent être de deux types. Insérées dans la membrane, les *protéines intégrales* la pénètrent plus ou moins profondément pour que leurs parties hydrophobes soient protégées par les parties hydrocarbonées des lipides tandis que leurs régions polaires soient en contact avec le solvant environnant (nous verrons un exemple d'une telle protéine dans le chapitre IV). Les *protéines périphériques*, elles, ne pénètrent pas du tout la membrane ; elles

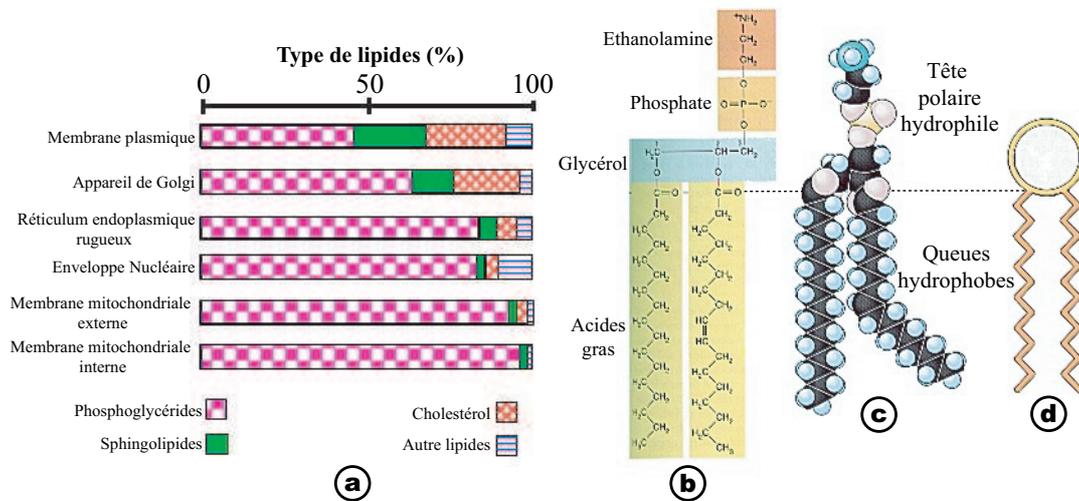


FIG. I.3 - (a) Composition lipidique de différents types de membranes cellulaires (pourcentage en poids). Structure d'un phosphoglycérol, le phosphatidyléthanolamine (PE) : (b) formule chimique, (c) modèle compact et (d) représentation symbolique (d'après [Alberts et al., 2002]).

constituent des appendices rattachés à la surface membranaire, souvent à la partie saillante de protéines membranaires (voir Fig.I.2a).

Les séquençages complets des génomes de différents organismes indiquent que 25 à 30 % des gènes codent pour des protéines membranaires [Jones, 1998]. Ceci démontre l'importance de cette famille de protéines et notamment dans un grand nombre de fonctions biologiques telles que la signalisation, la bioénergétique, l'adhésion, la reconnaissance, le transport de soluté (Fig. I.4). Cependant, sur les 20 000 structures de protéines solubles qui ont été déterminées, seules 48 protéines membranaires sont connues à l'heure actuelle⁽¹⁾.

I.1.3 De la structure à la dynamique moléculaire

I.1.3.a Modèle en mosaïque fluide

Après avoir décrit les éléments constitutifs, on peut se demander comment ils sont organisés au sein de cette structure membranaire. En s'appuyant sur les données expérimentales accumulées sur la morphologie, la biochimie et la physiologie des membranes cellulaires, Singer et Nicolson proposent, en 1972, un modèle moléculaire dit « en mosaïque fluide » [Singer and Nicolson, 1972]. Il décrit la matrice lipidique fondamentale comme un fluide bidimensionnel isotrope, c'est-à-dire en phase lamellaire fluide L_{α} au-dessus d'une certaine température T_m dite de fusion des chaînes qui est fonction de la longueur et du degré d'insaturation des chaînes d'acides gras [Lipowsky and Sackmann, 1995]. Or, tous les phénomènes

⁽¹⁾<http://www.mpibp-frankfurt.mpg.de/michel/public/memprotstruct.html>

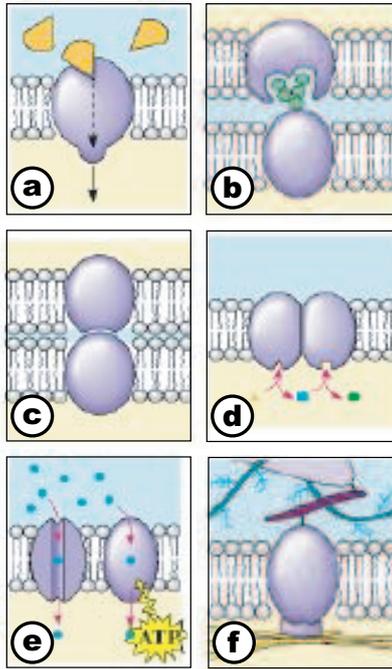


FIG. I.4 - Différents types de protéines membranaires et leurs fonctions : (a) Les récepteurs protéiques fixent spécifiquement des messagers chimiques (hormones, neurotransmetteurs) et génèrent une cascade de signaux qui modifient le comportement de la cellule. (b) Les chaînes oligosaccharidiques des glycoprotéines jouent un rôle important dans les processus de reconnaissance cellulaire. (c) Les protéines d'adhérence intercellulaire (cadhérines) attachent mécaniquement les cellules à leurs voisines en formant une sorte de ceinture d'adhérence. (d) Les protéines enzymatiques (protéines allostériques) lient un substrat sur leur site actif et catalysent sa conversion en un produit final qui inhibe souvent les enzymes qui l'ont initié. (e) Les protéines de transport (canaux ou pompes) permettent à des solutés de traverser la membrane. (f) Les protéines d'attachement (intégrines) permettent aux cellules de s'accrocher à la matrice extracellulaire. Adapté de <http://sci-div.bcc.ctc.edu/rkr/Biology201/lectures/Membranes/Membranes201.html>

de la physiologie cellulaire impliquent une importante participation de la fluidité des membranes. C'est pour cette raison que les cellules ajustent leur composition en acides gras de leurs lipides membranaires de manière à maintenir leur fluidité constante quelque soit la température du milieu.

Le modèle en mosaïque fluide doit être envisagé de façon dynamique (voir la Fig.I.5) : les lipides sont en perpétuel mouvement de diffusion latérale rapide, via le mouvement brownien [Lipowsky and Sackmann, 1995, p.305-357]. Dans « cette mare de lipides », des protéines membranaires se déplacent également, toutefois beaucoup plus lentement que les lipides. Des mesures quantitatives de la dynamique moléculaire dans les membranes ont été possible par des techniques du type FRAP (*Récupération de la fluorescence après photodécoloration*⁽²⁾), RMN (*Résonance Magnétique Nucléaire*) et RPE (*Résonance Paramagnétique Electronique*). Les valeurs ainsi obtenues sont typiquement de l'ordre de $D \simeq 10^{-7} - 10^{-8} \text{ cm}^2/\text{s}$ pour les molécules lipidiques [Baeriswyl et al., 1986]. En ce qui concerne les protéines transmembranaires, il est possible d'en estimer le coefficient de diffusion latérale à partir de la méthode de Saffman et Delbrück [Saffman and Delbrück, 1975]. Pour cela, ces derniers considèrent la bicouche comme un milieu visqueux dans laquelle se trouve une protéine représentée par un cylindre, de section $a = 10 \text{ nm}$ et de hauteur h , le tout plongé dans un fluide tridimensionnel beaucoup moins visqueux. Ils obtiennent alors la relation sui-

⁽²⁾En anglais, FRAP=“Fluorescence Recovery After Photobleaching”.

vante :

$$D = \frac{kT}{4\pi\eta_m h} \left[\ln \left(\frac{\eta_m h}{\eta_w a} \right) - \gamma \right] \simeq 10^{-7} - 10^{-8} \text{ cm}^2/\text{s}$$

avec h l'épaisseur de la membrane, $\eta_m \simeq 10^{-1}$ N.s/m² la viscosité de la membrane, $\eta_w \simeq 10^{-3}$ N.s/m² la viscosité du milieu aqueux environnant et $\gamma \approx 0,5772$ la constante d'Euler. Bien qu'elle donne des valeurs du coefficient de diffusion sensiblement identiques à celui des lipides, il faut rester prudent quant à la validité de cette relation. En effet, celle-ci est bien appropriée pour des membranes modèles baignant dans des solutions diluées en sels⁽³⁾, mais ne l'est plus dans le cas des systèmes biologiques pour lesquels les solutions environnantes sont beaucoup plus visqueuses dues à la présence de protéines solubles, de fibres polysaccharidiques (pour le glycocalyx) ou de polymères. Dans ces systèmes biologiques, des études ont montré que certaines protéines membranaires, comme les récepteurs e-cadhérine et transferrine, semblaient diffuser beaucoup plus lentement que les lipides avec un coefficient de diffusion compris entre 10^{-12} et 10^{-9} cm²/s, probablement liée aux interconnexions entre la membrane et le cytosquelette [Kusumi et al., 1993].

Des études ont montré, en outre, que suivant leur symétrie et leur environnement, ces molécules membranaires sont animées d'un mouvement de rotation autour de leurs axes mais aussi d'oscillation ("wobble") de cet axe rotationnel. Ces deux mouvements sont caractérisés par des temps de corrélation⁽⁴⁾ rotationnelle $\tau_{rot\parallel}$ et $\tau_{rot\perp}$, de l'ordre de 10^{-9} s et 10^{-11} s pour les lipides, ces valeurs dépendent naturellement du mécanisme et du modèle utilisé pour le mouvement des molécules sondées [Heyn, 1979, Jutila and Kinnunen, 1997]. D'autre part, les molécules lipidiques peuvent aussi migrer d'un feuillet de la bicouche à l'autre; néanmoins, ce phénomène de flip-flop est extrêmement lent, avec un temps de corrélation de l'ordre de l'heure voir du jour suivant la nature du phospholipide [Kornberg and McConnell, 1971, Zachowski, 1993]. Le taux de flip-flop est accru dans les membranes composites, et en particulier par la présence de certaines protéines telles que les flippases ou des bordures de plateaux qui sont suspectées jouer un rôle dans le flip-flop [Devaux, 1991]. Pour les molécules lipidiques, il existe aussi des mouvements intramoléculaires tels que les mouvements d'isomérisation trans/gauche des chaînes hydrocarbonées et de rotation des liaisons carbone-carbone avec des temps de corrélation respectivement de l'ordre de 10^{-10} s et 10^{-11} s.

⁽³⁾La solution donnée par Saffman et Delbrück n'est valable que pour des valeurs de $\eta_w a / \eta_m h$ inférieures à 0,1.

⁽⁴⁾C'est le temps moyen pris par une molécule pour tourner de 1 radian.

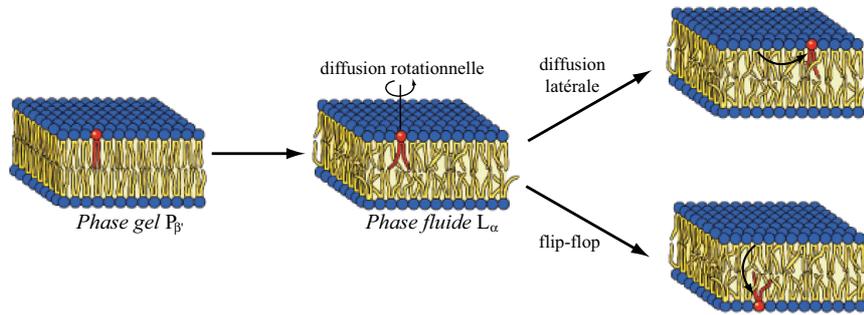


FIG. I.5 - Au-dessus de la température de fusion des chaînes acyles, une membrane lipidique passe d'une phase gel P_{β} (ou cristalline rigide) où les chaînes d'acides gras ont de fortes interactions hydrophobes, à une phase fluide moins ordonnée L_{α} (appelée smectique A en utilisant le vocabulaire des cristaux liquides) où les chaînes d'acides gras sont plus mobiles. Cette phase fluide est caractérisée par des comportements dynamiques au sein de la bicouche, qui sont à l'échelle microscopique les diffusions latérale, rotationnelle et l'échange transversal (ou flip-flop) avec des échelles de temps caractéristiques totalement différentes (voir par exemple [Lipowsky and Sackmann, 1995]).

I.1.3.b Nouveau modèle membranaire

Toutefois, grâce à l'avènement de nouvelles techniques telles que les pièges optiques, le SPT (*Simple Particle Tracking*) ou le FCS ⁽⁵⁾ (*Fluorescence Correlation Spectroscopy*), de récentes études [Forstner et al., 2003, Vereb et al., 2003] ont montré que les lipides (et les protéines) ne diffusaient pas aussi librement comme le proposait le modèle originel de Singer et Nicolson. En effet, les structures membranaires observées à l'aide de ces techniques ont révélé une forte hétérogénéité latérale, du moins à l'échelle nanométrique, ce qui laisserait supposer l'existence de micro-domaines distincts dans des phases différentes (comme les "rafts" de lipides et les "clusters" de protéines). Ainsi, le concept de fluidité du modèle originel est à ré-interpréter comme une exigence de l'architecture membranaire en accord avec les besoins de la cellule et avec les contraintes imposées par le milieu environnant.

I.1.4 Transport à travers la membrane

La cellule est un système thermodynamique ouvert qui opère dans des conditions hors d'équilibre, c'est-à-dire qu'elle échange continuellement avec le milieu extérieur de la matière et du combustible. Mais la composition interne de la cellule ne peut varier que dans d'étroites limites sous peine de se mettre en danger ; aussi, pour maintenir l'équilibre intracellulaire, la membrane cellulaire joue le rôle de barrière hautement sélective en imposant à chacune des substances qui

⁽⁵⁾Cette technique est basée sur la mesure des fluctuations du nombre de molécules fluorescentes dans un volume défini.

Compositions ioniques	Concentration (mM)		
	intracellulaire	extracellulaire	
cations :	Na ⁺	10	142
	K ⁺	140	4
	Mg ²⁺	1	1-2
	Ca ²⁺	< 10 ⁻³	2
	H ⁺	4.10 ⁻⁵ (pH 7,4)	4.10 ⁻⁵
anions :	Cl ⁻	4	105
	HCO ₃ ⁻	10	25
	phosphate	11	2

TAB. I.1 - Comparaison des compositions ioniques à l'intérieur et à l'extérieur d'une cellule animale typique. Adapté de [Alberts et al., 2002].

la traversent un bilan positif ou négatif (Fig. I.6). Ces échanges permettent à la cellule de maintenir des concentrations de solutés dans le cytoplasme différentes de celles du milieu extracellulaire (Tab. I.1).

En raison de la très grande diversité des substances biologiques, les cellules ont dû développer des systèmes particuliers pour transporter chaque substance à travers leurs membranes. L'universalité de ces phénomènes de transport explique que leur étude constitue l'un des thèmes importants de la recherche biologique et biophysique actuelle.

Pour transporter des ions inorganiques et de petites molécules hydrosolubles, les cellules utilisent deux types de protéines transmembranaires spécifiques : les *protéines porteuses* se lient au soluté spécifique, qui doit être transporté, et subissent un changement de conformation pour faire passer le soluté d'un côté à l'autre de la membrane ; et les *canaux protéiques* forment des pores étroits, remplis d'eau qui traversent la bicouche. Chaque protéine est destinée au transport d'une classe particulière de molécules et souvent d'une seule espèce moléculaire de cette classe. La perméabilité sélective de la membrane repose donc sur les propriétés chimiques de la bicouche et des protéines. Hormis la perméabilité sélective, inhérente à la membrane, deux facteurs physico-chimiques essentiels déterminent l'amplitude du transport : la différence de concentration (ou le gradient de concentration) et la différence de potentiel électrique (ou le potentiel de membrane) des deux côtés de la membrane.

Les transports biologiques sont répartis en deux catégories, suivant que le flux de matière est dirigé dans le sens du gradient de potentiel électrochimique de l'espèce déplacée, ou bien, au contraire, dans le sens opposé. Dans le premier cas, il s'agit d'un *transport passif* ; dans le second, de *transport actif* qui se fait toujours par l'intermédiaire de protéines porteuses. On peut encore distinguer

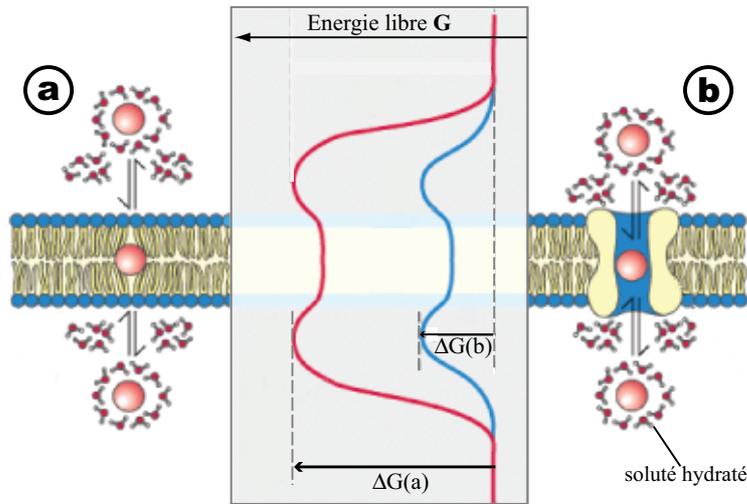


FIG. I.6 - Transport de solutés hydratés par deux voies différentes : (a) Diffusion simple et (b) Diffusion facilitée à l'aide d'une protéine porteuse. La barrière de potentiel $\Delta G(b)$ que doit passer le soluté par diffusion facilitée à travers la membrane est abaissée par rapport à la diffusion simple $\Delta G(a)$. Adapté de <http://chemweb.calpoly.edu/chem/stevenson/Chem371F02/Handouts/Chem371-F02-Lecture%2026-membranes.pdf>

dans ce dernier cas un transport actif secondaire d'un transport actif primaire. Le système de transport actif secondaire peut s'envisager comme un système de diffusion facilitée dans lequel le mouvement d'un soluté (généralement H^+ ou Na^+) dans le sens de son gradient de concentration peut entraîner, au niveau du même transporteur, le mouvement d'un autre soluté dans le sens opposé à son gradient. Dans ce cadre, l'énergie nécessaire au mouvement contre-gradient provient du gradient de concentration du soluté co-transporté. Par exemple, les cellules épithéliales contiennent des transporteurs d'oses ou d'acides aminés commandés par le gradient de Na^+ . Dans le transport actif dit primaire par contre, l'énergie nécessaire au transport contre gradient est directement dérivée d'une réaction métabolique, lumino-chimique ou autre [Alberts et al., 2002].

I.1.4.a Transport passif

Les bicouches lipidiques permettent à l'eau et aux petites molécules non polaires (oxygène, gaz carbonique) de pénétrer spontanément par *diffusion simple*. Elles sont également perméables à diverses molécules polaires, comme les ions (Na^+ , K^+ , Cl^-), les substances liposolubles et de nombreux métabolites cellulaires, qui ne traversent pas directement la membrane. Le transport passif est alors assuré soit par des canaux protéiques soit par des transporteurs mobiles,

spécifiques, qui les font passer rapidement d'une face à l'autre de la membrane : ce procédé porte le nom de *diffusion facilitée* (Fig.I.7(a)).

I.1.4.b Transport actif primaire

Les protéines peuvent fonctionner comme des pompes en entraînant activement certains solutés contre leurs gradients électrochimiques (Fig.I.7(b)). L'énergie fournie par l'extérieur sous forme chimique, lumineuse ou de gradient ionique est utilisée par la protéine pour changer de conformation, de telle sorte que le soluté lié à celle-ci se voit transporter de l'autre côté de la membrane. Des études de clonage et de séquençage de l'ADN montrent que les protéines porteuses appartiennent à un petit nombre de familles. La famille d'ATPases de transport en constitue un exemple important, celles-ci utilisent l'énergie provenant de l'hydrolyse d'ATP, suivant la réaction :



On distingue actuellement les *ATPases ioniques* impliquées dans le transport actif d'ions inorganiques des *ATPases de trafic* ou *transporteurs ABC* (=“ATP Binding Cassette”), impliquées dans le transport de solutés organiques.

Les ATPases ioniques sont réparties en trois classes majoritaires : “P” pour celles qui forment un intermédiaire phosphorylé, “V” pour celles qui sont situées dans la vacuole, et “F” pour celles qui sont formées de sous unités F_1F_0 . Les P-ATPases couplent l'hydrolyse de l'ATP au transport de différents ions (à travers les membranes plasmiques ou, en ce qui concerne le Ca^{2+} , également au niveau du RE) [Scarborough, 1999]. L'ATPase- Ca^{2+} du RE a pour rôle de pomper le calcium cytoplasmique dans le réticulum, réserve majeure de calcium intracellulaire. Elle joue, dès lors, dans le muscle un rôle primordial dans la relaxation qui suit l'excitation ; cette dernière étant déterminée par un relargage massif d'ions Ca^{2+} dans les myofibrilles. Dans les autres cellules, elle joue un rôle, avec l'ATPase- Ca^{2+} plasmique, dans la régulation de la concentration en Ca^{2+} du milieu intracellulaire. Le Ca^{2+} intervient dans différents systèmes de signalisation intracellulaire et sa concentration est alors contrôlée de manière très fine. Les V-ATPases sont des ATPases- H^+ que l'on retrouve spécifiquement au niveau des membranes de différents organites intracellulaires (vésicules, lysosome, etc) [Forgac, 2000]. Leur rôle est d'acidifier le compartiment intravésiculaire. Elles jouent, dans ce cadre, un rôle important dans les processus endocytaires. Les F-ATPases, qui sont en fait des ATPsynthases, pourraient être définies comme des ATPases- H^+ particulières. Présentes dans les mitochondries, elles couplent en conditions physiologiques le mouvement de H^+ suivant son important gradient à la synthèse de l'ATP à partir d'ADP et de P_i . Ces systèmes sont donc à considérer effectivement comme des synthétases plutôt que des ATPases. Les ATPsynthases font partie intégrante du système de phosphorylation oxydative caractérisant le mécanisme mitochondrial

de formation d'ATP (chaîne de transfert d'électrons). Notons cependant que les F-ATPases présentent un haut degré d'homologie structurale avec les V-ATPases [Grüber et al., 2001].

Les transporteurs ABC constituent l'une des familles de protéines les plus importantes tant par leur nombre que par leur implication dans des manifestations pathologiques, soit parce qu'ils sont inactivés par mutation qui provoque une maladie génétique (Mucoviscidose, Hyperinsulinisme familial, Maladie de Stargardt, etc), soit au contraire parce qu'ils sont suractivés, l'exacerbation de leur fonction provoquant alors la maladie [Chang, 2003]. Elles permettent soit l'import, soit l'export d'une grande variété de substrats à travers les membranes biologiques : des drogues, des toxines animales, des protéases, des ions, des acides aminés, des oligo-saccharides. Ils sont caractérisés par une structure en quatre domaines : deux segments transmembranaires, formant le site de reconnaissance du substrat (TMD="transmembrane domains"), et deux domaines cytoplasmiques qui lient les nucléotides (NBD="nucleotides binding domains").

I.1.4.c Transport actif secondaire ou Cotransport

Une pompe alimentée par l'ATP et transportant activement un certain soluté peut amorcer indirectement le transport passif d'un second soluté, que ce soit dans la même direction (*symport*), ou dans la direction opposée (*antiport*). Ce mécanisme est appelé *cotransport*. Par exemple, les cellules intestinales et rénales transportent du glucose à travers la membrane plasmique par un symporteur de Na^+ . Mais le transport de Na^+ peut aussi être utilisé dans le pompage de Ca^{2+} : il s'agit alors d'un mécanisme de cotransport de type antiport.

I.1.5 Le transport vésiculaire : le trafic cellulaire

Les cellules ont également mis au point des méthodes pour transporter du matériel tel que des protéines ou des phospholipides qui sont trop volumineux pour traverser la membrane par des canaux ou des pompes. Ces transports peuvent se faire, soit entre le milieu extérieur et la cellule, soit entre différents organites d'une même cellule. Même si les principaux mécanismes du trafic intracellulaire sont dans l'ensemble connus et ont pu être mis en évidence expérimentalement [Kirchhausen, 2000], il reste encore beaucoup de zones d'ombre à éclaircir, notamment les différents acteurs nécessaires à chacune des étapes et leur mode d'action.

I.1.5.a Exocytose

L'exocytose est un mécanisme qui permet le passage de certaines substances de l'intérieur de la cellule vers le milieu extracellulaire. Avant d'être expulsées, ces substances sont enfermées dans un sac constitué d'une membrane qu'on appelle

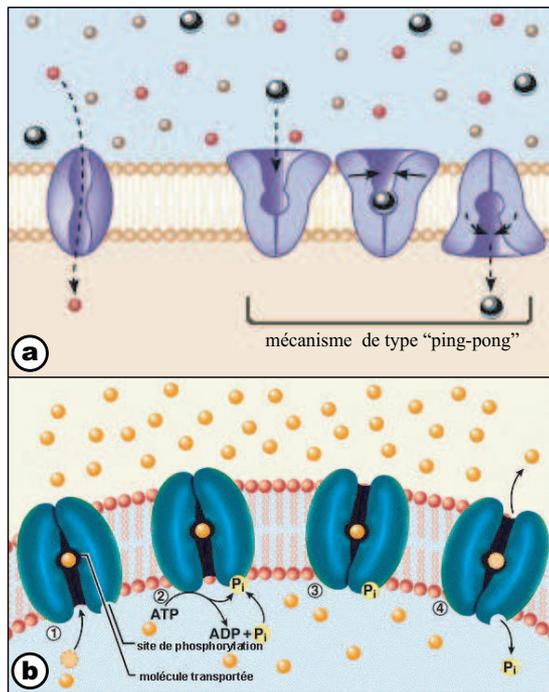


FIG. I.7 - (a) Transport passif à travers des canaux protéiques, comme par exemple les aquaporines (à droite) et à travers des transporteurs qui fixent une molécule cible et changent de conformation pour la libérer de l'autre côté de la membrane : mécanisme de type « ping-pong » (à gauche). (b) Transport actif : la pompe utilise l'énergie provenant de l'hydrolyse de l'ATP pour transporter des ions contre son gradient de concentration. Adaptés de <http://www.bmb.psu.edu/courses/bisci004a/cells/cellstruc.htm>

vésicule. L'étape suivante est la migration de cette vésicule en direction de la membrane plasmique puis sa fusion avec celle-ci. Pour terminer, le contenu de la vésicule se déverse alors dans le milieu extracellulaire (Fig.I.8).

I.1.5.b Endocytose

Inversement, les cellules internalisent diverses substances présentes dans le milieu environnant suivant trois voies : la pinocytose, l'endocytose via des récepteurs interposés et la phagocytose. Ces mécanismes d'endocytoses sont toujours compensés par un flux d'exocytose.

Dans la pinocytose, on voit se mettre en place dans la cellule un petit repli de membrane, appelé caveolae [Pelkmans and Helenius, 2002], qui vient envelopper une gouttelette de liquide extracellulaire dans laquelle se trouvent des molécules dissoutes. Comme tous les solutés dissous dans les gouttelettes sont englobés sans discrimination, ce processus ne constitue pas une forme de transport spécifique. (Fig.I.9(a)).

L'autre voie, l'endocytose par récepteurs interposés, nécessite la présence de récepteurs très spécifiques intégrés dans la membrane qui recrutent certaines substances, appelées ligands, en créant une invagination à cet endroit de la membrane. Prenons l'exemple de l'endocytose par voie clathrine. Ces molécules, qui sont liées à des récepteurs transmembranaires spécifiques au ligand à internaliser, peuvent polymériser spontanément en formant un petit panier qui enserre le puits d'endocytose avec une organisation polygonale [Sever et al., 2000]. L'individualisation en vésicule se fait par le resserrement complet du col de ce puits. C'est

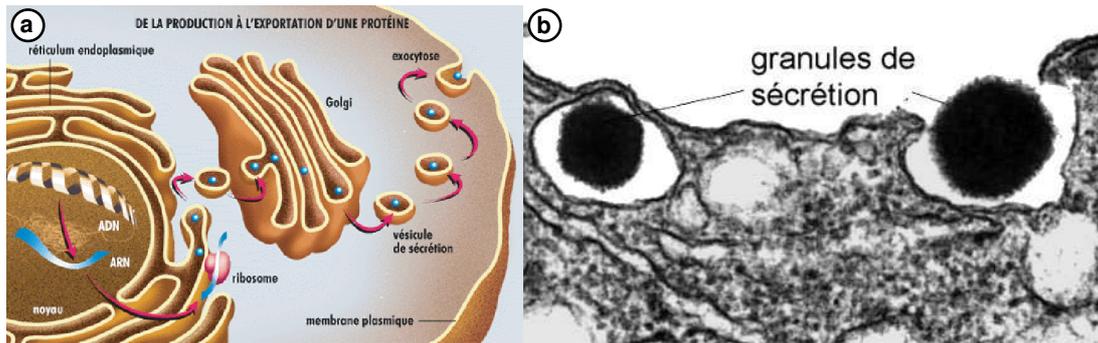


FIG. I.8 - (a) Représentation schématique des principales voies du trafic intracellulaire. Les voies de sécrétion et d'exocytose mettent en jeu le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi. (b) Exocytose de vacuoles sécrétrices observée en microscopie électronique (d'après [Alberts et al., 2002]).

un processus probablement très coûteux en énergie dans lequel intervient la dynamine. Celle-ci va former des sortes de spirales resserrant le col et va entraîner, par changement de conformation, le rapprochement des deux membranes et leur fusion. Au fur et à mesure que cette vésicule tapissée de clathrines se déplace dans le cytoplasme (avec l'aide du cytosquelette), il va y avoir destruction du manteau de clathrine donnant ainsi naissance à un endosome (Fig.I.9(b)). Cependant, au vue des connaissances actuelles, cette description reste encore hypothétique. Les détails du mécanisme de bourgeonnement-fission ne sont, en effet, pas encore bien compris. Parallèlement à l'observation de vésicules mantelées de clathrines, des études ont aussi montré que même des vésicules ne comportant aucun manteau protéique peuvent induire une endocytose dite de « phase fluide », indépendante de l'endocytose par voie clathrine. Certains travaux ont, en effet, mis en évidence que l'activité flippase pompant spécifiquement des phospholipides du feuillet externe vers le feuillet internes de la membrane plasmique génère une asymétrie en nombre de phospholipides qui est à l'origine de la vésicularisation initiant ce type d'endocytose [Farge et al., 1999, Rauch and Farge, 2000].

La cellule procède à la phagocytose en lançant ses pseudopodes autour d'une particule et en l'enveloppant dans un sac membraneux portant le nom de phagosome, autrement dit corps à manger (Fig.I.9(c)). Le plus souvent, le phagosome va fusionner avec un lysosome contenant des enzymes digestives qui vont permettre d'hydrolyser le contenu de la vésicule. Nous pouvons citer comme exemple les macrophages (une variété de globules blancs) qui éliminent les bactéries et d'autres substances étrangères.

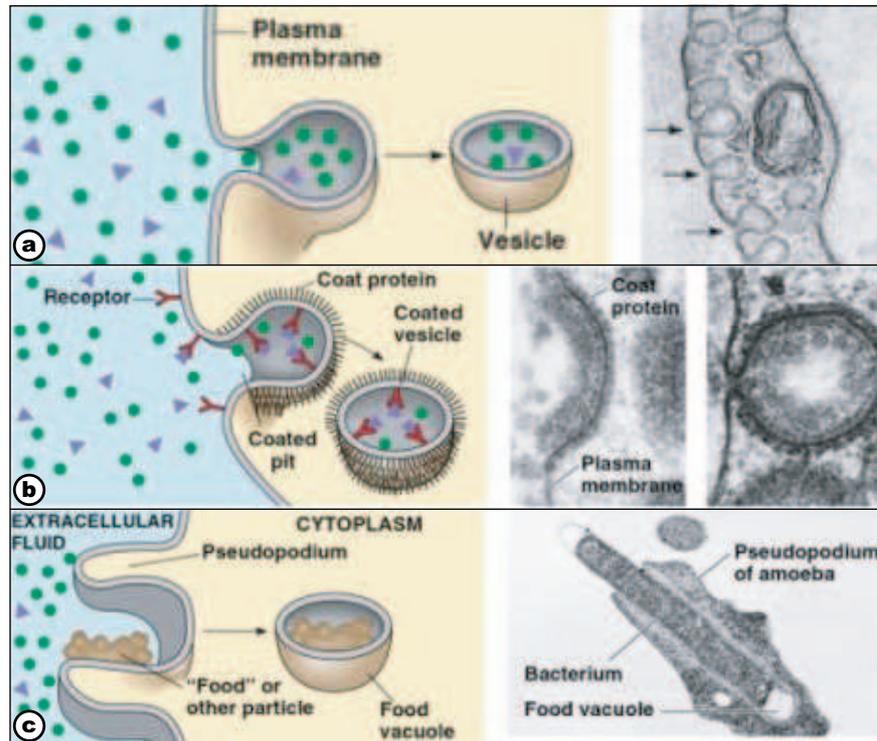


FIG. I.9 - Les différentes voies de l'endocytose (les images de droite correspondent à des micrographies électroniques) : (a) Pinocytose de liquide et de solutés dans de petites vésicules. (b) Endocytose de vésicules médiée par des protéines dites de « manteaux » (comme les clathrines) qui sont liées à des récepteurs membranaires. (c) Une bactérie est en train de se faire absorber par un granulocyte. Adapté de <http://scidiv.bcc.ctc.edu/rkr/Biology201/lectures/Membranes/Membranes201.html>

I.2 ... aux membranes artificielles

On voit que loin d'être des enveloppes inertes faites de structures fixes, les membranes sont douées de fonctions dynamiques et sont en interaction directe avec le milieu environnant. La « membranologie » constitue donc un champ de recherche stimulant pour les physiciens théoriciens et expérimentaux qui doivent faire face à un large panel de problèmes fondamentaux comme l'auto-organisation, la structure et les dynamiques moléculaires, les interactions intermoléculaires, le transport de matière et d'énergie, et les forces interfaciales. Mais, les physico-chimistes, qui se penchent sur la cellule, sont tentés, pour réduire la complexité du système, d'enlever tout l'intérieur (noyau, organelles, cytosquelette, ...). Une des pistes qu'ils empruntèrent fut le globule rouge, cellule dépourvue de noyau et d'organites cellulaires. Toutefois, cet objet reste encore d'une grande complexité en raison de son cytosquelette qui lui confère des propriétés viscoélastiques et du nombre important de constituants dans sa membrane. Ils choisirent alors d'enlever

tout ce qui dépasse (glycocalix) de la membrane, puis tout ce qui n'en constitue pas l'élément dominant (enzymes, protéines membranaires, ...). Il reste à u final une VÉSICULE.

I.2.1 Les liposomes

Les liposomes, vésicules phospholipidiques organisées en bicouche et contenant quelques μm^3 de solvant, remplissent bien la condition de compartimentation et de ce point vue se sont imposés comme un modèle extrêmement simple de cellules et membranes biologiques (C'est le niveau zéro de la modélisation). Outre leur statut de modèle, les liposomes ont également trouvé des applications en cosmétologie (crèmes hydratantes, antioxydants ...) et en pharmacologie en tant que vecteur de principes actifs sous une forme adaptée à un adressage spécifique et optimisé auprès des cellules cibles [Lasic, 1995].

Tout d'abord, les liposomes submicroniques SUV (*Small Unilamellar Vesicles* : 30-50 nm) et LUV (*Large Unilamellar Vesicles* : 50-500 nm) ont été intensivement et minutieusement étudiés, mais de par leurs dimensions, ils possèdent une courbure plus élevée que les membranes plasmiques et de ce fait, constituent des modèles assez éloignés de la cellule. Ils s'apparentent d'avantage à certains organites comme les vésicules de sécrétion, les lysosomes ou les endosomes. La préparation de populations unimodales de vésicules unilamellaires nécessite, pour être reproductible, l'utilisation de méthodes hautement invasives telles que la sonication [Kloesgen and Helfrich, 1993], l'ultrafiltration [MacDonald et al., 1991] ou l'évaporation de solvants organiques [Kim and Martin, 1981]. De plus, le résultat de ces préparations est souvent instable dans le sens où les objets obtenus changent aisément de forme et de taille. Cependant, il n'est pas encore clair que l'état vésiculaire soit un état d'équilibre ou seulement un état intermédiaire par lequel passe le mélange lipide-eau avant d'atteindre sa configuration d'équilibre finale [Harbich and Helfrich, 1990, Luisi and Walde, 2000, Helfrich et al., 1999].

I.2.2 Les vésicules géantes

Les vésicules unilamellaires de taille proche de la cellule GUV (*Giant Unilamellar Vesicles* : de 1 à 200 μm de diamètre) ont ensuite attiré l'attention car elles constituent un système idéal pour l'observation directe par les techniques de microscopie optique (contraste de phase, fluorescence, RICM, voir Fig.I.10) des propriétés physiques et chimiques des membranes et pour leurs applications techniques [Luisi and Walde, 2000]. De nombreux travaux ont été consacrés à l'inventaire, fort complexe, des formes d'équilibre et aux propriétés mécaniques des GUVs [Lipowsky and Sackmann, 1995]. L'étude des formes d'équilibre d'une vésicule sans contrainte extérieure a, à elle seule, nécessité des efforts considérables théoriques, numériques et expérimentaux [Seifert, 1997]. L'observation expérimentale a permis de confirmer la validité de certains travaux

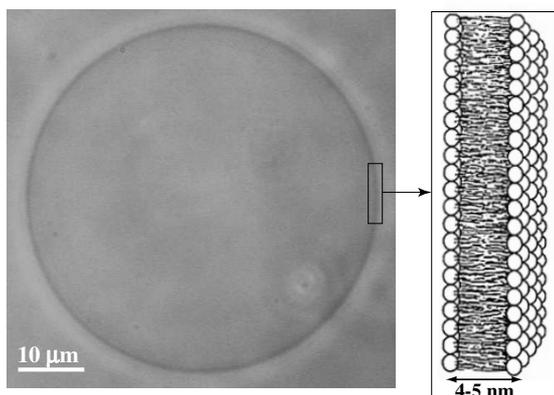


FIG. I.10 - Image d'une vésicule géante observée en microscopie à contraste de phase. La barre représente $10 \mu m$. Le schéma de droite correspond au détail moléculaire de la membrane constitué d'un double feuillet de lipides de l'ordre de 4-5 nm.

théoriques. En retour, ces modèles théoriques servent à interpréter les manipulations menées sur des vésicules, afin de mesurer des paramètres physiques de la membrane elle-même (constantes de courbure, tension) ou d'objets associés (couplage avec un réseau réticulé ou avec des protéines adsorbées, rigidité de polymères).

Différentes méthodes pour obtenir des GUVs ont été longuement décrites dans la littérature. D'ailleurs, la classification en taille des vésicules est liée à la méthode de préparation utilisée, qui permet une meilleure caractérisation des propriétés des vésicules. L'une de ces méthodes est basée sur l'hydratation d'un film de lipides séché par une solution aqueuse et pour une durée assez longue, en moyenne une trentaine d'heure, ce qui lui a valu le surnom de « méthode corse » [Needham and Evans, 1988, Akashi et al., 1998]. Une technique basée sur l'évaporation de solvant organique dans une solution aqueuse a été présentée par Moscho et al. [Moscho et al., 1996]. Un des avantages de cette méthode est la courte durée nécessaire pour obtenir des GUVs. Une autre technique, dite « méthode bulgare », introduite par Angelova et Dimitrov en 1986 [Angelova and Dimitrov, 1986], consiste à hydrater un film de lipides séché au-dessus de la température de transition de phase, et en présence d'un champ électrique. Ces vésicules géantes obtenues à l'aide d'un champ électrique ont d'ailleurs été l'objet de nombreuses études dans le but de comprendre leurs propriétés physiques et leurs changements de formes [Mathivet et al., 1996]. Nous parlerons de ces techniques plus en détail dans la suite du manuscrit.

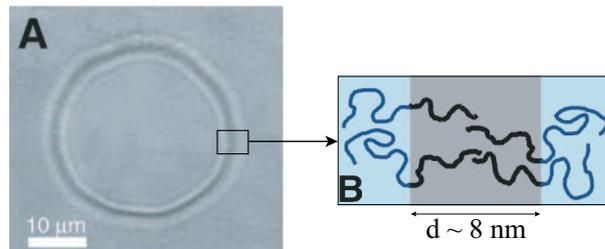
Dans ce manuscrit, nous nous sommes intéressés à ce type d'objet pour modéliser les échanges de matériels biologiques et les processus de transport qui ont lieu au niveau des membranes biologiques.

I.2.3 Les polymersomes

Avant de continuer sur le(s) système(s) qui fait(ont) le propos de ce manuscrit, ouvrons juste une parenthèse pour souligner le fait qu'il est possible de pousser ce

réductionnisme plus en avant. En effet, les « polyméristes », intéressés par ce type de structure supramoléculaire, ont remplacé les lipides, éléments principaux de la membrane, par un copolymère dibloc analogue des lipides car s'auto-organisant en diverses phases ordonnées, et notamment en liposome ce qui leur a valu le nom de polymersome (voir Fig.I.11).

FIG. I.11 - Vésicule géante unilamellaire de polyéthylèneoxyde-polyéthylène $EO_{40}-EE_{37}$ observée en microscopie à contraste de phase (A) et représentation schématique du copolymère dibloc formant la membrane d'épaisseur $d \simeq 8$ nm (B) [Discher et al., 1999].



I.3 Les membranes artificielles, des systèmes modèles...

I.3.1 ... pour le trafic intracellulaire

Les membranes cellulaires sont toutes le siège de trafics importants de matériels biologiques (lipides, protéines, etc.). Par exemple, les différents compartiments cellulaires (RE, appareil de Golgi, endosomes, lysosomes, membrane plasmique) communiquent entre eux par l'intermédiaire de petites vésicules qui bourgeonnent d'un compartiment donneur, migrent puis fusionnent avec un compartiment accepteur afin d'y libérer leur contenu (Fig. I.12), soit sous forme soluble, soit inséré dans la membrane (hormones, enzymes, etc.) [Kirchhausen, 2000]. Les différents intermédiaires de ces processus (fission-migration-fusion) ont, depuis peu de temps, été identifiés et en partie caractérisés. Toutefois, il n'en reste pas moins que les mécanismes mis en jeu et plus particulièrement, les forces endogènes intervenant lors de ces échanges soient encore mal caractérisées et donc mal comprises. Des études, *a priori* totalement disjointes de la problématique de l'endocytose, et effectuées sur un érythrocyte (globule rouge) par l'application d'une surpression hydrostatique ont pu mettre en évidence l'apparition de bourgeons pouvant conduire à l'exo-vésicularisation [Takeo et al., 1991], c'est-à-dire à la formation de tubes de membranes externes, ou bien à l'apparition de spicules caractéristiques de l'échinocytose (voir Fig. I.13).

Les propriétés mécaniques des membranes lipidiques sont trop souvent considérées comme secondaires dans les processus d'endocytose et d'exocytose. Or, récemment, des systèmes modèles ont été développés au laboratoire Physico-Chimie Curie pour étudier les flux de lipides et leurs conséquences sur la sta-

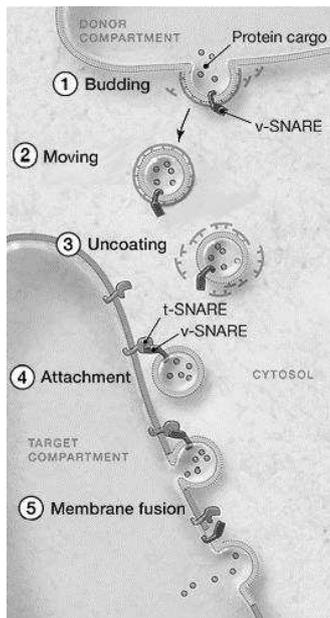


FIG. I.12 - *Trafic intracellulaire* : (1) les vésicules transportant les protéines bougeonnent de la membrane du compartiment donneur, (2) et (3) migration de la vésicule cargo vers le compartiment accepteur et perte de l'enveloppe protectrice, (4) la vésicule nue s'accroche à la membrane du compartiment cible par l'intermédiaire de la reconnaissance v-SNARE/t-SNARE, (5) la membrane de la vésicule adhère puis fusionne avec celle du compartiment cible générant un pore par lequel est libéré son chargement. Adapté de [Blumenthal et al., 2003].

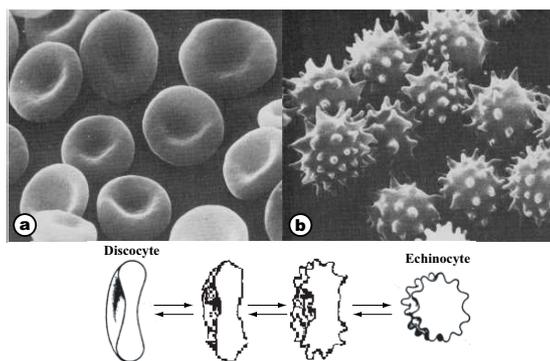


FIG. I.13 - Changement de forme du globule rouge à partir de sa forme (a) discocyte normale qui peut devenir crénelés, appelé (b) échinocyte, sous l'action d'un facteur extérieur (Images adaptées de [Smith et al., 1982]). Les différentes étapes de la transformation discocyte \rightarrow échinocyte appelée échinocytose sont indiquées en dessous.

bilité et la morphologie de la membrane. Pour initier la fusion en l'absence de protéine, certains ont choisi de déstabiliser la membrane de vésicules géantes par la présence de tensio-actifs (par exemple la famille des Tween Fig. I.14), ou encore par simple illumination d'un marqueur fluorescent intégré dans la membrane [Sandre, 2000]. D'autres ont opté pour l'interaction électrostatique en mélangeant des vésicules géantes chargées négativement (10% de charges) avec des petites vésicules chargées positivement (SUVs de quelques dizaines de nanomètres avec 10% de charges) mimant les intermédiaires de transport cellulaires [Solon, 2004]. Dans ce dernier cas, la fusion s'accompagne d'une instabilité avec l'apparition de bourgeons ou de « doigts » membranaires liée à l'apport de lipides. Pour extraire les paramètres physiques qui sont liés à l'apparition de ces instabilités, nous avons développé un modèle théorique constitué d'une membrane échangeant des phospholipides avec le milieu environnant qui est alors considéré comme un gigantesque réservoir de phospholipides (voir le chapitre III.2). Nous avons pu parfaitement prévoir l'apparition d'instabilités avec des fluctuations de forme de

grande amplitude.

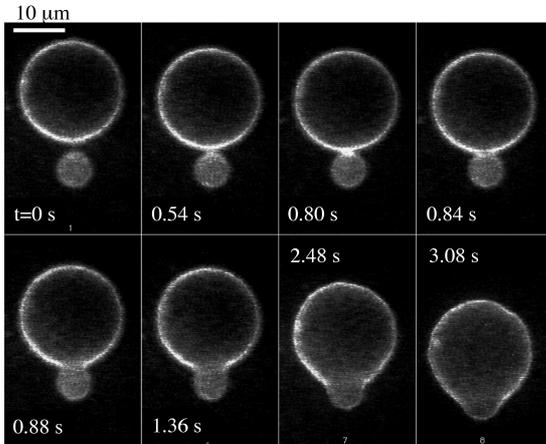


FIG. I.14 - Fusion de vésicules de DOPC marquées avec quelques % de marqueur fluorescent Di6-ASPBS. Les vésicules sont dans un mélange iso-osmolaire glucose/glycérol/Tween 20 [Puech, 2003]. Le Tween 20 est un surfactant qui s'incorpore dans la membrane et plus particulièrement dans une zone de forte courbure pour en abaisser la tension de ligne et ainsi stabiliser la formation du pore.

I.3.2 ... pour les processus actifs

Les membranes biologiques sont aussi le siège, via un arsenal de protéines, de nombreux processus dit actifs, car consommant de l'énergie, et essentiels à la survie d'une cellule. Par exemple, les compartiments intracellulaires (RE, appareil de Golgi, endosomes) ont des formes assez complexes dont l'origine est encore inexplicée. De récentes expériences *in vivo* [Sciaky et al., 1997], effectuées sur les changements de forme de l'appareil de Golgi induits par une variation de la température, suggèrent que ses morphologies sont maintenues par un trafic actif. Une description des membranes biologiques qui ne prendrait pas en compte leur nature hors équilibre serait donc clairement incomplète. Et pourtant, seules les membranes fluides à l'équilibre thermique ont fait l'objet d'intenses études, l'aspect hors d'équilibre des membranes a seulement été pris en compte sur les plans expérimental et théorique que depuis quelques années. Ainsi après avoir passés en revue, dans le chapitre II, les principaux résultats des membranes à l'équilibre thermodynamique, nous présenterons dans le chapitre III un modèle théorique sur les membranes contenant des centres actifs (pompes, enzymes, etc.) et basé sur la physique statistique hors équilibre [Prost and Bruinsma, 1996, Ramaswamy et al., 2000]. Nous verrons comment celui-ci a permis de comprendre l'augmentation des fluctuations de forme observée sur des membranes lipidiques contenant une pompe à proton photo-activable, la bactériorhodopsine (BR) [Manneville, 1999, Manneville et al., 2001]. C'est en suivant la même démarche que nous nous sommes intéressés à des vésicules lipidiques contenant une protéine transmembranaire, la pompe à calcium (ATPase- Ca^{2+}). Celle-ci est activée par hydrolyse de l'ATP et subit des changements de conformation de grande amplitude lors de son activation qui devraient produire des effets très importants sur les fluctuations de la membrane. Nous expliquerons dans la

chapitre IV le protocole que nous avons mis au point pour reconstituer cette protéine dans la membrane de vésicules géantes. La membrane ainsi décorée doit subir des forces dues à la fois à l'agitation thermique (c'est-à-dire au mouvement brownien) et en même temps à l'activité des protéines. Comme pour la BR, nous adapterons cette théorie à notre système et nous la confronterons, dans le chapitre V, aux résultats expérimentaux que nous avons obtenus sur l'ATPase- Ca^{2+} .

Chapitre II

Physique des membranes à l'équilibre

Le propos de ce chapitre est d'introduire les propriétés physico-chimiques des membranes fluides à l'équilibre thermodynamique et de rappeler les concepts de base de la physique statistique sur ce type d'objets. Nous étudierons, entre autre, l'une des conséquences de leur « molesse », à savoir les fluctuations thermiques engendrées par les chocs incessants des particules de fluide. Ceci nous conduira tout naturellement à ré-interpréter les propriétés élastiques des membranes aux échelles de longueur accessibles à l'expérimentateur les observant à travers son microscope. Nous passerons aussi en revue à ce propos, les modèles qui ont permis d'analyser et d'interpréter les formes observées des membranes.

II.1 Description microscopique des membranes

Depuis les travaux pionniers de Helfrich [Helfrich, 1973], Canham [Canham, 1970] et E. Evans [Evans, 1973] dans les années 70, le rôle important de l'élasticité de courbure pour les formes des vésicules et leur interaction avec des interfaces dures ou molles sont devenus de plus en plus évidents. Les propriétés élastiques des membranes ont permis d'expliquer (ou du moins, donner quelques éléments de réponse) quelques propriétés des cellules telles que certains changements de forme, les processus de fusion et de fission, ou encore certains aspects de la motilité cellulaire.

II.1.1 Propriétés élastiques

Les propriétés des bicouches lipidiques sont en général caractérisées par seulement trois types de déformation élastique : élongation, cisaillement et courbure (voir Fig.II.1). Une déformation quelconque est la combinaison de ces trois déformations élémentaires, qui font partie de classes de symétries différentes :

déformation isotrope pour l'étirement, déformation à surface constante pour le cisaillement et déformation perpendiculaire au plan de la membrane pour la courbure. L'élasticité des vésicules dans l'état fluide est essentiellement déterminée par la première et la troisième contribution, tandis qu'il est nécessaire de considérer les trois si nous voulons traiter le cas des érythrocytes ou des vésicules polymérisées.

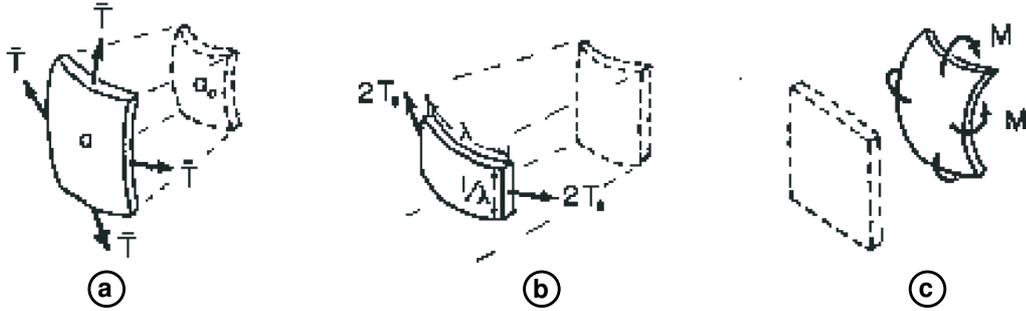


FIG. II.1 - Représentation schématique des trois modes de déformation indépendante (a) compression/élongation induisant un changement d'aire, (b) cisaillement induisant une extension latérale à aire constante, et (c) courbure (adaptée de [Bloom et al., 1991]).

Elongation (Stretching)

L'élongation des bicouches lipidiques est limitée à de faibles déformations, moins de 5 % de l'aire totale [Needham and Evans, 1988]. Au-delà de cette variation d'aire qui correspond à une tension critique τ_{lysis} ($\sim 10^{-3} \text{ J/m}^2$), des pores hydrophiles apparaissent dans la membrane jusqu'à sa complète destruction. La densité (surfactive) d'énergie d'étirement dépend du changement relatif de surface $\Delta A/A$ de manière quadratique ;

$$f_{st} = \frac{1}{2} K_a \left(\frac{\Delta A}{A} \right)^2, \quad (\text{II.1})$$

où K_a est le module de compressibilité, de l'ordre de 10^{-5} J/m^2 pour les globules rouges [Evans et al., 1976] et de $0,2 \text{ J/m}^2$ pour des vésicules lipidiques [Evans and Rawicz, 1990].

Cisaillement pur (Pure shear)

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

$$f_{sh} = \frac{1}{2} \mu (\ell^2 + \ell^{-2} - 2), \quad (\text{II.2})$$

où $\ell = (L_0 + \Delta L)/L_0$ est le taux d'extension latérale et μ le module de cisaillement. Cette énergie peut devenir importante dans le cas de membrane cristalline ou polymérisée : $\mu = 6 \times 10^{-6}$ J/m² pour le globule rouge [Mohandas and Evans, 1994]. Par contre, dans les membranes fluides, les molécules peuvent se mouvoir sans aucune résistance au cisaillement. Comme nous nous intéressons uniquement à ce dernier type de membrane, nous pourrions négliger ce terme.

Courbure (Bending)

Helfrich et Canham ont proposé un modèle simple pour décrire les propriétés mécaniques et thermodynamiques des bicouches dans lesquelles l'énergie de courbure joue un rôle important [Canham, 1970, Helfrich, 1973] :

$$f_{be} = \frac{1}{2}\kappa(H - H_0)^2 + \kappa_G K, \quad (\text{II.3})$$

où H est la courbure moyenne de la membrane ($H = c_1 + c_2$, $c_{1,2}$ étant les deux courbures principales), et K est la courbure gaussienne ($K = 1c_1c_2$). Une définition mathématique de ces quantités est donnée dans l'annexe A. La membrane est caractérisée par trois paramètres phénoménologiques : la rigidité de courbure κ qui doit contenir tout le détail microscopique de la bicouche (rigidité et longueur des queues lipidiques, nature des interactions entre les têtes polaires, etc.), le module élastique gaussien κ_G qui mesure l'énergie élastique associée à la courbure intrinsèque (ou gaussienne), et enfin, la courbure spontanée H_0 correspondant à une éventuelle asymétrie dans la composition lipidique des deux feuillettes ou bien à la forme adoptée par la bicouche en l'absence de contrainte.

Il existe de nombreuses techniques pour mesurer le module de rigidité κ . Elles peuvent être classées en deux catégories :

- les techniques basées sur l'analyse des fluctuations de forme de vésicules quasi-sphériques qui combinent la détection de contours de la vésicule et une analyse de Fourier rapide des images en microscopie de fluorescence [Schneider et al., 1984], de contraste de phase [Häckl et al., 1997, Döbereiner et al., 1997, Pécraux et al., 2004], en lumière pulsée [Méléard et al., 1992] ;
- les techniques qui étudient la réponse élastique à une déformation mécanique de la membrane créée par aspiration dans une micropipette [Kwok and Evans, 1981, Zhelev et al., 1994], par l'action d'un champ électrique alternatif [Kummrow and Helfrich, 1991, Méléard et al., 2000] ou par l'action d'un champ magnétique sur une vésicule remplie d'un ferrofluide [Bacri et al., 1996, Sandre et al., 2000].

Il est à noter que pour des vésicules constituées d'un même type de lipide, ces techniques ont donné des valeurs sensiblement différentes, restant toutefois autour de 10^{-19} J (voir Tab. II.1). Plusieurs raisons ont été avancées pour expliquer cette variabilité des résultats comme par exemple les conditions expérimentales

Phospholipides (voir Annexe B)	Module de courbure κ ($\times 10^{-19}$ J)	Techniques expérimentales	Références
SOPC :	$0,90 \pm 0,06$ (18°C)	micropipette	[Evans and Rawicz, 1990]
	$0,47 \pm 0,03$ (21°C)	micropipette	[Girard et al., 2004a]
	$0,48$ (20°C)	micropipette	[Fa, 2003]
	$1,15 \pm 0,30$ (25°C)	Analyse de contour	[Pécéréaux et al., 2004]
	$1,27 \pm 0,07$	Analyse de contour	[Méléard et al., 2000]
	(amb, pH \sim 5,5)		
	$1,81 \pm 0,08$	Analyse de contour	[Méléard et al., 2000]
	(amb, pH \sim 7,4)		
$1,81 \pm 0,19$ (amb)	Analyse de contour	[Gerbeaud, 1998]	
2 (18°C)	Filaments lipidiques	[Bo and Waugh, 1989]	
EYPC :	$0,40 \pm 0,01$	micropipette	[Manneville, 1999]
	$0,64 \pm 0,15$ (25°C)	Analyse de contour	[Pécéréaux et al., 2004]
	1-2	Analyse de contour	[Schneider et al., 1984]
	4-5	Analyse de contour	[Faucon et al., 1989]
	$0,66 \pm 0,06$	Analyse de contour	[Méléard et al., 2000]
	$0,25 \pm 0,05$	Champ électrique	[Kummrow and Helfrich, 1991]

TAB. II.1 - Valeurs expérimentales du module de courbure (κ) mesurées par plusieurs techniques et pour deux types de lipides. Elles dépendent étroitement de la techniques utilisée.

utilisées (pH, tampons, pureté des lipides, vieillissement des vésicules, ...) ou bien l'existence d'un excès de surface qui serait caché dans une sorte de « superstructure » membranaire [Niggemann et al., 1995], mais cette dernière hypothèse n'a pas encore été confirmée expérimentalement. Une autre raison qui peut expliquer cette différence de module est le fait que ces techniques sondent des domaines de longueurs d'onde différents, par exemple les techniques d'analyse d'images ne permettent pas d'accéder au régime des courtes longueurs d'onde.

Le théorème de Gauss-Bonnet [do Carmo, 1976] nous assure que le terme de courbure gaussienne est un invariant topologique. L'intégration de ce terme sur l'aire totale d'une vésicule conduit à $4\pi\kappa_G(1 - g)$, où g est le nombre de trous de la vésicule (appelé aussi le genre topologique : $g=0$ pour une vésicule sans trou, $g=1$ pour un tore, etc.). Dans ce qui suit, nous nous intéresserons à des fluctuations de forme qui ne changent pas la topologie de la membrane et pour lesquelles le terme gaussien demeure constant quelles que soient les déformations imposées à la membrane. Ce terme ne contrôlant pas la physique du problème peut donc être ignoré dans la suite.

En tenant compte des contraintes internes des bicouches, le module de courbure vérifie une relation du type $\kappa = e^2 K_a / b$, où e est l'épaisseur de la membrane et b un coefficient numérique. Cette relation est confirmée par un trai-

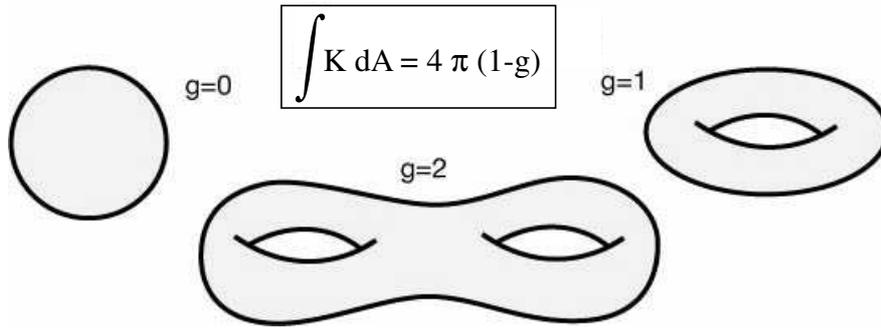


FIG. II.2 - Exemples de surface pour différentes valeurs du genre topologique : une sphère ($g = 0$), un tore ($g = 1$), un double tore ($g = 2$).

tement statistique de modèles microscopiques de la bicouche, où la contribution des chaînes à l'énergie élastique est traitée en détail [Szeifer et al., 1990, Lipowsky and Sackmann, 1995]. Les mesures expérimentales obtenues par Evans *et al.* [Evans and Rawicz, 1990] pour des lipides avec des chaînes alkyles saturées sont en bon accord avec cette relation de proportionnalité, ce qui n'est pas le cas pour des lipides avec des chaînes insaturées [Rawicz et al., 2000].

Autres propriétés mécaniques

L'hamiltonien élastique \mathcal{H} d'une membrane (soumise à aucune contrainte) est la somme de ces trois énergies intégrées sur l'aire totale. À partir de cette expression de l'énergie, il est possible de définir une tension latérale σ par $\partial\mathcal{H}/\partial A$, on obtient alors $\sigma = K_a \Delta A/A$ (de l'ordre de 10^{-6} - 10^{-5} J/m²). Nous verrons à la section II.2 qu'à cette contribution purement enthalpique de la tension de membrane, nous devons y rajouter une contribution entropique en raison des fluctuations thermiques. Pour une déformation de longueur d'onde λ et d'amplitude h ($h < \lambda$), l'énergie de courbure est de l'ordre de $\kappa(h/\lambda^2)^2 A$. Pour qu'elle soit du même ordre de grandeur que l'énergie d'étirement, il faut que $\kappa(h/\lambda^2)^2 \approx K_a(\Delta A/A)^2$. La variation d'aire doit donc être inférieure à l_0/λ ($l_0 = \sqrt{\kappa/K_a}$), c'est-à-dire négligeable pour des déformations spontanées ou induites par des conditions aux limites. Dans ce cas, il est naturel de considérer la membrane comme une surface d'aire fixe, sans tension de surface (ou du moins sans contribution enthalpique). Les membranes sont donc totalement différentes des systèmes habituels aux interfaces fluide-fluide pour lesquels c'est la tension interfaciale qui est fixe et non l'aire.

En plus de ces trois modes de déformation, il est possible de définir un coefficient de dilatation thermique à volume constant pour une membrane :

$$\beta = \frac{1}{A_0} \frac{dA}{dT} \quad (\text{II.4})$$

avec A_0 l'aire initiale de la vésicule. Des mesures ont en effet montré que l'aire totale des vésicules lipidiques est sensible aux variations de température. Par exemple, la valeur mesurée pour SOPC est de $(2,7 \pm 0,1) \times 10^{-3} \text{ K}^{-1}$ [Kwok and Evans, 1981].

II.1.2 Paramétrisation et Hamiltonien

De trois à quatre ordres de grandeurs séparent l'épaisseur d'une bicouche de la taille typique d'une vésicule, observable au microscope. Cette séparation des échelles de longueur suggère une description de la membrane comme une surface fluctuante bidimensionnelle plongée dans un espace tridimensionnel \mathbb{R}^3 (correspondant au solvant). La position de la membrane est alors paramétrée par un vecteur tridimensionnel⁽¹⁾ $\mathbf{R}(\tilde{u})$ fonction de deux paramètres (ou coordonnées) internes $\tilde{u} = (u^1, u^2)$ (Fig.II.3). Nous déterminerons ainsi toutes les configurations possibles d'une membrane en termes de cette paramétrisation : $\mathcal{C} \rightarrow \mathbf{R}(\tilde{u})$.

Nous allons maintenant rappeler brièvement comment écrire l'hamiltonien de Canham-Helfrich sous une forme qui tient compte d'une telle paramétrisation. Je présenterai abusivement cette expression comme étant la forme générale de l'hamiltonien d'une membrane, mais en réalité, le choix de l'hamiltonien traduit un modèle sous-jacent où la courbure spontanée H_0 est négligée et où la structure en bicouche est complètement omise. À cette fin, nous allons introduire quelques notions de géométrie différentielle (une description plus précise sera faite dans l'Annexe A). Nous pouvons définir un plan tangent *via* les vecteurs⁽²⁾ : $\mathbf{R}_i = \partial_i \mathbf{R}$ avec $i = 1, 2$ avec lesquels nous obtenons le tenseur métrique qui caractérise la géométrie locale de la surface : $g_{ij} \equiv \mathbf{R}_i \cdot \mathbf{R}_j$. Son déterminant $g \equiv \det(g_{ij})$, mène à l'élément d'aire infinitésimal : $d\mathcal{A} = du^1 du^2 \sqrt{g}$. Le plan tangent est entièrement défini et orienté par un vecteur normal unitaire :

$$\mathbf{n} = \frac{\mathbf{R}_1 \wedge \mathbf{R}_2}{|\mathbf{R}_1 \wedge \mathbf{R}_2|}. \quad (\text{II.5})$$

La courbure moyenne H et la courbure gaussienne K sont alors les deux invariants scalaires du tenseur de courbure $K_{ij} = \mathbf{n} \cdot \partial_i \partial_j \mathbf{R}$, respectivement la trace et le déterminant⁽³⁾ :

$$\begin{cases} H & \equiv g^{ij} K_{ij} \\ K & \equiv \det(g^{ij} K_{jk}) \end{cases} \quad (\text{II.6})$$

avec la convention que $H < 0$ donne une courbure orientée par le vecteur normal.

⁽¹⁾Dans tout le manuscrit, j'utilise la notation \mathbf{R} pour un vecteur tridimensionnel, \tilde{u} un vecteur bidimensionnel dans \mathbb{R}^3 .

⁽²⁾Nous introduirons pour toute la suite la notation suivante pour les dérivées partielles $\partial_i = \partial/\partial u^i$.

⁽³⁾Nous utilisons la notation d'Einstein et sommes sur les indices répétés.

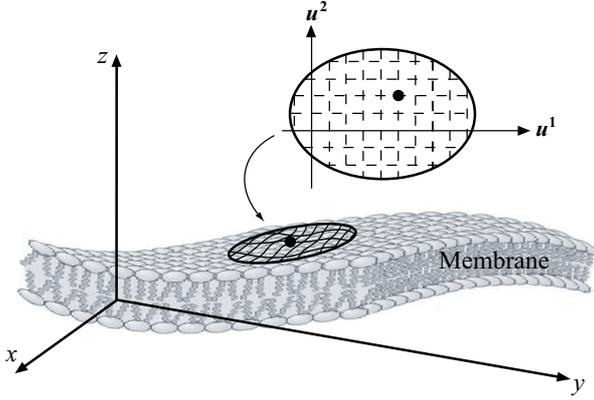


FIG. II.3 - Représentation schématique d'une membrane. Les déformations de la membrane dans l'espace tridimensionnel environnant sont paramétrées par $\mathbf{R}(\tilde{u})$ en fonction de deux coordonnées internes u^1 et u^2 .

Avec ces notations, l'hamiltonien de Canham-Helfrich prend la forme suivante :

$$\mathcal{H}_c = \int d^2\tilde{u} \sqrt{g} \left(\frac{\kappa}{2} H^2 + \frac{\kappa_G}{2} K \right) \quad (\text{II.7})$$

Bien sûr cette expression ne tient pas compte de toutes les contraintes imposées au système. En l'absence d'échange de lipides entre la membrane et le fluide environnant, la membrane peut être considérée comme incompressible, et autrement dit avec une aire constante, indépendante de sa forme. De manière plus précise, la condition d'incompressibilité constitue une propriété locale de conservation de la métrique ($\partial_t g = 0$) et doit être incorporée dans l'expression de l'énergie par l'intermédiaire d'un multiplicateur de Lagrange associé à l'aire infinitésimale de chaque élément de surface. Ce multiplicateur qui décrit la réponse à la compression ou à la dilatation dans le plan de la membrane n'est autre que la tension locale de la membrane. En supposant que les changements de forme de la membrane n'induisent pas de variations significatives de la tension locale, celle-ci est pratiquement constante et s'identifie à la tension globale σ . En conséquence, l'énergie totale de la membrane, abusivement appelé hamiltonien de Helfrich, s'écrit :

$$\mathcal{H}_H = \int d^2\tilde{u} \sqrt{g} \left(\frac{\kappa}{2} H^2 + \sigma \right) \quad (\text{II.8})$$

où la courbure gaussienne a été négligée pour les raisons citées au paragraphe précédent.

II.1.3 Représentation de Monge

Dans les jauges normales (Fig. II.4 (a)), les différentes formes de la membranes sont les configurations assez proche de l'état de référence $\mathbf{R}_0(\tilde{u})$, *i.e.* qui vérifient : $\mathbf{R}(\tilde{u}) = \mathbf{R}_0(\tilde{u}) + \mathbf{n}_0(\tilde{u})h(\tilde{u})$, avec \mathbf{n}_0 le champ de vecteurs normaux à la surface de référence et $h(\tilde{u})$ l'amplitude du déplacement. Un choix particulièrement simple de jauge normale est obtenu en considérant une configuration de référence

plane ou quasi-plane : il s'agit de la jauge de Monge (Fig. II.4 (b)). Dans ce cas, l'état de référence coïncide avec la base cartésienne, *i.e.* $\tilde{\mathbf{u}} \equiv \mathbf{x} = (x, y)$ et $\mathbf{R}(\mathbf{x}) = (\mathbf{x}, h(\mathbf{x}))$. L'hamiltonien de Helfrich prend, dans l'approximation quadratique $|\nabla h|^2 \ll 1$, une forme plus simple :

$$\mathcal{H}_H = \frac{1}{2} \int d^2\mathbf{x} (\kappa(\nabla^2 h)^2 + \sigma(\nabla h)^2) \quad (\text{II.9})$$

avec $\nabla = (\partial_x, \partial_y)$ l'opérateur différentiel dans la base cartésienne (x, y) .

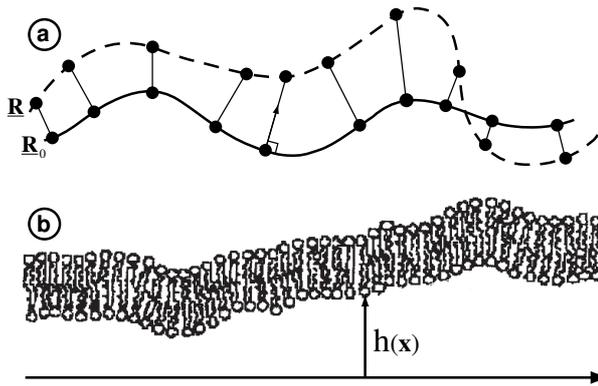


FIG. II.4 - (a) Définition des jauges normales. Etant donné une forme de référence correspondant à $\mathbf{R}_0(\mathbf{u})$, la déformation est décrite par un champ de variation : $\mathbf{R}(\mathbf{u}) = \mathbf{R}_0(\mathbf{u}) + \nu(\mathbf{u})\mathbf{n}_0(\mathbf{u})$ où $\mathbf{n}_0(\mathbf{u})$ est le vecteur unitaire normal à la surface $\mathbf{R}_0(\mathbf{u})$. (b) Représentation de Monge. Le déplacement de la membrane par rapport à son état plan de référence est défini par $h(\mathbf{x})$.

II.2 Fluctuations thermiques et conséquences

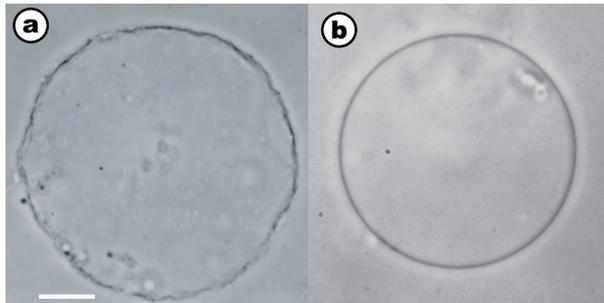


FIG. II.5 - Ondulations thermiques d'une vésicule géante observée en contraste de phase : (a) vésicule soumise à des fluctuations thermiques de grande amplitude qui froissent la membrane (la tension de la membrane est alors quasi-nulle) ; (b) vésicule tendue, sa forme est alors sphérique. La barre représente $10 \mu\text{m}$.

Les propriétés élastiques des bicouches leur confèrent une importante « mollesse », les rendant très déformables même sous une faible contrainte mécanique. Une bicouche plongée dans un milieu aqueux est alors soumise aux chocs incessants des molécules d'eau de chaque côté créant des ondulations à sa surface, les molécules d'eau étant bien sûr soumises au mouvement brownien (Fig.II.5). Au cours du temps, chaque point de la membrane est alors animé de petits mouvements rapides autour de sa position moyenne, et ce à toutes les échelles de longueur (Fig.II.6). Ce phénomène fut observé sur des globules rouges, il y a plus

d'un siècle, par le biologiste E. Browicz. En effet, celui ci remarqua que l'intensité lumineuse que diffusent ces cellules variait de manière erratique d'un point à l'autre de la membrane, donnant lieu à une impression de scintillement (le « flickering »). L'origine de ces mouvements est cependant resté incompris jusqu'en 1975, date à laquelle F. Brochard et J.-F. Lennon ont montré qu'il s'agissait du mouvement dû à l'agitation thermique, et qui ne nécessite aucune activité biologique spécifique [Brochard and Lennon, 1975]. Ces fluctuations mènent à une tension latérale dynamique qui peut induire des forces d'ondulation répulsives (ou force d'Helfrich) entre vésicules et un substrat solide et qui peut s'opposer aux forces attractives de Van der Waals [Rädler et al., 1995]. Les fluctuations de formes peuvent être, entre autre, utilisées pour des mesures très précises du module de courbure [Kwok and Evans, 1981]. Ces aspects seront traités plus en détails dans les sections suivantes.

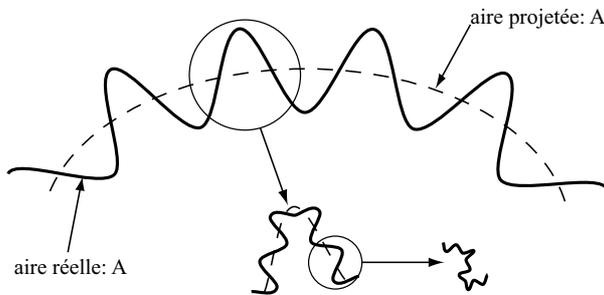


FIG. II.6 - Représentation schématique d'une membrane fluctuante à toutes les échelles spatiales. Chaque élément d'aire de la surface projetée A_p (en traits pointillés) a une masse plus grande que la surface réelle A (en trait plein) en raison du froissage. Le degré de froissage peut localement changer la densité effective et rendre la membrane compressible.

II.2.1 Energie libre

Une description précise du comportement à l'équilibre thermodynamique des membranes dépend de l'importance des fluctuations thermiques. En effet, si le module de courbure κ est plus grand que $k_B T$ (énergie typique des fluctuations thermiques), l'état d'équilibre est défini comme celui caractérisé par la fonction de position \mathbf{R} donnant à l'hamiltonien son minimum absolu⁽⁴⁾, c'est-à-dire que l'on néglige les fluctuations thermiques du champ $\mathbf{R}(\vec{u})$. Dans ce cas, l'énergie libre s'identifie à l'hamiltonien dans sa configuration la plus probable : $\mathcal{F} = \mathcal{H}[\mathbf{R}_0]$. Plus exactement, cela consiste à remplacer l'intégrale fonctionnelle (II.11) par sa valeur au col (*i.e.* le point de selle), définie comme le chemin pour lequel le hamiltonien est stationnaire⁽⁵⁾. Par contre, lorsque les fluctuations thermiques deviennent suffisamment importantes, il devient nécessaire de tenir compte de

⁽⁴⁾La quantité \mathbf{R}_0 est d'ailleurs une moyenne à « gros grain » de la fonction position sur une taille grande à l'échelle atomique : ceci définit une théorie champ moyen, ou plus précisément à température nulle ($T = 0$) suivant la terminologie de Wilson.

⁽⁵⁾La condition de stationnarité du hamiltonien est : $\left. \frac{\delta \mathcal{H}}{\delta \mathbf{R}} \right|_{\mathbf{R}_0} \equiv 0$.

toutes les configurations possibles \mathcal{C} de la membrane, c'est-à-dire de toutes les fonctions $\mathbf{R}(\tilde{u})$ possibles comptes tenu des conditions aux limites imposées au système, en sommant la fonction de partition sur celles-ci :

$$\mathcal{Z} = \sum_{\mathcal{C}} e^{-\mathcal{H}[\mathcal{C}]/k_B T} \quad (\text{II.10})$$

et puisque notre description ne dépend pas de ce qui se passe à l'échelle atomique, il est tout à fait licite de passer dans le *continuum* ce qui permet d'écrire la fonction de partition comme suit :

$$\mathcal{Z} = \int \mathcal{D}[\mathbf{R}] e^{-\mathcal{H}[\mathbf{R}]/k_B T} \quad (\text{II.11})$$

Les propriétés d'équilibre sont alors décrites par l'énergie libre conformationnelle de la membrane définie par :

$$\mathcal{F} = -k_B T \ln \mathcal{Z}. \quad (\text{II.12})$$

II.2.2 Spectre de fluctuations

Considérons une membrane quasi-plane fluctuante qui est limitée à rester dans un cadre d'aire $A_p = L \times L$. Comme la membrane est considérée comme étant incompressible à l'échelle moléculaire, chaque configuration de la membrane occupe une aire totale A , proportionnelle au nombre total de phospholipides. Les quantités A et A_p ainsi définies sont alors totalement différentes et indépendantes (Fig.II.6). Dans le cas d'une vésicule, c'est l'aire projetée A_p qui fluctue tandis que l'aire A reste fixe.

En introduisant la transformée de Fourier :

$$f_{\mathbf{q}}(t) = \int d^2 \mathbf{x} e^{i\mathbf{q} \cdot \mathbf{x}} f(\mathbf{x}, t) \quad (\text{II.13})$$

nous pouvons exprimer l'hamiltonien de Helfrich en représentation de Monge (nous garderons cette jauge jusqu'à la fin de cette section) sous la forme :

$$\mathcal{H}_H[h] = \frac{1}{2} \int \frac{d^2 \mathbf{q}}{(2\pi)^2} (\kappa q^4 + \sigma q^2) |h_{\mathbf{q}}|^2 = \frac{1}{2} \int \frac{d^2 \mathbf{q}}{(2\pi)^2} E_0(q) |h_{\mathbf{q}}|^2 \quad (\text{II.14})$$

où nous avons défini l'énergie du mode q par $E_0(q) = \kappa q^4 + \sigma q^2$. D'après le théorème d'équipartition, chaque mode contribue pour une énergie $k_B T/2$. La fonction de corrélation statique entre les amplitudes des modes de Fourier peut facilement être obtenue :

$$\langle h_{\mathbf{q}} h_{\mathbf{q}'}^* \rangle = \frac{k_B T}{\kappa q^4 + \sigma q^2} \delta(\mathbf{q} - \mathbf{q}') \quad (\text{II.15})$$

où $\langle \dots \rangle$ est la valeur la plus probable prise avec un poids de Boltzmann $e^{-\mathcal{H}_H/k_B T}$. La fonction de corrélation est seulement paramétrée par les paramètres statiques κ et σ qui résument les interactions à des échelles de longueur au-dessus du cut-off moléculaire a_0 . L'application de cette relation aux expériences d'analyse de contour en temps réel est un moyen de mesurer le module de courbure κ . Cette technique consiste à détecter le contour d'une vésicule fluctuante au cours du temps en utilisant la vidéo-microscopie en contraste de phase afin d'obtenir le spectre de fluctuations et ainsi de mesurer les modules élastiques (voir Fig. II.7, et pour plus de détails je vous renvoie par exemple à [Döbereiner et al., 1997, Pécrciaux, 2004]).

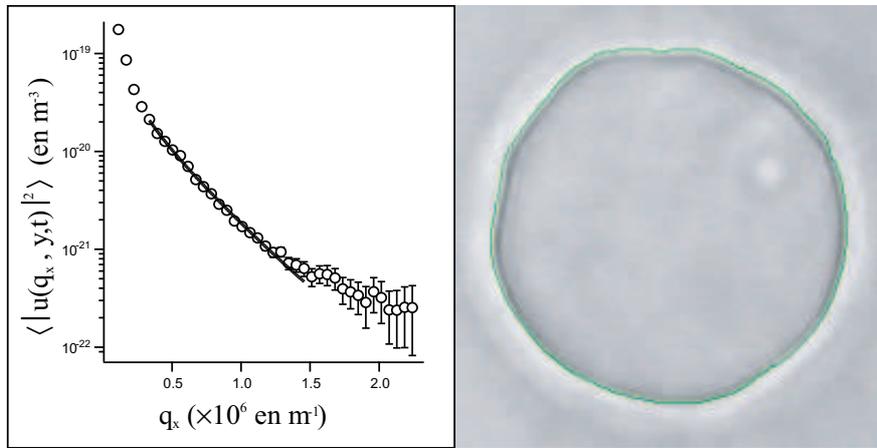


FIG. II.7 - Analyse de contour d'une vésicule fluctuante (tracé en vert ici). L'algorithme mis au point par J. Pécrciaux à l'Institut Curie permet de détecter le contour à la cadence vidéo (25 images/s) et d'en déduire le spectre des fluctuations (à gauche). Fournie par J. Pécrciaux.

Pour obtenir l'amplitude des fluctuations, il suffit d'intégrer sur les vecteurs d'onde compris entre $2\pi/L$ (L est un cut-off macroscopique) et $+\infty$ ⁽⁶⁾ :

$$\langle |h(L)|^2 \rangle = \int \frac{d^2 \mathbf{q}}{(2\pi)^2} \frac{k_B T}{\kappa q^4 + \sigma q^2} = \frac{k_B T}{4\pi\sigma} \ln \left(1 + \frac{\sigma}{\kappa} \frac{L^2}{(2\pi)^2} \right) \quad (\text{II.16})$$

Cette expression introduit une longueur caractéristique $\sqrt{\kappa/\sigma}$ qui varie du nm pour des tensions proche de τ_{lysis} au μm pour des membranes faiblement tendues ($\sigma = 10^{-7}$ N/m). L'amplitude des fluctuations, ou la rugosité de la membrane, correspondant à $\bar{h} = \sqrt{\langle |h(L)|^2 \rangle}$ dépend du cut-off macroscopique comme le montrent les deux régimes de tension

⁽⁶⁾Normalement, il faudrait intégrer jusqu'à $2\pi/a_0$ mais cette approximation est suffisante lorsque nous regardons des détails à des échelles de longueur grandes comparées à la taille moléculaire a_0 .

- *régime des faibles tensions* ($\sigma \ll \sigma^* = \kappa L^2 / (2\pi)^2$) : les échelles de longueur caractéristiques sont alors dominées par la rigidité de courbure et $\bar{h} = \sqrt{\frac{k_B T}{16\pi^3 \kappa}} L$,
- *régime des fortes tensions* ($\sigma \gg \sigma^*$) : les longueurs sont dominées par la tension et $\bar{h} = \sqrt{\frac{k_B T}{4\pi\sigma} \ln\left(\frac{\sigma}{\sigma^*}\right)}$,

le raccord entre ces deux régimes se faisant à la longueur $\sqrt{\kappa/\sigma}$.

II.2.3 Longueur de persistance

Historiquement parlant, la notion du froissage (le « crumpling ») des membranes a été introduite la première fois par de Gennes et Taupin en terme de longueur de persistance ξ_p [de Gennes and Taupin, 1982] et a donné lieu à une quantité impressionnante de travaux sur les surfaces fluides fluctuantes. En principe, une surface, qui n'est soumise à aucune tension latérale ($\sigma = 0$), apparaît rigide jusqu'à une certaine longueur ξ_p , appelée longueur de persistance, au-delà de laquelle elle perd son ordre orientationnel, *i.e.* qu'elle devient plus froissée (Fig.II.6) au-delà de cette longueur. Pour la déterminer, il suffit de calculer les fonctions de corrélation du vecteur normal en fonction de la longueur du cadre L , et d'utiliser le fait que celles-ci restent d'ordre 1 jusqu'à ξ_p . Dans la paramétrisation de Monge, le vecteur normal s'écrit $\delta\mathbf{n}(\mathbf{x}) = \mathbf{n}(\mathbf{x}) - \hat{\mathbf{e}}_z = -\nabla h - (|\nabla h|^2/2)\hat{\mathbf{e}}_z$, ce qui permet d'écrire la fonction de corrélation de la normale sous la forme :

$$\langle |\delta\mathbf{n}(\mathbf{0}) - \delta\mathbf{n}(\mathbf{x})|^2 \rangle = \langle |\nabla h(\mathbf{x})|^2 \rangle \sim 1 \quad (\text{II.17})$$

donnant ainsi une longueur de persistance $\xi_p \simeq a_0 e^{2\pi\kappa/k_B T}$, avec a_0 la taille typique des lipides. Il est intéressant de noter aussi qu'au-delà de cette longueur, notre description d'une membrane quasi-plane par l'hamiltonien de l'Eq. II.9 n'est plus valable.

II.2.4 Excès d'aire

Les fluctuations de la membrane et donc les ondulations agissent non seulement sur la forme globale mais aussi sur la tension de surface parce qu'elles consomment de l'excès de surface. Cette remarque nous amène à différencier l'aire projetée A_p fixe de l'aire réelle A puisque le calcul direct de cette différence (moyenne) nous donne :

$$\Delta A = A - A_p = \frac{1}{2} \int d^2\mathbf{x} \langle |\nabla h(\mathbf{x})|^2 \rangle \quad (\text{II.18})$$

Dans la littérature, on parle plutôt d'« excès de surface », défini comme l'aire ΔA récupérable en dépliant les fluctuations. Dans l'état complètement détendu

où $\sigma = 0$, cette variation $\Delta A^0 = A - A_p^0$ représente 5 à 10 % de la surface moyenne projetée, $A_p^0 = L^2$.

En utilisant la relation de Parseval dans l'éq. II.18 et en intégrant sur tous les modes q , nous obtenons la fraction de surface stockée dans l'ensemble des fluctuations :

$$\alpha = \frac{\Delta A}{A_p} = \frac{k_B T}{8\pi\kappa} \ln \left(\frac{(2\pi/a_0)^2 + \sigma/\kappa}{(2\pi/L)^2 + \sigma/\kappa} \right) \quad (\text{II.19})$$

Toutefois si on considère des tensions de membrane comprises entre 10^{-7} et 10^{-3} N/m, nous sommes dans un régime où $\sigma \ll (2\pi)^2 \kappa / a_0^2 \simeq$ qqs N/m. Dans ce cas, la variation d'excès de surface $\alpha^0 - \alpha$ à partir de l'état de tension nulle est

$$\alpha^0 - \alpha \simeq \frac{\Delta A^0 - \Delta A}{A_p^0} \simeq \frac{k_B T}{8\pi\kappa} \ln \left(1 + \frac{L^2}{(2\pi)^2} \frac{\sigma}{\kappa} \right) \quad (\text{II.20})$$

avec $\alpha^0 = \alpha(\sigma = 0) = (A - A_p^0)/A_p^0$ l'excès d'aire à tension nulle.

En tenant compte de la contribution enthalpique décrite dans le paragraphe II.1.1, la réponse élastique d'une membrane à une contrainte mécanique est décrite par l'expression suivante de la variation d'excès de surface relative (qui est égale à l'aire dépliée) :

$$\alpha^0 - \alpha = \frac{A_p - A_p^0}{A_p^0} \simeq \frac{k_B T}{8\pi\kappa} \ln \left(1 + \frac{L^2}{(2\pi)^2} \frac{\sigma}{\kappa} \right) + \frac{\sigma}{K_a} \quad (\text{II.21})$$

Des calculs plus précis, effectués par Evans et Rawicz, ont abouti à l'expression suivante [Evans and Rawicz, 1990] :

$$\alpha^0 - \alpha = \frac{k_B T}{8\pi\kappa} \ln(1 + cA\sigma) + \frac{\sigma}{K_a} \quad (\text{II.22})$$

avec $c = 1/24\pi$ et A l'aire d'une vésicule. L'augmentation de surface projetée lorsque l'on varie la tension exercée présente deux régimes. D'abord aux faibles tensions, nous déplions les fluctuations, c'est-à-dire que l'aire "stockée" dans ces fluctuations est restituée à la membrane, puis lorsque la tension devient comparable au module de compressibilité, nous sondons le régime hookéen (donc linéaire) de l'élasticité. En général, la tension de la membrane σ_0 dans son état libre (*i.e.* sans contrainte) n'est jamais nulle mais très faible (de l'ordre de 10^{-7} N/m). Il est alors préférable, et nous le verrons dans le chapitre V, d'exprimer la variation d'excès d'aire par rapport à cet état de référence. Ainsi en notant α_0 la valeur de l'excès d'aire pour une tension σ_0 , nous obtenons :

$$\alpha_0 - \alpha \simeq \frac{k_B T}{8\pi\kappa} \ln \left(\frac{1 + \frac{L^2}{(2\pi)^2} \frac{\sigma}{\kappa}}{1 + \frac{L^2}{(2\pi)^2} \frac{\sigma_0}{\kappa}} \right) + \frac{\sigma - \sigma_0}{K_a} \quad (\text{II.23})$$

Cette relation peut d'ailleurs servir, suivant le régime de tension dans lequel on se place, à mesurer la résistance des vésicules à l'étirement (son module de

compressibilité) et à la flexion (son module de courbure). À cette fin, Evans et ses collaborateurs ont mis au point la technique de micropipette (nous en reparlerons dans le chapitre V) pour tendre une vésicule, initialement flasque, et contrôler sa tension [Evans and Rawicz, 1990, Zhelev et al., 1994]. Au fur et à mesure que la vésicule est aspirée (en partie seulement), la membrane pénètre dans la micropipette, la vésicule finit alors par se tendre. Comme une partie des fluctuations composant ΔA est d'amplitude trop petite pour être observée en microscopie optique, cette expérience mesure l'augmentation d'aire projetée A_p par rapport à sa valeur A_{p_0} sous tension σ_0 très faible en fonction de la tension exercée sur la membrane, ce qui permet d'en déduire les modules élastiques κ et K_a . Mais il faut bien garder à l'esprit que les quantités mesurées sont des quantités macroscopiques qui reflètent les propriétés élastiques globales des membranes et non locales.

II.2.5 Force de Helfrich

Lorsqu'une membrane se rapproche d'une surface, l'amplitude de ses fluctuations diminue du fait de la présence de la paroi. Le nombre de configurations possibles pour la membrane est alors réduit, induisant une diminution de l'entropie et donc une augmentation de l'énergie. Cette répulsion stérique (appelée aussi pression de Helfrich) a été introduite la première fois en 1978 par Helfrich [Helfrich, 1978]. La distance ξ_\perp entre deux contacts successifs entre la membrane et la paroi est obtenue à partir du spectre de fluctuations. En effet, si on imagine que la membrane est subdivisée en surfaces élémentaires de taille ξ_\perp^2 , l'amplitude maximale \hbar des fluctuations de chacun de ces éléments doit être du même ordre de grandeur que la distance d séparant la position moyenne de la membrane et la paroi. En assimilant chaque case à une particule indépendante, la pression moyenne exercée par une telle particule sur la paroi séparées d'une distance d est donnée par la théorie cinétique des gaz et vaut $k_B T / \xi_\perp^2 d$ [Helfrich and Servuss, 1984].

Pour le régime dominé par la courbure, $\xi_\perp = 2\pi d \sqrt{4\pi\kappa/k_B T}$ et la pression de Helfrich : $P \propto (k_B T)^2 / \kappa d^3$. L'intégration de cette pression sur la distance d mène à l'énergie d'interaction par unité d'aire : $V_H \propto (k_B T)^2 / \kappa d^2$. En présence de tension de membrane, la longueur ξ_\perp passe d'une dépendance linéaire à une dépendance beaucoup plus compliquée en la distance d donc la portée des interactions est diminuée. Le *cross-over* dans ce cas est donné par $\ell_\sigma = \sqrt{k_B T / 2\pi\sigma}$ [Rädler et al., 1995] :

$$\xi_\perp = \ell_\sigma \left(\frac{d}{2\ell_\sigma} + \frac{1}{8} \ln(d/\ell_\sigma) \right)^{1/2}$$

et l'énergie d'interaction est obtenue en suivant les même étapes que précédemment :

$$V_H \propto \frac{k_B T \sigma}{\kappa} e^{-d/\ell_\sigma} \left(\frac{d}{\ell_\sigma} \right)^{1/4} \quad (\text{II.24})$$

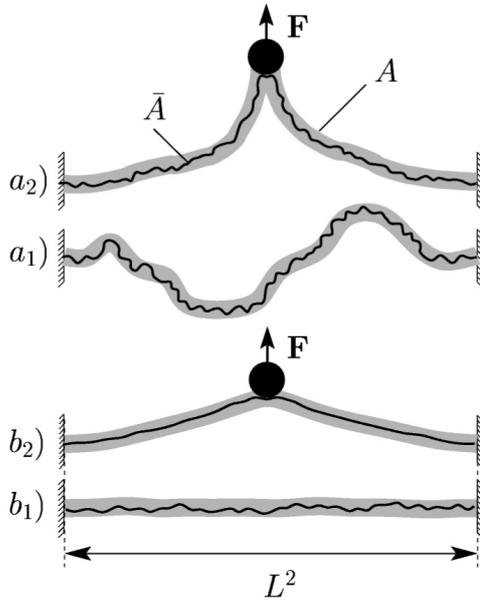


FIG. II.8 - Représentation schématique d'une membrane avec une aire microscopique \bar{A} et une aire optique A , attachée sur un cadre L^2 . La tension effective d'une membrane initialement plane (b_1), ayant un excès d'aire microscopique α_m , peut être accrue par une force externe (b_2). Dans le cas d'une membrane initialement sans tension (a_1), une force externe peut induire une tension (a_2). Adaptée de [Fournier et al., 2001].

Qualitativement, la présence d'une tension diminue sensiblement l'intensité et la portée (égale au *cross-over* ξ_{\perp}) de l'interaction de Helfrich. De plus, elle peut induire un changement du comportement de décollement et d'adhésion des membranes. La théorie de la renormalisation prévoit une transition continue de décollement lorsque l'on atteint une tension nulle [Lipowsky and Leibler, 1986], par contre, une transition du premier ordre (donc discontinue) est attendue à tension finie [Grotehans and Lipowsky, 1990].

II.3 Description à l'échelle macroscopique : renormalisation

Dans la description microscopique précédente, une membrane était décrite comme une surface élastique fluctuante avec une aire microscopique \bar{A} . Par contre, notre vision de la membrane à l'échelle macroscopique est toute autre puisqu'une partie de l'aire totale \bar{A} est alors cachée dans les fluctuations de courtes longueurs d'onde et qui sont optiquement non-résolues [Evans and Rawicz, 1990]. L'aire visible A à cette échelle est alors beaucoup plus faible. On s'attend donc à ce que les paramètres élastiques soient renormalisés sous l'effet des fluctuations. De plus, étant donné que l'amplitude des fluctuations dépend de l'échelle à laquelle on les observe, il doit en être de même pour les paramètres renormalisés.

II.3.1 Excès d'aire effectif [Fournier et al., 2001]

Pour décrire une membrane fluctuante, le hamiltonien effectif en théorie “coarse-grained” qui tient compte des détails sub-optiques seulement, est clairement plus adapté que le hamiltonien microscopique. Cet hamiltonien effectif $\mathcal{H}_{eff}[h]$ nous donne la probabilité $\exp(-\beta\mathcal{H}_{eff}[h])$ de la configuration définie par $h(\mathbf{x})$ à l'échelle optique, quelles que soient les fluctuations microscopiques (où nous prendrons dans ce paragraphe la fonction $\beta \equiv 1/k_B T$). Ce procédé constitue alors une renormalisation à aire fixée [Fournier et al., 2001].

Considérons une membrane d'aire microscopique fixée \bar{A} et attachée à un cadre d'aire L^2 . La réponse élastique d'une membrane est entièrement incluse dans l'hamiltonien microscopique $\mathcal{H}_m^{(7)}$ où seuls les termes de courbure et de compressibilité sont pris en compte :

$$\mathcal{H}_m[h_m] = \mathcal{H}_c[h_m] + \frac{K_a}{2\bar{A}} \left(L^2 + \int d^2\mathbf{x} \frac{1}{2} (\nabla h_m)^2 - \bar{A} \right)^2 \quad (\text{II.25})$$

Les fluctuations thermiques de la membrane sont alors décrites, dans l'approximation quadratique, par la fonction de partition suivante :

$$\mathcal{Z} = \int \mathcal{D}[h_m] e^{-\beta\mathcal{H}_m[h_m]} \quad (\text{II.26})$$

La position de la membrane $h_m(\mathbf{x})$ dans la représentation de Monge se décompose en une hauteur sub-optique $h^>(\mathbf{x})$ valable pour des vecteurs d'onde $\Lambda < q < \Lambda_0$ (Λ_0 étant un cut-off moléculaire) et une hauteur optique $h(\mathbf{x})$ pour les vecteurs d'onde $0 < q < \Lambda$: $h_m(\mathbf{x}) = h(\mathbf{x}) + h^>(\mathbf{x})$. Cette description introduit naturellement un vecteur d'onde Λ de coupure qui est défini, par exemple, par la limite optique d'une expérience. On peut alors intégrer la fonction de partition sur les longueurs d'onde sub-optiques ce qui introduit un potentiel de surface $\mathcal{H}_s[A]$:

$$\mathcal{Z} = \int \mathcal{D}[h] e^{-\beta(\mathcal{H}_c[h] + \mathcal{H}_s[A])} \quad (\text{II.27})$$

avec l'aire optique $A[h] = L^2 + \int d^2\mathbf{x} \frac{1}{2} (\nabla h)^2$. Le hamiltonien effectif aux échelles optiques s'écrit alors : $\mathcal{H}_{eff}[h] = \mathcal{H}_c[h] + \mathcal{H}_s[A]$. Dans la limite thermodynamique, le potentiel de surface peut être évalué sous la forme :

$$\mathcal{H}_s[A] \simeq \frac{\lambda_s}{\beta} (\bar{A} - A) + \frac{L^2}{2\beta} \int_{\Lambda}^{\Lambda_0} \frac{dq}{2\pi} \ln(\beta\kappa_m q^4 - \lambda_s q^2) \quad (\text{II.28})$$

avec λ_s la racine de $\bar{A} - A = \frac{L^2}{2} \int \frac{dq}{2\pi} (\beta\kappa_m q^2 - \lambda_s)^{-1}$. La tension effective mesurée par les techniques de micromanipulation est toujours déterminée par la dérivée fonctionnelle du potentiel de surface par rapport à la surface optique $\sigma(A) =$

⁽⁷⁾Dans ce paragraphe, l'indice m se référera à l'échelle microscopique.

$\delta\mathcal{H}_s/\delta A = -\lambda_s/\beta$, et de ce fait ce n'est pas une quantité microscopique. Elle est, de plus, reliée à l'aire "stockée" par les modes sub-optiques par :

$$\alpha = \alpha_m - \frac{k_B T}{8\pi\kappa_m} \ln \left(\frac{\kappa_m \Lambda_0^2 + \sigma}{\kappa_m \Lambda^2 + \sigma} \right) + (1 + \alpha_m) \frac{\sigma}{K_a} \quad (\text{II.29})$$

avec $\alpha_m = (\bar{A} - L^2)/L^2$ est l'excès d'aire microscopique et $\alpha = (A - L^2)/L^2$ est l'excès d'aire apparente. Cependant, comme nous l'avons vu précédemment, les vésicules manipulées sont de taille micronique ce qui nous assure d'être dans le régime où $\kappa_m \Lambda^2 \ll \sigma$. Dans ce cas, la variation d'excès d'aire prend la forme :

$$\alpha - \alpha_m = -\frac{k_B T}{8\pi\kappa_m} \ln \left(1 + \frac{\kappa_m \Lambda_0^2}{\sigma} \right) + (1 + \alpha_m) \frac{\sigma}{K_a} \quad (\text{II.30})$$

avec π/Λ_0 de l'ordre de 10 \AA .

Cette relation est assez similaire à celle obtenue dans le paragraphe II.2.4. Toutefois, dans l'équation (II.23), l'aire optique A est prise égale à L^2 , et σ est implicitement pris comme la tension de surface dans le hamiltonien microscopique.

II.3.2 Rigidité et tension effectives

Pour construire une théorie générale des perturbations dite « basse température » adaptée à notre système⁽⁸⁾, nous allons considérer une membrane possédant une configuration moyenne \mathbf{R}_0 et qui est caractérisée par le hamiltonien de Helfrich défini en (II.8) auquel nous ajoutons un terme de source $\mathcal{H}_s[\mathbf{J}, \mathbf{R}]$ avec $\langle \mathbf{R} \rangle_{\mathbf{J}} = \mathbf{R}_0$:

$$\begin{aligned} \mathcal{H} &= \mathcal{H}_s[\mathbf{J}, \mathbf{R}] + \mathcal{H}_H[\mathbf{R}] \\ &= \int d^2\tilde{u} \sqrt{1 + \mathbf{R}_j^2} \mathbf{J} \cdot \mathbf{R} + \int d^2\tilde{u} \sqrt{1 + \mathbf{R}_j^2} \left\{ \sigma + \frac{\kappa}{2} \left(\partial_i \left(\frac{\mathbf{R}_i}{\sqrt{1 + \mathbf{R}^2}} \right) \right)^2 \right\} \end{aligned} \quad (\text{II.31})$$

L'introduction du champ $\mathbf{J}(\tilde{u})$ conjugué au champ auxiliaire $\mathbf{R}(\tilde{u})$ est un artifice très utile pour, par exemple, déterminer les fonctions de réponse⁽⁹⁾ $\mathbf{G}(\tilde{u}, \tilde{u}')$ définies à champ nulle :

$$\mathbf{G}(\tilde{u}, \tilde{u}') = k_B T \frac{\delta \mathbf{R}_0(\tilde{u})}{\delta \mathbf{J}(\tilde{u}')} \Big|_{\mathbf{J}=0} = \frac{\delta^2 \ln \mathcal{Z}}{\delta \mathbf{J}(\tilde{u}) \delta \mathbf{J}(\tilde{u}')} \Big|_{\mathbf{J}=0} \quad (\text{II.32})$$

⁽⁸⁾Des exposés détaillés du schéma de renormalisation de Wilson pourront être trouvés dans le livre de M. Le Bellac intitulé "Des phénomènes critiques aux champs de jauge. Une introduction aux méthodes et aux applications de la théorie quantique des champs" InterEditions/Éditions du CNRS (1990).

⁽⁹⁾Il s'agit plutôt, sous la notation que nous avons adoptée, de la matrice des fonctions de réponse ayant pour coefficients $G_{\alpha\beta}$.

Schéma de renormalisation de Wilson

Nous pouvons alors définir un potentiel effectif Γ_e , qui est une fonctionnelle de \mathbf{R}_0 , comme une transformée de Legendre de l'énergie libre $\mathcal{F} = -k_B T \ln \mathcal{Z}$:

$$\Gamma_e = -k_B T \ln \left[\int \mathcal{D}[\mathbf{R}] \exp \left(-\beta \mathcal{H}_H - \beta \int d^2 \tilde{u} \sqrt{g} \mathbf{R} \cdot \mathbf{J} \right) \right] - \int d^2 \tilde{u} \sqrt{g} \mathbf{R}_0 \cdot \mathbf{J} \quad (\text{II.33})$$

Cette fonctionnelle caractérise le comportement effectif de la membrane après intégration sur les fluctuations. Nous souhaitons maintenant exprimer les paramètres σ et κ décrivant le comportement effectif de la membrane à une certaine échelle de longueur (par exemple à une échelle s/Λ_0 avec $s > 1$ le paramètre de dilatation), en connaissant ceux qui décrivent ce même comportement à une échelle inférieure $a_0 \sim 1/\Lambda_0$ (cut-off moléculaire imposé par la taille des lipides). Pour cela, nous allons intégrer la fonction de partition sur toutes les fluctuations gaussiennes de vecteur d'onde compris entre Λ_0/s et Λ_0 , nous obtenons alors :

$$\mathcal{Z} = \int_0^{\Lambda_0/s} \mathcal{D}[\mathbf{R}^<] e^{-\mathcal{H}^<[\mathbf{R}^<]/k_B T} \quad (\text{II.34})$$

où $\mathcal{H}^<[\mathbf{R}^<]$ est calculé de telle sorte que la fonction de partition reste inchangée. Il ne reste plus qu'à comparer les expressions de la fonction de partition avant et après intégration dans des unités de longueur différentes, de façon à ce qu'elles aient la même échelle de référence Λ_0 . Cette étape consiste à effectuer une dilatation d'échelle dans la relation (II.34) :

$$\mathcal{Z} = \int_0^{\Lambda_0} \mathcal{D}[\mathbf{R}] e^{-\mathcal{H}^r[\mathbf{R}]/k_B T} \quad (\text{II.35})$$

où \mathcal{H}^r possède la même structure que \mathcal{H} , exprimée en terme de grandeurs renormalisées.

Approximation à l'ordre d'une boucle

La présence de termes non quadratiques dans le hamiltonien ne nous permet pas de déterminer exactement $\mathcal{H}^<$. De ce fait, nous devons les traiter perturbativement ce qui revient à effectuer un développement de Taylor du hamiltonien \mathcal{H} à l'ordre quadratique en la perturbation $\delta \mathbf{R} = \mathbf{R} - \mathbf{R}_0$ (qui est dirigée suivant le vecteur normal) :

$$\mathcal{H}[\mathbf{R}] = \mathcal{H}_s[\mathbf{J}, \mathbf{R}_0] + \mathcal{H}_H[\mathbf{R}_0] + \frac{1}{2} \int d^2 \tilde{u} \sqrt{g} \int d^2 \tilde{u}' \sqrt{g} \delta \mathbf{R}(\tilde{u}) \mathbf{H}_H^{(2)} \delta \mathbf{R}(\tilde{u}') \quad (\text{II.36})$$

avec

$$\mathbf{H}_H^{(2)} = \left. \frac{\delta^2 \mathcal{H}_H}{\delta \mathbf{R}(\tilde{u}) \delta \mathbf{R}(\tilde{u}')} \right|_{\mathbf{R}_0}$$

La condition de stationnarité (voir le paragraphe II.2.1) nous affirme que l'ordre linéaire de ce développement dans les perturbations est nul. En ce qui concerne la partie quadratique, elle apporte des corrections non-triviales aux fluctuations qui, dans le langage des diagrammes de Feynman⁽⁸⁾, correspondent à des corrections à l'ordre une boucle. De plus, pour déterminer $\mathcal{H}^<$, il nous faut simplement évaluer l'intégrale gaussienne dont nous connaissons exactement le résultat :

$$\int \mathcal{D}\delta\mathbf{R}^> \exp \left\{ -\frac{1}{2k_B T} \int d^2\check{u} \sqrt{g} \int d^2\check{u}' \sqrt{g} \delta\mathbf{R}(\check{u}) \mathbf{H}_H^{(2)} \delta\mathbf{R}(\check{u}') \right\} = \frac{1}{\sqrt{\det_{\Lambda_0/s} \mathbf{H}_H^{(2)}}} \quad (\text{II.37})$$

où “ $\det_{\Lambda_0/s} \ln$ ” correspond au produit des valeurs propres de l'opérateur $\mathbf{H}_H^{(2)}$. Il en résulte que :

$$\begin{aligned} \mathcal{H}^< &= -k_B T \ln \left\{ \int \mathcal{D}\mathbf{R}^> e^{-\mathcal{H}[\mathbf{R}]/k_B T} \right\} \\ &= \mathcal{H}[\mathbf{R}_0] + \frac{k_B T}{2} \text{Tr}_{\Lambda_0/s}^{\Lambda_0} \ln \left(\frac{\Lambda_0^4}{k_B T} \mathbf{H}_H^{(2)} \right) \end{aligned} \quad (\text{II.38})$$

où “ $\text{Tr}_{\Lambda_0/s}^{\Lambda_0} \ln$ ” implique une sommation sur les valeurs propres de l'opérateur $\mathbf{H}_H^{(2)}$. Nous avons fabriqué un logarithme adimensionné en y incorporant $k_B T$ et une échelle de longueur $1/\Lambda_0$. Le premier terme est simplement la contribution classique, dite “ $T=0$ ”, du hamiltonien. Les effets des fluctuations à une boucle sont représentés par le second terme qui est d'ordre $O(k_B T)$.

Représentation de Monge

Etant donné que nous nous intéressons à comprendre le comportement thermodynamique de membranes quasi-plates, et en particulier leur stabilité, il paraît judicieux d'adopter une paramétrisation de Monge $\mathbf{R} = (\mathbf{x}, h(\mathbf{x}))$. Dans ce cas, le développement perturbatif nous donne, en remplaçant $\text{Tr} \rightarrow \int d^2\mathbf{x} \int d^2\mathbf{q}/(2\pi)^2$ et dans la limite $\mathbf{J} \rightarrow 0$:

$$\begin{aligned} \mathcal{H}_H^< &= \mathcal{H}_H[h_0] + \frac{k_B T}{2} \int d^2\mathbf{x} \int_{\Lambda_0/s}^{\Lambda_0} \frac{d^2\mathbf{q}}{(2\pi)^2} \times \\ &\ln \left\{ \frac{\kappa q^4 + \sigma q^2 - \frac{\kappa}{2} (q^2 (\partial_{ii}^2 h_0)^2 + 4q_k q_l \partial_{kl}^2 h_0 \partial_{ii}^2 h_0 + \dots)}{k_B T \Lambda_0^4} \right\} \end{aligned} \quad (\text{II.39})$$

L'intégration du second terme sur les vecteurs d'onde q permet d'écrire le hamiltonien $\mathcal{H}_H^<$ sous une forme identique à \mathcal{H}_H dans sa forme “Monge” (donnée dans le paragraphe II.1.3) :

$$\mathcal{H}_H^< = \int d^2\mathbf{x} \left\{ \frac{\kappa_{e,s}}{2} (\nabla^2 h_0)^2 + \sigma_{e,s} \left(1 + \frac{1}{2} (\nabla h_0)^2 \right) \right\} \quad (\text{II.40})$$

où les valeurs effectives de la rigidité de courbure $\kappa_{eff,s}$ et de la tension de surface $\sigma_{eff,s}$ à cette nouvelle échelle de longueur prennent la forme suivante :

$$\begin{cases} \sigma_{eff} &= \sigma + \varepsilon \frac{k_B T}{4\pi} \Lambda_0^2 \ln \left(1 + \frac{\sigma}{\kappa \Lambda_0^2} \right) \\ \kappa_{eff} &= \kappa - \varepsilon \frac{3k_B T}{4\pi} \frac{1}{1 + \sigma / \kappa \Lambda_0^2} \end{cases} \quad (\text{II.41})$$

avec $s = 1 + \varepsilon$. Quand nous intégrons les fluctuations jusqu'à des échelles de longueur macroscopique (soit $s \rightarrow \infty$), le hamiltonien effectif nous donne alors une estimation du potentiel thermodynamique effectif, *i.e.* $\mathcal{H}_H^< \rightarrow \Gamma_e$, mais aussi les paramètres élastiques macroscopiques contrôlant la thermodynamique des membranes $\kappa_{e,s} \rightarrow \kappa_e$ et $\sigma_{e,s} \rightarrow \sigma_e$.

II.4 Formes des membranes

La forme adoptée par les vésicules à l'équilibre mécanique résulte de deux principes. D'une part, la forme finale possède l'aire et le volume fixés aléatoirement au moment de la formation de la vésicule. D'autre part, elle est celle dont l'énergie de courbure est minimale. Cependant, le calcul de ces formes optimales à l'aide de ces deux principes conduit à une famille de formes géométriques qui ne rend pas compte de toutes les formes observées expérimentalement. La raison de cet échec est liée à la faiblesse de la description qui ne prend pas en compte l'architecture en double feuillet de la bicouche, *i.e.* que la membrane est considérée comme une simple interface incompressible séparant deux milieux aqueux. Effectivement, du fait de la courbure de la vésicule, le feuillet interne de la membrane possède une aire légèrement plus faible que le feuillet externe. Autrement dit, les deux feuillets de la bicouche n'ont pas le même nombre de molécules lipidiques, et cette petite différence caractérise l'asymétrie de la membrane. La description en terme d'hamiltonien de Canham-Helfrich requiert donc une extension.

II.4.1 Extension du modèle de courbure

Pour inclure l'asymétrie des deux feuillets dans le modèle, il est indispensable de décrire les propriétés hydrodynamiques d'une membrane à un seul composant par une densité latérale de lipides pour chacun des feuillets et considérer la possibilité d'un couplage entre ces densités et la déformation de la membrane [Rauch, 2001]. De plus, les degrés de liberté latéraux peuvent être couplés directement aux déformations de la membrane [Taniguchi et al., 1994, MacKintosh, 1994]. Une attention toute particulière doit être portée sur la possibilité que l'asymétrie de densités latérales ou de champs de concentration entre les deux monocouches (pratiquement individuelles notées "+" et "-") peut localement générer une courbure spontanée. En tenant compte des remarques précédentes, nous obtenons l'hamiltonien suivant qui a été introduit par Leibler

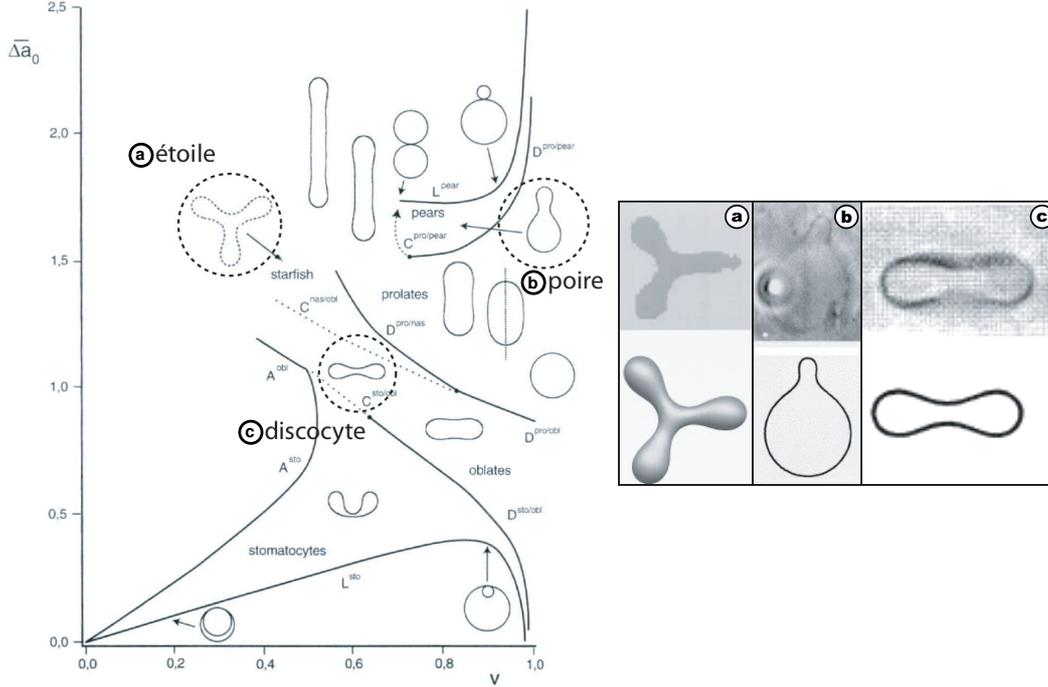


FIG. II.9 - Diagramme de phase du modèle ADE des formes accessibles aux vésicules unicumériques dans l'espace des paramètres : le volume réduit v et la différence d'aire effective entre les deux feuillettes $\Delta\bar{a}_0$. Les formes (a) d'étoile de mer (*starfish*) [Wintz et al., 1996], (b) de poire (*pear*) [Seifert et al., 1991] et (c) de discoocyte [Berndl et al., 1990] sont décrites par ce modèle.

[Leibler, 1986] :

$$\mathcal{H} = \int d^2\tilde{u} \sqrt{g} \left(\frac{\kappa}{2} H^2 + \frac{\chi}{2} \phi_\Delta^2 + \frac{\chi}{2} \phi_\Sigma^2 - \Xi \phi_\Delta H \right) \quad (\text{II.42})$$

Le dernier terme représente un couplage bilinéaire entre la courbure moyenne et la différence de densité $\phi_\Delta = (\phi_+ - \phi_-)/2$, et est la forme la plus simple de couplage qui respecte la symétrie du problème (“+” \longleftrightarrow “-”). Les deux autres termes décrivent les interactions entre degrés de liberté latéraux ϕ_Δ et $\phi_\Sigma = (\phi_+ + \phi_- - 2\phi_0)/2$, où ϕ_0 est la densité d'équilibre.

II.4.2 Modèle ADE

Sans aucun échange de lipides avec le milieu environnant, les nombres de lipides N^+ et N^- de chacun des feuillettes restent constants, et ces lois de conservations impliquent les contraintes intégrales :

$$\begin{aligned} \int dA \phi_\Sigma &= (N^+ + N^-)/2 - \phi_0 A \\ \int dA \phi_\Delta &= (N^+ - N^-)/2 \end{aligned} \quad (\text{II.43})$$

Si ces contraintes sont ajoutées dans le hamiltonien de Leibler avec des multiplicateurs de Lagrange, sa minimisation à aire fixée aboutit directement à la densité moyenne : $\phi_\Sigma = (N^+ + N^-)/2A - \phi_0$ et à la différence de densité : $\phi_\Delta = \Xi\phi_0 H/4\chi - \phi_0\Delta A/2A + (N^+ - N^-)/(2A)$. La différence d'aire ΔA est déterminée par $\Delta A = d \oint dAH$ pour des membranes d'épaisseur d négligeable et diffère de la différence d'aire initiale $\Delta A_0 \equiv (N^+ + N^-)/2\phi_0$. En remplaçant les valeurs des densités ϕ_Σ et ϕ_Δ dans l'expression du hamiltonien II.42, nous obtenons l'énergie :

$$\mathcal{H} = \frac{\kappa}{2} \oint dAH^2 + \frac{\chi}{2A} (\Delta A - \Delta A_0)^2 + \frac{\chi}{2} A \left(\frac{N^+ + N^-}{2\phi_0 A} - 1 \right)^2 \quad (\text{II.44})$$

Si nous remplaçons le dernier terme de l'Eq. II.44 par une contrainte dure en surface, nous obtenons le modèle ADE (Area-Difference-Elasticity) :

$$\mathcal{H}_{ADE} = \frac{\kappa}{2} \oint dAH^2 + \frac{\bar{\kappa}\pi}{2Ad^2} (\Delta A - \Delta A_0)^2 \quad (\text{II.45})$$

où $\bar{\kappa}$ est la rigidité de courbure non locale [Miao et al., 1994]. La différence de surface ΔA_0 induit une asymétrie et un sens de courbure préférentiel mais ne se réduit pourtant pas à une courbure spontanée effective. Les deux feuilletts sont en effet libres de glisser l'un sur l'autre pour relaxer vers un état de densité uniforme, il n'y a donc pas de frustration locale mais uniquement globale à l'échelle de la vésicule. Dans ce type de structures fermées, l'aire de la membrane peut être considérée comme constante. Dans ce cas, le volume, qui mesure l'état de gonflement de la vésicule, et l'asymétrie entre les deux feuilletts, qui traduit la tendance de la membrane à se courber, permet de rendre compte des différentes formes observées comme les formes en étoiles ou en poire (voir Fig. II.9). En première approximation, c'est le taux de remplissage de la vésicule donné par un rapport de type volume/surface qui va déterminer sa géométrie. Les vésicules très gonflées sont quasi-sphériques alors que celles qui ne contiennent que très peu de fluide sont très aplaties. Ce taux de remplissage est donc une caractéristique fondamentale de la vésicule qui est mesurée par le rapport entre le volume de la vésicule et le volume qu'aurait cette vésicule d'aire A si elle était sphérique :

$$v = 3V/(4\pi(A/4\pi)^{3/2})$$

L'autre paramètre caractérisant les formes observées est la différence d'aire effective entre les deux feuilletts :

$$\Delta a_0 = \Delta a_0 + \kappa c_0 / (2\pi\bar{\kappa})$$

avec $\Delta a_0 = \Delta A_0 / (8\pi d(A/4\pi)^{3/2})$ et $c_0 = H_0(A/4\pi)^{3/2}$.

Pour induire expérimentalement des changements de forme, beaucoup de méthodes ont été utilisées : changement de la température pour changer l'aire

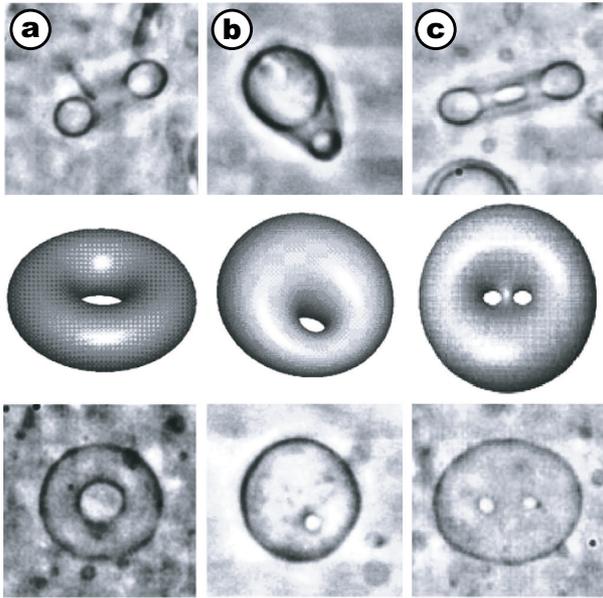


FIG. II.10 - Les vésicules peuvent avoir des topologies beaucoup plus complexes que les cellules biologiques. Les vésicules toriques à (a) section circulaire et (b) la cyclide de Dupin, dont le trou est excentré, en sont les manifestations les plus simples. Un autre exemple est (c) la « vésicule bouton », équivalente à une sphère contenant deux anses (genre topologique $g = 2$). Adapté de [Michalet, 1994].

à volume constant, utilisation de solutions salées pour induire une augmentation ou une diminution du volume interne, incorporation de phospholipides sur le feuillet externe augmentant ainsi l'asymétrie entre les deux feuillets [Farge and Devaux, 1992].

II.4.3 Vésicules de topologie non sphérique

Hormis les sphères et les surfaces planes, est-il possible d'observer d'autres surfaces plus radicalement différentes telles qu'un tore, par exemple, qui sont dites de genre topologique 1 ? La réponse a été fournie par U. Seifert [Seifert, 1991] qui a prédit théoriquement l'existence de vésicules toriques. Celles-ci peuvent être regroupées en trois familles caractérisées par l'aspect général de leur section : les tores à section circulaire (Fig. II.10(a)), ceux dont la section a une allure de croisissant (Fig. II.10(b)), et enfin ceux que l'on peut se représenter comme des disques biconcaves. Puis, dans la même année, M. Mutz et D. Bensimon ont confirmé ces prédictions théoriques par leur observation [Mutz and Bensimon, 1991]. Les tores ne sont pas les vésicules observées les plus étonnantes. En effet, M. Mutz et D. Bensimon ont aussi observé une vésicule dite « bouton » (voir Fig. II.10(c)), qui constitue une surface de genre topologique g supérieur à 2.

II.4.4 Vésicules à deux composants

Le processus de modélisation des membranes biologiques, qui est bien plus compliquées qu'une simple bicouche contenant un seul type de lipides, a donc tout naturellement conduit les physico-chimistes à inclure plusieurs composants (différents types de lipides ou inclusions) dans les membranes modèles. La des-

cription théorique s'appuie de nouveau sur le hamiltonien de Helfrich (éq. II.8) auquel sont ajoutés un terme de type Ginzburg-Landau et un terme de couplage entre la courbure local et la différence de composition lipidique (pour un mélange de deux lipides) ou la concentration d'inclusions membranaires Φ [Leibler, 1986, Taniguchi, 1996] :

$$\mathcal{H} = \int d^2\tilde{u} \sqrt{g} \left(\frac{\kappa}{2} H^2 + \sigma + \frac{B}{2} (\mathcal{D}\Phi)^2 + \frac{A_2}{2} \Phi^2 + \frac{A_4}{2} \Phi^4 - \Xi \Phi H \right) \quad (\text{II.46})$$

Les membranes constituées de deux types de lipides peuvent latéralement se séparées en deux phases liquides, ou en domaines qui changent la forme d'équilibre de ces vésicules [Andelman et al., 1992, Seul and Andelman, 1995, Jiang et al., 2000]. Résultant de la compétition entre l'énergie de courbure de la bicouche et de l'énergie de ligne au niveau de la bordure de ces domaines, ces derniers induisent, si leur taille est suffisamment grande, la formation de protrusions (ou “buds”) donnant naissance à une morphologie de vésicules crénelées (voir Fig. II.11(b)) [Lipowsky, 1992, Taniguchi, 1996]. Ce processus, qui peut ressembler à la formation de “rafts” dans les membranes cellulaires, a été obtenu par des simulations numériques [Taniguchi, 1996, Kumar et al., 2001] et observé directement dans les vésicules géantes unilamellaires [Dietrich et al., 2001, Baumgart et al., 2003]. Dans certaines situations, la séparation en domaines conduit la vésicule à adopter une forme de « cacahuète » (“peanut-shape”, voir images (iii) et (vii) dans Fig. II.11(a)) ou, dans le cas extrême, à la scission en deux vésicules, chacune ayant un seul type de lipides et connectées entre elles par un col infinitésimal (voir image (viii) dans Fig. II.11(a)) [Jülicher and Lipowsky, 1996, Baumgart et al., 2003].

Suivant leur taille et leur type d'interaction avec la membrane, les inclusions (colloïdes, nanoparticules, macro-ions, polymères, protéines, etc.) modifient les propriétés élastiques des vésicules comme, par exemple, le module de courbure [Lipowsky et al., 1998]. Elles peuvent induire des déformations dans la forme des vésicules soit par séparation de phase soit à travers un couplage important de la concentration d'inclusions avec la courbure de la membrane [Shibuya et al., 2002]. Ces changements morphologiques sont représentées dans les diagrammes de phases de la figure II.11(c). Par exemple, l'adsorption de polypeptides chargés à la surface de bicouches formées d'un mélange de lipides neutres et de lipides chargés peut induire une séparation de phase et aboutir à la formation de domaine [Lipowsky and Sackmann, 1995, p.280].

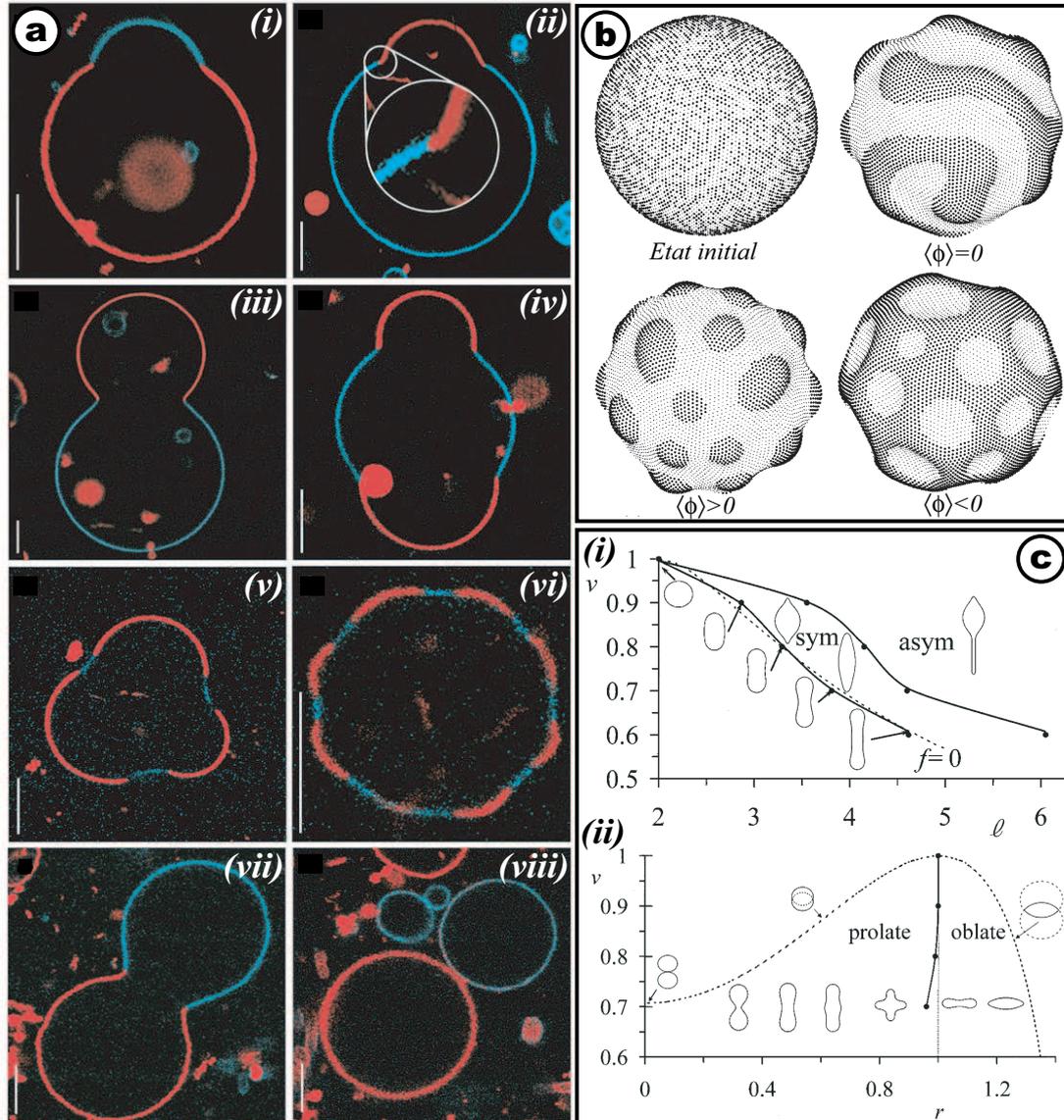


FIG. II.11 - (a) Images de microscopie à deux photons montrant des GUVs constituées d'un mélange ternaire de sphingomyéline, DOPC et cholestérol et montrant la coexistence de deux phases. Les GUVs sont marquées par du pérylène (en bleu) dans la phase ordonnée à courte distance L_o et par du rho-DPPE (en rouge) dans la phase désordonnée L_d . La barre correspond à $5 \mu\text{m}$. Adapté de [Baumgart et al., 2003]. (b) Evolution d'une vésicule à deux composants à partir de l'état initial pour les cas où la différence moyenne de composition vaut $\langle \phi \rangle = 0, > 0$ ou < 0 . Adapté de [Taniguchi, 1996]. (c) Diagrammes de phase de vésicules avec un volume v normalisé par $4\pi R^3/3$ (où R est le rayon initial de la vésicule) pour (i) des filaments tubulaires de longueur ℓ et pour (ii) des filaments en forme d'anneau de rayon r à l'équateur. Adapté de [Shibuya et al., 2002].

Chapitre III

Membranes hors d'équilibre : aspects théoriques

Toutes les études sur les membranes décrites dans le chapitre précédent ont été effectuées sur des systèmes à l'équilibre thermodynamique. Les cellules biologiques sont au contraire le siège de nombreuses réactions chimiques irréversibles nécessitant ou produisant de l'énergie et qui ont pour effet de mettre les cellules hors équilibre. En particulier, une grande majorité de ces phénomènes hors équilibre est localisée au niveau des membranes biologiques qui sont impliquées dans le transport membranaire actif et passif, la motilité cellulaire, les processus d'endocytose et d'exocytose. Une description plus complète et plus réaliste des membranes, c'est-à-dire plus proches des situations rencontrées dans le vivant, doit donc inclure ces aspects hors-équilibre. Et pourtant, cela ne fait que depuis quelques années que cet aspect a été pris en compte notamment grâce aux travaux sur les membranes actives [Prost and Bruinsma, 1996, Prost et al., 1998, Ramaswamy et al., 2000] et aux processus actifs de fusion-fission rencontrés dans le trafic intracellulaire [Ramaswamy and Rao, 2001].

La physique d'un système hors équilibre se traite différemment de celle d'un système à l'équilibre. En effet, alors que nous disposons, pour décrire les systèmes à l'équilibre, d'une approche systématique et unifiée basée sur le formalisme des distributions de Boltzmann-Gibbs, les méthodes utilisées pour rendre compte à l'échelle microscopique de la dynamique des processus hors-équilibre sont assez variées. Cependant, à l'échelle macroscopique, il existe quelques grandes idées directrices qui aident à analyser ces processus et qui les rattachent à la physique microscopique sous-jacente.

C'est dans la perspective de considérer les effets hors équilibre des membranes que nous nous sommes intéressés à deux problèmes, différents par les processus qu'ils mettent en jeu : les membranes avec des centres de forces actives (par exemple, des pompes ou des canaux ioniques), et le cas du trafic membranaire avec des membranes qui échangent du matériel biologique (par exemple

des phospholipides, des enzymes, ou des protéines) avec le milieu environnant. La présence de centres actifs dans les membranes a déjà été considérée dans des travaux antérieurs (voir à ce propos [Manneville, 1999]), nous ferons un rappel des principaux résultats en les adaptant à nos conditions expérimentales ce qui nous permettra dans le chapitre suivant de vérifier expérimentalement la validité de ce modèle théorique. Par contre, en ce qui concerne les échanges, ils viennent récemment d'être pris en compte dans les modèles de membranes mais de manière phénoménologique et dans le cas où ils sont induits par des processus actifs [Rao and Sarasij, 2001]. Nous verrons que par ces illustrations de phénomènes hors d'équilibre, nous pouvons extraire certaines caractéristiques qui sont essentielles dans ces systèmes modèles et qui le sont peut être dans les systèmes biologiques.

III.1 Membranes avec des centres actifs

Dans cette partie, nous allons considérer une membrane qui contient des « centres actifs » dont l'activité produit une force « généralisée » moyenne hors d'équilibre F_a couplée au flux transmembranaire de solvant et dirigée suivant la normale à la membrane. Ce sont par exemple des canaux ou des pompes ioniques. Cette force n'est pas nulle en raison des propriétés vectorielles des centres actifs (elle le serait s'il en était autrement), à savoir une activité s'exerçant dans une direction privilégiée et une orientation asymétrique dans la membrane. Nous pouvons estimer l'amplitude de cette force en supposant qu'elle est générée par une dissipation d'énergie, provenant par exemple de l'hydrolyse de l'ATP de l'ordre de $15k_B T$, sur la taille typique ℓ_1 d'un centre actif, soit $F_a = 15k_B T/\ell_1$. Cette force est alors d'une dizaine de pN pour $\ell_1 \sim 8$ nm. Nous pouvons de la même manière estimer l'amplitude de la force produite par le bruit thermique. L'énergie transférée à la membrane par le mouvement brownien à l'origine de ce bruit thermique est de l'ordre de $k_B T$, ce qui donne une force $F_{th} \sim k_B T/d$ de quelques pN avec $d \sim 5$ nm l'épaisseur de la membrane. La force active est donc du même ordre de grandeur que la force due aux fluctuations thermiques, et ne doit donc pas être négligée.

Les centres actifs n'exercent pas cette force de manière continue mais de façon aléatoire. La force est corrélée dans le temps sur un temps caractéristique τ avec une fonction d'autocorrélation de la forme $I(t) = I_0 \exp(t/\tau)$. Chaque centre actif, que nous appellerons (de manière consistante) pompe dans toute la suite, est supposé être mobile dans la membrane, assimilée à un fluide bidimensionnel, avec un coefficient de diffusion D .

III.1.1 Description de la membrane

La modélisation de ce type de membrane active a été décrite la première fois dans [Prost and Bruinsma, 1996], mais je présente ici une version qui tient compte du couplage entre la courbure de la membrane avec le mouvement et l'activité des pompes [Ramaswamy et al., 2000].

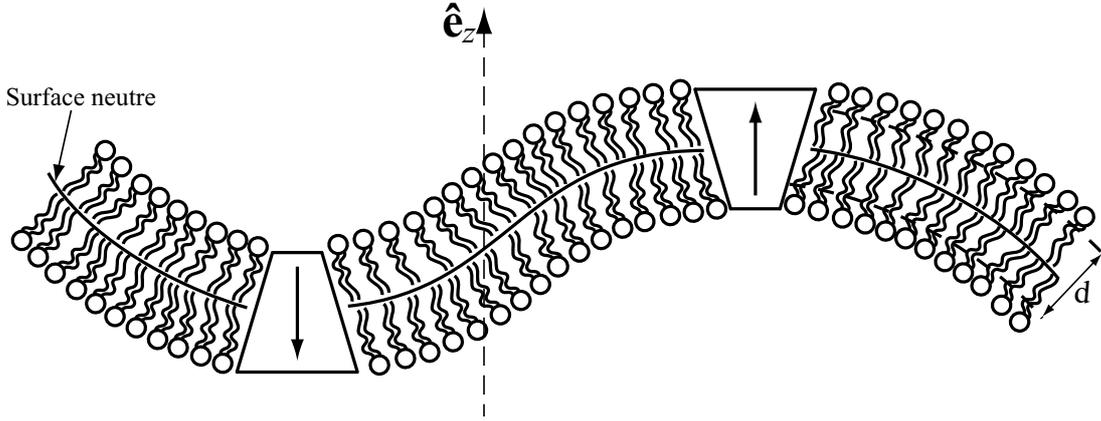


FIG. III.1 - Les protéines asymétriques imposent un angle de contact à la membrane en raison de leur forme conique (tronquée) et créent ainsi une déformation de la forme moyenne de la membrane. Elles sont caractérisées par une orientation parallèle ou antiparallèle au vecteur normal \hat{e}_z .

Les pompes actives sont rarement symétriques, et doivent être modélisées par une forme conique (tronquée) orientée comme le montre la Fig. III.1 de manière parallèle au vecteur normal (dirigé suivant \hat{e}_z) à la membrane (“pompe \uparrow ”) ou antiparallèle (“pompe \downarrow ”). Nous pouvons remarquer qu’en l’absence d’agents facilitant les processus de flip-flop, les flips “ $\uparrow \rightleftharpoons \downarrow$ ” sont peu probables. La suite du développement est correcte à des échelles de temps inférieures au temps de flip-flop. La membrane est aussi caractérisée par la position de sa surface neutre, sans considérer sa structure interne (*i.e.* le double feuillet). Elle est supposée symétrique en l’absence de pompe, ainsi la surface neutre coïncide avec le plan moyen de la bicouche et la courbure spontanée est nulle. L’état de la membrane est alors décrit, dans la représentation de Monge, par un champ de position $h(\mathbf{x}, t)$ et par les projections $\phi^{\uparrow/\downarrow}(\mathbf{x}, t) = \rho^{\uparrow/\downarrow}(\mathbf{x}, t) \sqrt{1 + (\nabla h)^2}$ dans le plan (x, y) des concentrations (surfaiques) intrinsèques $\rho^{\uparrow/\downarrow}$ des pompes \uparrow / \downarrow respectivement. Il est alors préférable de distinguer la concentration de protéines :

$$\phi(\mathbf{x}, t) = \phi^{\uparrow}(\mathbf{x}, t) + \phi^{\downarrow}(\mathbf{x}, t) \quad (\text{III.1})$$

de la concentration vectorielle :

$$\psi(\mathbf{x}, t) = \phi^{\uparrow}(\mathbf{x}, t) - \phi^{\downarrow}(\mathbf{x}, t) \quad (\text{III.2})$$

qui garde la trace de l'orientation préférentielle mais aussi de la densité de force locale sur la membrane (puisque les pompes \uparrow / \downarrow contribuent à la force exercée sur la membrane de manière identique en norme mais de sens opposé). Nous noterons ϕ_0 et ψ_0 les valeurs moyennes de ces quantités⁽¹⁾.

À l'équilibre thermique où les protéines sont présentes dans la membrane mais pas sous leur forme active, la probabilité de la configuration $\{h(\mathbf{x}), \psi(\mathbf{x})\}$ est alors proportionnelle à $\exp(-\mathcal{H}/k_B T)$ avec un hamiltonien effectif [Lipowsky, 1993, Kumar and Rao, 1998] (dans l'approximation quadratique en $h(\mathbf{x})$ et $\psi(\mathbf{x})$) :

$$\mathcal{H} = \frac{1}{2} \int d\mathbf{x} [\kappa(\nabla^2 h)^2 + \sigma(\nabla h)^2 + \chi(\psi - \psi_0)^2 - 2\Xi\psi\nabla^2 h] \quad (\text{III.3})$$

En toute rigueur, ce hamiltonien devrait contenir un (ou plusieurs) terme lié au champ de concentration $\phi(\mathbf{x})$. Toutefois étant donné que la symétrie du problème : $(h, \psi, \phi) \rightarrow (-h, -\psi, \phi)$ (qui correspond à inverser le signe de chaque pompe) proscrit, à l'ordre bilinéaire, tout couplage du type $\psi\phi$ ou $\nabla h\phi$, seuls les termes ϕ et ϕ^2 conservant cette symétrie doivent être pris en compte dans le hamiltonien. Ainsi en supposant qu'aucun échange de protéines n'ait lieu entre la membrane et le fluide environnant, ϕ peut être traité, à ce niveau de description, comme une constante ($\phi = \phi_0$) et de ce fait, les termes dépendant de ϕ dans le hamiltonien sont aussi constants et peuvent donc être négligés. En addition au module de courbure κ , à la tension de surface σ , au module de compressibilité⁽²⁾ χ pour la différence de concentration ψ (pour de faibles densités de protéines $\chi \sim k_B T/\phi_0$), l'équation (III.3) contient un coefficient de couplage Ξ qui est une conséquence de l'orientation prise par les protéines et de l'asymétrie de leur forme. En effet, localement, une différence d'orientation des protéines (*i.e.* $\psi \neq 0$) induit une courbure spontanée locale, qui s'obtient en minimisant (III.3) à ψ constant :

$$H_0 = (\nabla^2 h) = \frac{\Xi}{\kappa^e} \psi \quad \text{avec} \quad \kappa^e = \kappa - \frac{\Xi^2}{\chi} \quad (\text{III.4})$$

et dont le signe est le même que celui de ψ . Les protéines vont donc avoir tendance à diffuser vers les régions de la membrane où la courbure est adaptée à leur asymétrie (voir la Fig. III.2). Ce couplage a aussi été introduit dans le cas de la pompe à protons, la bactériorhodopsine (BR), mais la protéine n'étant que très légèrement asymétrique, d'autres origines possibles de ce couplage ont été évoquées [Manneville et al., 2001] : d'une part, un couplage entre les moments dipolaires permanents de la pompe au champ flexoélectrique induit par la courbure locale de la membrane ; d'autre part, l'énergie électrostatique moyenne du transport d'ions dans le champ flexoélectrique [Petrov, 1984].

Expérimentalement, nous verrons dans le chapitre IV qu'avec le protocole de reconstitution de pompes dans des vésicules géantes que nous avons utilisé,

⁽¹⁾Dans ce cas, ces valeurs moyennes ne sont pas des quantités locales mais globales.

⁽²⁾Certains auteurs préfèrent utiliser le terme de module osmotique pour définir le paramètre χ [Ramaswamy et al., 2000].

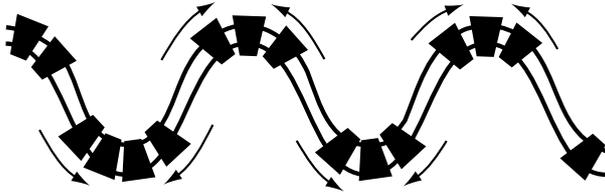


FIG. III.2 - Couplage entre les flux diffusifs de centres actifs et la courbure de la membrane. Les protéines s'accumulent dans les zones où la courbure est adaptée à leur asymétrie.

nous nous attendons en moyenne à avoir autant de protéines orientées \uparrow que de protéines \downarrow (ou du moins une distribution quasi-uniforme), ce qui nous amène à considérer $\psi_0 = 0$ (même si localement il existe une différence de densité non nulle).

La relation (III.3) donne un spectre de fluctuations à l'équilibre de :

$$\langle |h_{\mathbf{q}}|^2 \rangle = \frac{k_B T}{\kappa^e q^4 + \sigma q^2} \quad (\text{III.5})$$

La présence des protéines inactives dans la membrane renormalise le module de courbure par κ^e qui est indépendant du signe de la constante de couplage Ξ . L'échelle des fluctuations est déterminée par la température thermodynamique. Ainsi, une membrane passive (car les protéines sont inactives) ne montre pas qualitativement de nouveau comportement.

III.1.2 Equations du mouvement

Quand les pompes sont activées, l'activité produit des déformations locales dans la membrane [Prost and Bruinsma, 1996], et ces déformations agissent en retour sur la diffusion des centres de force [Ramaswamy et al., 2000]. La question qui se pose alors est de savoir si en partant d'une membrane initialement plate avec une distribution uniforme de pompes, ce système reste stable ou devient instable. Pour y répondre, il faut déterminer les équations du mouvement pour $h(\mathbf{x})$ et $\psi(\mathbf{x})$.

Equation de Darcy

L'activité d'une pompe induit une force $\pm F_a$ sur la membrane, dont le signe dépend de l'orientation de la protéine et qui est normale à la membrane, dans le cas où la courbure moyenne H est nulle. Mais dans le cas présent où la membrane est incurvée ($H \neq 0$), la symétrie, correspondant à $h \rightarrow -h$ et " \uparrow " \rightarrow " \downarrow " pour une pompe, apporte une contribution supplémentaire $\ell_2 F_a H$ à la force normale, où ℓ_2 est une longueur caractérisant la sensibilité de l'activité de pompage à la courbure de la membrane. En effet, des expériences effectuées sur les canaux potassiques mécanosensibles TREK⁽³⁾ et TRAAK⁽³⁾ ont apporté la preuve

⁽³⁾Les canaux potassiques participent à de nombreuses fonctions biologiques et sont notamment responsables du maintien du potentiel transmembranaire, de la transmission de l'influx

que l'ouverture de ces canaux est directement reliée au signe de la courbure [Maingret et al., 1999b, Maingret et al., 1999a]. Ainsi, la membrane est soumise aux forces normales liées, d'une part, à l'activité des pompes et, d'autre part, aux sauts de pressions hydrostatique $\delta P(\mathbf{x}, t) = (P|_{z=h^+} - P|_{z=h^-})$ et osmotique $\delta \Pi(\mathbf{x}, t)$ à travers la membrane. Ces forces normales induisent un flux de solvant qui, dans le référentiel de la membrane, obéit à la loi de Darcy :

$$\partial_t h(\mathbf{x}, t) - v_{sz}(\mathbf{x}, t) = \lambda_p [\delta P(\mathbf{x}, t) - \delta \Pi(\mathbf{x}, t) + F_a \psi(\mathbf{x}, t) + \ell_2 F_a \phi \nabla^2 h(\mathbf{x}, t) + f_p(\mathbf{x}, t)] \quad (\text{III.6})$$

où λ_p est un coefficient cinétique de perméation. La dernière densité de force $f_p(\mathbf{x}, t)$ est un bruit blanc correspondant à la dissipation d'énergie dans le processus de perméation et satisfait, d'après le théorème de fluctuation-dissipation, la statistique suivante⁽⁴⁾ :

$$\begin{aligned} \langle f_p(\mathbf{x}, t) \rangle &= 0 \\ \langle f_p(\mathbf{x}, t) f_p^*(\mathbf{x}', t') \rangle &= 2k_B T \lambda_p^{-1} \delta(\mathbf{x} - \mathbf{x}') \delta(t - t') \end{aligned} \quad (\text{III.7})$$

La nature stochastique de l'activité de pompage n'a pas été prise en compte dans cette description puisqu'elle induit des effets négligeables dans la limite des grandes longueurs d'onde par rapport à ceux dûs aux fluctuations collectives de ψ [Prost et al., 1998].

Equation de Stokes

Les propriétés statiques des membranes ont pu être calculées comme si la membrane était isolée : le fluide environnant n'introduit pas d'interactions inter- et intra-membranaires. Par contre, les propriétés dynamiques dépendent étroitement de l'hydrodynamique du solvant : le mouvement de la membrane à fréquence nulle induit un mouvement dans le solvant, qui en retour exerce une force sur un autre endroit de la membrane [Cai and Lubensky, 1994, Seifert, 1999]. Pour des échelles de longueur microscopique appropriées pour la membrane, le flux de solvant est dans le régime « visqueux », *i.e.* à faible nombre de Reynolds. En effet, si on s'intéresse à des situations où la densité volumique et la viscosité sont celles de l'eau : $\rho_s = 10^3 \text{ kg/m}^3$, $\eta = 10^{-3} \text{ kg/m.s}$, et pour des vitesses typiques de solvant V_s de l'ordre de $10 \mu\text{m/s}$ et une taille L de l'ordre de $10 \mu\text{m}$, le nombre de Reynolds vaut $Re = \rho_s V_s L / \eta \approx 10^{-4} \ll 1$. Si les variations

nerveux et de la rythmogénèse. Ces canaux se répartissent en trois familles structurales qui ont été définies d'après les homologies de séquence, le nombre de segments transmembranaires (STM) et de portion participant à la formation du pore ionique (le segment P). L'une d'entre elles est caractérisée par la présence de 4 STM et de 2 segments P pour chaque sous-unité protéique; ce sont par exemple les canaux TWIK=“Tandem of P domain in a Weak Inwardly rectifying K^+ channel”, TREK=“TWIK Related K^+ channel”, et TRAAK=“TWIK Related Arachidonic Acid activated K^+ channel”.

⁽⁴⁾Le symbole * signifie qu'il s'agit du terme conjugué.

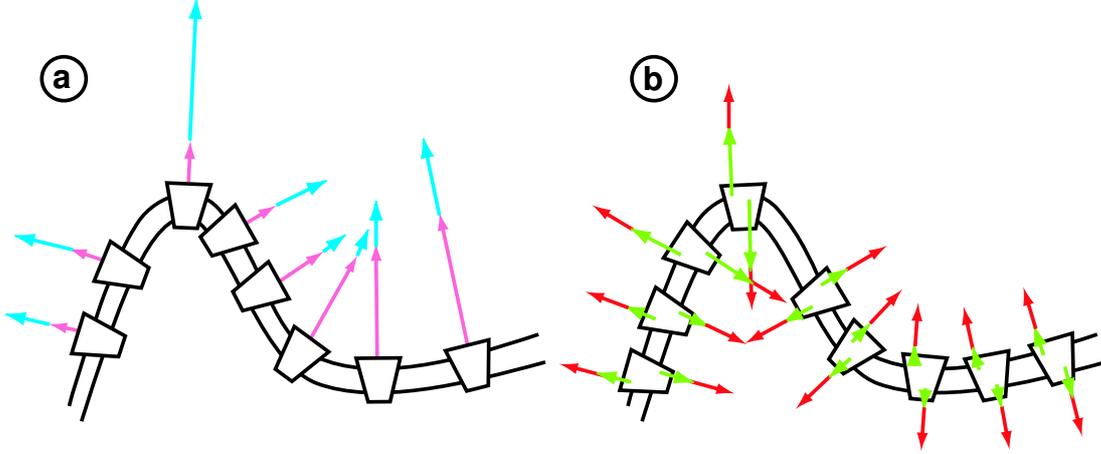


FIG. III.3 - Représentation schématique des champs de forces exercés par l'activité des pompes (a) sur la membrane dans l'équation de Darcy ($F_a\psi(\mathbf{x}, t)$ en mauve, $\ell_2 F_a \phi \nabla^2 h(\mathbf{x}, t)$ en bleu) et (b) sur le solvant dans l'équation de Stokes ($F_a [\delta(z - w^\uparrow) - \delta(z + w^\downarrow)] \psi(\mathbf{x}, t)$ en vert, $\ell_2 F_a [\delta(z - w^\uparrow) - \delta(z + w^\downarrow)] \phi \nabla^2 h$ en rouge).

temporelles de la vitesse \mathbf{v}_s sont suffisamment lentes par rapport au temps de diffusion visqueuse $\rho L^2/\eta \approx 10^{-6}$ s⁽⁵⁾, l'écoulement du solvant est alors décrit par l'équation de Stokes en y incluant la condition d'incompressibilité du solvant :

$$\begin{aligned} \eta \nabla^2 \mathbf{v}_s(\mathbf{r}, t) &= \nabla P(\mathbf{r}, t) - \mathbb{F}(\mathbf{r}, t) \hat{\mathbf{e}}_z - \mathbf{f}_h(\mathbf{r}, t) \\ \nabla \cdot \mathbf{v}_s(\mathbf{r}, t) &= 0 \end{aligned} \quad (\text{III.8})$$

La densité de forces $\mathbb{F} \hat{\mathbf{e}}_z$ provient de deux origines différentes. D'une part, la force de rappel agissant en un point de la membrane et qui est due à ses seules propriétés élastiques est donnée par

$$-\left. \frac{\delta \mathcal{H}}{\delta h} \right|_\psi = -\kappa (\nabla^2 h)^2 + \sigma \nabla^2 h + \Xi \nabla^2 \psi \quad (\text{III.9})$$

À concentration de protéines constante, celle-ci doit alors compenser la force exercée par la membrane sur le solvant. D'autre part, l'activité hors-équilibre des pompes n'est pas localisée en un unique point mais dans un volume comparable à celui de la protéine créant ainsi une force sur le fluide environnant. Etant donné qu'aucune source de forces extérieures n'est présente, la résultante des forces exercées au système pompe+membrane+solvant doit être nulle. En d'autres termes, la densité de forces associée à une pompe ne contient pas de terme monopolaire. En ce qui concerne les termes polaires d'ordre plus élevé, à petites échelles de longueur, c'est le terme de dipôle de forces :

$$F_a [\delta(z - w^\uparrow) - \delta(z + w^\downarrow)] \psi(\mathbf{x}, t)$$

⁽⁵⁾En fait, cela revient à négliger le terme non stationnaire $\partial_t \mathbf{v}_s$ devant le terme de viscosité $\eta \nabla^2 \mathbf{v}_s$ dans l'équation de Navier-Stokes [Happel and Brenner, 1991].

qui prédomine, où $w^{\uparrow/\downarrow}$ sont des longueurs du même ordre de grandeur que la protéine. Pour simplifier, les autres termes multipolaires ne sont pas pris en compte. Pour tenir compte (comme précédemment) de la dépendance de l'activité à la courbure, il est nécessaire d'ajouter le terme :

$$\ell_2 F_a [\delta(z - w^\uparrow) - \delta(z + w^\downarrow)] \phi \nabla^2 h(\mathbf{x}, t).$$

Le dernier terme dans l'équation (III.8) correspond au bruit thermique volumique $\mathbf{f}_h(\mathbf{r}, t)$ qui vérifie les fonctions de corrélation suivantes :

$$\begin{aligned} \langle \mathbf{f}_h(\mathbf{r}, t) \rangle &= \mathbf{0} \\ \langle \mathbf{f}_{hi}(\mathbf{r}, t) \mathbf{f}_{hj}^*(\mathbf{r}', t') \rangle &= 2k_B T \eta (-\delta_{ij} \nabla^2 + \partial_i \partial_j) \delta(\mathbf{r} - \mathbf{r}') \delta(t - t') \end{aligned} \quad (\text{III.10})$$

Equation de Langevin de la membrane

Le saut de pression $\delta P(\mathbf{q}, t)$ et la composante $v_{sz}(\mathbf{q}, t)$ de la vitesse du solvant sont calculés à partir de l'équation de Stokes (voir l'annexe C pour le détail des calculs). En les remplaçant dans l'équation de Darcy (III.6), et après avoir effectué une transformée de Fourier 2D, nous obtenons l'équation de type Langevin vérifiée par $h(\mathbf{q}, t)$:

$$\partial_t h(\mathbf{q}, t) + \tau_h^{-1} h(\mathbf{q}, t) = \beta \psi(\mathbf{q}, t) + \lambda_p f_p(\mathbf{q}, t) + \frac{1}{2\eta\pi} \int dk_z \frac{\mathbf{f}_h(\mathbf{k}, t) \cdot \hat{\mathbf{e}}_z}{k^2} \quad (\text{III.11})$$

avec

$$\begin{aligned} \tau_h^{-1} &= \left(\lambda_p + \frac{1}{4\eta q} \right) (\kappa q^4 + \sigma q^2) + \phi \lambda_p \ell_2 F_a q^2 - \ell_2 \mathcal{P}_a w \phi \frac{q^3}{4\eta} \\ \beta &= \lambda_p \bar{F}_a - \Xi q^2 \left(\lambda_p + \frac{1}{4\eta q} \right) - \mathcal{P}_a w \frac{q}{4\eta} \end{aligned} \quad (\text{III.12})$$

où $\bar{F}_a = F_a - 2k_B T \dot{a} / D_{ions} q$ provient du terme de pression osmotique, à le taux de pompage (voir la relation (C.14) dans l'annexe C), D_{ions} le coefficient de diffusion des ions dans le solvant, $\mathcal{P}_a = F_a \frac{w^{\uparrow 2} - w^{\downarrow 2}}{2w}$ le dipôle de force actif et w la taille de la protéine.

Loi de conservation des pompes

La contribution des dipôles de forces des pompes est de l'ordre de $q^3 \psi(\mathbf{q}, t)$ et peut donc être négligée⁽⁶⁾. L'équation d'évolution temporelle de ψ est alors simplement une loi de conservation :

$$\partial_t \psi(\mathbf{x}, t) = -\nabla \cdot \mathbf{j}(\mathbf{x}, t) + \nabla \cdot \mathbf{f}_\psi(\mathbf{x}, t) \quad (\text{III.13})$$

où $\mathbf{j}(\mathbf{x}, t) = \psi \mathbf{v}_{s\perp}(\mathbf{x}, z = 0, t) - \Lambda \nabla \delta \mathcal{H} / \delta \psi$ est le courant de pompes dans la membrane, $\mathbf{v}_{s\perp}(\mathbf{x}, z = 0, t)$ le vecteur vitesse du solvant tangent à la membrane

⁽⁶⁾Cette remarque provient d'une longue discussion avec J. Prost.

et Λ la mobilité des pompes. Le dernier terme \mathbf{f}_ψ dans l'éq. (III.13) est dû au bruit thermique vérifiant les propriétés statistiques suivantes :

$$\begin{aligned}\langle \mathbf{f}_\psi(\mathbf{x}, t) \rangle &= \mathbf{0} \\ \langle \mathbf{f}_{\psi_i}(\mathbf{x}, t) \mathbf{f}_{\psi_j}^*(\mathbf{x}', t') \rangle &= 2k_B T \Lambda \delta_{ij} \delta(\mathbf{r} - \mathbf{r}') \delta(t - t')\end{aligned}\quad (\text{III.14})$$

Il est tout-à-fait possible que l'activité de la protéine soit elle-même stochastique et qu'elle contribue donc en tant que source de bruit supplémentaire mais la possibilité d'un tel bruit dépendant du pompage est ignorée pour simplifier cette description du système.

La vitesse tangentielle étant d'ordre 2, elle est négligeable par rapport aux autres termes dans l'éq. (III.13). Avec $\delta\mathcal{H}/\delta\psi = \chi\psi - \Xi\nabla^2 h$, cette loi de conservation prend, dans l'approximation linéaire, une forme plus simple :

$$\partial_t \psi(\mathbf{x}, t) \simeq \Lambda \chi \nabla^2 \psi(\mathbf{x}, t) - \Lambda \nabla^4 h(\mathbf{x}, t) + \nabla \cdot \mathbf{f}_\psi(\mathbf{x}, t) \quad (\text{III.15})$$

En passant dans l'espace réciproque bidimensionnel, on obtient la deuxième équation de Langevin couplant ψ et h :

$$\partial_t \psi(\mathbf{q}, t) + \tau_\psi^{-1} \psi(\mathbf{q}, t) = \gamma h(\mathbf{q}, t) - i \mathbf{q} \cdot \mathbf{f}_\psi(\mathbf{q}, t) \quad (\text{III.16})$$

avec

$$\begin{aligned}\tau_\psi^{-1} &= \Lambda \chi q^2 = D q^2 \\ \gamma &= -\Lambda \Xi q^4\end{aligned}\quad (\text{III.17})$$

III.1.3 Etude de stabilité

Il est important de signaler que si ℓ_2 ou Ξ est suffisamment grand et négatif c'est-à-dire que la force est dans le sens opposé au centre de courbure, alors les équations (III.11) et (III.16) montrent qu'une membrane initialement plate avec une répartition uniforme de pompes \uparrow / \downarrow (soit $\psi = 0$) est linéairement instable avec un taux de croissance variant comme q^2 à grandes longueurs d'onde. Pour s'en convaincre, imaginons une région avec un excès de pompes \uparrow dans une membrane plate. L'activité de ces pompes induit dans cette région une courbure moyenne $H = \nabla^2 h < 0$ ce qui peut mener à une instabilité suivant deux mécanismes possibles : (i) si $\ell_2 < 0$, l'activité des pompes \uparrow est amplifiée (voir Fig. III.4(a)), (ii) si $\Xi < 0$, les pompes \uparrow sont attirées dans la région courbée (vers le haut, *i.e.* dans le même sens que l'asymétrie de la protéine) de la membrane (voir Fig. III.4(b)). De tels mécanismes physiques pourraient être invoqués dans les processus où les membranes plasmiques développent de larges déformations. Toutefois, à partir de cette description linéaire, il n'est pas encore possible de connaître la forme de la membrane lorsque celle-ci développe une telle instabilité. Seules des études numériques du modèle complet, c'est-à-dire en tenant compte des termes non-linéaires, seraient capables d'y répondre. Actuellement, des simulations numériques de Monte Carlo et de EDPs⁽⁷⁾ [Ramaswamy, 2003] sont en cours.

⁽⁷⁾EDPs = équations aux dérivées partielles.

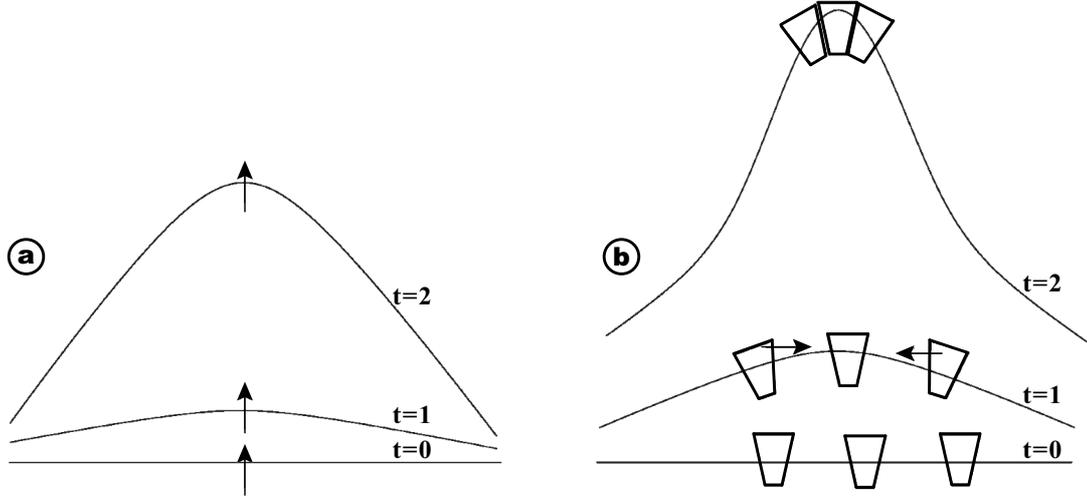


FIG. III.4 - Représentation schématique des deux mécanismes produisant une instabilité : (a) une courbure moyenne non nulle de la membrane amplifie la force exercée par une unique pompe orientée dans le même sens que la courbure; (b) la courbure induite par le pompage attire les autres pompes ayant la même orientation. Adapté de [Ramaswamy et al., 2000].

III.1.4 Fluctuations hors-équilibres

III.1.4.a Spectre de fluctuations

Pour calculer le spectre des fluctuations $\langle h(\mathbf{q}, \omega)h^*(\mathbf{q}', \omega') \rangle$, il suffit de résoudre les équations couplées de Langevin (III.11) et (III.16) dans l'espace de Fourier temporel (défini dans l'annexe C) en utilisant les fonctions de corrélation des sources de bruit $f_p(\mathbf{q}, t)$, $\mathbf{f}_h(\mathbf{k}, t)$ et $\mathbf{f}_\psi(\mathbf{q}, t)$. Un calcul des pôles puis une intégration dans le plan complexe sur tous les ω donnent :

$$\langle |h(\mathbf{q}, t)|^2 \rangle = \frac{k_B T}{(\tau_h^{-1} + \tau_\psi^{-1})(\tau_h^{e-1} + \tau_a^{-1})} \left[\frac{1}{\chi} \left(\lambda_p \bar{F}_a - \mathcal{P}_a w \frac{q}{4\eta} \right)^2 + (\tau_h^{-1} + \tau_\psi^{-1} - \tau_a^{-1}) \left(\lambda_p + \frac{1}{4\eta q} \right) \right] \quad (\text{III.18})$$

où

$$\tau_a^{-1} = \frac{\Xi}{\chi} q^2 \left(\lambda_p \bar{F}_a - \mathcal{P}_a w \frac{q}{4\eta} \right) \quad (\text{III.19})$$

et τ_h^{e-1} a la même structure que τ_h^{-1} , mais en remplaçant κ par κ^e (voir éq. III.4). Lorsque la protéine est inactive, les paramètres F_a et \mathcal{P}_a sont nuls, et dans ce cas, la relation (III.18) se réduit au spectre des fluctuations statiques obtenu précédemment (équation III.5) et la relation (III.16) donne le spectre de densité :

$$\langle |\psi(\mathbf{q}, t)|^2 \rangle = \frac{k_B T}{\chi q^2} \quad (\text{III.20})$$

III.1.4.b Régimes pertinents dans les expériences

On peut distinguer plusieurs régimes en fonction des échelles de longueur. Tout d'abord, il est possible de définir une longueur de coupure au delà de laquelle le terme monopolaire $\lambda_p F_a$ domine sur le terme dipolaire $\mathcal{P}_a w q / 4\eta$ par :

$$l_1^c = 2\pi \frac{w \mathcal{P}_a}{4l_p F_a} \approx 2\pi \frac{w^2}{4l_p} \quad (\text{III.21})$$

lorsque $\mathcal{P}_a \approx w F_a$ et la longueur de perméation $l_p = \lambda_p \eta$. En prenant la viscosité de l'eau $\eta = 10^{-3} \text{ kg/m.s}$ et une valeur typique du coefficient de perméation $\lambda_p \simeq 10^{-12} \text{ m}^3/\text{N.s}$ mesurée pour le passage d'eau à travers une membrane lipidique [Jansen and Blume, 1995], on obtient une longueur $l_p \sim 10^{-15} \text{ m}$ négligeable par rapport au détail moléculaire des lipides (de l'ordre de 10 \AA), c'est-à-dire que la relaxation par l'hydrodynamique est dominante à nos échelles de longueur. De plus, avec une taille de protéine comme celle correspondant à l'ATPase- Ca^{2+} qui est de 140 \AA (voir chapitre IV) nous avons $l_1^c \sim 0,3 \text{ m}$ qui est très grand comparé à la taille maximale de $100 \mu\text{m}$ des vésicules géantes, ce qui veut dire que ce sont les termes dipolaires qui sont toujours prépondérants pour ce système et probablement pour toutes les pompes.

La comparaison entre le terme osmotique $2\lambda_p k_B T \dot{a} / D_{ions} q$ et le terme dipolaire conduit également à une longueur de coupure l_2^c en-dessous de laquelle c'est le terme dipolaire qui domine :

$$l_2^c = 2\pi \left(\frac{\mathcal{P}_a w D_{ions}}{8l_p k_B T \dot{a}} \right)^{1/2} \quad (\text{III.22})$$

Le taux de pompage dépend fortement de la protéine considérée qu'il s'agisse de canaux ioniques avec \dot{a} de l'ordre de 10^6 s^{-1} ou bien de pompes avec par exemple $\dot{a} \simeq 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ pour l'ATPase- Ca^{2+} . En ce qui concerne \mathcal{P}_a qui peut être considéré comme l'énergie consommée par une pompe, nous pouvons prendre, dans le cas de l'ATPase- Ca^{2+} , l'énergie d'hydrolyse de l'ATP qui est de l'ordre de $15 k_B T$. Ainsi avec $D_{ions} \sim 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$, la longueur l_2^c est de quelques mètres ce qui, en d'autres termes, permet de négliger la contribution de la pression osmotique dans le cas des pompes. Par contre, dans le cas des canaux ioniques, nous n'avons plus le droit de négliger cette contribution.

Avec ces simplifications, nous avons maintenant pour le cas des pompes :

$$\begin{aligned} \tau_h^{-1} &= \frac{1}{4\eta q} (\kappa_a q^4 + \sigma q^2) \\ \tau_a^{-1} &= -\frac{\Xi}{4\chi\eta} \mathcal{P}_a w q^3 \end{aligned} \quad (\text{III.23})$$

qui introduit tout naturellement une renormalisation de κ par l'activité des pompes : $\kappa_a = \kappa - \ell_2 \mathcal{P}_a w \phi$.

De plus, en comparant τ_h^{-1} et τ_ψ^{-1} , nous pouvons définir deux nouvelles longueurs de coupure

$$\begin{aligned} l_3^c &= \pi\kappa/2\eta D \approx 10^{-4} \text{ m} \\ l_4^c &= 8\pi\eta D/\sigma \approx 10^{-12} - 10^{-8} \text{ m} \end{aligned} \quad (\text{III.24})$$

pour des coefficients de diffusion des pompes dans la membrane de l'ordre de $10^{-12} \text{ m}^2/\text{s}$ [Bloom et al., 1991] et des tensions de membrane comprises entre 10^{-7} et 10^{-3} J/m^2 (voir le paragraphe II.1.1). La plupart des expériences sur les vésicules géantes se font à des échelles de longueur comprises justement entre l_4^c et l_3^c , ce qui veut dire que nous pouvons négliger le terme de diffusion : $\tau_\psi^{-1} \ll \tau_h^{-1}$. Dans ces conditions, le spectre des fluctuations se réduit à :

$$\langle |h(\mathbf{q}, t)|^2 \rangle \simeq \frac{k_B T}{\kappa_a^e q^4 + \sigma q^2} + \frac{k_B T \mathcal{P}_a w \Xi_a}{\chi(\kappa_a q^2 + \sigma)(\kappa_a^e q^2 + \sigma)} \quad (\text{III.25})$$

avec les paramètres renormalisés $\Xi_a = \Xi + \mathcal{P}_a w$ et $\kappa_a^e = \kappa^e - \ell_2 \mathcal{P}_a w \phi - \mathcal{P}_a w \Xi \phi / k_B T$ où nous avons pris $\chi = k_B T / \phi$.

III.1.4.c Excès d'aire

À partir du spectre de fluctuations III.25, il est possible de calculer l'excès de surface⁽⁸⁾ $\alpha = (A_p - A_p^0)/A_p^0 = \langle (\nabla h)^2 / 2 \rangle_\sigma$ présenté au paragraphe II.2.4 qui doit, dans le cas présent, contenir la marque de l'activité des pompes. Après de long calculs, la variation de l'excès de surface $\Delta\alpha$ par rapport à un état de faible tension σ_0 s'exprime, dans le régime entropique, sous la forme :

$$\Delta\alpha = \alpha_0 - \alpha = \frac{k_B T_{eff}}{8\pi\kappa^e} \ln \left(\frac{\sigma}{\sigma_0} \right) \quad (\text{III.26})$$

avec une température effective proportionnelle à la température thermodynamique

$$\boxed{T_{eff} = \frac{\kappa^e}{\kappa_a^e} \left(1 + \frac{\mathcal{P}_a w \Xi_a}{\kappa_a \chi} \right) T} \quad (\text{III.27})$$

III.2 Membranes en contact avec des réservoirs de lipides

En parallèle de notre étude sur les membranes actives modélisant le transport membranaire, nous nous sommes aussi intéressés aux fluctuations de membrane en contact avec des réservoirs lipidiques. Or, les membranes cellulaires sont toutes

⁽⁸⁾L'indice σ dans l'expression de α signifie que la valeur moyenne est mesurée dans un état où la tension σ est imposée.

le siège de trafics importants de lipides et de protéines. Ceux-ci sont, par exemple, synthétisés dans le réticulum endoplasmique (RE) et sont transportés de l'appareil de Golgi vers leurs destinations respectives (voie de sécrétion). De manière similaire, les protéines et les lipides insérés dans la membrane plasmique sont internalisés et transportés dans de petites vésicules appelées endosomes (voie d'endocytose) [Alberts et al., 2002]. Cette constatation nous a motivé pour développer une description théorique “lissée”⁽⁹⁾ d'une membrane à des échelles grandes comparées à celle-ci qui puisse tenir compte de ces échanges avec le fluide environnant.

Je vais maintenant décrire, dans les paragraphes qui suivent, les points importants qui permettent de situer et de justifier le travail présenté plus bas, où j'ai reproduit le texte de l'article intitulé “Fluid Membranes Exchanging Material With External Reservoirs” et soumis à The European Physical Journal E [Girard et al., 2004b]. Dans ce papier, nous partons de la description covariante et invariante sous une reparamétrisation d'une membrane fluide proposée initialement par Cai et Lubensky [Cai and Lubensky, 1994, Cai and Lubensky, 1995]. Nous y avons incorporé le fait que les lipides ont la possibilité de fusionner avec la membrane, de regagner le fluide environnant, de diffuser sur la membrane ainsi que dans la solution. Nous verrons que ces processus peuvent agir aussi bien sur les propriétés d'équilibre que sur celles hors d'équilibre. Dès lors un couplage intervient par l'échange cinétique entre la concentration membranaire de lipides et celle en volume. Contrairement à la description de Rao et Sarasij [Rao and Sarasij, 2001], nous supposons que les événements de fusion et de fission ne sont pas contrôlés par des processus actifs. De plus, leurs relations qui lient les taux de fusion/fission à la courbure moyenne et à la densité de particules sont introduites par des arguments de symétrie. Par contre, dans notre cas, les flux de lipides entre la membrane et le milieu extérieur sont reliées, par des relations de type Onsager, aux causes qui les ont créés (c'est-à-dire la différence de potentiel chimique).

Après avoir introduit une théorie contrôlée des membranes en contact avec des réservoirs de lipides, nous déterminons à la fois les conditions sous lesquelles une membrane atteint un état d'équilibre stable et quasi-plat mais aussi la structure en modes de la membrane dans ces conditions. En particulier, nous avons montré l'existence d'une instabilité pour certaines valeurs des paramètres cinétiques et obtenu un simple critère qui donne les propriétés physiques de cette instabilité.

III.2.1 Abstract

We investigate the dynamics of a single component fluid bilayer, which exchanges material with the surrounding fluid. We derive covariant equations of motion taking into account solvent permeation, exchange of lipids between solvent

⁽⁹⁾Les physiciens-théoriciens ont donné le nom de description « coarse-grainé » qui n'est pas sans rappeler le terme anglais “coarse-grained”.

and the membrane and discuss the sources of noise in these equations. Different lipid concentrations on both sides of the membrane lead to a non-equilibrium state. We discuss steady states as well as shape instabilities which occur at a critical osmotic pressure difference.

III.2.2 Introduction

Biological membranes play a crucial role in the compartmentalization of cells. They act as highly selective permeability barriers separating the cytosol from the extracellular environment as well as from different cell organelles. They participate also in a variety of biological processes, such as passive and active transport, cell locomotion, phagocytosis and endocytosis, etc [Alberts et al., 2002]. Biomembranes, despite their different functions, have a common structural basis : they are composed of lipid molecules that have a polar head group region and two hydrophobic hydrocarbon chains. Due to their amphiphilic character, when dissolved in an aqueous solvent these molecules aggregate spontaneously into two opposing monomolecular layers [Nelson et al., 1989, Lipowsky and Sackmann, 1995].

Single-component incompressible membranes have represented the fundamental model of biomembranes over thirty years. The elastic continuum description has been the starting point for studies of the thermodynamic and statistical properties of such membranes [Helfrich, 1973, Canham, 1970, Evans, 1973]. It is valid at length scales large compared to microscopic lengths such as the bilayer thickness and allows us to understand mesoscopic shapes and long wavelength fluctuations [Lipowsky and Sackmann, 1995, Brochard and Lennon, 1975, Bloom et al., 1991]. However, in living cells, membranes contain many components such as several different species of lipids, anchored polymers or membrane proteins which can move within the two-dimensional liquid state of the membrane and perform diffusive motion. Many of these complexities have been addressed both theoretically and experimentally and are known to play a role in shape transformation [Leibler, 1986, Leibler and Andelman, 1987, Baumgart et al., 2003], magnification of shape fluctuation [Ramaswamy et al., 2000, Manneville et al., 2001], coalescence and budding processes [Kumar et al., 2001]. Furthermore, inside an organism, the membranes are subject to exchanges of small transport vesicles containing different sorts of cargo molecules (*e.g.* lipids, enzymes, proteins, small intercalated particles, etc.). Thus in order to obtain a more appropriate description of biological membranes, physicists have to learn how to deal with membranes exchanging material with their three-dimensional surrounding. The work we present here may be considered as a step in this direction. It follows and generalizes earlier work considering static properties [Lipowsky and Sackmann, 1995], Rouse dynamics [Rao and Sarasij, 2001], or membrane interactions with a diffusion field as protein density [Divet et al., 2002].

We extend a covariant, reparametrization invariant theory for one component

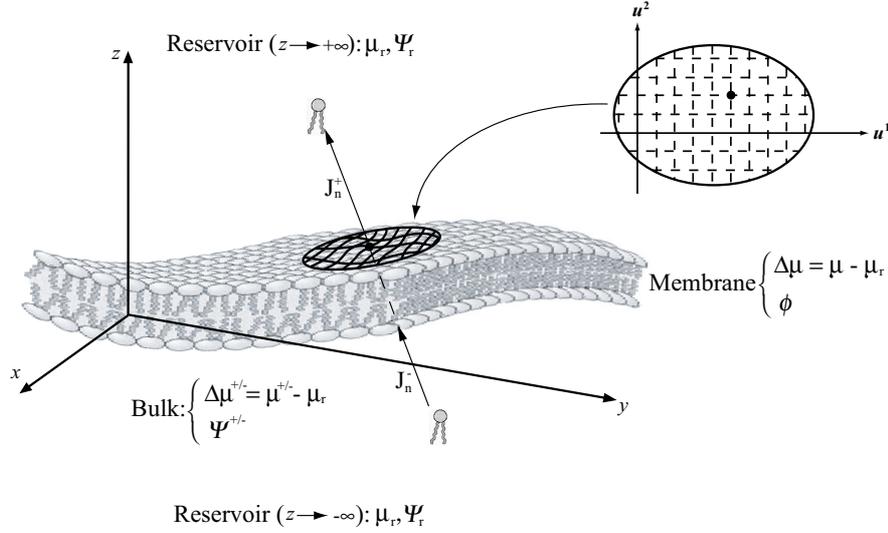


FIG. III.5 - Schematic representation of a fluid membrane which exchanges material with the solvent. The shape of the membrane in the three-dimensional embedding space is parameterized in terms of two internal coordinates u^a , $a = 1, 2$. Lipids in the membrane are characterized by the density $\phi(\tilde{u}, t)$ and the chemical potential $\mu(\tilde{u}, t)$. The membrane is located in the x-y plane and exchanges material with the solvent via the currents J_n^\pm . The density and chemical potential of material above and below are denoted Ψ^\pm and μ^\pm . Reservoirs of membrane material far from the membrane at $z \rightarrow \pm\infty$ are characterized by the density Ψ_r and the chemical potential μ_r .

membranes, proposed initially by Cai and Lubensky [Cai and Lubensky, 1994], by allowing for an exchange of material with the three-dimensional embedding fluid. The fluid is assumed to contain a fraction of membrane material either in the form of isolated molecules or of small vesicles, controlled by its chemical potential μ . In the case of vesicles dissolved in the three-dimensional fluid, the length scales considered in this manuscript must be large compared to the vesicle diameter. We assume the chemical potential difference between the membrane and each of the 3D compartments to be small enough to ensure the validity of an Onsager theory of the exchanges. This allows us to systematically construct a theory of membranes with sources and sinks of material. In order to illustrate our theory, we define the conditions under which a flat steady state may be reached, and derive the mode structure of the membrane under these conditions. In particular, we show the existence of an instability under certain conditions, and derive a simple criterion which gives us an insight into the physical basis of this shape instability.

III.2.3 Membrane description

For a theoretical description on length scales large compared to microscopic lengths, fluid membranes can be considered as two-dimensional fluctuating sur-

faces embedded in a three-dimensional Newtonian fluid. The membrane shape is described by a three-component vector field $\mathbf{R}(u^1, u^2)$ depending on two internal coordinates u^1 and u^2 of the membrane (fig. III.5). We can locally define covariant tangent-plane vectors⁽¹⁰⁾ :

$$\mathbf{R}_a = \partial_a \mathbf{R} \quad \text{for } a = 1, 2 \quad (\text{III.28})$$

from which we obtain the metric tensor : $g_{ab} \equiv \mathbf{R}_a \cdot \mathbf{R}_b$. Its determinant, $g \equiv \det(g_{ab})$, yields the area element : $d\mathcal{A} = du^1 du^2 \sqrt{g}$. The inverse metric tensor g^{ab} satisfying $g^{ab} g_{bc} = \delta_c^a$ allows us to define contravariant tangent-plane vectors $\mathbf{R}^a = g^{ab} \mathbf{R}_b$ [Nelson et al., 1989]. The tangent plane is completely defined and oriented by the local unit (outward) normal :

$$\mathbf{n} = \frac{\mathbf{R}_1 \wedge \mathbf{R}_2}{|\mathbf{R}_1 \wedge \mathbf{R}_2|}.$$

The curvature tensor is given by $K_{ab} = \mathbf{n} \cdot \partial_a \partial_b \mathbf{R}$ and permits us to construct two invariant scalars which are the mean curvature : $H \equiv g^{ab} K_{ab}/2$ and the Gaussian curvature : $K \equiv \det(g^{ab} K_{bc})$, where g^{ab} is the contravariant metric tensor [Nelson et al., 1989].

In the classical curvature model, a membrane is characterized by the Helfrich-Canham Hamiltonian [Helfrich, 1973, Canham, 1970] :

$$\mathcal{F}_{HC} \equiv \frac{1}{2} \int d^2 \tilde{u} \sqrt{g} [\kappa (2H - H_0)^2 + \kappa_G K] \quad (\text{III.29})$$

where κ is the bending rigidity, κ_G is the Gaussian curvature rigidity and H_0 is the spontaneous curvature which takes into account the possible asymmetry of either chemical or physical origin. If we exclude topological fluctuations, the Gauss-Bonnet theorem [Nelson et al., 1989] allows us to omit the term controlled by the Gaussian rigidity, since it is merely a topological invariant.

Following Cai and Lubensky, we use a single continuous scalar variable $\phi(\tilde{u}, t)$ to describe the local density of phospholipids in the membrane. In order to include the lateral density in our description, let us introduce the local free energy density $f(\phi) - \Delta\tilde{\mu}\phi$ corresponding to the replacement of the embedding fluid in the presence of its equilibrium solvated lipid density, by the bilayer membrane without curvature terms. $\Delta\tilde{\mu}$ is the difference between the membrane chemical potential and the equilibrium lipid chemical potential $\mu_r = \mu_e(T, P, \Psi_r)$ at the temperature T and pressure P of the experiment, and Ψ_r is the three-dimensional lipid density in the reservoir. The corresponding Ginzburg-Landau Hamiltonian then can be written as :

$$\mathcal{F}_{GL} = \int d^2 \tilde{u} \sqrt{g} [f(\phi) - \Delta\tilde{\mu}\phi]. \quad (\text{III.30})$$

⁽¹⁰⁾ $\partial_a = \frac{\partial}{\partial u^a}$ denotes the partial derivative with respect to coordinate u^a .

The equilibrium value ϕ_e in a flat membrane with imposed $\Delta\tilde{\mu}$ is given by $\Delta\tilde{\mu} = f'(\phi_e)$. For instance, for a membrane covering a small hole and when the equilibration time with the bulk embedding fluid is long enough the chemical potential is imposed by the Plateau borders which forces $\Delta\tilde{\mu} \neq 0$ (see section III.2.6). Under such circumstances, $f(\phi)$ can be expanded in a power series of the density deviation $\phi - \phi_e$:

$$f(\phi) = f(\phi_e) + \Delta\tilde{\mu}(\phi - \phi_e) + \frac{\chi_e}{2}(\phi - \phi_e)^2 \quad (\text{III.31})$$

with $\chi_e = f''(\phi_e)$. Equation (III.30) defines the equilibrium surface tension :

$$\sigma = f(\phi_e) - \Delta\tilde{\mu}\phi_e. \quad (\text{III.32})$$

In a situation where the bulk embedding fluid and the membrane are at equilibrium, then $\Delta\tilde{\mu} = 0$ and $\phi_e = \phi_0$ with $f(\phi_0) = 0$. As a consequence of relation (III.32), the tension σ also vanishes. For small deviations of ϕ from that value ϕ_0 , eq. (III.31) becomes :

$$f(\phi) \simeq \frac{\chi}{2}(\phi - \phi_0)^2. \quad (\text{III.33})$$

Here, $\chi = f''(\phi_0)$ is the compressibility modulus of the membrane. In general, there will also be stiffness terms depending on covariant derivatives of ϕ , as for example $|\mathcal{D}^2\phi|$ and $g^{ab}(\partial_a\phi)(\partial_b\phi)$ where $\mathcal{D}^2 = g^{-1/2}\partial_a g^{1/2}g^{ab}\partial_b$ denote the Laplace-Beltrami operator associated with the metric g_{ab} . They will, however, not concern us here since they introduce subdominant terms in the long length scale limit.

The effective Hamiltonian of symmetric membranes has the following structure :

$$\mathcal{F}[\mathbf{R}, \phi] = \int d^2\tilde{u}\sqrt{g} \left[\frac{\kappa}{2}(2H)^2 + \frac{\chi}{2}(\phi - \phi_0)^2 \right]. \quad (\text{III.34})$$

In the case when the chemical potential is imposed by Plateau borders, and for small deviations from ϕ_e , then :

$$\mathcal{F}[\mathbf{R}, \phi] = \int d^2\tilde{u}\sqrt{g} \left[\sigma + \frac{\kappa}{2}(2H)^2 + \frac{\chi_e}{2}(\phi - \phi_e)^2 \right] \quad (\text{III.35})$$

in which σ is defined by eq. (III.32).

III.2.4 Membrane dynamics

For the mesoscopic length scales of membrane systems, the hydrodynamic flow is usually in the low-Reynolds-number, creeping flow regime ($Re = \rho_s V_s L / \eta \simeq 10^{-3}$ for a typical lateral size L of order micrometers and a solvent velocity V_s of few millimeters per second). In this case, the embedding incompressible fluid dynamics is governed by the 3D Stokes equation [Happel and Brenner, 1991] :

$$\begin{aligned} \eta\Delta\mathbf{v}_s(\mathbf{r}, t) &= \nabla P(\mathbf{r}, t) + \int d^2\tilde{u} \delta(\mathbf{r} - \mathbf{R}) \left. \frac{\delta\mathcal{F}}{\delta\mathbf{R}} \right|_{\sqrt{g}\phi} + \boldsymbol{\zeta}_h(\mathbf{r}, t) \\ \nabla \cdot \mathbf{v}_s(\mathbf{r}, t) &= 0 \end{aligned} \quad (\text{III.36})$$

In which \mathbf{v}_s , P and η are the embedding fluid velocity, pressure and viscosity. The force density acting on the solvent $\delta\mathcal{F}/\sqrt{g}\delta\mathbf{R}$ is obtained at constant areal density projected onto the tangent-plane $\sqrt{g}\phi$:

$$\left. \frac{1}{\sqrt{g}} \frac{\delta\mathcal{F}}{\delta\mathbf{R}} \right|_{\sqrt{g}\phi} = [\kappa(2\mathcal{D}^2H + 4H^3 - 4HK) + 2p(\phi)H]\mathbf{n} + \partial_a p \mathbf{R}^a, \quad (\text{III.37})$$

with $p(\phi)$ the two-dimensional membrane pressure : $p(\phi) \simeq \chi\phi_0(\phi - \phi_0)$. The last term in eq. (III.36), ζ_h , represents the fluctuating force exerted on the solvent due to equilibrium thermal fluctuations and has the correlation :

$$\begin{aligned} \langle \zeta_h(\mathbf{r}, t) \rangle &= \mathbf{0} \\ \langle \zeta_{hi}(\mathbf{r}, t) \zeta_{hj}^*(\mathbf{r}', t') \rangle &= 2kT\eta \frac{(-\delta_{ij}\nabla^2 + \partial_i\partial_j) \times}{\delta(\mathbf{r} - \mathbf{r}')\delta(t - t')} \end{aligned} \quad (\text{III.38})$$

A special solution of the noiseless Stokes equation for the velocity field generated is given by :

$$\mathbf{v}_s(\mathbf{r}, t) = \int d^2\tilde{u} \sqrt{g} \mathcal{O}(\mathbf{r}, \mathbf{R}) \left. \frac{1}{\sqrt{g}} \frac{\delta\mathcal{F}}{\delta\mathbf{R}} \right|_{\sqrt{g}\phi}, \quad (\text{III.39})$$

where the Oseen tensor $\mathcal{O}(\mathbf{r}, \mathbf{r}')$ has Cartesian matrix elements [Doi and Edwards, 1986] :

$$\mathcal{O}_{ij}(\mathbf{r}, \mathbf{r}') \equiv \frac{1}{8\pi\eta|\mathbf{r} - \mathbf{r}'|} \left[\delta_{ij} + \frac{(r_i - r'_i)(r_j - r'_j)}{|\mathbf{r} - \mathbf{r}'|^2} \right]. \quad (\text{III.40})$$

Thus, as already well known, hydrodynamics mediates a long-range interaction ($\sim 1/|\mathbf{r} - \mathbf{r}'|$) through the velocity field.

Following standard procedures in irreversible thermodynamics [de Groot and Mazur, 1984], we can postulate linear constitutive relations between the fluxes (the relative flow of the solvent through the membrane and the particle currents J_n^\pm between each half space and the membrane) and the associated forces (hydrostatic minus osmotic pressure discontinuity across the membrane, chemical potential difference between positive (resp. negative) half space and membrane. According to Onsager's reciprocal relations [Onsager, 1931a, Onsager, 1931b], the constitutive flux-force relations in the linear regime can be expressed in the form :

$$\begin{pmatrix} (\mathbf{v}(\tilde{u}, t) - \mathbf{v}_s(\mathbf{R}, t)) \cdot \mathbf{n} \\ J_n^+ \\ J_n^- \end{pmatrix} = \mathbf{L} \begin{pmatrix} \Delta P(\tilde{u}, t) - \Delta\Pi \\ \Delta\mu(\tilde{u}, t) - \Delta\mu^+(z=0, t) \\ \Delta\mu^-(z=0, t) - \Delta\mu(\tilde{u}, t) \end{pmatrix} + \mathcal{N}(\tilde{u}, t) \quad (\text{III.41})$$

where we define the Onsager matrix by :

$$\mathbf{L} = \begin{pmatrix} \lambda_p & -\Lambda\Psi_r & -\Lambda\Psi_r \\ -\Lambda\Psi_r & \lambda\Psi_r^2 & 0 \\ -\Lambda\Psi_r & 0 & \lambda\Psi_r^2 \end{pmatrix} \quad (\text{III.42})$$

The membrane velocity $\mathbf{v}(\check{u}, t)$ will be defined below. $\Delta P(\check{u}, t)$ is the hydrostatic pressure difference across the membrane, $\Delta \Pi$ the osmotic pressure difference, $\Delta \mu(\check{u}, t)$ the chemical potential of lipids in the membrane defined by :

$$\Delta \mu(\check{u}, t) = \frac{1}{\sqrt{g}} \left. \frac{\delta \mathcal{F}}{\delta \phi} \right|_{\mathbf{R}} = \chi(\phi - \phi_0), \quad (\text{III.43})$$

or more generally $\Delta \mu = \chi_e(\phi - \phi_e) + \Delta \tilde{\mu}$ and $\Delta \mu^\pm(z, t)$ denotes the chemical potentials in the $+/-$ half spaces which, in the dilute solution case, can be written as $\Delta \mu^\pm(z, t) = \mu^\pm(z, t) - \mu_r = kT \ln(\Psi^\pm(z, t)/\Psi_r)$. The kinetic coefficients λ_p (the membrane permeability), λ and Λ are entirely determined by the internal structure of the membrane, independently of the constraints applied on the system, and don't depend on Ψ_r for small Ψ_r . They are dependent, however, on the state variables such as temperature, pressure and the density ϕ_0 or ϕ_e . Stability conditions imply that all diagonal elements (λ_p and λ) are positive whereas the off-diagonal elements must satisfy, the condition : $\lambda_p \lambda - 2\Lambda^2 > 0$. In principle all fluxes should depend linearly on all forces, and the Onsager matrix \mathbf{L} should not have any vanishing element. However, the particle current between the membrane and the lower half plane driven by the chemical potential difference between the upper half plane and the membrane is very small, and reciprocally. Thus, for the sake of simplicity we set the corresponding coefficients to zero.

In order to describe long wavelength fluctuations, we further introduce thermal noise sources $\mathcal{N} = (\zeta_n; \varsigma^+; \varsigma^-)$ in the dynamical equations. The first contribution of noise, ζ_n , is the brownian noise corresponding to the dissipation of energy in the permeation process. The contributions, ς^\pm , represent the thermal noise due to particle flow perpendicular to the membrane. The fluctuation-dissipation theorem requires :

$$\begin{aligned} \langle \mathcal{N}_\alpha(\check{u}, t) \rangle &= 0 \\ \langle \mathcal{N}_\alpha(\check{u}, t) \mathcal{N}_\beta(\check{u}', t') \rangle &= 2kT L_{\alpha\beta} \frac{\delta(\check{u} - \check{u}')}{\sqrt{g}} \delta(t - t'). \end{aligned} \quad (\text{III.44})$$

We now write down the equation of conservation of the membrane molecule density. They exhibit a conserved part which corresponds to molecule motion within the membrane, and a source term which is nothing else than the flux difference $J_n^- - J_n^+$:

$$\mathcal{D}_t \phi + \mathcal{D}_a j^a(\phi) = J_n^- - J_n^+ \quad (\text{III.45})$$

where $\mathcal{D}_t = g^{-1/2} \partial_t g^{1/2}$ and $\mathcal{D}_a = g^{-1/2} \partial_a g^{1/2}$ is the covariant derivative. A detailed discussion of the current $j_a(\phi) = g_{ab} j^b(\phi)$ can be found in ref. [Cai and Lubensky, 1994] :

$$j_a(\phi) = \sum_i \frac{du_a^{(i)}}{dt} \frac{\delta(\check{u} - \check{u}_i)}{\sqrt{g}} \quad (\text{III.46})$$

where the summation i is over all molecules defining the membrane and $du_a^{(i)}/dt$ is the covariant component of the molecule velocity, tangential to the membrane. Thus, the membrane velocity is defined by :

$$\mathbf{v} = \frac{j_a(\phi)\mathbf{R}^a}{\phi} + \partial_t \mathbf{R} \quad (\text{III.47})$$

The source and sink terms, which are not included in ref. [Cai and Lubensky, 1994], generate a new physics which needs to be investigated. If we denote the friction coefficient γ of the membrane with the solvent, the in-plane membrane dynamics obeys the following equation :

$$-\partial_a p - \gamma[\mathbf{v}(\tilde{u}, t) - \mathbf{v}_s(\mathbf{R}(\tilde{u}), t)] \cdot \mathbf{R}_a + \zeta_a(\tilde{u}, t) = 0, \quad (\text{III.48})$$

where we have ignored other sources of dissipation, for example, due to intra-membrane viscosity, since that is subdominant compared to the friction with the surrounding fluid [Seifert, 1997]. The function $\zeta_a(\tilde{u}, t)$ is a Gaussian white noise source with correlations :

$$\begin{aligned} \langle \zeta_a(\tilde{u}, t) \rangle &= 0 \\ \langle \zeta_a(\tilde{u}, t) \zeta_b^*(\tilde{u}', t') \rangle &= 2kT\gamma g_{ab} \frac{\delta(\tilde{u}-\tilde{u}')}{\sqrt{g}} \delta(t-t') \end{aligned} \quad (\text{III.49})$$

The dynamics of the lipid density Ψ in the 3D solvent is described by a convection-diffusion equation in the membrane frame of reference :

$$\partial_t \Psi + \mathbf{v}_s(\mathbf{r}, t) \cdot \nabla \Psi = D \Delta \Psi + \nabla \cdot \zeta_\Psi \quad (\text{III.50})$$

where D is a diffusion coefficient and ζ_Ψ is random source of diffusion related to dissipation in bulk through the generalized fluctuation dissipation theorem :

$$\begin{aligned} \langle \zeta_\Psi(\mathbf{r}, t) \rangle &= \mathbf{0} \\ \langle \zeta_{\Psi_i}(\mathbf{r}, t) \zeta_{\Psi_j}^*(\mathbf{r}', t') \rangle &= 2\Psi_r D \delta_{ij} \delta(\mathbf{r} - \mathbf{r}') \delta(t - t') \end{aligned} \quad (\text{III.51})$$

Eventually, the lipid currents at the membrane verify the continuity conditions $J_n^\pm = (\Psi^\pm \mathbf{v}_s - D \nabla \Psi^\pm) \cdot \mathbf{n} \Big|_{\mathbf{r}=\mathbf{R}}$, which express the coupling between the bulk and the membrane. Equations (III.34) to (III.51) constitute a complete set, which can in principle allow us to describe any dynamical behavior of a membrane submitted to specific initial and boundary conditions.

As an example, we consider the stationary behavior of a membrane, driven out of equilibrium by an osmotic pressure difference $\Delta\Pi^0$. The pressure and chemical potential are kept identical on both sides of the membrane ($\Delta P = 0$; $\Delta\mu^\pm(z \rightarrow \pm\infty, T, P, \Psi_r) = 0$). If $\Delta\Pi^0 = 0$, the system evolves toward equilibrium with $\sigma = 0$ and $\phi = \phi_0$. If $\Delta\Pi^0 \neq 0$ and the chemical potential in the membrane is determined by the chemical potential of the phospholipids in the Plateau borders and consequently $\Delta\tilde{\mu} \neq 0$, the membrane density evolves quickly towards ϕ_e and

$\sigma \neq 0$ is determined by eq. (III.32). When $\Delta\Pi^0 \neq 0$, both a hydrodynamic flow and a lipid flow are generated through the membrane, in the membrane reference frame. In the fluid reference frame, there is no lipid flux. We obtain a fluid flow through the membrane given by :

$$v_{sz}(z=0) = \lambda_p^{eff} \Delta\Pi \quad \text{with} \quad \lambda_p^{eff} = \frac{\lambda_p \lambda - 2\Lambda^2}{2\lambda_p + \lambda - 4\Lambda} \quad (\text{III.52})$$

Relation (III.52) expresses the fact that the lipid flux modifies the fluid flow through the membrane. Note that in the fluid reference frame, the membrane moves with a velocity $v_m = -v_{sz}(z=0)$. The lipid concentration $\Psi(z)$ is constant on the downstream side and exhibits an exponential variation over a length scale $\xi = |D/v_m|$ on the upstream side. For instance for $v_m > 0$, the stationary state is given by : $\Psi^+(z) = \Psi_r - (2\beta\Delta\Pi/kT) \exp(-v_m z/D)$ and $\Psi^-(z) = \Psi_r$, with $\beta = (\lambda_p - \Lambda)/(\lambda - 2\Lambda)$. Therefore, the difference in lipid concentration on each side of the membrane contributes to the osmotic pressure $\Delta\Pi = \Delta\Pi^0/(1 + 2\beta)$. The effective permeation coefficient λ_p^{eff} is always positive since $\lambda_p \lambda - 2\Lambda^2 > 0$ and $2\lambda_p + \lambda - 4\Lambda > 0$, both inequalities being required by the stability condition of the Onsager matrix. The difference between λ_p and λ_p^{eff} in lipid systems has not been measured, to our knowledge. The experimentally measured quantity is λ_p^{eff} . According to eq. (III.52), it is always smaller than λ_p . If the rate of lipid uptake is large ($\lambda \gg \lambda_p, \Lambda$), the lipid exchange does not perturb the fluid flow through the membrane and $\lambda_p^{eff} \simeq \lambda_p$. If the rate of lipid uptake is very slow ($\lambda_p \gg \lambda, \Lambda$), the osmotic pressure difference across the membrane $\Delta\Pi$ is strongly reduced compared to $\Delta\Pi^0$, and $\lambda_p^{eff} \simeq \lambda/2 \ll \lambda_p$. The experimental value of λ_p^{eff} ($10^{-13} - 10^{-12}$ m³/N.s in [Jansen and Blume, 1995]) is extremely small. This could be due to such an effect but there is currently no proof that this is the case. For $\Delta\tilde{\mu} = 0$, this solution corresponds to a true steady state. For conditions where chemical potentials are buffered by Plateau borders, $\Delta\tilde{\mu} \neq 0$, it correctly describes the short time behaviour ($t < \tau = \eta L/\sigma$).

We can remark that there is no bulk lipid flux although there is exchange of lipids between the membrane and the 3D embedding fluid. The stationary condition imposes that the 2D density attains a uniform value given by :

$$\phi_{stat} = \phi_0 + \frac{\beta|\Delta\Pi|}{\chi\Psi_r} \quad (\text{III.53})$$

The fact that the change in membrane density is non analytic in $\Delta\Pi$ may look surprising at first sight. It results from the fact that irrespective of the sign of $\Delta\Pi^0$, there is an increase of the three-dimensional concentration Ψ on one side of the membrane.

For nearly flat surfaces, we can describe the membrane fluctuations in the Monge representation by the height $h(\mathbf{x})$ of the surface above a Euclidean base plane⁽¹¹⁾. It is convenient to perform a Fourier transformation parallel to the

⁽¹¹⁾In this case, $\tilde{u} \equiv \mathbf{x} = (x, y)$ and $\mathbf{R}(\mathbf{x}) = (\mathbf{x}, h(\mathbf{x}))$.

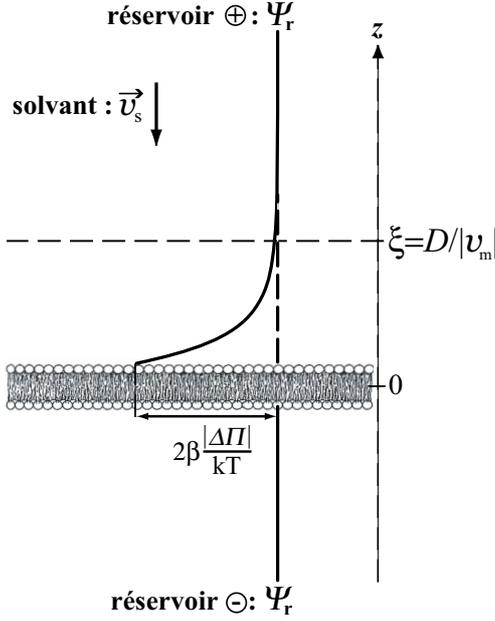


FIG. III.6 - Schematic 3D density profile of the flat membrane with a hydrodynamic flow $v_{sz} = -v_m$. The particles density of section ($z > 0$) changes on a characteristic length $\xi = |D/v_m|$.

membrane plane defined by : $f_q(t) = \int d^2\mathbf{x} e^{i\mathbf{q}\cdot\mathbf{x}} f(\mathbf{x}, t)$ with $q = \sqrt{q_x^2 + q_y^2}$. After assuming a e^{st} time dependence of the height and density variables, we obtain, in momentum space, the following noiseless linear dynamics :

$$s \begin{pmatrix} h_q \\ \delta\phi_q \end{pmatrix} = \mathcal{M}(s, q) \begin{pmatrix} h_q \\ \delta\phi_q \end{pmatrix} \quad (\text{III.54})$$

in which $\delta\phi = \phi - \phi_{stat}$. The dynamical matrix $\mathcal{M}(s, q)$ is defined by its components :

$$\begin{cases} m_{11} \simeq (2\bar{\Lambda}A^+(s, q) - 1) \frac{\sigma^e q + \kappa q^3}{4\eta} \\ m_{12} = 2\chi\Lambda\Psi_r A^-(s, q) \\ m_{21} = 2\Psi_r A^-(s, q) \left(\Lambda + \frac{1}{4\eta q} \right) (\sigma^e q^2 + \kappa q^4) - \phi_0 v_m q^2 \\ m_{22} = -2\chi\lambda\Psi_r^2 (1 - A^+(s, q)) - \chi\phi_0 \frac{q}{4\eta} \end{cases} \quad (\text{III.55})$$

where we have taken advantage of the fact that $1/4\eta q \gg \lambda_p^{eff}, \Lambda, 1/\gamma$ in the range of validity of the theory. We have defined :

$$\begin{cases} A^\pm(s, q) = \frac{1}{2} \left(\frac{1}{1+B^+(s, q)} \pm \frac{1}{1-B^-(s, q)} \right) \\ B^\pm(s, q) = v_m (-1 \pm \sqrt{1 + 4\xi^2 (s/D + q^2)}) / 2v_1 \\ v_1 = kT\lambda\Psi_r \\ \sigma^e = \sigma - \phi_0\beta|\Delta\Pi|/\Psi_r \\ \bar{\Lambda} = \Lambda/\lambda \end{cases} \quad (\text{III.56})$$

For the slowest mode at vanishingly small q , we find :

$$s_1 \simeq -\sigma^e q / 4\eta^e \quad \text{with} \quad \eta^e = \eta / (1 - 2\bar{\Lambda}) \quad (\text{III.57})$$

It describes membrane undulations in the tension controlled regime. Similar results are obtained in Langmuir films [Andelman et al., 1987, Milner et al., 1989, Hu and Granek, 1996] and conserved membrane dynamics [Cai and Lubensky, 1994]. The effective viscosity is always larger than the fluid viscosity. It arises since the couplings described by eq. (III.42) introduce extra dissipation. This mode becomes unstable when σ^e changes sign that is in the Plateau border case at a critical osmotic pressure difference : $|\Delta\Pi_c^0| = (1 + 2\beta)\sigma\Psi_r/\beta\phi_0$. The corresponding instability in Langmuir films due to a direct compression of the film, is called “buckling” instability in analogy with the buckling of beams. In the absence of Plateau borders, the mode is always unstable since then $\Delta\Pi_c^0$ vanishes. Keeping higher order terms in q , up to third order leads to :

$$s_1 \simeq -(\sigma^e q + \kappa q^3)/4\eta^e + O((\Delta\Pi^0)^2) \quad (\text{III.58})$$

Terms quadratic in q do exist. Their prefactor is linear in $\Delta\Pi^0$; anticipating $q \sim (\Delta\Pi^0)^{1/2}$ (see below), we find that this term contribute to s_1 as $(\Delta\Pi^0)^2$, small compared to the other terms which scale as $(\Delta\Pi^0)^{3/2}$.

In the unstable case, the fastest growing mode will appear with wavevector $q_g = \sqrt{-\sigma^e/3\kappa}$, on a time scale $\tau = s_1^{-1}(q_g) = \eta^e \kappa^{1/2}/(-\sigma^e/3)^{3/2}$. At threshold $\sigma^e = 0$, and the mode is controlled like in the buckling instability by lateral boundary conditions. However, it is very likely that $(-\sigma^e)$ keeps on growing to significantly non vanishing values. We leave a more detailed analysis for further developments. All modes can be directly calculated from the equation $\det(\mathcal{M}(s, q) - s\mathbb{1}_2) = 0$. After subtracting s_1 , power counting allows to infer that there are four additional modes $s_i(q)$, $i \in [2, 5]$ which have all a non vanishing value at $q = 0$. It is possible to obtain analytical solutions in the latter case, but they are not very illuminating. They can be either complex or real depending on parameters, but in all cases their real part is negative. For non zero q and real $s_i(q)$, it is possible to show analytically that $s_i(q)$ is always negative. In the complex case numerical analysis suggests that the real part of $s(q)$ is always negative. We thus conclude that these four modes are always stable. They correspond to exchanges of lipid between the membrane and the embedding fluid on both sides, and permeation flow. The assumption of exponential time dependance requires particular z distributions of the Ψ fluctuations on both sides of the membrane. The time dependance could be more complex for general types of Ψ fluctuations but there is not more physics to be learned from the general case.

Taking into account the influence of thermal noise in the dynamic equations, we can calculate the equal time height fluctuations about this homogenous steady states. To that end, we first Fourier transform the variables in space and time, and integrate the correlator with respect to frequency ω to obtain,

$$\langle h_q(t)h_q^*(t) \rangle \simeq \frac{kT \left(1 + \frac{\Lambda^2 v_1}{\lambda_p \lambda (v_1 + v_m)} \right)}{\frac{\lambda - \Lambda}{\lambda - 2\Lambda} \left(1 - \frac{\Lambda^2}{\lambda \lambda_p} \right) \sigma^e q^2} \quad (\text{III.59})$$

The fluctuation spectrum does not reduce to the usual $1/q^4$ spectrum of a passive membrane but the exchanges of particles with the surrounding fluid induces a tension σ_{ind} proportional to kinetic parameters and the osmotic pressure difference :

$$\sigma_{\text{ind}} = \frac{(\lambda - \Lambda)(1 - \Lambda^2/\lambda\lambda_p)}{(\lambda - 2\Lambda)(1 + \Lambda^2v_1/\lambda_p\lambda(v_1 + v_m))} \sigma^e \quad (\text{III.60})$$

The fact that the induced tension is dependent on kinetic parameter shows that the fluctuation-dissipation theorem is not verified and that nonequilibrium fluctuations are produced by exchange phenomena. We can also notice that if both the osmotic pressure difference and the linkage parameter vanish ($\Delta\Pi^0 = 0$ and $\Lambda = 0$), then the variance of height fluctuations approaches that of a tense membrane, i.e. $\langle |h_q(t)|^2 \rangle \simeq kT/\sigma q^2$ at small q .

Following the same steps, we find the following correlation function for the density difference field :

$$\langle \delta\phi_q(t)\delta\phi_q^*(t) \rangle \simeq \frac{kT}{\chi} \left(1 + \frac{3v_1}{2(v_m + v_1)} \right) \quad (\text{III.61})$$

III.2.5 Discussion

The equations we have introduced in this work involve only two new parameters as compared to earlier one component membrane descriptions, namely the rate at which phospholipids may be incorporated in the membrane, and the associated fluid flow. It would be highly interesting to measure these parameters. A conceptually simple experiment would be to work with a membrane without Plateau borders, and maintained at constant tension. Such an experiment is currently being set. The area increase as a function of time, under conditions in which the chemical potential difference between the membrane and the bulk are controlled, would provide a direct measure of λ . The measurement of the off-diagonal coefficient would be more tricky. The best is certainly to extract the effective viscosity η^e from the study of the membrane undulation mode according to equations (III.57)-(III.58) and compare it to the fluid viscosity η . The values of the permeation coefficients we have to date are effective permeation coefficients as defined by eq. (III.52) : this is enough to obtain a complete set of measurements for λ , Λ and λ_p . We would then be in a position to deal in a fully quantitative way with situations in which membranes are exchanging material with the bulk. As an example we have looked at the mode structure of a membrane submitted to an osmotic pressure difference only. In practice, this could be done by maintaining salt concentration differences between the two sides of the membrane : ions are highly insoluble in phospholipid membranes and should not interfere with the membrane state, thus defining $\Delta\Pi^0$ only. We have assumed that the hydrostatic pressure difference was kept small over the time scales of the experiment. This is clearly possible when the fluid reservoirs have a free surface. We show in appendix

III.2.6 that this timescale is of the order of $t \simeq (S/S_m)/\rho g \lambda_p^{eff}$ where S and S_m are respectively the area of the bulk fluid free surface and of the membrane, ρ the fluid density and g the gravitational acceleration. Since $1/\rho g \lambda_p^{eff} \simeq 10^8$ s under most practical circumstances the pressure difference is indeed negligible.

It is useful to check if the critical osmotic pressure difference can be reached experimentally when the membrane chemical potential is set by the Plateau borders. The lamellar structure of the Plateau border with interlayer distance d , provides an estimate of the tension σ_{imp} imposed on the membrane : $\sigma_{imp} \simeq kT/d^2$. Introducing the average distance ℓ_b between phospholipids in the bulk such that $\Psi_r = 1/\ell_b^3$, and the average lateral distance between phospholipids in the membrane ℓ_m such that $\phi_0 = 1/\ell_m^2$, we get

$$|\Delta\Pi_c^0| \simeq \left(\frac{kT}{\ell_b^3}\right) \left(\frac{\ell_m}{d}\right)^2 \ll \left(\frac{kT}{\ell_b^3}\right) = \Pi \quad (\text{III.62})$$

since $\ell_m \ll d$. Π is the osmotic pressure due to phospholipids in the fluid. It is thus clear that the critical value for triggering the instability is easily accessible to experiment.

One may wonder why we do not find in our analysis an other instability reminiscent of the one described by Rao *et al.* [Rao and Sarasij, 2001]. This instability arises from a coupling between membrane local velocity and curvature. If we express the first line of equation (III.41), we find :

$$\mathbf{v}(\check{u}, t) - \mathbf{v}_s(\mathbf{R}, t) = -\lambda_p \Delta\Pi + \Lambda \Psi_r (\Delta\mu^+ - \Delta\mu^-) \quad (\text{III.63})$$

any reference to the curvature state, which is contained in the membrane chemical potential $\Delta\mu(\check{u}, t)$ disappears from the equations because of the symmetry of membrane at rest. However, in steady state the two sides of the membrane are not equivalent since they experience different phospholipid concentrations. The off diagonal components should really read $\Lambda(\Psi_r + \beta\Delta\Pi/kT)$ on the plus side, and $\Lambda\Psi_r$ on the minus side (keeping the same conventions as before). Then, relation (III.63) reads :

$$\begin{aligned} \mathbf{v}(\check{u}, t) - \mathbf{v}_s(\mathbf{R}, t) = & -\lambda_p \Delta\Pi + \Lambda \Psi_r (\Delta\mu^+ - \Delta\mu^-) \\ & - \Lambda \beta \Delta\Pi (\Delta\mu - \Delta\mu^+)/kT \end{aligned} \quad (\text{III.64})$$

in which $\Delta\mu$ does depend on curvature. In the logic of equation (III.41), the expansion must be linear in the fields $\Delta\Pi$, $\Delta\mu$, etc..., and the last term of equation (III.64) must be omitted. However, in any extension to higher powers of $\Delta\Pi$, such a term should be retained and provided Λ has the appropriate sign it would be an instability source. One should however point out that many other non linearities would have to be retained in order to set up a fully consistent analysis.

At last, conditions under which the chemical potentials $\Delta\mu^\pm$ are set different far from the membrane could be worked out as well. They cannot lead to steady state situations, and we postpone their study for future work.

III.2.6 Appendix : Supported bilayers

Consider an experimental case in which a membrane separates two bulk reservoirs in contact with air via a free surface, each of area S (see Fig. III.7). At the free surface the hydrostatic pressure is continuous and any hydrostatic pressure discontinuity at the membrane translates in a height difference δh of the free surfaces. The hydrostatic pressure difference will cancel the osmotic pressure difference when $\rho g \delta h = \Delta \Pi^0$. this requires a volume flow $\delta h S$ through the membrane. Knowing that the rate of volume flow is given by $v_{sz} S_m$, where S_m is the membrane area, we get immediately : $t \simeq (S/S_m)/\rho g \lambda_p^{eff}$.

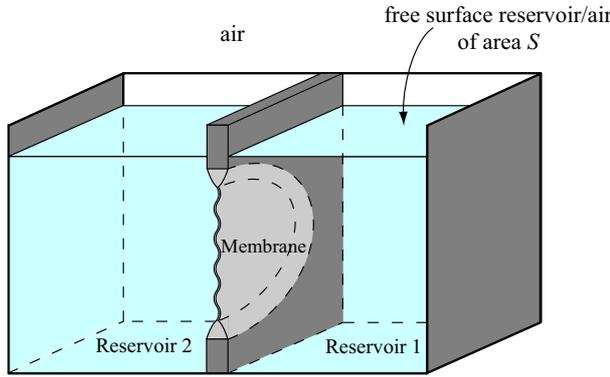


FIG. III.7 - Schematic illustration of a supported membrane which covers a small hole and separates two bulk reservoirs in contact with air.

III.2.7 Complements⁽¹²⁾

All modes can be directly calculated from the equation $\det(\mathcal{M}(s, q) - s\mathbf{1}_2) = 0$. After subtracting s_1 , power counting allows to infer that there are four additional modes $s_i(q)$, $i \in [2, 5]$ which have all a non vanishing value at $q = 0$. After a lengthy calculation and limiting us at sub-optic length, these modes can be written with the dimensionless parameters $S = \xi^2 s/D$ and $Q = \xi q$:

$$S^2 + [\vartheta_1 Q(1 - 2\bar{\Lambda}A^+(S, Q)) + \vartheta_2(1 - A^+(S, Q))] S + \vartheta_1 \vartheta_2 Q [(1 - A^+(S, Q))(1 - 2\bar{\Lambda}A^+(S, Q)) - 2\bar{\Lambda}A^-(S, Q)^2] = 0 \quad (\text{III.65})$$

where $\vartheta_1 = \sigma \xi / 4\eta D$ and $\vartheta_2 = 2\chi \lambda \Psi_r^2 \xi^2 / D$. To study the stability of the modes, we can first begin by solving the dispersion relation at $q = 0$. We find five solutions : one undulation mode $S = 0$, two modes of lipid exchange with the bulk (the membrane separates two half spaces) and two 2D density modes which can be written as follow :

$$\begin{cases} S(Q=0)_{1,2} = \frac{1 \pm \sqrt{1 + 2B_0 \sqrt{\vartheta_2^2 B_0^2 + 1} + B_0^2 - 2\vartheta_2 B_0^2 - \vartheta_2 B_0^2 + B_0 \sqrt{\vartheta_2^2 B_0^2 + 1}}}{2B_0^2} \\ S(Q=0)_{3,4} = \frac{1 \pm \sqrt{1 - 2B_0 \sqrt{\vartheta_2^2 B_0^2 + 1} + B_0^2 - 2\vartheta_2 B_0^2 - \vartheta_2 B_0^2 + B_0 \sqrt{\vartheta_2^2 B_0^2 + 1}}}{2B_0^2} \end{cases} \quad (\text{III.66})$$

⁽¹²⁾Ce paragraphe n'est pas inclus dans l'article mais il s'agit simplement de calculs complémentaires qui ne m'ont pas semblé nécessaire pour la compréhension de l'article.

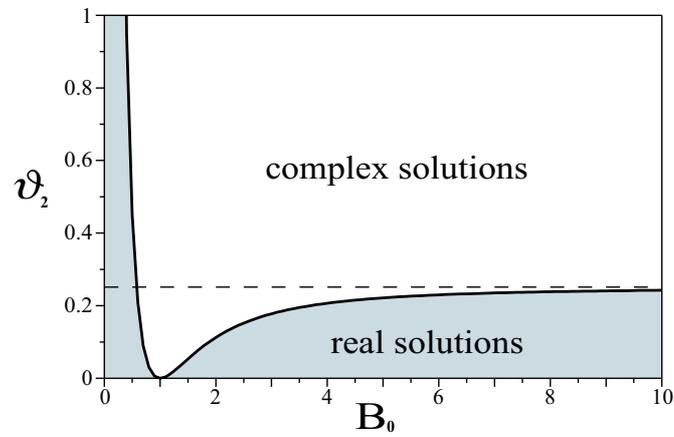


FIG. III.8 - Diagram of oscillatory ($S(Q = 0)$ is not in \mathbb{R}) and real ($S(Q = 0) \in \mathbb{R}$) solutions in space of parameters (B_0, ϑ_2) .

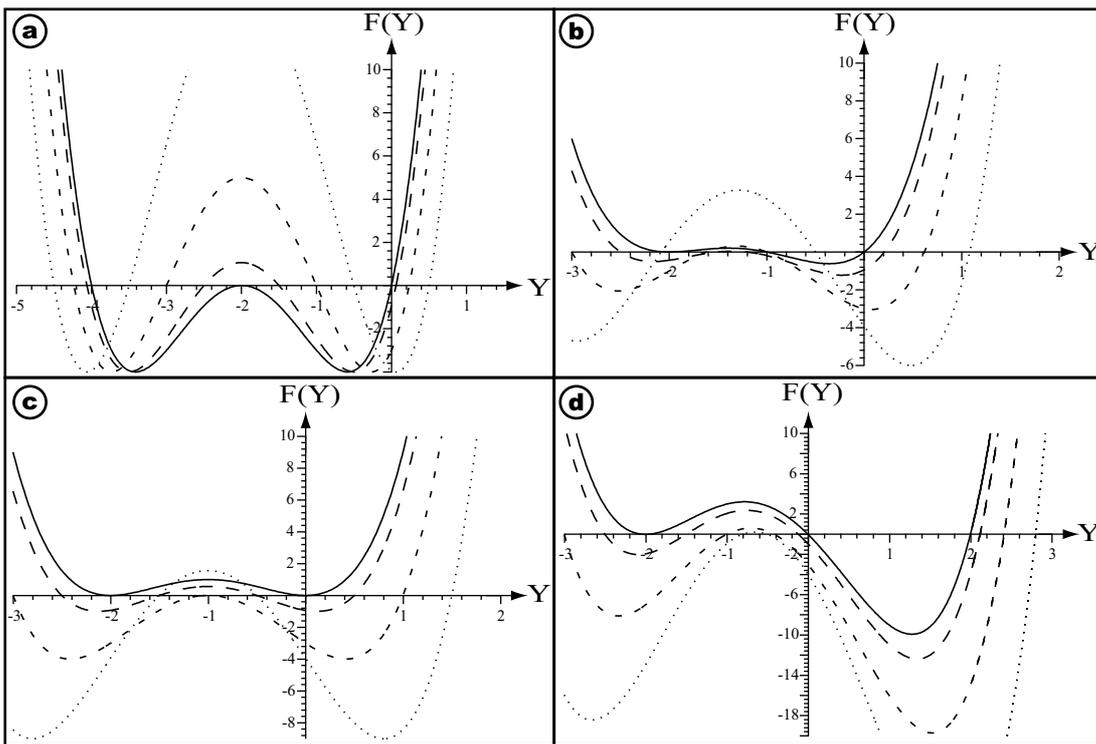


FIG. III.9 - Plots of $F(Y)$ with $B_0 = 0$ (solid line), $B_0 = 0.5$ (long dashed line), $B_0 = 1$ (short dashed line) and $B_0 = 1.5$ (dotted line) for (a) $\bar{\Lambda} = -0.5$, (b) $\bar{\Lambda} = 0.25$, (c) $\bar{\Lambda} = 0.5$ and (d) $\bar{\Lambda} = 1$.

with $B_0 = v_m/v_1$.

Numerical analysis suggests that when ϑ_2 becomes better than $[(1 + B_0^2)^2 - 4B_0^2]/[4B_0^2(1 + B_0^2)]$ (see Fig. III.8), the modes $S(Q = 0)_{3,4}$ correspond to complex (or oscillatory) solutions but their real part is always negative. In the case of real solutions, to obtain a simple and analytical form is nontrivial, so we prefer to determine the first Q that we call Q^c such as $S(Q^c) = 0$. The dispersion relation at $S = 0$, corresponding at $m_{11}m_{22} - m_{12}m_{21} = 0$, leads to solve the following equation with $Y = B_0\sqrt{1 + 4Q^2}$ at :

$$F(Y) = Y^4 + (6 - 4\bar{\Lambda})Y^3 + (12 - 16\bar{\Lambda} - 2B_0^2)Y^2 + [8 - 16\bar{\Lambda} - B_0^2(6 - 4\bar{\Lambda})]Y + B_0^2(B_0^2 - 4) = 0 \quad (\text{III.67})$$

Of course, we have eliminated the solution $Q^c = 0$ which corresponds to the undulation mode. The solutions of this fourth order equation can be obtained analytically : $Y_1 = B_0 - 2$, $Y_2 = -B_0 - 2$, $Y_{3,4} = -1 + 2\bar{\Lambda} \pm \sqrt{(1 - 2\bar{\Lambda})^2 + B_0^2}$ and depend on two parameters $\bar{\Lambda}$ and B_0 . The solutions of Eq.III.67 at real Q^c must check the condition : $Y_{1,2,3 \text{ or } 4} \geq B_0$, which can be also written : $(1 - 2\bar{\Lambda})B_0 \leq 0$. Only the cases $\bar{\Lambda} \geq 0.5$ (Fig. III.9c and III.9d) reach this condition, but as shown in Fig. III.8, we must eliminate the last case because it is not a physically solution. As for the case $\bar{\Lambda} = 0.5$, it corresponds to $\Delta\Pi^0 = 0$ and then the system remains at the equilibrium with $\sigma^e = \sigma$ and $\phi = \phi_0$. Finally, there is no solution what implies that the last fourth modes are always negative and so always damped.

We thus conclude that these four modes are always stable. They correspond to exchanges of lipid between the membrane and the embedding fluid on both sides, and permeation flow. The assumption of exponential time dependance requires particular z distributions of the Ψ fluctuations on both sides of the membrane. The time dependance could be more complex for general types of Ψ fluctuations but there is not more physics to be learned from the general case.

III.2.8 Application du modèle : fusion de vésicules de charges opposées

Par des phénomènes d'endocytose et d'exocytose, des lipides sont perpétuellement apportés ou évacués aussi bien à la membrane plasmique qu'à celle des sous-unités de la cellule. Partant de cette constatation, J. Solon de l'équipe « Membranes et fonctions cellulaires » a mis au point, sous la direction de P. Bassereau, un système modèle qui permet de créer des flux de lipides importants, pour en étudier les conséquences sur la stabilité et la morphologie de la membrane [Solon, 2004]. Ce système consiste à faire fusionner des SUVs chargées positivement (10 %) de quelques centaines de nanomètres avec une vésicule géante chargée négativement (10 %). Quelques secondes après que la GUV soit placée dans un milieu contenant ces SUVs, une amplification des fluctuations est observée (Fig. III.10(b)). Des instabilités tubulaires et des fluctuations de forme de

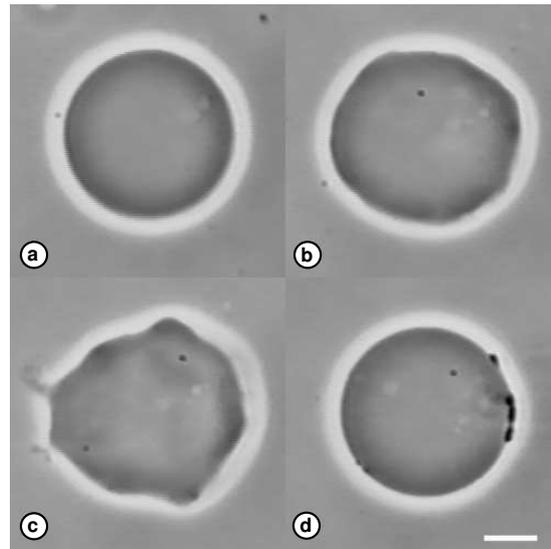


FIG. III.10 - Evolution de la forme d'une vésicule géante chargée négativement (10 %) mise en contact avec des SUVs positives (10 %). L'amplitude des fluctuations augmente (a) puis la vésicule est très déformée et des instabilités tubulaires apparaissent (c). Finalement, la bicouche collapse : elle est à nouveau sphérique et tendue avec des agrégats lipidiques denses appelées "catons" (d). La barre correspond à $10 \mu\text{m}$. Image fournie par J. Solon.

grande amplitude se développent (Fig. III.10(c)) tout autour de la vésicule qui est finalement déstabilisée. Un collapse de la bicouche donnant lieu à la formation d'agrégats lipidiques noirs (Fig. III.10(d)) se produit et la vésicule se retend pour retrouver sa forme sphérique. L'apparition d'instabilités tubulaires dans la membrane serait probablement liée à la diminution de la tension de membrane (voir même à son changement de signe si on suppose que la vésicule est initialement non tendue, ce qui créerait une pression bidimensionnelle dans la membrane). Ceci s'apparenterait à la prédictions de notre modèle. Mais pour le vérifier nous avons besoin de déterminer la tension de la membrane au cours de l'observation. La méthode qui semble bien adaptée pour ce genre de mesure est la technique d'analyse de contours en série de Fourier et en temps réelle mise au point par J. Pécéréaux [Pécéréaux, 2004] à partir d'une caméra numérique Pullnix TM 1040 qui permet l'acquisition de 30 contours par seconde. Avec cette méthode, on détermine le spectre de fluctuation qui dans notre cas correspond à la relation (III.59). Plus exactement, puisque la microscopie en contraste de phase ne permet d'observer qu'une section de la vésicule, seules les fluctuations de la vésicule dans le plan équatorial (que nous supposons être le plan $y = 0$) sont accessibles. Cela consiste à repasser dans l'espace ambiant des y et à se focaliser au plan $y = 0$,

c'est-à-dire :

$$\langle |h(q_x, y = 0, t)|^2 \rangle = \int_{-\infty}^{\infty} \frac{dq_y}{2\pi} \langle |h_q(t)|^2 \rangle \simeq \frac{k_B T}{2\sigma^e} \left(\frac{1}{q_x} - \frac{1}{\sqrt{q_x^2 + \sigma^e/\kappa}} \right) \quad (\text{III.68})$$

Une autre limitation inhérente à la technique de mesure est le temps d'ouverture du shutter de la caméra. En effet, le temps de vie des fluctuations $\tau_m(q)$ est, d'après la relation (III.58), donné par :

$$\tau_m^{-1}(q) \simeq \frac{\sigma^e q + \kappa q^3}{4\eta^e} \quad (\text{III.69})$$

mais si ce temps de vie est plus court que l'intégration en temps de la caméra $\tau_c = 33$ ms, les fluctuations ne sont pas observables. En définitive, les spectres de fluctuations obtenus par la technique de reconnaissance des contours doivent être ajustés par l'expression suivante qui prend en compte le temps d'intégration τ_c lié à la caméra [Pécéréaux et al., 2004] :

$$\langle |h(q_x, y = 0, t)|^2 \rangle = 2 \int_{-\infty}^{\infty} \frac{dq_y}{2\pi} \langle |h_q(t)|^2 \rangle \frac{\tau_m^2(q)}{\tau_c^2} \left(\frac{\tau_c}{\tau_m(q)} + e^{-\tau_c/\tau_m(q)} - 1 \right) \quad (\text{III.70})$$

Mesure du spectre des fluctuations

Le spectre de fluctuations $\langle |h(q_x, y = 0, t)|^2 \rangle$ est obtenu à partir de la mesure des amplitudes des modes de Fourier $c_n(t)$:

$$\langle |h(q_x, y = 0, t)|^2 \rangle = \frac{\pi R}{2} \langle (c_n(t) - \langle c_n(t) \rangle)^2 \rangle \quad (\text{III.71})$$

avec R le rayon de la vésicule. Nous avons représenté l'évolution du spectre des fluctuations d'une vésicule au cours du processus de fusion. On observe une importante augmentation des fluctuations de un à deux ordres de grandeur. Si, en première approximation, nous supposons que la vésicule reste assez proche d'un état d'équilibre, nous pouvons ajuster les spectres obtenus à partir de la technique de reconnaissance de contours par la relation (III.59), et ainsi obtenir l'évolution de la tension σ^e au cours du temps représentée sur la Fig. III.12. Toutefois, nous observons qu'au-delà d'une vingtaine de secondes correspondant à une tension inférieure à 10^{-8} J/m², le produit $\langle |h(q_x, y = 0, t)|^2 \rangle \times q_x$ n'est plus indépendant de q_x ce qui veut dire que le théorème d'équipartition de l'énergie n'est plus vérifié et que le système doit être loin de l'équilibre.

Mesure des fonctions de corrélation

Afin de comprendre les phénomènes physiques qui éloigne la vésicule loin de l'équilibre, il est possible de mesurer les fonctions d'autocorrélation temporelle

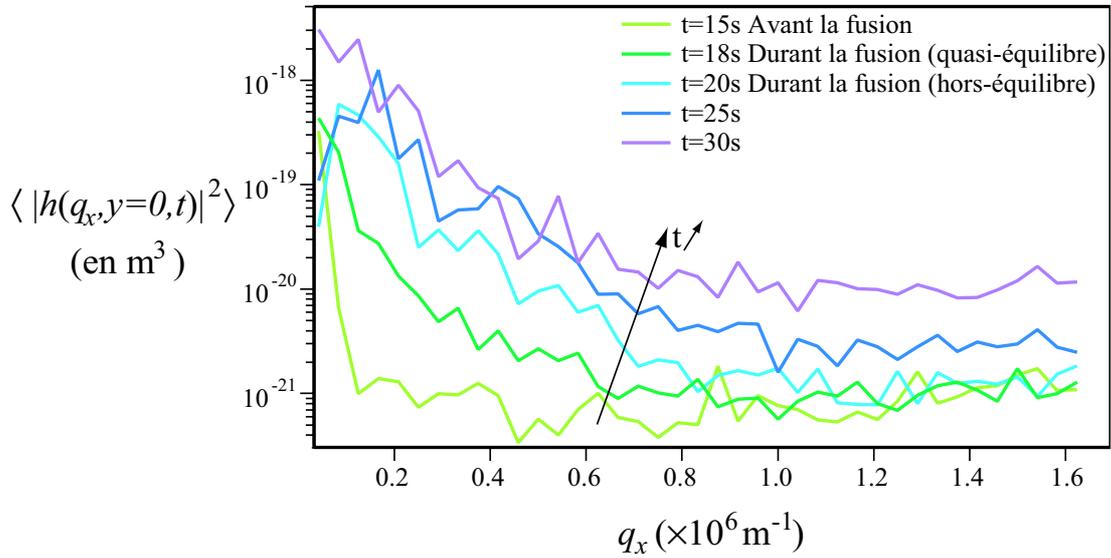


FIG. III.11 - Evolution au cours du temps du spectre de fluctuations $\langle |h(q_x, y = 0, t)|^2 \rangle$ de la GUV. Durant le processus de fusion, les fluctuations sont amplifiées de un à deux ordres de grandeur.

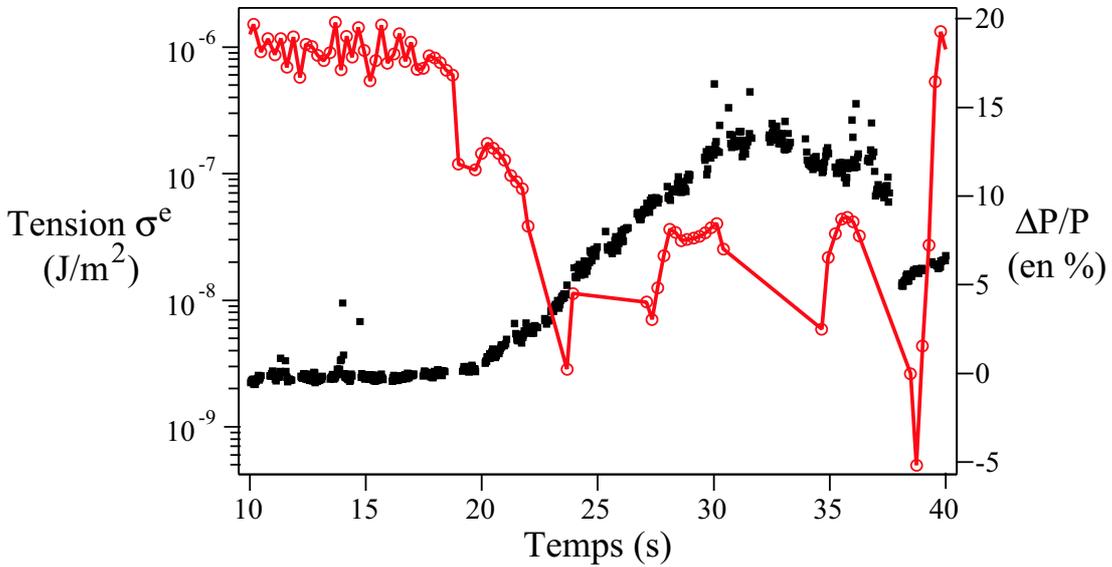


FIG. III.12 - Evolution de la tension effective σ^e (cercles vides reliés entre eux par des droites) et variation relative du périmètre (carrés pleins) de la GUV au cours du temps.

des fluctuations de la membrane pour un mode n donné à chaque instant du processus de fusion par la relation suivante :

$$\mathcal{C}_n(\tau) = \frac{\langle c_n(t)c_n(t+\tau) \rangle - \langle c_n(t) \rangle \langle c_n(t+\tau) \rangle}{\langle c_n(t)^2 \rangle} \quad (\text{III.72})$$

On peut alors directement déterminer un temps de corrélation τ en sachant que la fonction de corrélation $\mathcal{C}_n(\tau)$ décroît de manière exponentielle, c'est-à-dire comme $\exp(-t/\tau)$ où t est le temps d'acquisition. Nous avons représenté sur la Fig. III.13 le temps et l'amplitude des corrélations au cours du processus de fusion du mode $n = 5$. On peut remarquer une importante augmentation des corrélations avec un temps de corrélation de l'ordre de 2 à 2,5 s pour $t = 20$ s qui doit correspondre au début du processus de fusion. Puis, entre 20 et 30 s, les fluctuations sont corrélées avec un temps $\tau \sim 3-3,5$ s. Ensuite, entre 30 et 35 s, les fluctuations redeviennent corrélées à temps court ($\tau < 2$ s). Pour un mode donné, le temps de corrélation est théoriquement relié aux paramètres élastiques par la relation suivante :

$$\tau^{-1} = \frac{n}{4\eta^e R} \left(\sigma^e + \kappa \frac{n^2}{R^2} \right) \quad (\text{III.73})$$

Ainsi, en prenant pour valeur des paramètres : $\kappa = 10k_B T$, $\eta^e \approx \eta = 10^{-3}$ kg/m.s et $R = 15 \mu\text{m}$ (le rayon de la vésicule de la Fig. III.10), la relation théorique précédente nous donne, pour un temps de corrélation de $\tau \sim 2,5$ s du début du processus de fusion, une tension effective σ^e négative de l'ordre de -10^{-10} J/m².

Nous avons montré qu'au début de la fusion, la vésicule restait proche de l'équilibre pour des tensions supérieures à 10^{-8} J/m². En deçà de cette valeur, le système s'éloigne de l'équilibre et le passage d'une tension positive à une tension négative doit déclencher les instabilités tubulaires observées. L'adaptation de notre modèle rend donc bien compte des premières étapes de l'instabilité et particulièrement de l'apparition d'une tension négative. Toutefois, il faut rester prudent avec les interprétations que l'on fait car cette expérience est faite dans des conditions (par exemple, les forces électrostatiques mises en jeu pour induire le collapse entre petites et grosses vésicules) qui ne sont pas pris en compte dans la description théorique que nous avons développé. De plus, de nombreuses questions restent sans réponse à propos, notamment, de l'évolution ultérieure du système vers un état où la vésicule se retend avec l'apparition de "catons"⁽¹³⁾.

⁽¹³⁾Ce terme désignant une sorte d'agrégat lipidique a été introduit par J. Prost au cours d'un entretien que j'ai eu avec J. Solon et P. Bassereau.

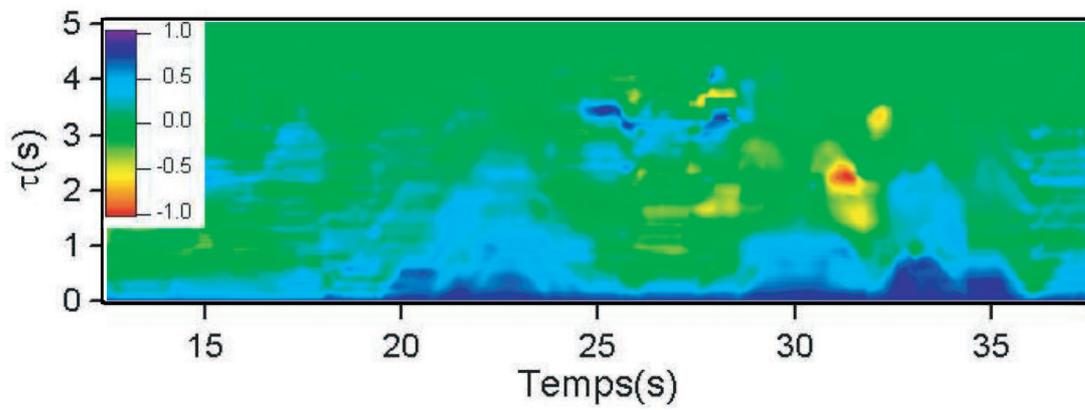


FIG. III.13 - Evolutions du temps de corrélation temporelle du mode $n = 5$ sur une fenêtre temporelle $\tau \in [0, 5 \text{ ms}]$ d'une vésicule au cours du processus de fusion. L'amplitude des corrélations est représentée par la palette de couleurs située à gauche.

Chapitre IV

Modèle de membrane active

Beaucoup de situations biologiques mettent en jeu des processus hors d'équilibre qui exercent des forces sur les membranes. Par exemple, les pompes ioniques décrites dans le chapitre I, sont des protéines qui transportent spécifiquement des ions à travers une membrane dans une direction privilégiée. Ce transport se produit grâce à des changements conformationnels de la protéine qui nécessitent de l'énergie, par exemple, sous forme chimique (hydrolyse de l'ATP), ou sous forme lumineuse. Et, ces mouvements induisent en moyenne des forces normales à la surface. D'autres exemples sont fournis par les canaux ioniques qui, lorsqu'ils sont ouverts, créent spécifiquement un flux d'ions à travers la membrane mais dans le sens du gradient (contrairement au cas des pompes). Il est alors clair que l'ouverture de ces canaux engendre des forces normales sur la membrane. Pour finir, nous pouvons citer le cas de la polymérisation de l'actine à la surface des membranes qui doit lutter contre la friction visqueuse et, par conséquent, induire une force qui, par des considérations hydrodynamiques, doit être de l'ordre du pN.

Pour jouer le rôle de centre actif et ainsi modéliser l'effet de processus hors équilibre sur les membranes, notre choix s'est porté sur une pompe à calcium ATP-dépendante, l'ATPase- Ca^{2+} . L'intérêt d'avoir choisi cette pompe est qu'elle est entièrement caractérisée du point de vue de sa structure, de son cycle enzymatique et de ses changements conformationnels. Ceci va nous permettre de comparer nos résultats *via* le modèle théorique de membranes actives avec ceux déjà connus pour ainsi valider ou non ce modèle. Pour cela, la première étape a été de mettre au point une méthode de reconstitution de cette protéine dans la bicouche de vésicules géantes (GUVs). Cette étude a été effectuée en collaboration avec J.-L. Rigaud (Institut Curie, UMR-CNRS 168 et LRC-CEA 8) et P. Falson (CEA Saclay, DSV-DBJC-SBFM, URA-CNRS 2096). L'intérêt des GUVs est d'être observables avec les techniques classiques de microscopie optique, mais aussi d'être assez résistantes et donc manipulables. Elles constituent donc un outil expérimental puissant pour les expériences de micromanipulation que nous avons

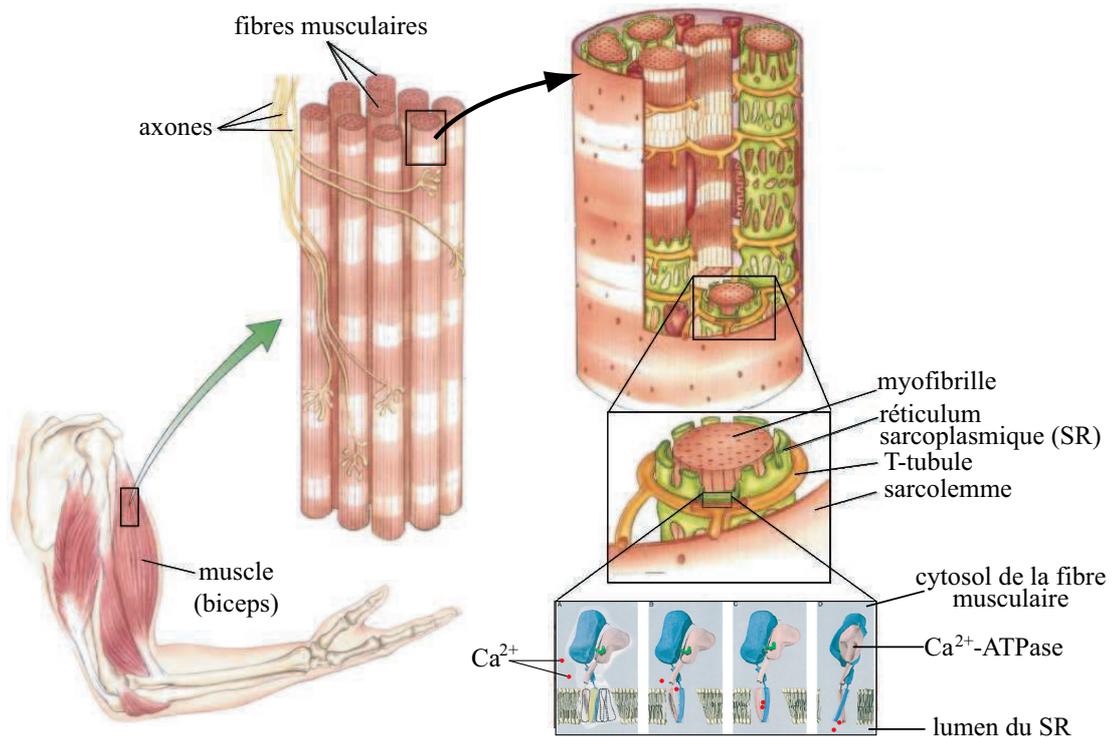


FIG. IV.1 - Structure du muscle squelettique. Chaque muscle, innervé par un réseau de terminaisons nerveuses (les axones), se contracte par l'effet de nombreuses fibres allongées, formées de myofibrilles contenant deux protéines : l'actine et la myosine. La contraction/relaxation du muscle dépend de la quantité d'ions calcium présents dans le cytosol de la cellule musculaire. L'ATPase- Ca^{2+} , incorporée dans la membrane du réticulum sarcoplasmique (RS), est impliquée dans la relaxation musculaire en pompant rapidement le calcium présent dans le cytosol des cellules musculaires pour le stocker dans le lumen du RS, qui constitue ainsi une véritable réserve de calcium. © 2001 Lippincott Williams & Wilkins.

effectuées.

IV.1 Description de la pompe à calcium

IV.1.1 Le muscle squelettique

La fibre musculaire forme de longues structures cylindriques de $50 \mu\text{m}$ de diamètre et allant jusqu'à 50 cm de long. Ce sont des cellules polynucléées avec leurs noyaux rejetés à la périphérie. La majeure partie du cytoplasme est occupée par les myofibrilles qui s'étendent parallèlement sur toute la longueur de la cellule. Ces myofibrilles sont constituées de protéines contractiles, les filaments d'actine et les filaments épais de myosine, l'ensemble formant une structure contractile dont l'unité est le sarcomère (ou case musculaire). La membrane plasmique (ou

sarcolemme) de la cellule musculaire s'invagine à l'intérieur du cytoplasme au niveau de chaque sarcomère pour former des tubules transverses (ou T-tubules) entourant chaque myofibrille (voir Fig. IV.1). La membrane de ces T-tubules est reliée avec la membrane du réticulum sarcoplasmique (RS) par des structures en forme de "pieds" via deux canaux calciques : le récepteur de la ryanodine, inséré dans la membrane du RS, et le récepteur des dihydropyridines, situé dans la membrane tubulaire.

Le RS a une forme de sacs aplatis (les citernes terminales), qui sont reliés entre eux par des portions tubulaires (les parties longitudinales), et constitue un réservoir à calcium jouant un rôle important dans le cycle contraction/relaxation de la fibre musculaire. En effet, l'influx nerveux qui arrive par l'intermédiaire de l'axone va se propager le long des membranes des T-tubules jusqu'au niveau du RS où il provoque une dépolarisation de la membrane. Ceci s'accompagne d'un brusque efflux d'ions Ca^{2+} qui étaient contenus à une concentration élevée dans les citernes du RS en provoquant l'ouverture des canaux- Ca^{2+} . La concentration d'ions Ca^{2+} dans le cytosol passe alors typiquement de 0,1 à $10\ \mu\text{M}$ ce qui déclenche la contraction musculaire. Ce taux est ensuite abaissé rapidement par l'action d'une pompe à calcium, l'ATPase- Ca^{2+} qui tapisse près de la moitié de la surface du RS, ce qui a pour conséquence d'inhiber l'interaction actine-myosine et donc de relaxer le muscle. L'ATPase- Ca^{2+} joue donc un rôle crucial dans le maintien des concentrations calciques du cytosol de la cellule musculaire et bien plus encore dans la régulation de son homéostasie calcique.

IV.1.2 Propriétés de l'ATPase- Ca^{2+}

Structure

L'ATPase- Ca^{2+} appartient à une large famille de protéines des cellules eucaryotes et procaryotes, les ATPases de type P qui utilisent l'énergie de l'hydrolyse de l'ATP (adénosine 5'-triphosphate) pour transporter des cations tels que Ca^{2+} , Na^+/K^+ , H^+ , et des métaux lourds comme Cd^{2+} , Cu^{2+} , Hg^{2+} contre leur gradient de potentiel électrochimique.

Dans notre étude, nous nous sommes intéressés à une protéine particulière, l'ATPase- Ca^{2+} du RS qui appartient à la sous-famille multigénique des ATPases SERCA (Sarco(Endo)plasmique Reticulum Ca^{2+} -ATPases). Elle est constituée d'une seule chaîne polypeptidique de 994 amino-acides, correspondant à une masse de 110 kDa. Elle représente plus de 70 % des protéines membranaires du RS et occupe presque la moitié de sa surface ; la densité de pompes est alors de 25.000 par μm^2 [Stewart and MacLennan, 1974]. Son abondance naturelle en fait donc un objet de choix pour l'étude de membrane active.

De plus, cette ATPase- Ca^{2+} a des implications importantes sur le plan médical car certains de ces mutants sont responsables de maladies, par exemple la myopathie autosomique récessive de Brody [Odermatt et al., 1996] (incapacité à relaxer

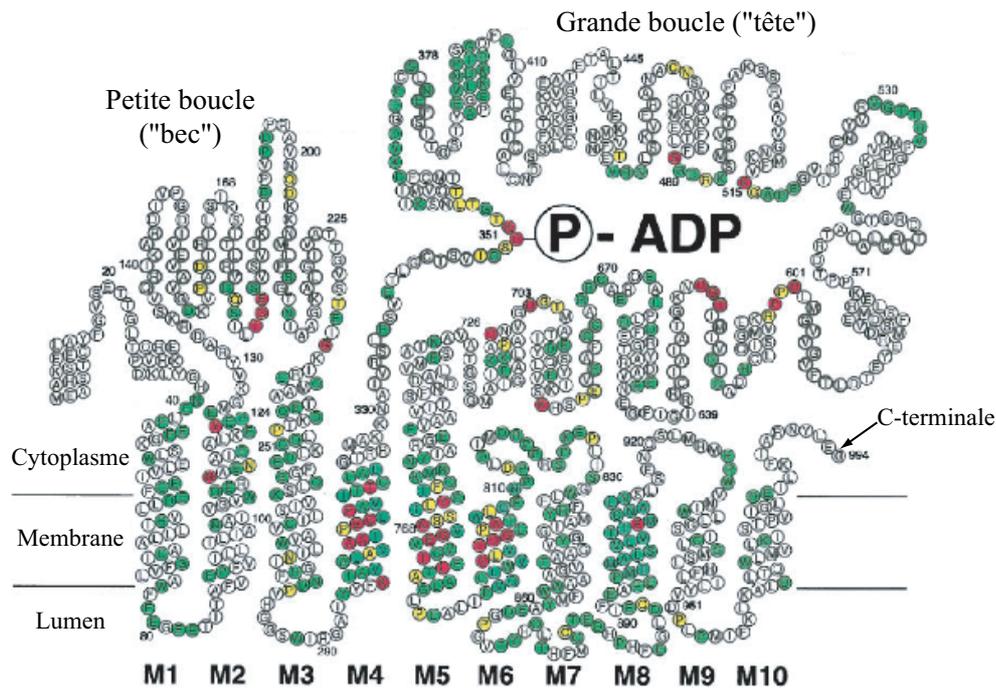


FIG. IV.2 - Représentation de la structure secondaire de l'ATPase- Ca^{2+} du RS sur laquelle sont indiqués le site Asp-351 de fixation du phosphate et le site Lys-515 de fixation du FITC, un analogue de la partie adénosine de l'ATP. Adapté de [MacLennan et al., 1997].

les muscles), la maladie de Darier-White [Sakuntabhai et al., 1999] et la maladie de Hailey-Hailey [Sudbrak et al., 2000] (rupture des ponts intercellulaires interkératinocytaires de l'épiderme provoquant la dissociation des kératinocytes).

Comparées aux canaux ioniques, qui peuvent transférer des millions d'ions par seconde à travers la membrane, les pompes et en particulier l'ATPase- Ca^{2+} travaillent beaucoup plus lentement : seulement 60 ions calcium par seconde. Le séquençage de l'ADNc, la microscopie électronique et les études chimiques de cette pompe indiquent qu'elle a une structure en trois parties (voir Fig. IV.2) [MacLennan et al., 1985] :

- ❶ une volumineuse tête cytosolique qui constitue le siège catalytique et qui représente environ les deux tiers (en taille) de la protéine totale. Ce domaine est lui-même formé de deux boucles de taille inégale, ressemblant à la tête et au bec d'un oiseau. La partie C-terminale de la grande boucle (la tête) contient le site nucléotidique (domaine N) de l'enzyme proche du domaine P de phosphorylation (dont fait partie le résidu aspartate Asp-35, responsable de la fixation du phosphate). La petite boucle (le bec), riche en feuillets β antiparallèles, forme le domaine A de transduction de la protéine [Toyoshima et al., 2000] ;

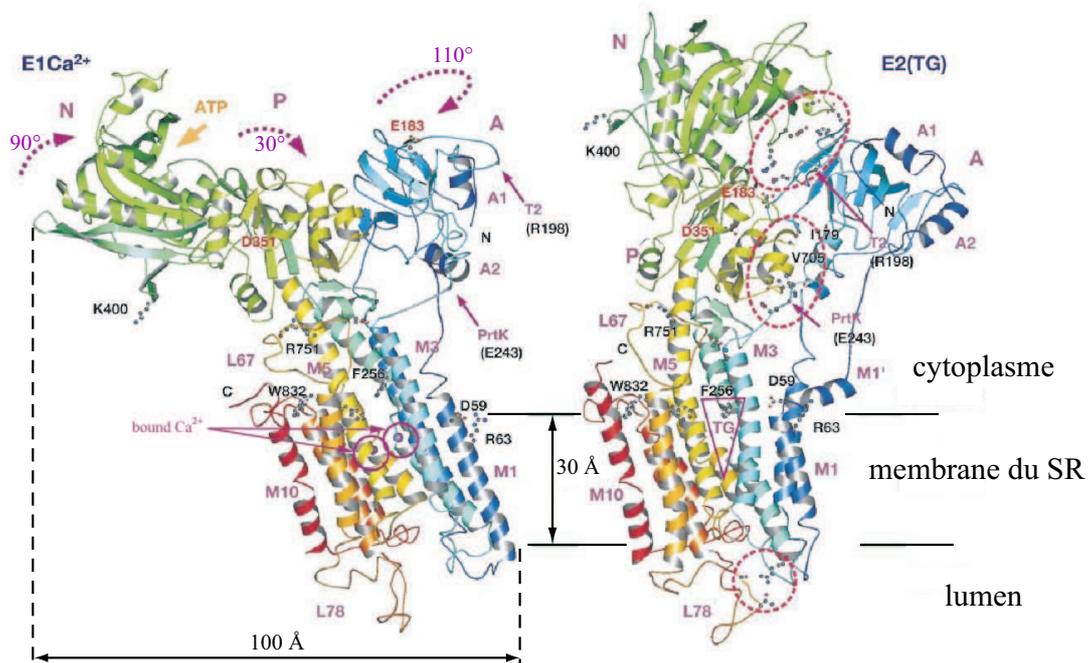


FIG. IV.3 - Représentation de l'ATPase-Ca²⁺ du RS dans sa forme Ca²⁺ fixé (E1Ca²⁺) et dans sa forme Ca²⁺ libre (E2(TG)) en présence de thapsigargine, un inhibiteur spécifique des ATPases du RS. Les deux cercles violets dans E1Ca²⁺ représentent les sites calciques [MacLennan et al., 1985]. Les cercles rouges dans E1(TG) indiquent les sites de fixation des protons. Adapté de [Toyoshima and Nomura, 2002].

- ② une région membranaire de 30 Å comprenant 10 hélices α dont certains résidus sont impliqués dans la fixation et la translocation du calcium. La structure tridimensionnelle reconstituée indique que l'hélice M7 est particulièrement longue et qu'elle peut s'incliner de 40° par rapport à la verticale engendrant des contraintes mécaniques à la membrane. Des expériences de mutagenèse tendent à montrer que le segment peptidique connectant le site de phosphorylation à l'hélice M4 joue un rôle structural important dans la transmission du signal de phosphorylation qui initie la translocation des cations liés aux sites calciques. De plus, la boucle L6-7 connectant les hélices M6 et M7 semble être fortement impliquée dans la formation d'une voie d'accès vers les sites calciques transmembranaires [Falson et al., 1997, Menguy et al., 2002] ;
- ③ une tige de 25 Å, riche en hélices α amphipatiques chargées négativement, qui unit le domaine cytosolique au domaine membranaire.

Sa taille (100 Å × 80 Å × 140 Å) et ses caractéristiques lui donnent alors une forte asymétrie dans son organisation au sein de la membrane. De telles observations topographiques ont été récemment confirmées par deux structures 3D de la protéine obtenues par cristallographie à 2,6 et 3,1 Å de résolutions, dans les

deux conformères E1 et E2 entre lesquels oscillerait la protéine au cours de son cycle enzymatique [Toyoshima et al., 2000, Toyoshima and Nomura, 2002] (voir Fig. IV.3). L'existence de ces deux formes de la protéine avait été validée par la mesure des changements de fluorescence intrinsèque de l'enzyme lors de la fixation d'ions calcium [Dupont and Leigh, 1978]. Au cours du cycle catalytique, le domaine N tourne d'environ 90° pour adopter une orientation pratiquement verticale qui n'est possible qu'avec une légère rotation de 30° du domaine P (relié au pivotement des hélices α), et ensuite le domaine A tourne horizontalement d'environ 110° [Toyoshima and Nomura, 2002] (voir les flèches en pointillés, Figs IV.3 et IV.4) ce qui correspond à mouvement d'amplitude de l'ordre de 40 \AA . Ainsi, l'amplitude des changements conformationnels étant très importante, on peut s'attendre à observer des effets assez importants sur les fluctuations de la vésicule associés à l'activité de la protéine.

Des expériences sur des vésicules de RS natif ont clairement démontré que ce transport de calcium est inhibé lorsque la concentration en ions calcium stockés à l'intérieur du RS atteint des valeurs de l'ordre de 1 mM [Scarpa and Inesi, 1972]. Cette valeur élevée est à rapprocher du fait que l'accumulation des charges positives du côté luminal est partiellement compensée par la fuite d'ions monovalents (Na^+/K^+ , H^+) qui traversent la membrane par l'intermédiaire de canaux ioniques. De plus, le transport de calcium est couplé au contre-transport de protons, avec une stœchiométrie de 2 ou 3 H^+ et 2 Ca^{2+} pour chaque ATP hydrolysé [Levy et al., 1990, Forge et al., 1995], ce qui lui a valu le sobriquet de "pompe funèbre". Cette stœchiométrie est apparemment conditionnée par les variations de pH entre l'intérieur et l'extérieur du RS : elle est voisine de 1 H^+ par Ca^{2+} lorsque $\text{pH}_{lum} = 6-7$ et $\text{pH}_{cyt} = 7-8$, mais varie dès que l'écart de pH est plus important.

Cycle enzymatique

Le mécanisme enzymatique de la protéine généralement admis pour le transport actif du Ca^{2+} est discuté en termes de modèle à deux états distincts E1 et E2, développé à partir du schéma de Post-Elbers pour les ATPase-(Na^+,K^+) [de Meiss, 1981]. Dans sa forme E1, l'ATPase possède deux sites calciques de haute affinité, avec un $K_d \sim 1 \mu\text{M}$, accessibles sur la face cytoplasmique de la membrane et peut former un intermédiaire phosphorylé E1.P.Ca_2 , Mg-dépendant de haute énergie. Par contre, dans sa forme E2, ses sites calciques cytoplasmiques sont fermés et orientés vers la lumière du RS lorsque E2 est phosphorylé en E2.P.Ca_2 , de basse énergie.

Pour démarrer son cycle enzymatique, deux choix s'offrent à la protéine : soit deux ions Ca^{2+} cytosoliques se fixent sur les sites calciques haute affinité de E1 (étape 1, Fig. IV.6), ces deux ions se lient alors de manière coopérative et entraînent l'activation de la protéine qui devient phosphorylable par l'ATP en présence de Mg^{2+} (étape 2) ; soit l'ATP active la protéine (étape 4) en permettant

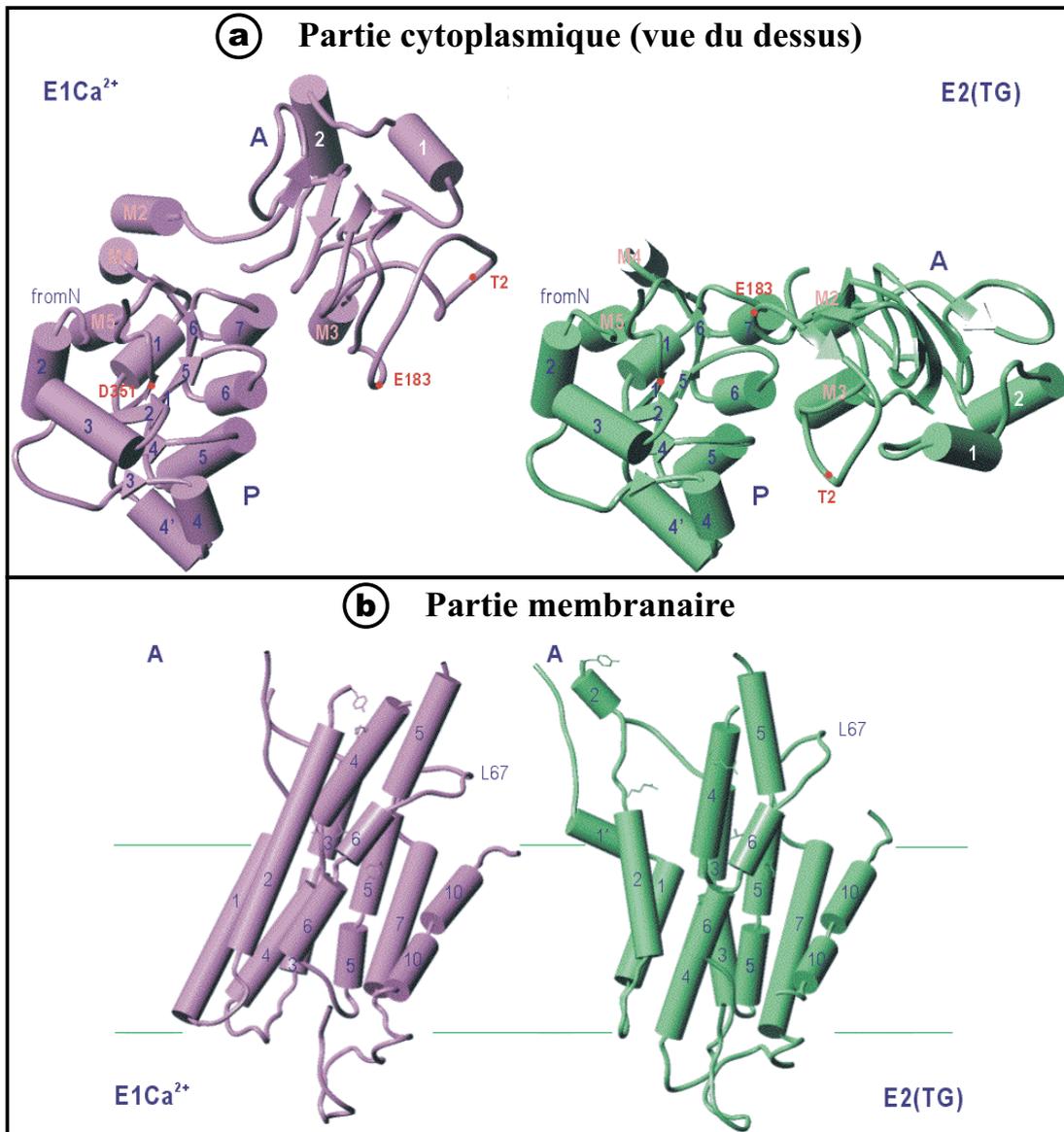


FIG. IV.4 - (a) Partie cytoplasmique de la ATPase- Ca^{2+} du RS (vue du dessus par rapport à Fig. IV.3). Les domaines A et P sont représentés dans les états E1Ca^{2+} et E2(TG) , le domaine N ayant été supprimé pour des raisons de clarté. (b) Changements conformationnels de la région transmembranaire au cours de l'isomérisation $\text{E1Ca}^{2+} \rightarrow \text{E2(TG)}$. Adapté de <http://www.iam.u-tokyo.ac.jp/StrBiol/animations/index.html>

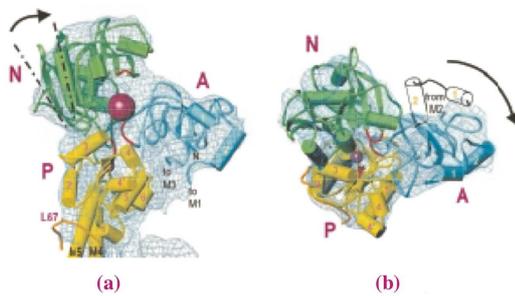


FIG. IV.5 - Vue du côté cytoplasmique (vue du dessus par rapport à Fig. IV.3) au cours de l'isomérisation E1(a)→E2(b). Les changements conformationnels de chacun des domaines extramembranaires, indiqués par les flèches noires, engendrent la fermeture des sites calciques. Un ion Ca²⁺ est représenté par une sphère rouge dans la forme E1 et disparaît dans la forme E2.

la fixation des deux Ca²⁺ (étape 5). Le transfert du phosphate terminal de l'ATP forme un dérivé phosphorylé covalent E1.P.Ca₂ qui conduit à la libération d'ADP dans le cytoplasme. Ce dérivé s'isomérise ensuite en E2.P.Ca₂ en engendrant des changements conformationnels qui réorientent les sites calciques et qui les rendent complètement inaccessibles du côté cytoplasmique, comme le montre la figure IV.5. Ces derniers deviennent alors accessibles du côté luminal et l'affinité de l'enzyme pour le calcium devient alors très faible, avec un K_d supérieur à 1 mM, ce qui entraîne la libération des deux Ca²⁺ à l'intérieur du RS. Le dérivé phosphorylé E2.P est alors hydrolysé et le phosphate est libéré dans le cytoplasme. L'enzyme dans l'état E2 s'isomérise en E1 et un nouveau cycle catalytique peut commencer.

Depuis peu, le cycle enzymatique a été réinterprété en termes de modèle alternatif à 4 sites (voir Fig. IV.6). Dans ce modèle, le transport d'ions Ca²⁺ est relié directement à la paire de sites cytosoliques et lié à la fermeture de sites calciques du côté luminal [Lee, 2002]. Ainsi, la paire de sites calciques du lumen est capable de fixer des ions Ca²⁺ dans les conformations E1 et E2 mais pas dans la forme phosphorylée E2.P.Ca₂, comme montré sur la figure IV.6, et la paire de sites de transport sont ouverts à la lumière dans l'intermédiaire E2.P.Ca₂ mais sont fermés dans les états non phosphorylés E1 et E2.

IV.2 Reconstitution dans des vésicules géantes

IV.2.1 Intérêt de cette reconstitution

Les protéines membranaires sont, comme nous l'avons déjà fait remarquer, impliquées dans un large panel de processus biologiques comme les phénomènes de transport, la transduction d'énergie, la reconnaissance cellulaire et la motilité [Alberts et al., 2002]. Cependant, le rôle des protéines à l'échelle moléculaire dans ces processus est souvent difficile à dissocier du rôle des autres éléments des membranes natives, beaucoup trop complexes. Aussi, pour pallier à cette difficulté, il est souvent nécessaire, en première approche, d'étudier des systèmes plus

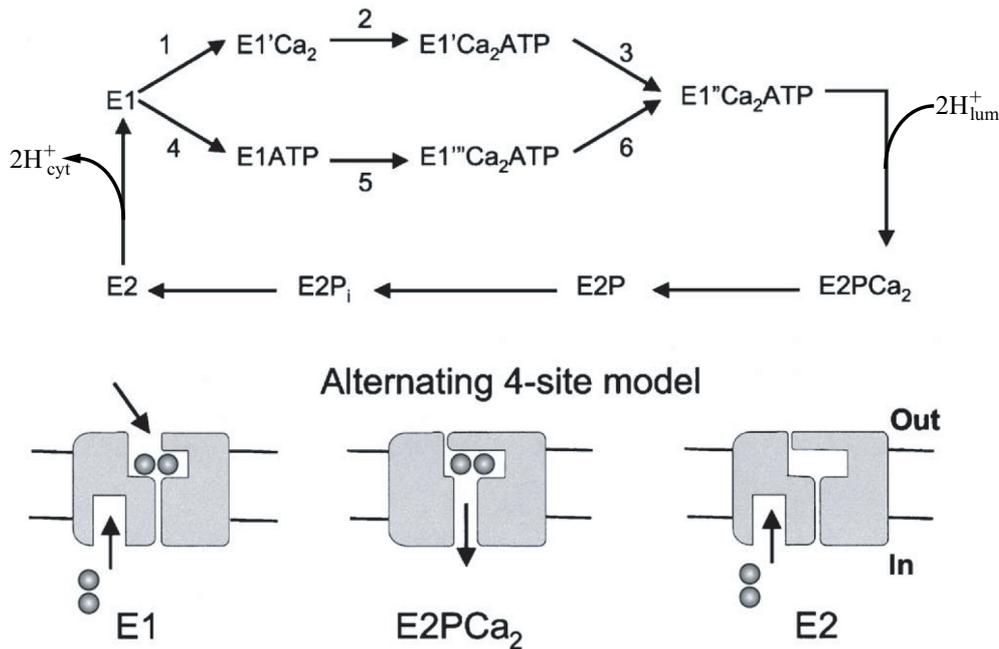


FIG. IV.6 - Schéma E1-E2 du cycle enzymatique de l'ATPase- Ca^{2+} . La durée du cycle est d'environ 30 ms. Le co-transport de deux protons du lumen (H^+_{lum}) au cytoplasme (H^+_{cyt}) est aussi indiqué. En dessous, est représenté le modèle alternatif à 4 sites qui rend compte des résultats structuraux et de mutagenèse. Ceci montre que deux Ca^{2+} sont nécessaires du côté luminal pour transporter deux autres Ca^{2+} à travers la membrane du cytoplasme au lumen du RS. Adapté de [Lee, 2002].

simples, comme des protéines membranaires reconstituées dans des membranes lipidiques artificielles. Dans ce contexte, l'incorporation, via des détergents, de protéines membranaires spécifiques dans des protéoliposomes⁽¹⁾ a permis d'obtenir une multitude d'informations sur la structure et la fonction de différentes protéines [Rigaud et al., 1988, Rigaud et al., 1995, Rigaud et al., 2000]. Toutefois, l'utilisation de la reconstitution médiée par des détergents est limitée par la taille relative (0,1 – 0,2 μm) des protéoliposomes. En fait, les petites tailles empêchent l'observation et l'analyse des relations structure/fonction des protéines membranaires par les techniques de microscopies optiques traditionnelles ou par manipulation des protéoliposomes en utilisant des micropipettes, des pinces optiques ou des microélectrodes.

Les vésicules géantes, de taille comprise entre 10 et 100 μm et décorées de protéines, sont alors apparues comme des modèles d'étude très attractifs. Différentes méthodes pour produire des vésicules géantes ont été développées et reportées dans la littérature. De telles méthodes consistent en la déshydratation de membranes biologiques ou de protéoliposomes préformés en présence de li-

⁽¹⁾Les protéoliposomes sont des liposomes contenant des protéines.

pides exogènes [Ajouz et al., 2000] suivie d'un processus de réhydratation dans le tampon voulu. Comme variante de cette méthode, il est possible d'obtenir des protéoliposomes géants par la réhydratation de films séchés, obtenus après l'évaporation de solvant organique [Darszon et al., 1980] dans lequel est solubilisé le mélange lipides-protéines. L'intérêt de cette méthode est que les vésicules peuvent être préparées dans une grande variété (en composition) de tampons et spécifiquement dans des tampons à grandes forces ioniques. Cependant, la méthode de déshydratation/réhydratation produit une population très hétérogène de protéoliposomes avec une large proportion de vésicules multilamellaires reliées au processus non-contrôlé de réhydratation.

La méthode d'électroformation [Angelova and Dimitrov, 1986], appelée aussi « méthode bulgare » a permis de remédier à ce problème. Celle-ci consiste à réhydrater un film lipidique, au-dessus de sa température de transition de phase, en présence d'un champ électrique alternatif. Avec cette méthode, il est possible de produire une large population de vésicules géantes unilamellaires avec une distribution beaucoup plus homogène centrée autour de 20 μm de diamètre. L'utilisation de la technique d'électroformation pour reconstituer la bacteriorhodopsine (BR), une protéine membranaire très hydrophobe, a été décrite une première fois dans [Manneville et al., 2001]. Les GUVs sont, dans ce cas, obtenues à partir d'une solution déshydratée de lipides exogènes et de BR dans du diéthyléther. Malheureusement, une telle reconstitution est très limitée car elle implique l'utilisation de solvants organiques, qui dénaturent la plupart des protéines membranaires amphiphiles. Une autre approche consiste à faire fusionner des GUVs purement lipidiques préparées par électroformation avec des protéoliposomes préformés [Kahya et al., 2001]. Ceci limite toutefois la quantité de protéines incorporées et aboutit à l'insertion d'agents fusogènes qui sont attachés de manière covalente aux protéoliposomes et qui permettent leur fusion avec les GUVs.

Nous avons donc développé, en collaboration avec l'équipe de J.-L. Rigaud de l'Institut Curie, une nouvelle méthode de reconstitution de protéines membranaires dans des GUVs qui se divise en trois étapes :

- ① reconstitution de protéines, solubilisées dans des liposomes unilamellaires sub-microniques, médiée par des détergents [Rigaud et al., 1995] ;
- ② déshydratation partielle de ces protéoliposomes préformés sur des lames conductrices ;
- ③ réhydratation sous champ électrique.

Pour vérifier les potentialités de cette méthode, nous avons caractérisé la reconstitution d'une protéine membranaire : l'ATPase- Ca^{2+} du RS. Il est toutefois à noter que cette méthode a aussi été appliquée avec succès à la BR [Girard et al., 2004c, Pécréaux, 2004].

IV.2.2 Description de la méthode

Le protocole de la méthode est présenté sur la Fig. IV.7. Quelques détails sont apportés ci-dessous.

Préparation des liposomes sub-microniques

Les vésicules de RS sont préparées à partir d'homogénats de muscles squelettiques de lapin comme décrit dans [Champeil et al., 1985] et nous sont fournies par P. Champeil (URA CNRS/CEA 2096, Gif-sur-Yvette) à une concentration de 40 mg/ml. L'ATPase- Ca^{2+} est reconstituée dans des protéoliposomes en utilisant la procédure générale développée par Rigaud *et al.* [Rigaud et al., 1998, Rigaud and Levy, 2003]. Typiquement, les vésicules de RS sont incubées dans un détergent, l'octaéthylène glycol mono-*n*-1-dodécyl éther (C_{12}E_8) dans un rapport détergent/protéine de 2 w/w (où w/w est un rapport massique) dans un tampon contenant 20 mM Mops-Tris⁽²⁾ (pH=7,0) et 0,1 mM de CaCl_2 . Le détergent est ajouté en excès de telle manière que pas plus d'une protéine ne soit présente dans une micelle de détergent. Les liposomes purement lipidiques⁽³⁾ à 4 mg/ml sont préparés par sonication et complètement solubilisés dans des micelles mixtes dans un rapport C_{12}E_8 /lipide de 3 w/w dans 2 mM de Mops-Tris (pH=7).

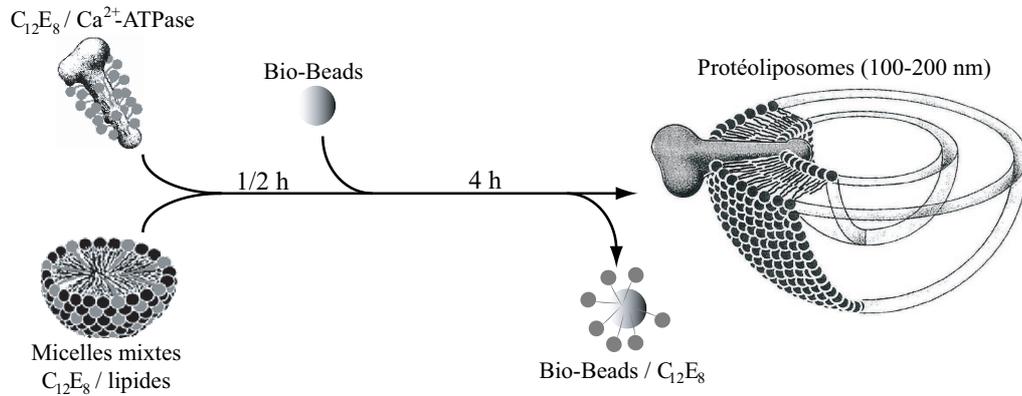
Ensuite, les aliquots de protéines solubilisées sont ajoutés au mélange détergent-lipide sous agitation dans le rapport voulu de lipide/protéine (typiquement de 3 à 40 w/w). Après 30 min d'incubation à température ambiante, le détergent est complètement éliminé par une unique addition de 30 mg/mg de C_{12}E_8 , de billes de polystyrène SM2 Bio-Beads 25-50 mesh pré-lavées (Bio-Rad, Hercules, CA), suivie d'une incubation de 4 h. En effet, les détergents possèdent une plus forte affinité avec les Bio-Beads qu'avec les autres molécules du mélange. Des vésicules phospholipidiques contenant la protéine se forment spontanément au fur et à mesure que la concentration en détergent diminue. De plus, cette élimination rapide permet d'éviter l'incorporation inhomogène de la protéine [Levy et al., 1992] en minimisant les interférences possibles des molécules de détergent résiduelles sur la formation de liposomes [Rigaud et al., 1998]. Des études de cryomicroscopie sur ces protéoliposomes ont permis de voir qu'en partant d'une solution micellaire lipide-ATPase- Ca^{2+} -détergent, cette procédure de reconstitution produit des protéoliposomes avec une asymétrie mais avec une orientation préférentielle de la protéine dans la membrane : à peu près 80 % des protéines ont leur large domaine cytoplasmique dirigé vers l'extérieur [Levy et al., 1992].

Après élimination complète du détergent, les protéoliposomes sont séparés des billes en pipétant le surnageant.

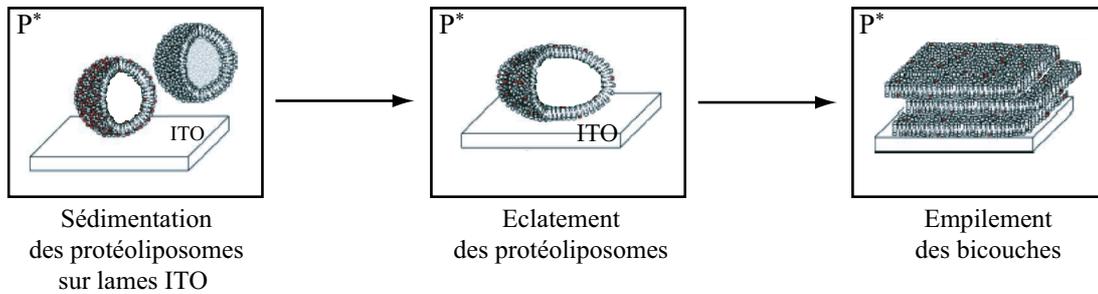
⁽²⁾Mops : 3-[N-morpholino]-propanesulfonic acid, $\text{C}_7\text{H}_{15}\text{NO}_4\text{S}$, $\text{pK}_a = 7,2$;
Tris : Tris[hydroxyméthyl]aminométhane, $\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$, $\text{pK}_a = 8,1$.

⁽³⁾La méthode de préparation des liposomes lipidiques est indiquée dans l'Annexe B.

1) Reconstitution dans des petits liposomes



2) Séchage sous atmosphère contrôlée (une nuit)



3) Electroformation

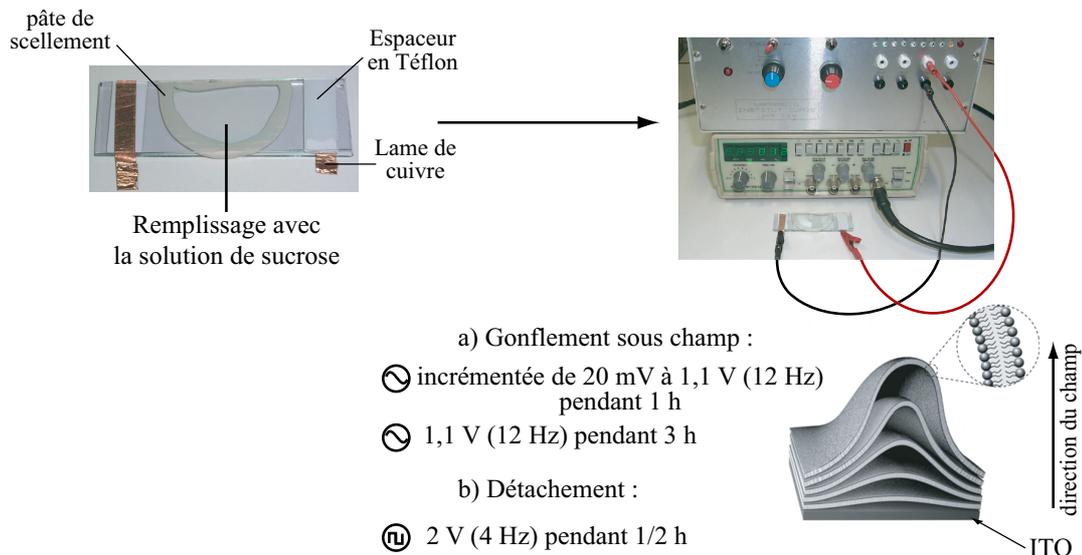


FIG. IV.7 - Synoptique du protocole de reconstitution.

Préparation des GUVs

Des gouttelettes de $2\ \mu\text{l}$ de solution de protéoliposomes, dilués à $0,8\ \text{mg/ml}$ en concentration lipidique, sont déposées sur la surface de deux lames conductrices d'ITO (Indium Tin Oxide). Ces lames sont préalablement lavées avec du chloroforme et de l'éthanol puis rincées à l'eau distillée et enfin conservées dans une enceinte à vide. La quantité de matériels déposées correspond à un bon compromis entre la formation d'un film trop mince (ne générant pas de vésicules géantes) et la formation d'un film trop épais (qui s'hydraterait mal). Le film est alors partiellement déshydraté toute une nuit dans un dessiccateur sous pression de vapeur saturante d'une solution saline saturée de NaCl. Effectivement, une déshydratation totale du film, par exemple dans une enceinte à vide, provoque une forte diminution (environ 90 %) de l'activité de la protéine.

La technique d'électroformation est ensuite utilisée pour former des GUVs. Pour cela, nous formons la chambre d'électroformation en assemblant face à face les deux lames ITO, séparées de 1 mm par des espaceurs en Téflon. L'étanchéité est assurée par une pâte de scellement Silligum wax (Vitrex, Copenhagen, Danemark). Les contacts électriques sont réalisés par l'intermédiaire de lames de cuivre autocollantes qui sont branchées à un générateur basse fréquence. La composition du tampon de réhydratation est un paramètre très important à contrôler au cours du processus de formation de GUVs par électroformation qui requiert de basses forces ioniques [Luisi and Walde, 2000]. Effectivement, nous avons observé que des solutions contenant plus de 5 mM d'ions monovalents ou 1 mM d'ions bivalents empêchaient la formation de GUVs. Vu que ces basses conditions ioniques peuvent être délétères pour l'activité des protéines reconstituées, nous avons déterminé la concentration saline minimale qu'il est nécessaire d'avoir pour maintenir l'activité de l'ATPase- Ca^{2+} . En utilisant des tests ATPasiques, dont nous reparlerons plus en détail dans le paragraphe "Fonction et activité dans les GUVs", nous nous sommes aperçus que l'utilisation d'une solution contenant 0,1 M de sucrose (α -D-glucopyranosyl β -D-fructofuranoside, $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$), 1 mM Mops-Tris (pH=7,0) et 1 mM MgCl_2 était suffisante pour maintenir l'activité hydrolytique ATPasique. Le calcium contaminant, estimé à $20\ \mu\text{M}$, suffit aussi pour préserver cette activité.

La chambre est alors remplie sous champ électrique alternatif, afin de limiter le gonflement spontané parasite, d'environ 1 ml de cette solution. Nous appliquons alors une rampe de tension de 20 mV jusqu'à 1,1 V à 12 Hz pendant la première heure et une tension constante pendant 3 h. Ceci conduit à la formation d'une mousse de vésicules (voir Fig. IV.8). Pour détacher les vésicules de la lame conductrice et les séparer, on utilise une tension carrée alternative (d'amplitude 2 V, de fréquence 4 Hz) pendant 1/2 h.

La question que pose cette méthode est de savoir si l'on reconstitue bien tout ce que l'on a déposé sur les lames conductrices. En première approximation, on peut faire l'hypothèse que si la méthode d'électroformation fournit beaucoup de

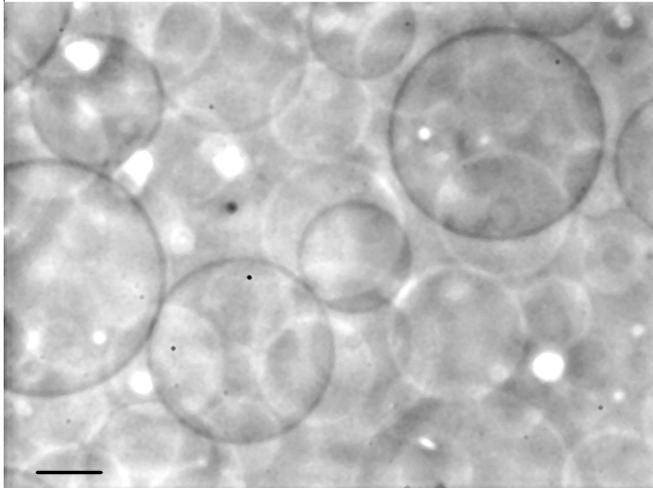


FIG. IV.8 - Image en contraste de phase de la chambre d'électroformation remplie de GUVs EYPC:EYPA (9:1) contenant l'ATPase- Ca^{2+} dans un rapport de 6,5 w/w. La barre représente 10 μm .

vésicules géantes de morphologie non-pathologique, il est alors raisonnable de supposer que nous retrouvons la composition du dépôt dans les GUVs. Toutefois, seule une étude statistique des phénomènes que l'on observe pourra lever cette incertitude.

Observation des GUVs

Les vésicules formées par l'électroformation sont en général tendues, on les laisse alors reposer quelques heures au réfrigérateur. Ensuite, 20 μl de ces GUVs reconstituées sont transférées dans une cellule d'observation (lamelles de $22 \times 22 \text{ mm}^2$ séparées de 1 mm et recouvertes de PEG (PolyEthylène Glycol) pour éviter l'éclatement des vésicules) contenant un mélange équi-osmolaire de glucose (D-(+)-glucose, $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$), 5 mM Mops-Tris (pH=7,0), 5 mM MgCl_2 et 0,5 mM CaCl_2 . Il est toutefois nécessaire que ce transfert se fasse le plus délicatement possible pour éviter de cisailer les vésicules ce qui les détruit facilement et ne permette de garder que les plus tendues. Pour cela, nous utilisons un capillaire en verre de gros diamètre, monté au bout d'une pipette Gilson, en aspirant très lentement. De plus, la légère différence de densité entre le milieu interne, le sucrose ($d = 1,002 \text{ g/l}$), et le milieu externe, le glucose ($d = 1,006 \text{ g/l}$), des vésicules permet leur sédimentation. La différence d'indice optique ($\Delta n = 0,002$) entre les deux milieux améliore la visualisation de la vésicule en contraste de phase. Environ 10 min après le transfert, quand toutes les vésicules se sont déposées sur la lamelle inférieure, les GUVs sont observées par contraste de phase sur un microscope inversé (Axiovert 135, Carl Zeiss Inc., Allemagne).

Marquage de l'ATPase-Ca²⁺

Pour pouvoir contrôler l'homogénéité de la distribution des protéines dans la membrane des GUVs, et dans la préparation, l'ATPase-Ca²⁺ a été marquée avec une molécule fluorescente : la fluoresceine 5'-isothiocyanate (FITC, C₂₁H₁₁NO₅S, $\lambda_{ex} = 495$ nm, $\lambda_{em} = 520$ nm). Pour cela, les vésicules de RS (2 mg/ml) ont été incubées pendant 30 min, à 25 °C, en chambre noire, dans un milieu contenant 0,3 M sucrose, 1 mM MgCl₂, 20 μ M CaCl₂ et 50 mM Tricine-Tris⁽⁴⁾ (pH=8,0) en présence d'un excès de marqueurs (10 fois plus). En effet, le marquage par FITC sature autour de 0,8 nmol de FITC par mg d'ATPase-Ca²⁺, cette valeur a été mesurée par un test ATPasique qui sera décrit ultérieurement dans le paragraphe "Fonction et activité dans les GUVs" (voir Fig. IV.9). La solution stock de FITC est produite le jour même et consiste en 2 mM de FITC dans du diméthyl formamide (DMF). La réaction de marquage est arrêtée par centrifugation à $100.000 \times g$ pendant 15 min à 4 °C. Le culôt est resuspendu dans 20 mM Mops-Tris (pH=7,0), et la concentration de FITC fixée est mesurée sur un spectrophotomètre ATI Unicam UV2-100 en présence de 1 % de sodium dodécyl sulfate (SDS), en connaissant le coefficient d'absorption molaire $\epsilon = 8 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ à 496 nm [Mitchinson et al., 1982]. Pour reconstituer ces protéines marquées dans les GUVs, il suffit alors de suivre le même protocole décrit précédemment. Il est à noter que le FITC, qui se lie de manière covalente à la Lys-515, occupe donc le site de fixation du nucléotide ce qui inhibe complètement l'activité de la protéine. Ceci nous a alors contraint à observer séparément la présence de l'ATPase-Ca²⁺ et son activité dans les GUVs.

IV.2.3 Caractérisation de la reconstitution dans les GUVs

Pour déterminer l'efficacité de ce nouveau protocole de reconstitution dans des GUVs, nous avons étudié les caractéristiques physiques des vésicules en termes de morphologie, de taille et de lamellarité, mais aussi l'homogénéité de la reconstitution de la protéine dans la membrane et son activité (ces résultats sont extraits de [Girard et al., 2004c]).

IV.2.3.a Morphologie et taille

Les effets de la composition lipidique ou du tampon sur la morphologie et la taille des GUVs reconstituées sont contrôlés par microscopie DIC (Contraste Différentiel Interférentiel, voir Fig. IV.10(a)). La formation de vésicules géantes dépend du rapport lipide/protéine qui se trouve à l'origine dans les protéoliposomes. Les vésicules géantes peuvent être directement formées à partir des vésicules de RS natives qui contiennent déjà des lipides dans un rapport lipide/ATPase-Ca²⁺ de 0,8 w/w (ou 110 mol/mol), mais probablement en

⁽⁴⁾Tricine : N-tris[hydroxyméthyl]méthylglycine, C₆H₁₃NO₅, pK_a = 8,1.

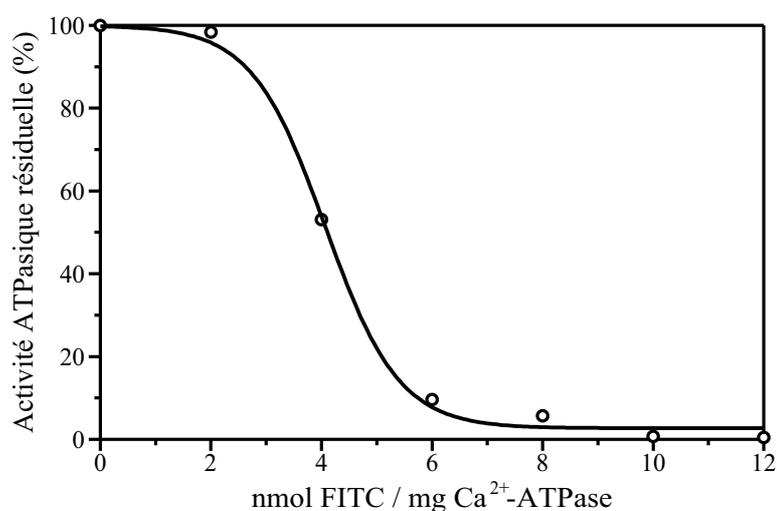


FIG. IV.9 - Activité ATPasique relative de l'ATPase-Ca²⁺ dans les vésicules de RS en fonction de la quantité de FITC fixée. Sans FITC, son activité est de 6,1 μmol d'ATP hydrolysé /min/mg de protéine. Nous voyons que l'activité est pratiquement nulle lorsque 8 nmol de FITC fixée / mg d'ATPase-Ca²⁺ ont été ajoutées aux vésicules de RS.

raison de la géométrie fortement asymétrique de la protéine et de la forte concentration de protéines, les vésicules observées exhibent de nombreuses formes pathologiques : formes tubulaires, ovoïdales et en poire. À partir de protéoliposomes reconstitués dans un rapport lipide/ATPase-Ca²⁺ d'environ 3,5 w/w⁽⁵⁾ (*i.e.* 490 mol/mol), les vésicules sphériques commencent à apparaître, et la proportion de vésicules non-sphériques décroît avec l'augmentation du rapport lipide/protéine. Les échantillons avec seulement des GUVs sphériques peuvent être obtenus de protéoliposomes avec des rapport lipide/ATPase-Ca²⁺ compris entre 5 et 40 w/w (*i.e.* de 680 à 5500 mol/mol). Nous avons aussi observé que la distribution en taille des GUVs contenant l'ATPase-Ca²⁺ est très large avec un diamètre variant de 5 à 100 μm , et peut être fittée par une gaussienne centrée autour de 20 μm (Fig. IV.10(b)). Ce résultat est assez comparable avec les résultats obtenus sur de pures vésicules lipidiques.

La morphologie et la taille des GUVs reconstituées sont indépendantes de la nature des lipides. En effets, nous avons aussi bien utilisé des lipides neutres⁽⁶⁾ (EYPC, DOPC ou SOPC), que des mélanges de lipides neutres et chargés EYPC: EYPA (9:1 mol/mol) ou DOPC:DOPS (9:1 mol/mol), ou bien encore des mélanges complexes de lipides DOPC:DOPE:DOPS (9:1:0, 8:1:1, 7:2:1), des lipides extraits de cerveau ou l'asolectine (qui sont des lipides de lécithine de soja dont la composition reste très imprécise).

⁽⁵⁾Ce rapport et tous ceux qui vont suivre tiennent compte des lipides endogènes contenus dans le RS natif.

⁽⁶⁾La description et les caractéristiques de tous les lipides sont rassemblées dans l'annexe B.

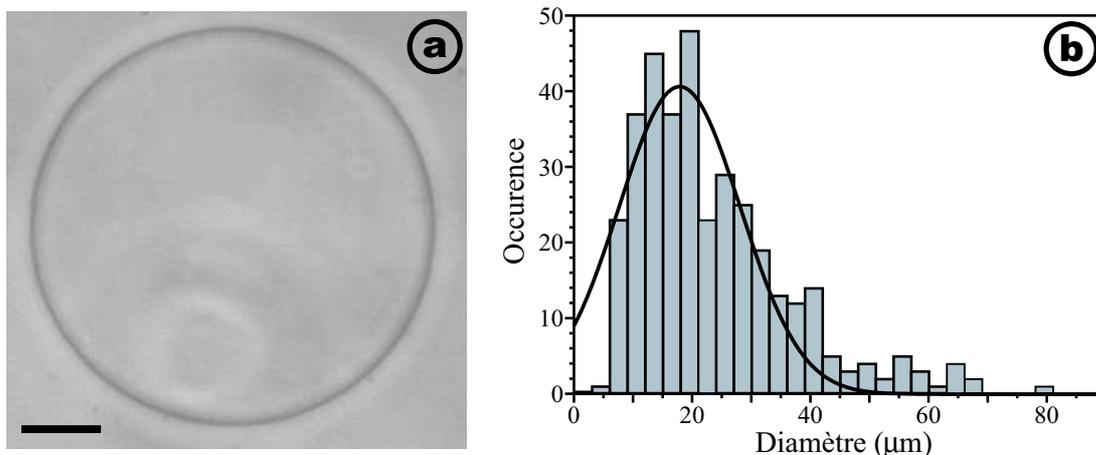


FIG. IV.10 - (a) Image en DIC (Contraste Différentiel Interférentiel) de GUVs EYPC:EYPA (9:1) contenant l'ATPase- Ca^{2+} dans un rapport de 6,5 w/w. La barre représente $10\ \mu\text{m}$. (b) Distribution en taille de GUVs reconstituées. Les vésicules ayant un diamètre inférieur à $5\ \mu\text{m}$ ne sont pas prises en compte. Cette distribution peut être fittée par une gaussienne centrée autour d'un diamètre de $20\ \mu\text{m}$.

IV.2.3.b Détermination de l'unilamellarité

L'unilamellarité des GUVs est déterminée en mesurant la distribution de lipides fluorescents entre les feuillettes interne et externe par un test de « quenching » [Gruber and Schindler, 1994]. Pour de telles mesures, 0,5 mol % de lipides NBD-C12-HPC fluorescents ($\lambda_{ex} = 465\ \text{nm}$, $\lambda_{em} = 534\ \text{nm}$) sont inclus à la composition lipidique initiale et les GUVs fluorescentes ainsi formées sont transférées dans une cuvette de 2 ml. L'intensité de fluorescence est mesurée en fonction du temps sur un spectrofluorimètre Perkin Elmer LS 50B. À la flèche 1 sur la figure IV.11(a), $20\ \mu\text{l}$ d'une solution de quencher de fluorescence, le sodium hydrosulfite (1 M $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ dans 5 mM Tes⁽⁷⁾ à pH=9) sont ajoutés dans la cuvette. Comme le quencher diffuse à la surface des vésicules mais pas à travers la membrane, l'intensité décroît et finalement arrive à un plateau quand la fluorescence de tous les lipides NBD-C12-HPC présents sur le feuillet externe a été éteinte. À la flèche 2, une solution concentrée de Triton X-100 permet, en solubilisant les GUVs, d'exposer les lipides fluorescents, présent sur le feuillet interne, au quencher. L'intensité diminue alors jusqu'à une valeur minimale correspondant à la fluorescence du fond. Pour calculer le nombre moyen de bicouches par vésicules, nous supposons qu'à la première étape, l'intensité relative I_1 est proportionnelle à la concentration de NBD-C12-HPC du feuillet externe de la bicouche, et que I_2 , la différence d'intensité entre les valeurs initiale et finale, est proportionnelle à la concentration totale de NBD-C12-HPC présents dans l'échantillon. Pour une vésicule parfait-

⁽⁷⁾Tes : N-tris[hydroxyméthyl]méthyl-2-aminoéthanesulfonic acide, $\text{C}_6\text{H}_{15}\text{NO}_6\text{S}$, $\text{pK}_a = 7,4$.

tement unilamellaire, le rapport I_1/I_2 devrait être égal à 0,5. Pour des GUVs purement lipidiques (EYPC) ou contenant l'ATPase- Ca^{2+} , nous avons mesuré des rapports de 0,42 et 0,38, respectivement. Ces valeurs correspondent assez bien à une répartition homogène des lipides fluorescents entre les deux feuillets des vésicules. Toutefois, cette légère différence (environ 10 %) entre les intensités de fluorescence des deux feuillets pourrait s'expliquer par la présence de petites vésicules qui apparaissent encapsulées à l'intérieur de GUVs (Fig. IV.11(b)) ou d'autres structures lipidiques comme des agrégats (ou spots) de lipides indiquées par des flèches sur la Fig. IV.11(c). Cependant, ces défauts restent tout de même assez rares. De plus, dans nos expériences, nous n'utiliserons pas les vésicules contenant ces défauts.

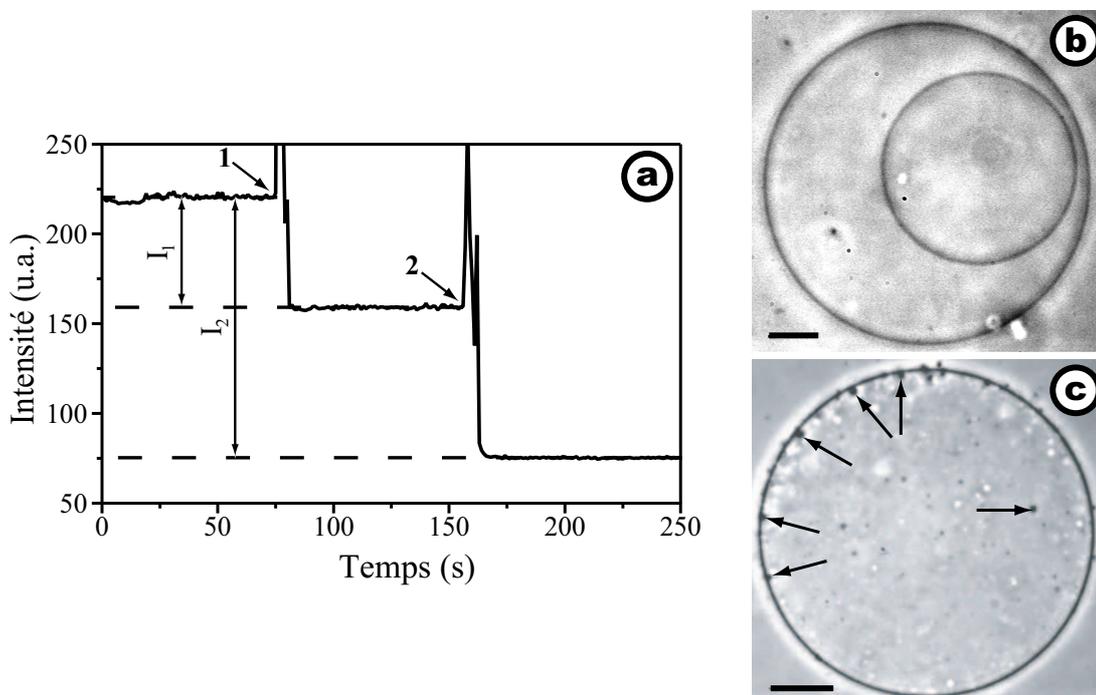


FIG. IV.11 - Les GUVs sont préparées avec un mélange de lipides EYPC:NBD-C12-HPC (99,5:0,5 mol/mol) avec un rapport lipide/ATPase- Ca^{2+} de 6,5 w/w (900 mol/mol). (a) L'unilamellarité des GUVs est vérifiée en mesurant la distribution de lipides fluorescents NBD-C12-HPC entre le feuillet interne et le feuillet externe. L'addition de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ à la solution de GUVs (flèche 1) implique le quenching des lipides fluorescents du feuillet externe de la membrane des GUVs. La solubilisation des vésicules dans un excès de détergent Triton X-100 (flèche 2) induit une seconde décroissance de l'intensité de fluorescence due, cette fois-ci, au quenching du feuillet interne. Le rapport I_1/I_2 devrait être de 0,5 pour des vésicules unilamellaires. La valeur de 0,38 mesurée pour les GUVs reconstituées peut s'expliquer en partie par la présence de petites vésicules à l'intérieur de GUVs (b) ou d'autres structures lipidiques (c). La barre sur chacune des images en contraste de phase correspond à $5 \mu\text{m}$.

Les propriétés élastiques des vésicules, mesurées par la technique d'aspira-

tion dans des micropipettes ont aussi confirmé l'unilamellarité des GUVs reconstituées. Cette technique, sur laquelle nous reviendrons dans le chapitre suivant, permet de mesurer, entre autres, le module de courbure κ dont la valeur est proportionnelle au nombre de bicouches constituant la vésicule. Par exemple, ce paramètre élastique a été mesuré sur 80 GUVs EYPC:EYPA (9:1) contenant l'ATPase- Ca^{2+} dans un rapport lipide/protéine de 6,5 w/w (900 mol/mol) en l'absence d'ATP. Nous avons alors obtenu une valeur moyenne de $9,0 \times k_B T$ avec une déviation standard de $1,5 \times k_B T$ (la méthode de mesure est détaillée dans le chapitre V) qui est du même ordre de grandeur que les valeurs répertoriées pour des GUVs purement lipidiques EYPC, environ $10 \times k_B T$ (voir le tableau II.1).

IV.2.3.c Homogénéité de la reconstitution dans les GUVs

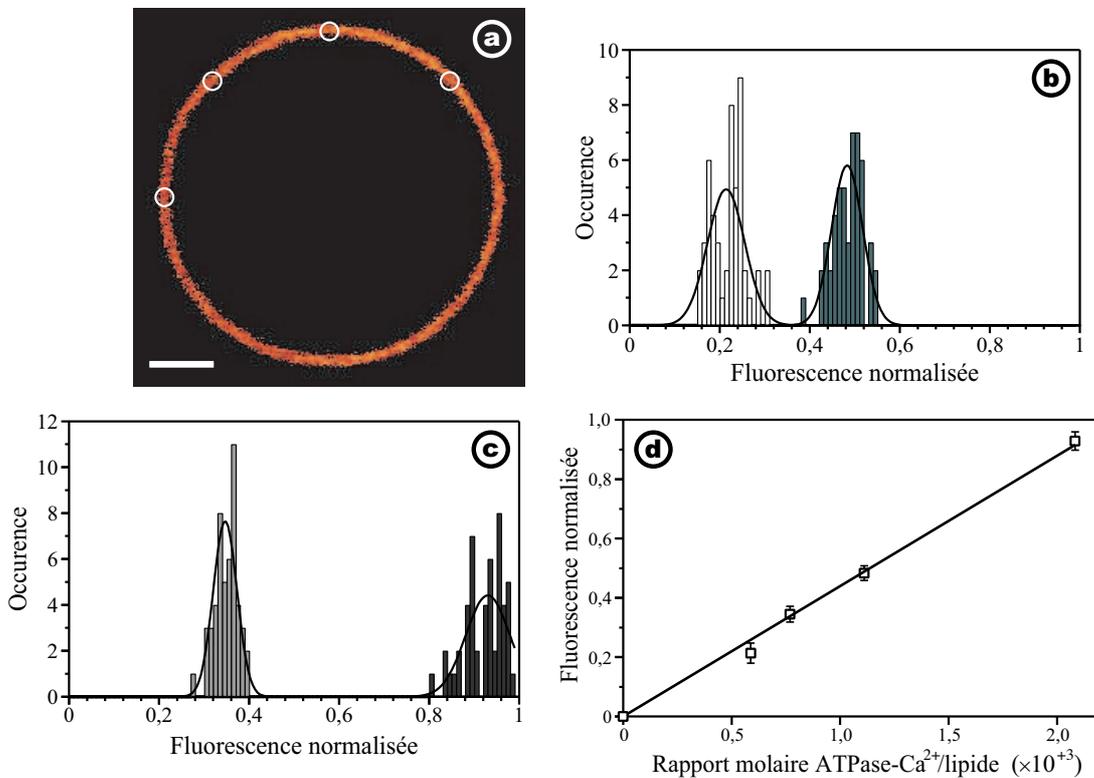


FIG. IV.12 - (a) Image de fluorescence (en fausses couleurs), obtenue sur un microscope confocal, d'une GUVs de SOPC contenant l'ATPase- Ca^{2+} marquée avec FITC dans un rapport lipide/protéine de 6,5 w/w (900 mol/mol). Barre = $5 \mu\text{m}$. (b) et (c) Distributions de la fluorescence normalisée (en divisant par 255, le nombre de niveaux de gris) pour une population de 50 GUVs reconstituées dans un rapport lipide/ATPase- Ca^{2+} de (b) 3,5 (480 mol/mol en gris-noir), 9,5 (1300 mol/mol en gris clair) et (c) 6,5 w/w (900 mol/mol en gris foncé), 12,5 w/w (1700 mol/mol en blanc). Celles-ci peuvent être fittées par une distribution gaussienne nous donnant la valeur moyenne et la déviation standard. (d) L'intensité moyenne de fluorescence, obtenue dans (b) et (c) (symbole \square), s'ajuste de manière linéaire au rapport protéine/lipide.

Un des enjeux majeurs pour la reconstitution de telles protéines membranaires est l'homogénéité de l'incorporation aussi bien sur une distribution de vésicules que dans la membrane de chaque vésicule. Nous avons analysé ces points en utilisant un microscope confocal de fluorescence Leica TCS SP2 (Leica Laser Technik, Heidelberg, Allemagne) équipé d'un objectif Zeiss HCX-Apochromat 63 \times (d'ouverture numérique : NA = 1,4). Un laser argon opérant à 488 nm est alors utilisé au maximum de l'absorption du FITC avec laquelle nous avons marqué la protéine. L'épi-fluorescence est convertie en un faisceau statique par un dispositif de balayage en x - y qui est focalisé sur un photomultiplicateur (PMT). L'émission de fluorescence passe à travers un filtre passe-haut à 505 nm, et un pinhole de 320 μ m d'ouverture, placée devant le PMT, permet de diminuer fortement la fluorescence de tout ce qui se trouve en dehors du plan focal.

Les mesures ont été réalisées pour quatre différents rapports lipide/ATPase- Ca^{2+} (3,5 ; 6,5 ; 9,5 ; 12,5 en w/w ou 480 ; 900 ; 1300 ; 1700 en mol/mol) et sur des vésicules contenant l'ATPase- Ca^{2+} marquées au FITC. L'intensité du laser et les autres paramètres (taille du pinhole, gain du PMT) sont maintenus constants pour toute la durée de l'expérience, nous permettant ainsi de comparer directement nos résultats. Nous avons traité les images obtenues par le microscope confocal à l'aide du logiciel ScionImage (Scion Corporation), et nous avons mesuré l'intensité de fluorescence (en niveaux de gris variant de 0 à 255) en quatre points de la membrane indiqués par des cercles blancs sur la Fig. IV.12(a), et ce pour chaque vésicule. Ces quatre mesures nous ont donné des résultats assez similaires. Ceci semble indiquer que la protéine est répartie de manière homogène dans la membrane comme l'indique la Fig. IV.12(c). Ce résultat est à comparer avec le protocole de reconstitution de la BR mis au point par J.-B. Manneville [Manneville, 1999] qui obtenait souvent des spots de fluorescence indiquant la présence d'agrégats de protéines dans la membrane (voir Fig. IV.13).

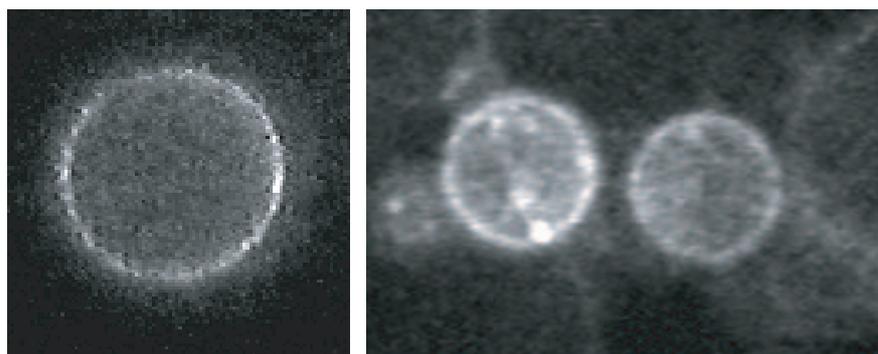


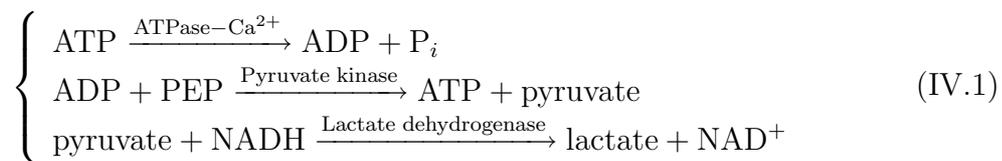
FIG. IV.13 - Images de fluorescence de GUVs contenant de la BR marquée au FITC. Les GUVs sont préparées à partir d'une solution déshydratée de lipides et de BR dans du diéthyléther (pour une description plus précise du protocole, je vous renvoie à [Manneville, 1999]).

Nous avons ensuite étudié l'homogénéité de la reconstitution sur un échantillon de 50 vésicules (nous permettant d'avoir une statistique suffisante) préparées dans un même rapport lipide/protéine, l'intensité de fluorescence d'une vésicule étant la moyenne des quatre valeurs mesurées sur sa membrane. La distribution de l'intensité de fluorescence normalisée (en divisant par 255, le nombre de niveaux de gris) s'accorde assez bien avec une distribution gaussienne, pour chacun des rapports définis plus haut, comme le montre la Fig. IV.12 (b). Il faut cependant remarquer que la largeur à mi-hauteur des gaussiennes augmente lorsque la concentration de l'ATPase-Ca²⁺ marquée diminue en raison du faible rapport signal sur bruit des images de fluorescence. De plus, comme on le voit sur la Fig. IV.12(c), la variation de la fluorescence moyenne (prise comme l'intensité au centre de la gaussienne) des GUVs est proportionnelle au rapport protéine/lipide, et donc dépend linéairement de la quantité de protéines marquées, initialement présentes dans les protéoliposomes préformés. En faisant varier la concentration en ATPase-Ca²⁺ dans les protéoliposomes, nous faisons varier de la même façon sa concentration dans les GUVs, ce qui prouve bien que le rapport lipide/protéine soit conservé. Au vu de ces résultats, il est alors tout à fait raisonnable de dire que ce protocole assure une reconstitution homogène de la protéine aussi bien dans la membrane d'une vésicule que dans un ensemble de GUVs préparées dans les mêmes conditions. De plus, ceci signifie que par ce protocole, la concentration en protéines est contrôlée au cours de la reconstitution.

IV.2.3.d Fonction et activité dans les GUVs

Activité hydrolytique

L'efficacité de la reconstitution dans des GUVs a aussi été analysée en mesurant l'activité hydrolytique calcium-dépendant et son activité de pompage. Pour cela, nous avons en premier lieu utilisé une technique d'enzymes couplées [Möller et al., 1979] qui relie la quantité d'ATP hydrolysés (donc d'ADP produits) à l'oxydation du NADH⁽⁸⁾ comme l'indique le schéma réactionnel suivant :



en d'autres termes, la quantité d'ATP hydrolysés est égale à la quantité de NADH consommés.

Cette expérience est typiquement réalisée dans une cuvette de 1 cm contenant 2 ml de la solution suivante : 50 mM Mops-Tris (pH= 7,5), 0,1 M KCl, 5 mM MgCl₂, 0,1 mM CaCl₂, 1 mM phosphoénol pyruvate (PEP), 5 unités/ml de pyruvate kinase, 5 unités/ml de lactate déshydrogénase, 1 mg/ml de C₁₂E₈. Les GUVs

⁽⁸⁾NADH : α -nicotinamide adénine dinucléotide forme réduite, C₂₁H₂₇N₇O₁₄P₂Na₂.

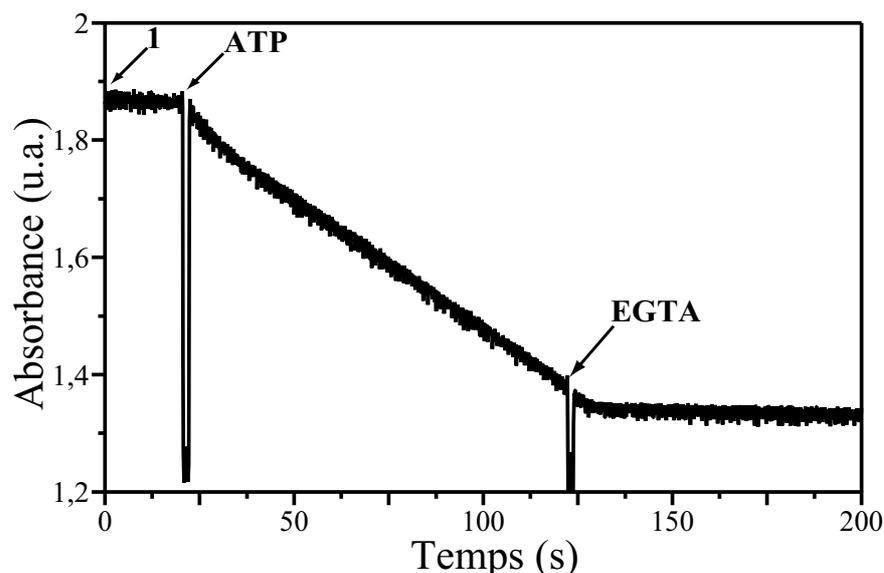


FIG. IV.14 - L'évolution au cours du temps de la quantité de NADH présent dans la solution est mesurée par absorbance à 340 nm sur un spectrophotomètre après addition d'une solution d'ATPase- Ca^{2+} reconstituées. En présence d'ATP, la protéine hydrolyse l'ATP en ADP qui est alors utilisé pour oxyder le NADH en NAD^+ en suivant le schéma réactionnel équation IV.1. Puis en présence d'EGTA, cette réaction est arrêtée. La différence des deux pentes permet d'obtenir l'activité ATPasique de l'ATPase- Ca^{2+} .

contenant l'ATPase- Ca^{2+} sont directement prélevées de la chambre de pousse à l'aide d'une pipette Hamilton, et nous nettoyons les lames ITO en injectant la même solution que celle se trouvant dans la cuvette, le détergent permettant de décoller les vésicules adhérentes sur les lames. La concentration d'ATPase- Ca^{2+} est ensuite déterminée par un dosage spectrophotométrique à 280 nm en présence de 1 % de SDS (dans ces conditions, une densité optique de 1 correspond à une concentration en ATPase- Ca^{2+} de 1 mg/ml). Nous mesurons l'absorbance du NADH à 340 nm en fonction du temps après avoir incorporé à la cuvette, et tout en agitant, 4 mM de NADH puis la solution de GUVs. La réaction est initiée par addition de 1 mM d'ATP puis stoppée par 2,5 mM d'EGTA⁽⁹⁾ qui est un chélateur spécifique des ions Ca^{2+} (voir la Fig. IV.14). Le taux d'ATP hydrolysé (en $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de protéine) peut alors se déduire de la différence des deux pentes obtenues en absence et en présence d'EGTA (*i.e.* lorsque la protéine est active puis passive). En effet, la variation au cours du temps de la concentration de NADH s'obtient à partir du coefficient d'absorption molaire du NADH

⁽⁹⁾EGTA : Ethylène glycol-bis(β -aminoéthyl éther)-N,N,N',N'-tétraacetic acide, $\text{C}_{14}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_{10}$.

$\epsilon_{340\text{ nm}} = 6220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ et de la taille de la cuvette $\ell = 1 \text{ cm}$:

$$\left| \frac{d[\text{NADH}]}{dt} \right| = \frac{1}{\ell \epsilon_{340}} \times \text{pente} \quad (\text{IV.2})$$

ce qui nous permet de mesurer le taux d'ATP hydrolysé (voir Fig. IV.14) :

$$\text{ATP hydrolysé}/\text{min}/\text{mg de protéine} = \frac{60}{[\text{ATPaseCa}^{2+}]} \Delta \left| \frac{d[\text{NADH}]}{dt} \right| \quad (\text{IV.3})$$

avec $\ell = 1 \text{ cm}$ la taille de la cuvette et $[\text{ATPaseCa}^{2+}]$ la concentration de pompes en mg/ml présentes dans le milieu. Il a parfois été utile de vérifier l'état du NADH en ajoutant une quantité connue d'ADP, de l'ordre de $50 \mu\text{M}$, le saut d'absorbance observé permettant d'obtenir directement la correspondance pente \rightarrow quantité d'ATP hydrolysé et de vérifier la calibration. Nous avons alors mesuré sur les GUVs reconstituées une activité ATPasique de $4,1 \mu\text{mol}$ d'ATP consommé/min/mg de protéine, indépendante du rapport lipide /protéine. Cette valeur est seulement 30 % plus faible que l'activité dans le RS natif (mesurée à $6,4 \mu\text{mol}$ d'ATP consommé/min/mg de protéine), indiquant que les différentes étapes de notre procédure de reconstitution n'affectent pas de manière significative l'activité de la protéine. L'utilisation de détergent dans cette expérience est imposée par le fait que l'intégrité des protéines dans la membrane n'est pas maintenue par cette technique. En effet, le transfert des GUVs de la chambre de pousse à la cuvette de mesure ainsi que l'agitation nécessaire pour mesurer l'activité font exploser beaucoup de vésicules. La mesure sans détergent qui nous permettrait de calculer la quantité de protéines ne serait ainsi pas du tout interprétable puisque nous ne saurions pas la proportion de protéines restant dans la membrane des vésicules, par rapport à la proportion de protéines qui ont été solubilisées.

Activité de pompage de calcium

Cependant, bien que cette méthode nous renseigne sur l'état fonctionnel de l'ATPase- Ca^{2+} après tous les traitements plus ou moins invasifs qu'elle a dû subir, aucune information nous est fournie sur son activité réelle dans les GUVs puisque nous solubilisons les protéines dans un détergent qui les dissocie des autres constituants membranaires. Nous avons alors utilisé une sonde fluorescente, Fluo-5N (impermeant form, Molecular Probes Inc., Eugene, OR) ayant une faible affinité avec le calcium que nous avons encapsulée dans les GUVs. Pour cela, nous avons ajouté 20 mM de cette sonde dans la solution d'électroformation. Ensuite, 20 μl des GUVs formées sont transférées dans une cellule d'observation remplie d'une solution de glucose équiosmolaire. En absence d'ATP, l'intensité de fluorescence à l'intérieur des GUVs, observée au microscope confocal avec un objectif $\times 63$, reste à un niveau assez bas. Mais lorsqu'une solution de 1 mM

d'ATP est ajoutée dans la cellule d'observation, nous observons une croissance significative de l'intensité au cours du temps, comme le montre la série d'images (Fig. IV.15) prises à des instants différents.

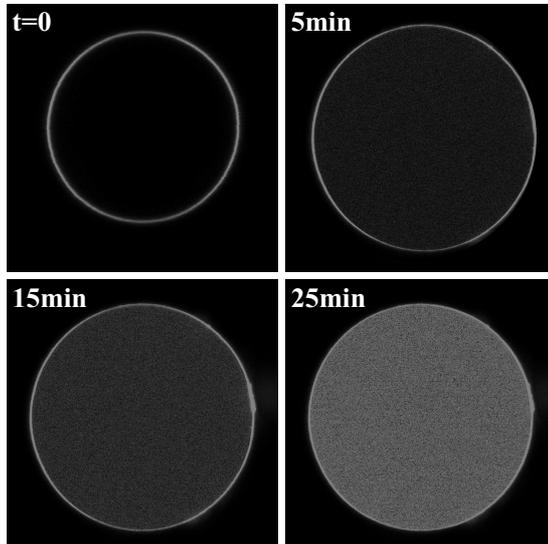


FIG. IV.15 - Images de GUVs (environ $30\ \mu\text{m}$ de diamètre) obtenues en microscopie confocale et contenant l'ATPase- Ca^{2+} et renfermant une sonde à calcium, Fluo-5N, de faible affinité. Nous observons sur cette série d'images, prises aux instants $t = 0, 5, 15$ et 25 min après addition d'ATP, l'augmentation de l'intensité de fluorescence au cours du temps révélant l'activité de pompage de calcium de la protéine.

Même si pour des raisons techniques (liées à l'addition d'ATP dans la cellule d'observation), il a été impossible de suivre la même vésicule à partir de l'instant $t = 0$, correspondant à l'addition d'ATP. Toutefois, toutes les vésicules d'un échantillon ont été produites de manière identique, elles doivent donc en moyenne contenir la même quantité de sondes Fluo-5N et ceci nous est d'ailleurs confirmé en mesurant la fluorescence à l'intérieur d'une dizaine de vésicules à $t = 0$. Dans ce cas, il est tout à fait justifié de dire que la première image de la figure IV.15 représente bien l'état de la vésicule à l'instant $t = 0$ et dont nous avons suivi l'évolution de l'intensité de fluorescence. Ceci prouve le pompage de calcium vers le compartiment luminal des GUVs, dépendant de l'ATP. Il est à noter qu'en ajoutant l'ATP seulement dans le milieu extérieur aux GUVs, nous ne pouvons rendre compte que de l'activité des protéines ayant leur domaine d'activation dirigé vers l'extérieur, de ce fait les Ca^{2+} ne sont pompés que vers l'intérieur.

Remarque sur l'orientation des protéines

Ouvrons une parenthèse pour discuter de l'orientation adoptée par les protéines reconstituées dans les GUVs. Un moyen aurait été de mesurer l'intensité de fluorescence du Fluo-5N au cours du temps afin d'en déduire, à l'aide de la constante de complexation avec le calcium ($K_d = 420\ \mu\text{M}$ dans notre tampon), la quantité de Ca^{2+} pompée au cours du temps. Avec l'activité de l'ATPase- Ca^{2+} dans les GUVs qui est de $8,2\ \mu\text{mol}$ d'ions Ca^{2+} pompés /min/mg de protéine (mesurée à partir de la stœchiométrie de pompage qui est d'une molécule d'ATP

hydrolysée pour deux ions Ca^{2+} pompés), nous aurions pu ainsi remonter à la quantité de protéine qui pompent du cytoplasme au lumen des GUVs et comparer cette quantité avec le nombre de protéines reconstituées. Toutefois, au moment de son addition, l'ATP n'est pas directement distribué de manière homogène dans la chambre ce qui fait que cette mesure est impossible (du moins de cette manière). Pour y remédier, il faudrait utiliser de l'ATP cagée pour obtenir une concentration homogène d'ATP.

Toutefois, en utilisant le même protocole de reconstitution mais cette fois-ci appliqué à la BR, nous avons pu distinguer deux types de population avec une direction de pompage privilégiée. L'expérience a consisté à encapsuler une sonde fluorescente sensible aux variations de pH, la pyranine, dans les GUVs, puis après une illumination de 5 min avec une lampe halogène équipée d'un filtre jaune (nécessaire pour activer la protéine), nous avons pu observer dans deux tiers des cas, une acidification du lumen, *i.e.* un pompage de protons vers l'intérieur des GUVs, et dans le tiers restant, un pompage vers l'extérieur (voir Fig. IV.16). Ceci peut s'interpréter par le fait qu'il existe une direction de pompage privilégiée. De plus, la variation de fluorescence s'effectue sur des échelles de temps beaucoup plus longues dans la population minoritaire. Il semble donc que la répartition ne soit pas exactement symétrique et que la BR adopte de préférence une orientation out-in (mais il est impossible de donner une valeur précise de cette orientation).

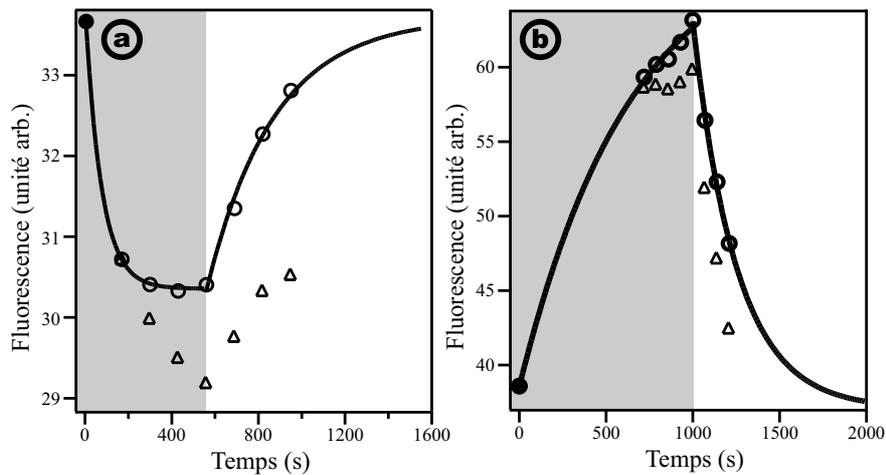


FIG. IV.16 - Intensité de fluorescence d'une sonde sensible aux variations de pH, la pyranine, encapsulée dans les GUVs contenant de la bactériorhodopsine (BR). Celles-ci sont préparées dans un rapport SOPC/BR de 7 w/w. Dans les parties grisées, la BR est activée par illumination par une lampe halogène équipée d'un filtre jaune ce qui se traduit dans deux tiers des vésicules par un pompage out→in (a) et dans le tiers restant à un pompage in→out (b) de protons. Les symboles ○ correspondent aux valeurs de l'intensité corrigées du photobleaching comparativement aux valeurs mesurées (▲). Le symbole ● correspond à la valeur initiale (qu'il n'est pas possible d'observer dans nos conditions expérimentales) extrapolée par rapport à l'état finale après relaxation.

Ces observations n'ont aucune raison de changer pour d'autres protéines comme l'ATPase- Ca^{2+} . Il est donc tout à fait justifié de considérer que cette protéine s'oriente préférentiellement avec son énorme tête du côté cytosolique mais qu'une partie de protéines soit aussi orientée dans la direction opposée.

IV.2.4 Conclusion

Les GUVs, comme nous l'avons vu, constituent un système modèle de membranes biologiques, puisqu'elles sont appropriées pour l'observation sous un microscope optique et possèdent une courbure voisine des cellules. De plus, la manipulation de ces vésicules géantes par des pinces optiques ou des micropipettes donne l'opportunité d'observer une vésicule soumise à des perturbations mécaniques, thermiques et/ou chimiques contrôlées. Tout cela a engendré d'importantes applications dans l'analyse du comportement élastique des bicouches, des interactions entre membranes et entre membrane-particule colloïdale, des transitions de phase, de l'adhésion des vésicules sur divers supports, les effets du transport de substances biochimiquement actives. Cependant, la fragilité des protéines et les procédures invasives de préparations des vésicules limitent l'utilisation de ces procédures dans la reconstitution des protéines. Notre méthode de préparation est relativement simple et devrait en principe être généralisable à toutes les protéines pour lesquelles le protocole de reconstitution en SUVs est applicable.

Outre la préservation de l'activité des protéines, notre méthode de reconstitution vérifie d'autres critères, comme l'efficacité et l'homogénéité de l'insertion des protéines dans des structures unilamellaires. De tels systèmes reconstitués devraient jouer un rôle central pour identifier et caractériser les mécanismes d'action des protéines membranaires avec une fonction de transport vectoriel. De plus, la possibilité d'avoir une concentration importante et contrôlée de protéines dans une vésicule serait un moyen d'analyser l'adhésion de membranes décorées [Abdelghani-Jacquin et al., 2002], la propulsion biomimétique des bactéries [Giardini et al., 2002], ou les effets de l'activité enzymatique sur les fluctuations de membrane (comme nous le verrons dans le chapitre suivant).

À plus long terme, nous pouvons aussi considérer des applications d'intérêt biotechnologique, comme l'utilisation de pompes et de canaux ioniques pour contrôler la composition ionique à l'intérieur des GUVs, utilisées comme micro-réacteurs chimiques [Karlsson et al., 2001]. Le même type d'étude a été récemment effectué pour la préparation de bicouches supportées et fonctionnalisées pour réaliser des bio-senseurs [Barth et al., 2003].

Chapitre V

Mesure des fluctuations de membranes actives : technique des micropipettes

Dans la perspective de caractériser complètement les vésicules, il a été nécessaire de trouver un moyen de sonder leurs propriétés mécaniques et thermiques, qui permet non seulement d'appliquer des contraintes contrôlées mais aussi de mesurer ou de contrôler la tension exercée. La technique des micropipettes, introduite par Rand et Burton [Rand and Burton, 1964] et plus tard perfectionnée par Evans *et al.* [Evans and Hochmuth, 1977, Kwok and Evans, 1981], est alors apparue comme une technique adaptée pour mesurer des modules élastiques. L'autre technique, développée à cette fin, est la détection de contours en temps réel en utilisant la vidéomicroscopie [Pécéréaux et al., 2004]. Grâce à l'analyse des fluctuations de contour de la vésicule, celle-ci donne alors accès aux variations de l'amplitude des différents modes de Fourier et ainsi au spectre de fluctuations. Elle est toutefois limitée par la longueur d'onde optique et n'est donc pas sensible aux longueurs d'ondes sub-optiques contrairement à la technique des micropipettes qui, elle, y est sensible. Des mesures directes de propriétés des membranes ont donc été possible grâce essentiellement au développement de ces techniques mais aussi à la mise au point de protocoles contrôlés de formation de vésicules géantes, observables en microscopie optique.

Dans notre cas, nous avons utilisé la technique des micropipettes, sensibles aux échelles de longueurs sub-optiques, pour mesurer l'effet de l'activité de l'ATPase- Ca^{2+} sur les fluctuations de membrane. Cette protéine a été reconstituée dans des vésicules géantes par le protocole décrit dans le chapitre précédent. Cette étude s'inscrit dans le prolongement des expériences de micropipette réalisées par J.-B. Manneville sur une autre protéine membranaire, la bactériorhodopsine (BR) qui est une pompe à protons photoactivable. Il a pu mettre en évidence une large amplification des fluctuations de la vésicule liée à l'activité de la protéine

[Manneville et al., 1999]. La comparaison avec le modèle théorique suggère que ce sont les termes de dipôle de force hydrodynamique qui doivent dominer dans ces expériences par rapport aux forces de perméation actives, en raison de la très faible perméation des membranes au solvant. Ce résultat a été interprété par le fait que les changements conformationnels de la protéine pendant son photocycle induisent des mouvements supplémentaires dans le fluide environnant qui se répercutent sur la membrane en amplifiant ses fluctuations de manière substantielle [Manneville et al., 2001]. De plus, cette expérience a donné un bon ordre de grandeur pour les mouvements conformationnels de la BR dont l'amplitude est de l'ordre de $3,5 \text{ \AA}$ (qui correspond au pivotement de l'hélice α). Pour l'ATPase- Ca^{2+} , l'amplitude des changements conformationnels (voir le paragraphe IV.1) au cours de son cycle enzymatique est de l'ordre de 40 \AA si l'on s'en remet aux deux structures 3D connues. Nous nous attendons donc à observer des effets de l'activité beaucoup plus important sur les fluctuations, comparativement aux effets induits par la BR.

V.1 Principe de la technique des micropipettes

Lorsqu'une vésicule fluctue sous l'effet de l'agitation thermique, une partie de son aire réelle est stockée dans les fluctuations (voir le paragraphe II.2). En appliquant une tension à la membrane par aspiration dans une micropipette, on peut augmenter son aire visible (*i.e.* son aire projetée) et ainsi « défroisser » mécaniquement la membrane. La différence de pression appliquée à la vésicule géante est directement reliée à la tension de membrane par la formule de Laplace. À partir des changements de la longueur de membrane (appelée langue) pénétrant à l'intérieur de la micropipette, on mesure très précisément les variations de surface de la vésicule par de simples considérations géométriques.

V.1.1 Montage expérimental

Le montage, présenté sur la Fig. V.1, est réalisé sur un microscope inversé (Axiovert 135, Zeiss) en contraste interférentiel différentiel (DIC) équipé d'un objectif à huile $\times 63$ Plan-Apochromat ($\text{NA} = 1,4$). La technique DIC est basée sur un dédoublement du faisceau lumineux en deux ondes par un Wollaston (= prisme de Nomarski modifié), décalées latéralement d'une distance d . Le dédoublement de l'image est invisible quand d est choisi bien en dessous de la résolution du microscope. Par contre, la réflexion sur des objets de phase déforme les deux surfaces d'ondes, dont on visualise les interférences différentielles entre polariseur et analyseur croisés. La source de lumière utilisée est une lampe halogène (100 W) dont le faisceau est polarisé rectilignement, puis dédoublé par un biprisme de Nomarski. Les deux rayons émergents possèdent, après réflexion sur la surface de la vésicule, entre eux une différence de marche $\delta = 2d\partial_x z$. Cette méthode

d'imagerie réalise donc un opérateur gradient sur la surface réfléchissante, dans une direction x qui est liée à l'orientation des axes du biprisme. En déplaçant ce dernier, on varie la direction de l'ombrage et l'on ajuste la teinte du fond.

Les GUVs contenant l'ATPase- Ca^{2+} sont formées en suivant le protocole décrit dans le paragraphe IV.2. Pour les GUVs purement lipidiques, elles sont préparées sur le même principe : les SUVs sont directement déposées sur des lames ITO, puis séchées partiellement sous atmosphère contrôlée et enfin ces lames ITO sont placées sous champ électrique. Les vésicules ainsi obtenues (qu'elles contiennent la protéine ou non) sont transférées dans une cellule d'observation remplie d'une solution à 0,1 Osm contenant du glucose, 5 mM Mops-Tris (pH=7,0), 5 mM MgCl_2 et 0,5 mM CaCl_2 . Un des côtés de la cellule est laissé ouvert pour faciliter le passage de la micropipette et la lamelle du dessous est traitée au mal-PEG afin d'éviter l'éclatement et l'adhésion de vésicules après sédimentation. La cellule est ensuite disposée sur la platine du microscope. Pour limiter l'évaporation, nous travaillons dans une pièce climatisée à 20 °C et la température est contrôlée avant chaque mesure. De plus, nous plaçons la cellule dans une enceinte saturée en humidité. Toutefois, chaque mesure se fait sur une durée assez courte (moins de 5 min) et durant ce laps de temps, nous pouvons considérer que l'évaporation est pratiquement nulle.

Le système de micromanipulation a été décrit en détail dans [Evans, 1989] et dans [Luisi and Walde, 2000, p.103-147]. Brièvement, les micropipettes sont étirées à partir d'un capillaire en verre de 1 mm de diamètre (borosilicate GC 100T-10, Phymep) par une étireuse automatique (P-97, Sutter Instruments Co.). Le bout de la micropipette est coupé par fracture au diamètre interne désiré (de 3 à 5 μm) à l'aide d'une microforge. La micropipette est alors traitée au minimum 1 h à la caséine (2 mM dans la même solution de glucose définie plus haut) pour empêcher l'adhérence de la vésicule lors de l'aspiration, ce qui pourrait fausser la mesure. Celle-ci est maintenue par un porte-pipette positionné à l'extrémité d'un micromanipulateur qui permet de déplacer précisément la micropipette dans les directions axiale, latérale et verticale.

Un manomètre constitué d'un réservoir d'eau est relié à la pipette et peut se déplacer verticalement ce qui exerce une différence de pression entre l'intérieur et l'extérieur de la pipette. Pour déterminer la pression de succion, ce réservoir est connecté à un autre récipient d'eau fixe via une membrane métallique qui se déplace sous l'effet de la différence de pression entre ces deux récipients. Ce déplacement est alors transformé en une différence de potentiel électrique par un transducteur de pression (Validyne, Northridge, CA). Nous étalonnons systématiquement le capteur de pression sur chaque micropipette pour déterminer la relation de proportionnalité entre la tension délivrée et la différence de pression. La gamme de pression que nous pouvons appliquer va de 0,1 Pa (soit $\sim 1 \mu\text{m}$ d'eau) à 10^3 Pa (~ 10 cm d'eau).

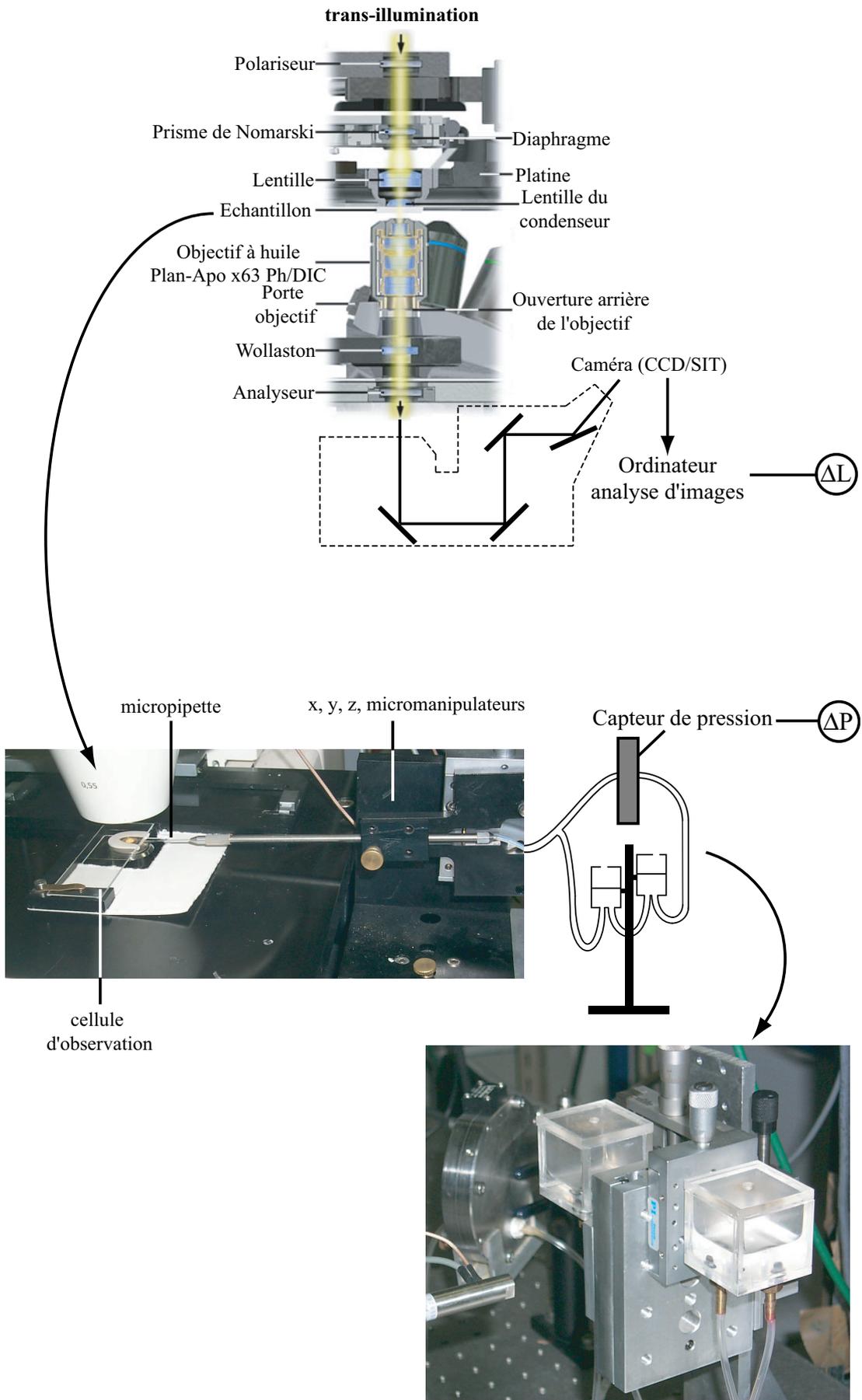


FIG. V.1 - Schéma du montage.

V.1.2 Procédure expérimentale

Les changements de l'aire de la vésicule sont calculés à partir de la longueur de la langue à l'intérieur de la pipette L_p en utilisant des relations géométriques pour l'aire et le volume totale de la vésicule aspirée. Du fait qu'une légère dépression hydrostatique met la vésicule sous tension et que celle-ci adopte une forme sphérique, ces relations dépendent uniquement du diamètre de la portion sphérique de la vésicule D_v , du diamètre interne de la pipette D_p et de la longueur projetée de la langue L_p (voir la Fig. V.2). Nous utilisons des solutions de même osmolarité à l'intérieur et à l'extérieur de la vésicule, et de ce fait, la pression osmotique est la même de chaque côté de la membrane (mis à part l'évaporation qui peut induire une légère variation). De plus, le nombre de lipides dans chaque vésicule peut être supposé constant.

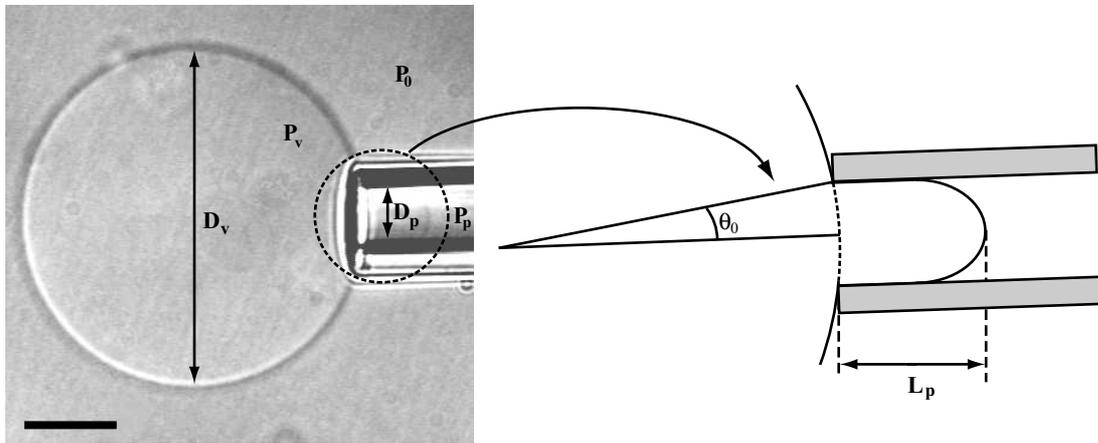


FIG. V.2 - Image d'une *GUV* aspirée par une micropipette et observée en DIC. À droite est représenté le contour apparent de la langue. La barre correspond à $5\ \mu\text{m}$.

Mesure de la tension

Les différences de pression d'une part entre l'intérieur de la vésicule (P_v) et l'intérieur de la pipette (P_p), et d'autre part entre l'intérieur de la vésicule et le milieu extérieur (P_0) sont reliées à la tension de membrane σ par la loi de Laplace :

$$P_v - P_p = \frac{4\sigma}{D_p} \quad \text{et} \quad P_v - P_0 = \frac{4\sigma}{D_v}$$

La tension est uniforme sur la vésicule. Ainsi, nous pouvons obtenir la tension à partir de la différence de pression mesurée par le transducteur de pression

$\Delta P = P_p - P_0 :$

$$\sigma = \frac{D_p}{4(1 - D_p/D_v)} \Delta P \quad (\text{V.1})$$

Mesure de l'excès d'aire

Une vésicule aspirée se compose de deux parties. La partie à l'intérieur de la pipette est cylindrique et se termine par une calotte sphérique, son aire et son volume s'obtiennent assez facilement :

$$A_p = \pi \frac{D_p^2}{2} + \pi D_p \left(L_p - \frac{D_p}{2} \right) \quad \text{et} \quad V_p = \pi \frac{D_p^3}{12} + \pi \frac{D_p^2}{4} \left(L_p - \frac{D_p}{2} \right)$$

Pour la région à l'extérieur de la pipette, il s'agit d'une sphère amputée d'une calotte sphérique d'angle θ_0 au sommet⁽¹⁾

$$A_v = \pi \frac{D_v^2}{2} (1 + \cos(\theta_0)) \quad \text{et} \quad V_v = \pi \frac{D_v^3}{24} (2 + 3 \cos(\theta_0) - \cos^3(\theta_0))$$

avec $\sin(\theta_0) = D_p/D_v$. Le volume étant supposé constant $V_p + V_v = \pi D_v^3/6$, nous obtenons à l'ordre le plus bas la variation de surface entre l'état aspiré $A = A_p + A_v$ et l'état libre $A_0 = \pi D_v^2$:

$$\frac{A - A_0}{A_0} \approx \frac{(D_p/D_v)^2 - (D_p/D_v)^3}{D_p} L_p \quad (\text{V.2})$$

Les dimensions de la vésicule, de la pipette et de la longueur de la langue sont déterminées à partir d'un traitement d'images⁽²⁾. Celui-ci consiste à convoluer l'image par un filtre médian 5×5 (matrice constituée de 1 qui effectue un lissage) puis par un filtre laplacien 5×5 (amplifiant fortement les variations de niveaux de gris). Ensuite, il suffit de tracer le profil d'intensité sur une droite passant par le milieu de la pipette (voir Fig. V.3), la comparaison avec l'image initiale permet alors de déterminer le pic correspondant à la position de la langue. À partir de ces mesures, nous avons accès précisément à la variation relative d'excès de surface $\alpha_0 - \alpha = (A - A_0)/A_0$ pour chaque déplacement L_p et à partir d'une référence L_{p0} correspondant à l'aspiration la plus faible. Il est impossible de connaître la tension et l'excès d'aire de la vésicule dans son état libre. Par contre, nous pouvons définir un état de référence correspondant à la plus faible aspiration applicable à la vésicule [Evans and Rawicz, 1990]. Cet état est alors défini par la pression P_0 minimale nécessaire pour aspirer une longueur L_{p0} de membrane dans la pipette. Toutes les mesures sur cette vésicule sont ensuite obtenues à partir de cet état de

⁽¹⁾Pour mesurer le volume, il suffit d'additionner le volume : $\frac{\pi}{12} D_v^3 \int_{\theta_0}^{\pi} \sin(\theta) d\theta$ au volume du cône d'angle θ_0 : $\frac{\pi}{24} D_v^3 \cos(\theta_0) (1 - \cos^2(\theta_0))$.

⁽²⁾Au delà de sa représentation visuelle, une image est un tableau à deux entrées. L'analyse d'images consiste alors à effectuer des opérations arithmétiques sur les valeurs des pixels.

référence : $\Delta L_p = L_p - L_{p0}$ et $\Delta P = P - P_0$. Nous avons vu dans le paragraphe II.3.1 que pour $\sigma \ll \kappa \Lambda_0^2 \approx 10^{-3} \text{ N/m}$, la variation d'excès d'aire par rapport à cet état de référence peut être reliée, dans le cas d'une membrane purement lipidique (donc sans inclusion), à la tension par :

$$\alpha_0 - \alpha \simeq \frac{k_B T}{8\pi\kappa} \ln \left(\frac{\sigma}{\sigma_0} \right) + c \times \frac{\sigma - \sigma_0}{K_a} \quad (\text{V.3})$$

avec une constante $c = 1 + \alpha_m$ proche de l'unité [Fournier et al., 2001]. C'est cette relation (quelque peu modifiée selon les auteurs) qui a été utilisée pour fitter les expériences de micropipette et a permis de mesurer les coefficients élastiques κ et K_a [Kwok and Evans, 1981, Evans and Rawicz, 1990, Olbrich et al., 2000, Rawicz et al., 2000]. Par contre dans notre cas d'étude, nous nous intéressons essentiellement au régime des fluctuations, c'est-à-dire des faibles tensions, et pour lequel l'expression de $\alpha_0 - \alpha$ se réduit à :

$$\alpha_0 - \alpha \simeq \frac{k_B T}{8\pi\kappa} \ln \left(\frac{\sigma}{\sigma_0} \right) \quad (\text{V.4})$$

Remarques importantes

❶ La vésicule doit être assez fluctuante, donc pas trop tendue dans son état libre. Pour cela, nous effectuons à plusieurs reprises une aspiration et une éjection de la vésicule ce qui permet aussi d'éliminer les vésicules trop fragiles.

❷ Le diamètre de la vésicule doit être au minimum 4 fois plus grand que le diamètre de la micropipette pour que l'on puisse avoir accès au régime des faibles déformations qui nous intéresse pour mesurer le module de courbure κ .

❸ Dans le régime des fortes tensions, nous avons vu l'apparition d'un tube reliant une partie cylindrique dans la pipette au reste de la vésicule lié au cisaillement sur les parois de la pipette ou à des défauts dans la membrane (voir Fig. V.4). Cette instabilité n'est pas visible, dans tous les cas, directement au microscope mais les courbes d'excès d'aire en fonction de la tension permettent de les distinguer et donc de les éliminer.

❹ À partir du moment où nous injectons l'ATP dans la cellule, les temps de mesure dans cette cellule doivent être limités à 1/2 h pour être sûr que les effets que nous mesurons sont effectivement liés au pompage d'ions Ca^{2+} par l'ATPase- Ca^{2+} . Au-delà de ce temps, la différence de concentration en ions entre l'intérieur et l'extérieur des vésicules pourrait être suffisamment grande pour bloquer l'activité de la protéine.

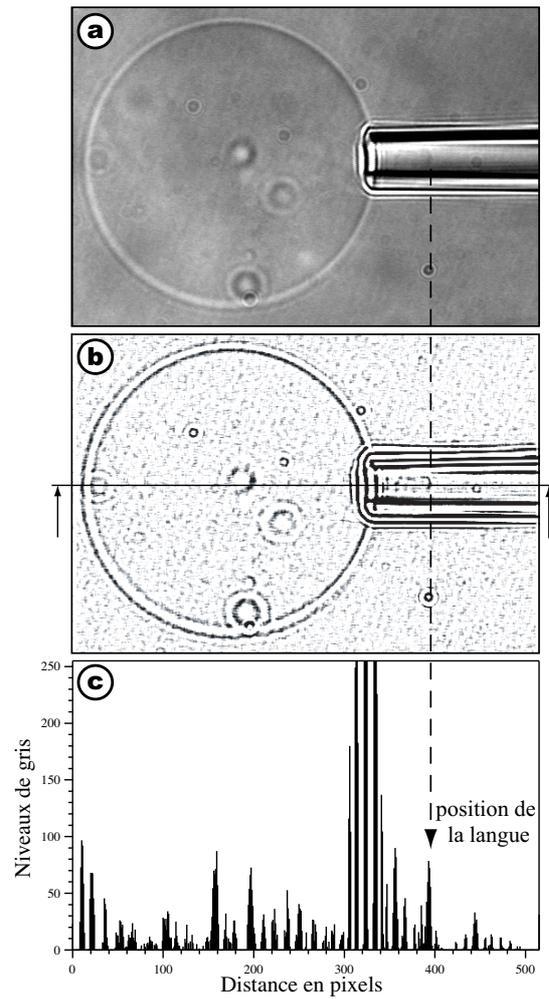


FIG. V.3 - Méthode de mesure des rayons de la vésicule et de la pipette ainsi que de la longueur de la langue L_p . (a) Image en niveaux de gris. (b) convolution avec un filtre médian 5×5 puis un filtre laplacien 5×5 . (c) Profil d'intensité de la droite horizontale indiquée par des flèches sur l'image (b).

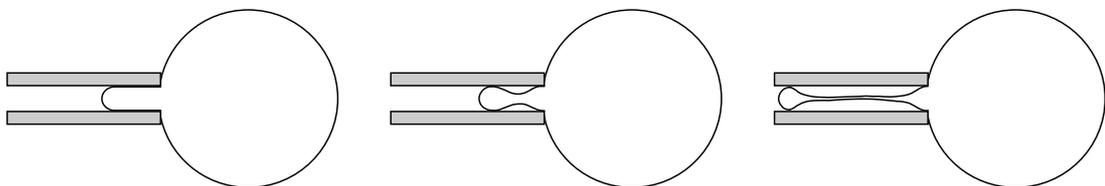


FIG. V.4 - Apparition d'un tube de membrane lié au cisaillement sur les parois de la pipette ou à des défauts dans la membrane.

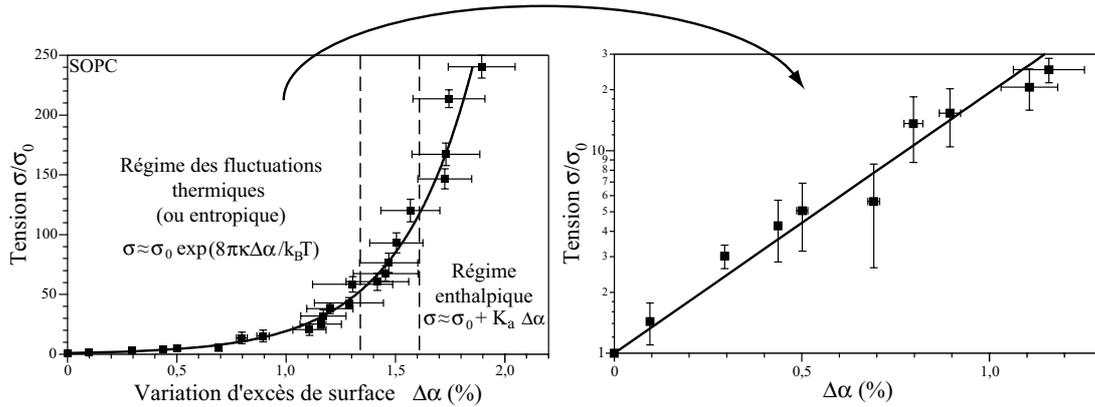


FIG. V.5 - Tension de membrane en fonction de la variation d'excès d'aire $\Delta\alpha$ pour une vésicule SOPC de $43\mu\text{m}$ de diamètre (à gauche). Les pointillés séparent les deux régimes : entropique (ou des fluctuations thermiques) et enthalpique. Les valeurs expérimentales (■) s'accordent bien avec l'expression (V.3) de [Fournier et al., 2001] en prenant $\kappa_0 = (11,9 \pm 0,2) \times k_B T$ et $K_a = 313,0 \pm 45,1 \text{ mJ/m}^2$. À droite est représentée la tension en fonction de $\Delta\alpha$ dans le régime entropique dont on peut fitter par une droite, en échelle semi-logarithmique.

V.2 Analyses des mesures de micropipettes

V.2.1 Vésicules purement lipidique

À partir de la mesure de la longueur de la langue L_p et de la pression de succion exercée sur la vésicule (voir Fig. V.3), nous en déduisons la tension σ et la variation relative d'excès d'aire $\Delta\alpha = \alpha_0 - \alpha$. Le tracé de la tension normalisée par la tension minimale σ_0 en fonction de $\Delta\alpha$ permet de déterminer le module de courbure κ et le module de compressibilité K_a en utilisant l'expression (V.3), avec la constante $c = 1$, adaptée de [Fournier et al., 2001]. La figure V.5 (à gauche) montre l'exemple d'une de ces courbes obtenue pour des GUVs SOPC dans laquelle il est possible de distinguer deux régimes : dans le régime des faibles tensions (régime entropique), σ varie de manière exponentielle avec $\Delta\alpha$, tandis que dans le régime des fortes tensions (régime enthalpique) cette variation devient linéaire avec une pente de $313,0 \pm 45,1 \text{ mJ/m}^2$ correspondant au module de compressibilité K_a . Pour le régime entropique, la courbe σ en fonction de $\Delta\alpha$ en échelle semi-logarithmique (Fig. V.5 à droite) peut être fittée par une droite de pente⁽³⁾ $\frac{8\pi\kappa_0}{k_B T} = 296,6$ avec une erreur standard de $4,69$, ce qui donne un module de courbure de $\kappa_0 = (11,9 \pm 0,2) \times k_B T$. Pour déterminer le cross-over qui sépare

⁽³⁾Nous noterons dans ce chapitre κ_0 le module de courbure d'une vésicule contenant uniquement des lipides.

ces deux régimes, il suffit donc de tracer la courbe σ en fonction de $\Delta\alpha$ en échelle semi-logarithmique.

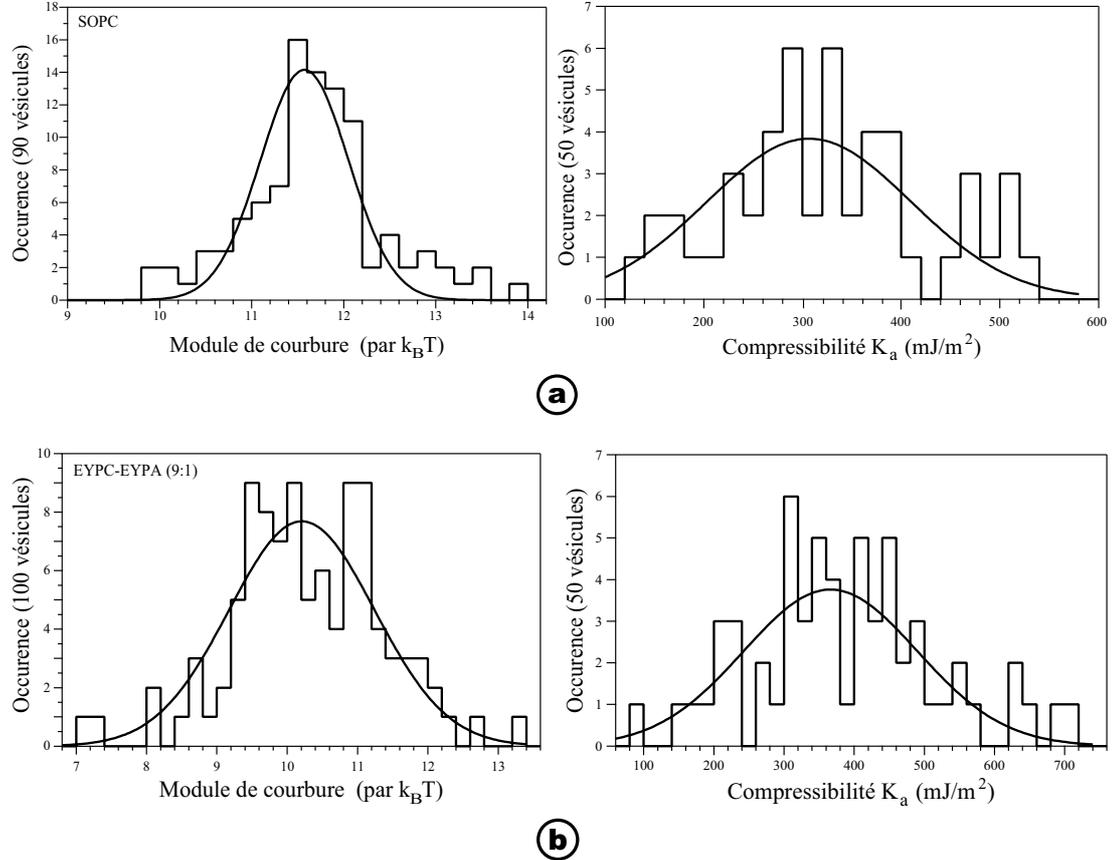


FIG. V.6 - Distributions des valeurs du module de courbure κ (à gauche) et du module de compressibilité K_a (à droite) pour des vésicules purement lipidiques SOPC (a) et EYPC-EYPA 9:1 (b). Ces distributions sont proches d'une distribution gaussienne avec les valeurs suivantes : $\kappa_0 = (11,6 \pm 0,7) \times k_B T$ et $K_a = 306,6 \pm 146,4 mJ/m^2$ pour SOPC, $\kappa_0 = (10,2 \pm 1,4) \times k_B T$ et $K_a = 366,1 \pm 175,1 mJ/m^2$ pour EYPC-EYPA.

Cette expérience a été reproduite sur de nombreuses vésicules différentes de SOPC pour obtenir une bonne statistique : 90 vésicules ont permis la mesure du module de courbure, mais seulement dans 50 de ces vésicules, nous avons pu mesurer en plus un module de compressibilité car nous n'avons pas exercé une tension assez forte pour sonder le régime enthalpique. Les distributions des modules de courbure κ_0 et de compressibilité K_a pour des vésicules SOPC sont représentées sur la figure V.6(a) et correspondent approximativement à une distribution gaussienne centrée autour de $\kappa_0 = 11,6 \times k_B T$ avec une largeur à mi-hauteur de $0,7 \times k_B T$, et $K_a = 306,6 mJ/m^2$ avec une largeur à mi-hauteur de

146,4 mJ/m² respectivement. Cette valeur du module de courbure est assez semblable à la valeur mesurée par N. Fa [Fa, 2003] en utilisant la même technique, elle est cependant presque deux fois plus faible que celle obtenue par Evans et Rawicz [Evans and Rawicz, 1990]. Nous n'avons pas d'explication sur l'origine de cette différence entre nos valeurs et celles d'Evans *et al.*. En ce qui concerne le module de compressibilité, la distribution est assez large ce qui veut dire que l'erreur sur la valeur moyenne est très importante (environ 50 %) rendant très délicate l'interprétation de ce résultat. Nous pouvons simplement remarquer que cette valeur moyenne est proche de la valeur de 235 ± 14 J/m² mesurée par Rawicz *et al.* [Rawicz et al., 2000].

Ce même type d'expériences a été effectué sur des vésicules EYPC-EYPA (9:1). L'ajustement avec une distribution gaussienne donne un module de courbure de $\kappa_0 = (10,2 \pm 1,4) \times k_B T$ et un module de compressibilité de $K_a = 366,1 \pm 175,1$ mJ/m² (Fig. V.6(b)). Jusqu'à présent, aucune mesure de modules élastiques n'avait été réalisée sur ce type de composition lipidique. Nous pouvons toutefois comparer notre valeur du module de courbure avec celle obtenue sur des vésicules purement EYPC (autour de $10 \times k_B T$ voir à ce propos le tableau II.1) et nous remarquons qu'elles sont assez comparables.

Dans certaines de nos mesures, nous avons eu besoin de mesurer les pentes des courbes tension-excès de surface tout d'abord en augmentant la pression puis en diminuant la pression sur une même vésicule pour suivre, par exemple, l'effet de l'addition d'un élément supplémentaire (ATP, EGTA,...) dans le solvant. Aussi a-t-on mesuré les variations de l'excès d'aire d'une vésicule par augmentation (trajet "aller") puis par diminution (trajet "retour") de la pression, et donc de la tension. Nous avons tracé ces courbes sur le même graphique en adimensionnant la tension par la tension de référence σ_0 prise au début de l'expérience. Nous n'avons pas observé de changement significatif sur la valeur de la pente. Par contre, le fit de la courbe "retour" par l'expression (V.4) ne donne pas, contrairement au cas de la courbe "aller", une valeur de $\sigma/\sigma_0 = 1$ pour $\Delta\alpha = 0$. En d'autres termes, la tension de référence est décalée entre ces deux courbes bien qu'il s'agisse de la même vésicule. Plusieurs raisons peuvent être avancées pour expliquer cela. Premièrement, la tension exercée par l'aspiration peut générer l'ouverture de pores⁽⁴⁾ par lesquels le fluide intérieur de la vésicule peut s'échapper et du coup, le volume interne de la vésicule diminue. Deuxièmement, au cours de l'aspiration, nous avons dû déplier des tubes ou tout autre structure tubulaire, mais lorsque nous relâchons la tension, ces structures, coûteuses en énergie de courbure, ne se reforment pas et l'aire fournie par celles-ci reste dépliée. Pour nos mesures faites sur une même vésicule, il faudra tenir compte de cette remarque et prendre soin d'adimensionner les trajets "aller" et "retour" avec des tensions de référence différentes.

⁽⁴⁾L'ouverture de pores a été observée pour des tensions de l'ordre de 10^{-5} J/m² [Sandre, 2000, Karatekin et al., 2003].

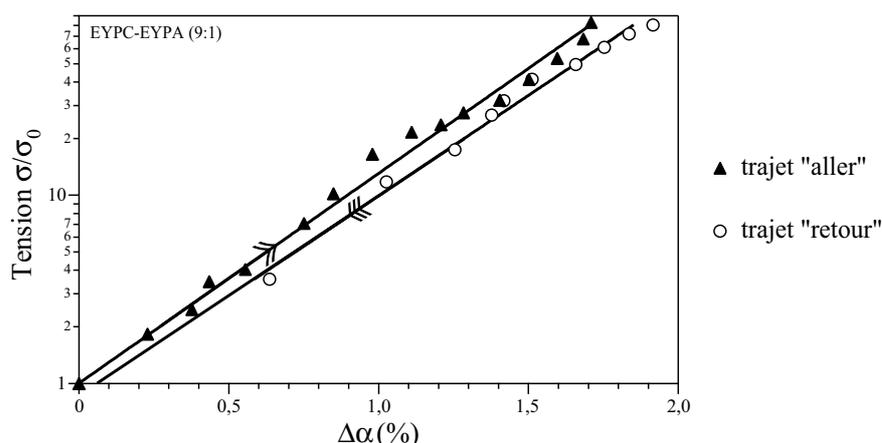


FIG. V.7 - Comparaison des courbes de tension σ/σ_0 en fonction de la variation d'excès d'aire pour une augmentation de la pression (\blacktriangle) puis pour une diminution de la pression (\circ) sur la même vésicule EYPC-EYPA (9:1). Les flèches indiquent le sens de parcours de nos mesures. Les pentes sont pratiquement identiques : $8\pi\kappa_0/k_B T = 256,8 \pm 9,1$ pour l'aller et $245,8 \pm 10,2$ pour le retour. Mais la valeur de la tension de référence σ_0 n'est plus la même au retour.

Avec notre technique, nous avons obtenu une bonne précision dans le domaine des faibles tensions ce qui nous a permis de mesurer assez précisément le module de courbure. Pour sonder la région des fortes tensions, il faut appliquer de fortes dépressions dans la micropipette, mais le capteur de pression que nous avons utilisé sature assez vite lorsque la différence de pression entre les deux réservoirs d'eau devient trop forte, le maximum étant atteint pour 0,22 cm d'eau. Ceci explique le peu de points expérimentaux qui se situent dans le régime enthalpique (voir Fig. V.5). De plus, l'apparition de tube (voir Fig. V.4) essentiellement dans ce régime des fortes tensions a fortement limité la mesure de K_a . Dans ce qui suit, nous nous sommes donc plus particulièrement intéressés au régime entropique et nous avons donc fitté nos courbes expérimentales σ en fonction de $\Delta\alpha$ avec seulement le terme logarithmique de la relation (V.3).

V.2.2 Effet de l'incorporation de l'ATPase- Ca^{2+}

Nous allons voir si la présence de l'ATPase- Ca^{2+} dans la membrane provoque des effets sur le module de courbure. Pour cela, nous avons comparé uniquement les modules de courbure mesurés sur des GUVs purement lipidiques et sur des GUVs contenant différentes proportions d'ATPase- Ca^{2+} (voir Fig. V.8(a)). Pour rendre le graphique plus lisible, nous n'avons pas ajouté les erreurs sur les mesures, mais elles sont tout de même prises en compte dans la valeur du module de courbure. Dans ce dernier cas, nous avons veillé toutefois à ne pas ajouter d'ATP

à la solution de glucose pour ne pas activer la protéine. Nous n'avons pas observé d'effet notable sur les modules de compressibilité par la présence de protéines dans la membrane lié sans doute à la précision des expériences.

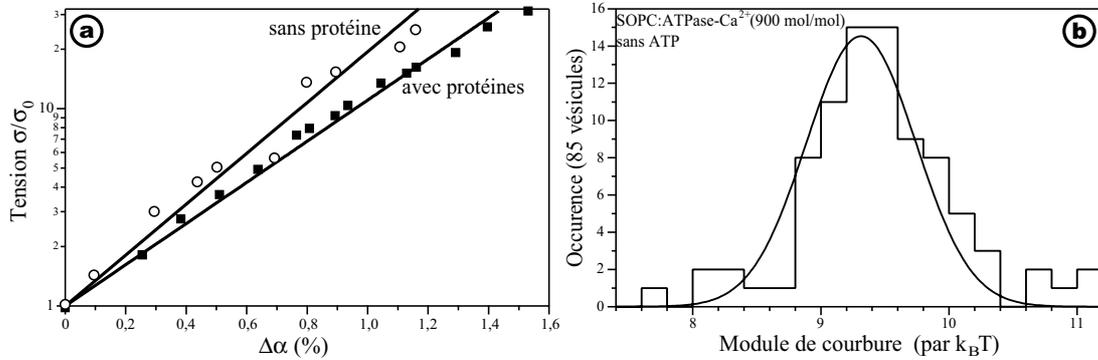


FIG. V.8 - Effet de l'incorporation de l'ATPase-Ca²⁺. (a) Tension en fonction de la variation d'excès d'aire en échelle semi-logarithmique d'une vésicule purement SOPC (○) et d'une vésicule SOPC contenant l'ATPase-Ca²⁺ dans un rapport lipide/protéine de 900 mol/mol en l'absence d'ATP (■). Les ajustements linéaires donnent un module de courbure de $\kappa_0 = (11,9 \pm 0,2) \times k_B T$ pour SOPC et $\kappa_p = (9,6 \pm 0,3) \times k_B T$ pour SOPC :ATPase-Ca²⁺. (b) Distribution des valeurs du module de courbure κ_p pour 85 vésicules SOPC:ATPase-Ca²⁺ (900:1 mol/mol) en l'absence d'ATP. L'ajustement par une distribution gaussienne donne une valeur moyenne de $\kappa_p = 9,3 \times k_B T$ avec une largeur à mi-hauteur de $0,6 \times k_B T$.

Pour 85 GUVs SOPC avec l'ATPase-Ca²⁺ (dans un rapport lipide/protéine de 900 mol/mol), nous obtenons une valeur moyenne du module de courbure⁽⁵⁾ de $\kappa_p = 9,3 \pm 0,6 \times k_B T$ (voir Fig. V.8(b)), correspondant à une diminution par rapport aux GUVs purement SOPC de $\Delta\kappa = \kappa_0 - \kappa_p = 2,2 \times k_B T$. Nous observons donc une dépendance assez significative du module de courbure en fonction de la densité de protéines.

De même, nous pouvons mesurer l'effet de la protéine sur des vésicules EYPC-EYPA (9:1), en faisant varier le rapport protéine/lipide. Tous les résultats sont regroupés dans le tableau V.1.

V.2.3 Effet de l'activité de l'ATPase-Ca²⁺

Pour tester l'effet du pompage de l'ATPase-Ca²⁺, nous avons comparé les pentes $\kappa/k_B T$ (divisées par le facteur 8π) des courbes $\ln(\sigma/\sigma_0)$ en fonction de $\Delta\alpha$ pour des GUVs contenant la protéine dans un milieu sans et avec d'ATP (à 1 mM).

⁽⁵⁾Nous noterons κ_p le module de courbure renormalisé d'une vésicule contenant la protéine dans son état non activé.

	Rapport protéine/lipide (mol/mol)			
	0	1/1700	1/1300	1/900
EYPC-EYPA (9:1 mol/mol)				
Module de courbure (par $k_B T$) :	$\kappa_0 = 10,2$	$\kappa_p = 9,5$	$\kappa_p = 9,3$	$\kappa_p = 9,0$
Déviati on standard (par $k_B T$) :	$\pm 1,4$	$\pm 1,1$	$\pm 1,0$	$\pm 1,5$
$\Delta\kappa = \kappa_0 - \kappa_p$ (par $k_B T$)	–	0,7	0,9	1,2
SOPC				
Module de courbure (par $k_B T$) :	$\kappa_0 = 11,6$	–	$\kappa_p = 10,2$	$\kappa_p = 9,3$
Déviati on standard (par $k_B T$) :	$\pm 0,7$	–	$\pm 1,1$	$\pm 0,6$
$\Delta\kappa = \kappa_0 - \kappa_p$ (par $k_B T$)	–	–	1,4	2,2

TAB. V.1 - Effet de l'incorporation de l'ATPase- Ca^{2+} sur le module de courbure dans différents rapports de protéine/EYPC-EYPA ou SOPC. Nous avons noté κ_0 le module de courbure en l'absence de protéines et κ_p le module renormalisé par la présence des protéines.

Les expériences ont été de deux sortes. En premier lieu, nous avons effectué une série de mesures sur une population de vésicules en absence d'ATP, puis après avoir changé de solution de vésicules, en présence d'ATP. La comparaison entre les deux modules obtenus ne peut se faire que de manière statistique puisqu'il ne s'agit pas des mêmes vésicules. Ensuite, nous avons aspiré successivement la même vésicule en absence et en présence d'ATP. Cette dernière série de mesures n'a été faite que sur un nombre limité de vésicules lié au fait que les comportements pathologiques sont plus fréquents lors de la deuxième aspiration. Nous n'avons pas vu de changement significatif entre ces deux séries de mesures.

La figure V.9(a) représente des courbes d'aspiration obtenues sur des GUVs EYPC:EYPA avec l'ATPase- Ca^{2+} (dans un rapport molaire lipide/protéine de 900) en absence (\circ) et en présence d'ATP (\blacksquare). On voit une nette différence entre les pentes dans l'état passif $p_p = \kappa_p/k_B T = 9,4 \pm 0,3$ et l'état actif $p_a = \kappa_p/k_B T_{eff} = 3,5 \pm 0,4$. Au lieu de quantifier ce changement de pente par une variation du module de courbure, nous utilisons plutôt la notion de température effective (voir le paragraphe III.1) qui définit la pente de la courbe pour une vésicule « active » par $p_a = p_p T/T_{eff}$. Une diminution de la pente correspond donc à une augmentation de la température effective. Dans chacune de nos expériences, nous avons donc déterminé le rapport :

$$\frac{\Delta T}{T} = \frac{T_{eff} - T}{T} = \frac{p_p - p_a}{p_a} \quad (V.5)$$

Tous les résultats sont regroupés dans le tableau V.2.

Nous constatons immédiatement que l'activation de la protéine induit des variations de $\Delta T/T$ importantes (avec T_{eff} allant jusqu'à trois fois la température

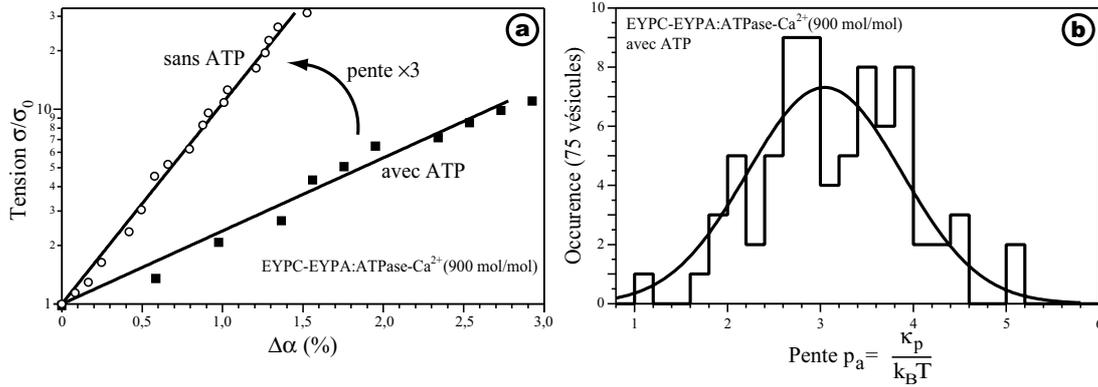


FIG. V.9 - Effet de l'activité de l'ATPase-Ca²⁺ incorporée dans des GUVs EYPC-EYPA dans un rapport 900 (mol/mol). (a) Tension en fonction de la variation d'excès d'aire en échelle semi-logarithmique en l'absence d'ATP (○) et en présence d'1 mM d'ATP (■). Les ajustements linéaires donnent des pentes de $p_p = \kappa_p/k_B T = 9,4 \pm 0,3$ sans ATP et de $p_a = 3,5 \pm 0,4$ avec ATP. (b) Distribution des valeurs de la pente p_a pour 75 vésicules en présence d'ATP.

thermodynamique T) que nous discuterons plus loin.

Après avoir mesuré la tension et la variation d'excès de surface lorsque les vésicules sont dans un milieu contenant à la fois de l'ATP et des ions Ca²⁺ et Mg²⁺, nous avons ajouté dans ce milieu de l'EGTA, qui chélate à la fois les ions Ca²⁺ et Mg²⁺ avec une préférence pour les premiers et rend ces ions inaccessibles pour les protéines. L'EGTA inhibe donc l'activité de la protéine puisque aucun ion Ca²⁺ ne peut être transporté. Nous avons alors observé une augmentation de la pente des courbes σ en fonction de $\Delta\alpha$ par rapport au cas sans EGTA avec des écarts identiques à ceux qui sont observés entre l'état sans ATP et l'état avec ATP. Cette variation de pente provient bien de l'activité de la protéine. De tels types d'expérience ont aussi été effectués en ajoutant de l'EDTA qui chélate préférentiellement les ions Mg²⁺. Nous avons alors observé une légère augmentation de la pente $p_a(\text{sans EDTA}) - p_a(\text{avec EDTA}) = 2,1$ pour des vésicules EYPC-EYPA (9:1) avec un rapport molaire lipide/protéine de 900 (voir Fig. V.10) mais dans une proportion plus faible que ce que nous avons observé avec l'EGTA. Cette augmentation est probablement liée au fait que l'EDTA n'inhibe pas complètement l'activité de la protéine, contrairement à l'EGTA, mais probablement doit diminuer seulement son taux de pompage et donc son activité.

	Rapport protéine/lipide (mol/mol)		
	1/1700	1/1300	1/900
EYPC-EYPA (9:1 mol/mol)			
$p_p = \kappa_p/k_B T :$	$9,6 \pm 1,3$	$9,4 \pm 1,0$	$9,0 \pm 1,5$
$p_a = \kappa_p/k_B T_{eff} :$	$4,9 \pm 0,9$	$4,1 \pm 0,8$	$3,0 \pm 1,2$
$(T_{eff} - \bar{T})/\bar{T}$	$0,96 \pm 0,18$	$1,29 \pm 0,20$	$1,96 \pm 0,40$
SOPC			
$p_p = \kappa_p/k_B T :$	–	$10,2 \pm 1,1$	$9,3 \pm 0,6$
$p_a = \kappa_p/k_B T_{eff} :$	–	$4,4 \pm 1,0$	$3,3 \pm 0,8$
$(T_{eff} - \bar{T})/\bar{T}$	–	$1,26 \pm 0,23$	$1,96 \pm 0,24$

TAB. V.2 - Effet de l'activité de l'ATPase-Ca²⁺ sur la pente $\kappa_p/k_B T$ dans différents rapports de protéine/EYPC-EYPA ou SOPC.

V.3 Comparaison théorie-expérience

V.3.1 Effet de l'incorporation de l'ATPase-Ca²⁺

Les études théoriques de l'influence d'inclusions dans les membranes prévoient une diminution du module de courbure de l'ordre de $\Delta\kappa = \kappa_0 - \kappa_p = \phi \Xi_p^2/k_B T$ où ϕ est la densité moyenne de protéine et Ξ_p est la constante de couplage entre la courbure de la membrane et la densité moyenne d'inclusions [Leibler, 1986]. Cette relation est équivalente à l'équation (III.4) sauf que nous considérons ici l'effet de toutes les protéines de la membrane sur la diminution du module de courbure et non pas uniquement la différence entre les protéines “↑” et “↓”.

Pour mesurer ce coefficient de couplage, nous avons besoin de la densité moyenne ϕ de protéines reconstituées dans une vésicule qui se calcule en mesurant l'aire A d'une vésicule. Celle-ci est reliée à l'aire de chacun de ces constituants : les lipides d'aire $a_{lip} \approx 0,6 \text{ nm}^2$ et les protéines d'aire $a_{prot} \simeq 80 \text{ nm}^2$, par la relation $A = N_{lip}a_{lip}/2 + N_{prot}a_{prot}$ avec $N_{lip}/2$ le nombre de lipides d'un feuillet. Nous obtenons alors facilement la densité :

$$\phi = \frac{N_{prot}}{A} = \frac{1}{a_{prot} + a_{lip}r_m/2} \quad (\text{V.6})$$

où $r_m = N_{lip}/N_{prot}$ est le rapport molaire lipide/protéine qui est une quantité connue dans nos expériences. Par exemple, un rapport molaire de 900 correspond à une densité de protéines $\phi \simeq 2,86 \times 10^{15} \text{ m}^{-2}$. Nous avons alors tracé la variation de $\Delta\kappa$ en fonction de la densité de protéines (voir Fig. V.11) et un ajustement linéaire nous a permis d'obtenir la valeur du coefficient de couplage pour les vésicules SOPC (■) $\Xi_p \simeq 1,1 \times 10^{-28} \text{ J.m}$ et pour les vésicules EYPC-EYPA (○)

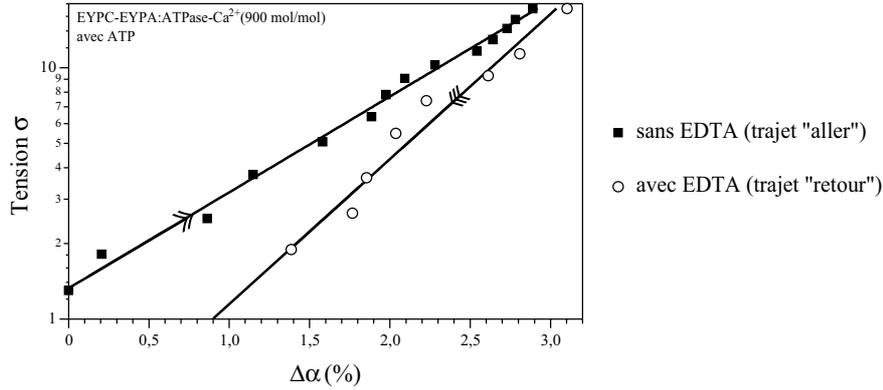


FIG. V.10 - Effet de la présence de l'EDTA sur la pente des courbes σ en fonction de $\Delta\alpha$ pour une même vésicule EYPC-EYPA/ATPase- Ca^{2+} (900:1) avec de l'ATP. La pente $\kappa_p/k_B T$ passe de $3,4 \pm 0,5$ (■) sans EDTA à $5,5 \pm 0,4$ (○) avec EDTA. Nous n'avons pas représenté les barres d'erreur pour faciliter la lecture du graphe.

$\Xi_p \simeq 0,8 \times 10^{-28}$ J.m. On peut remarquer que ce paramètre dépend de l'entourage lipidique de la protéine. Ceci n'est pas étonnant puisqu'il est directement relié aux modifications structurales de la bicouche et donc aux phospholipides qui assurent sa cohésion. La différence entre ces valeurs peut s'interpréter par le fait que l'EYPC et EYPA soient constitués d'un mélange de plusieurs longueurs de chaînes hydrocarbonnées, principalement des C16 et des C18 (voir annexe B), et différentes insaturation qui tendent à minimiser le décalage hydrophobe [Lipowsky and Sackmann, 1995] (« hydrophobic mismatch », qui correspond à la différence entre la longueur du domaine transmembranaire de la protéine et la longueur des chaînes hydrophobes des lipides⁽⁶⁾) contrairement au SOPC qui ne contient qu'une seule longueur de chaînes C18 avec une insaturation.

D'autres expériences ont pu mettre en évidence une forte diminution du module de courbure dans des membranes lipidiques contenant de petits peptides [Méléard et al., 1998, Gerbeaud, 1998]. Les études portant sur l'incorporation de protéines membranaires sont plus rares. Dans le cas de la BR, une légère diminution du module de courbure a pu être observée dans une bicouche SOPC (avec des rapports molaires lipide/protéine compris entre 1700 et 3400) [Gerbeaud, 1998]. Avec leurs valeurs expérimentales, nous pouvons mesurer un coefficient de couplage de $\Xi_p = 5,3 \times 10^{-28}$ J.m. Par contre aucune modification n'a été observée dans des vésicules EYPC:BR préparées par le protocole de reconstitution utilisé par J.-B. Manneville [Manneville, 1999], sans doute liée à la faible densité de protéines reconstituées et au protocole qui ne contrôle pas assez bien la quantité de protéines réellement incorporées mais peut être aussi parce que l'EYPC est

⁽⁶⁾Pour une bonne incorporation de la protéine, cette différence de longueurs doit être minimale pour minimiser les contacts des parties hydrophobes, aussi bien des protéines que des lipides, avec le solvant aqueux.

bien adapté à la longueur des hélices transmembranaires de la BR minimisant ainsi le mismatch [Piknova et al., 1993].

De plus, ce paramètre est peut-être relié à la taille des inclusions L et à l'angle modélisant la « conicité » θ par (voir Fig. V.12) : $\Xi_p \simeq \kappa_0 L \theta$. En prenant $L = 100 \text{ \AA}$ la taille de l'ATPase- Ca^{2+} , nous obtenons alors un angle d'asymétrie de $\theta \simeq 14^\circ$ pour SOPC et $\theta \simeq 11^\circ$ pour EYPC-EYPA qui correspond donc à une forte asymétrie.

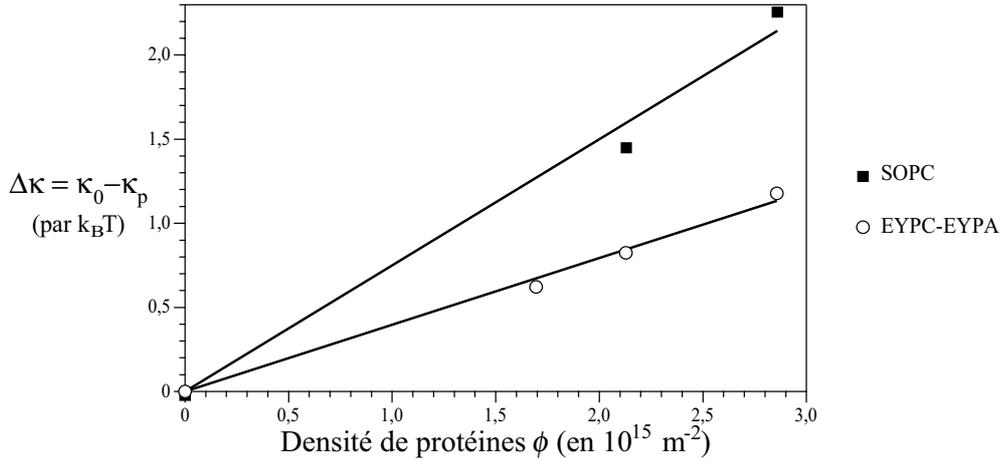


FIG. V.11 - Variation de $\Delta\kappa$ en fonction de la densité de protéines ϕ reconstituées dans des GUVs SOPC (■) et EYPC-EYPA (○). Un ajustement linéaire permet d'obtenir le coefficient de couplage $\Xi_p = 1,1 \pm 0,3 \times 10^{-28} \text{ J.m}$ pour SOPC et $\Xi_p = 0,8 \pm 0,1 \times 10^{-28} \text{ J.m}$ pour EYPC-EYPA. D'après [Girard et al., 2004a].

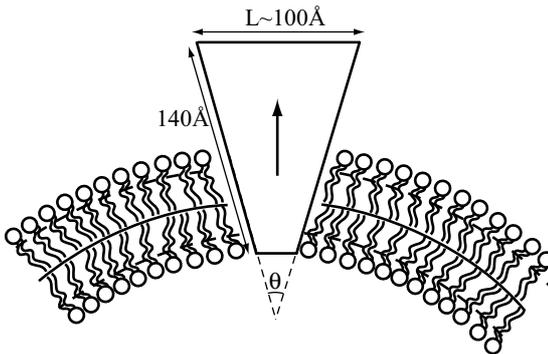


FIG. V.12 - Modélisation et notations utilisées pour décrire la forme conique des protéines.

V.3.2 Effet de l'activité de l'ATPase- Ca^{2+}

À partir des résultats précédents, nous avons observé une diminution des pentes des courbes $\ln(\sigma/\sigma_0)$ en fonction de $\Delta\alpha$ pour des GUVs contenant

l'ATPase-Ca²⁺ lorsque le milieu contient de l'ATP (1 mM) et des ions Ca²⁺ (1 mM) et Mg²⁺ (5 mM). En d'autres termes, l'excès de surface dû aux fluctuations étant plus grand en présence qu'en l'absence d'ATP, on peut donc déplier une surface de membrane beaucoup plus importante quand le milieu contient de l'ATP. De plus, pour déceler un effet possible de l'ATP présent dans le solvant sur les GUVs (autre que l'activation des pompes), nous avons mesuré le module de courbure de vésicules purement lipidiques en présence d'ATP et nous n'avons observé aucune différence notable avec les valeurs de κ_0 obtenues pour les mêmes vésicules mais en l'absence d'ATP. Nous pouvons donc interpréter ces résultats par le fait que c'est bien l'activité des pompes qui augmente l'amplitude des fluctuations des vésicules et non pas par l'effet de l'incorporation des protéines ou de la présence d'ATP dans le milieu extérieur.

Qualitativement, la théorie, développée dans le chapitre III, prévoit aussi une amplification des fluctuations de forme d'une membrane active par la présence de pompes qui jouent le rôle de centres actifs et qui, de part leur activité, créent un source de bruit hors-équilibre. Ce modèle théorique est bien adapté à nos expériences puisque d'une part, les mesures sont effectuées suffisamment loin des surfaces de la lamelle pour négliger toute interaction entre la membrane et la paroi⁽⁷⁾, et d'autre part, aux échelles de longueur auxquelles nous nous sommes intéressés pour nos mesures, l'approximation en géométrie plane du modèle est totalement justifiée. Les résultats expérimentaux sont donc en bon accord avec la théorie et l'origine des effets observés est démontrée de façon claire.

Dans le paragraphe V.2.3, nous avons décrit l'effet du pompage sur les expériences de micropipettes en introduisant la notion de température effective. Cette démarche semble très naturelle puisque la variation de $\ln(\sigma/\sigma_0)$ en fonction de $\Delta\alpha$ reste linéaire en présence d'ATP. Nous observons une simple diminution de la pente, donc une augmentation de la température effective de la membrane. Si on reprend l'expression (III.26) de l'excès d'aire d'une membrane active, la variation relative de la température effective T_{eff} par rapport à la température thermodynamique T est donnée par :

$$\frac{\Delta T}{T} = \frac{T_{eff} - T}{T} = \frac{\kappa_p - \kappa_a^e}{\kappa_a^e} + \frac{\kappa_p}{\kappa_a^e} \frac{\mathcal{P}_a w (\Xi + \mathcal{P}_a w)}{\kappa_a \chi} \quad (\text{V.7})$$

où nous avons pris la valeur Ξ du même ordre de grandeur que $\Xi_p \approx 10^{-28} \text{ J.m} \sim w k_B T$ avec la taille de la protéine $w = 10^{-8} \text{ m}$ et donc $\kappa^e \approx \kappa_p = \kappa_0 - \phi \Xi_p^2 / k_B T$ puisque cette diminution du module de courbure est, comme nous l'avons vu, due à toutes les protéines présentes dans la vésicule. Par contre, en ce qui concerne κ_a et κ_a^e , introduits dans le paragraphe III.1.4, ils sont homogènes à un module de courbure et contiennent le paramètre lié à l'activité des protéines \mathcal{P}_a (il ne faut pas les voir comme des modules de courbure "actif", ils sont là juste pour rendre plus

⁽⁷⁾Dans le cas contraire, il faudrait utiliser un modèle plus adapté qui prenne en compte ces interactions [Prost et al., 1998, Sankararaman et al., 2002].

lisible la relation V.7). Dans nos expériences, seules les protéines ayant leur tête cytosolique, qui contient le site de fixation de l'ATP, vers l'extérieur des vésicules sont donc activables, puisque l'ATP est ajouté dans le milieu extérieur. Si on suppose une distribution symétrique de l'orientation des protéines ⁽⁸⁾, la quantité de protéines activées est réduite de moitié par rapport à la quantité totale de protéines. C'est ce qui explique le facteur 1/2 dans les expressions suivantes :

$$\kappa_a = \kappa_0 - \ell_2 \mathcal{P}_a w \frac{\phi}{2} \quad \text{et} \quad \kappa_a^e = \kappa_p - \ell_2 \mathcal{P}_a w \frac{\phi}{2} - \mathcal{P}_a w \frac{\Xi}{k_B T} \frac{\phi}{2}$$

Dans notre cas, on peut supposer que ℓ_2 qui caractérise la longueur sur laquelle une protéine est sensible à la courbure est de l'ordre de la taille w de la protéine. Alors, si on pose les paramètres adimensionnés suivants : $y = \mathcal{P}_a/k_B T$, $\bar{\phi} = w^2 \phi$ et $\bar{\kappa}_0 = \kappa_0/k_B T$, la variation relative de température devient :

$$\frac{\Delta T}{T} = \frac{y \bar{\phi}}{\bar{\kappa}_0 - (1 + y) \bar{\phi}} + \frac{\bar{\kappa}_0 - \bar{\phi}}{\bar{\kappa}_0 - (1 + y) \bar{\phi}} \cdot \frac{y(1 + y) \bar{\phi}}{\bar{\kappa}_0 - y \bar{\phi}/2} \quad (\text{V.8})$$

Nous avons tracé la variation relative de température en fonction de la densité adimensionnée $\bar{\phi}$ (voir Fig. V.13). Pour obtenir \mathcal{P}_a , il suffit alors de fitter ces courbes avec l'expression (V.8) en imposant $\bar{\kappa}_0$ pour chaque type de lipides. Nous avons obtenu des valeurs de y assez semblables pour SOPC avec $y = 9, 0 \pm 1, 0$ et pour EYPC-EYPA avec $y = 8, 3 \pm 0, 7$.

Nous pouvons aussi estimer la valeur de \mathcal{P}_a pour la comparer avec ces valeurs expérimentales. Durant son cycle de pompage, le système ATPase- Ca^{2+} -2 ions Ca^{2+} doit franchir une barrière de potentiel W_b . Le taux de pompage est alors contrôlé par un poids de Boltzmann $\exp(-W_b/k_B T)$. Lorsque la membrane est incurvée, cela induit une polarisation électrique et donc un champ électrique à travers la membrane qui peut s'écrire sous la forme : $E = -e(\nabla^2 h)/\varepsilon w$ avec $\varepsilon \sim 3\varepsilon_0$ la perméabilité diélectrique de la partie hydrophobe de la protéine⁽⁹⁾ et $|e| \sim \text{qqs} \times 10^{-20} \text{ C}$ est le coefficient flexoélectrique introduit dans [Petrov, 1984]. Ce potentiel flexoélectrique diminue alors la barrière de potentiel de quelques % d'après [Manneville et al., 2001] (appelons x le facteur de diminution). L'énergie d'activation de la protéine, que nous pouvons prendre égale à l'énergie d'hydrolyse de l'ATP environ $15 \times k_B T$, est alors multipliée par un facteur $\exp(-2xq e(\nabla^2 h)/\varepsilon k_B T)$ où $q \simeq 1, 6 \times 10^{-19} \text{ C}$ est la charge unité. Cet effet étant relié au couplage entre la courbure de la membrane et le dipôle de force, il s'agit donc du terme $\ell_2 F_a H$ dont nous parlons ici. Pour de faibles variations de courbure, nous pouvons linéariser ce facteur multiplicatif pour obtenir :

$$|\ell_2 \mathcal{P}_a| \simeq 15x \frac{eq}{\varepsilon} \sim \text{quelques } w k_B T$$

⁽⁸⁾D'après le paragraphe IV.2.3.d, la distribution de l'orientation des protéines n'est pas vraiment symétrique mais s'en rapproche quelque peu.

⁽⁹⁾ $\varepsilon_0 \simeq 8, 8 \times 10^{-12} \text{ F/m}$ est la perméabilité du vide.

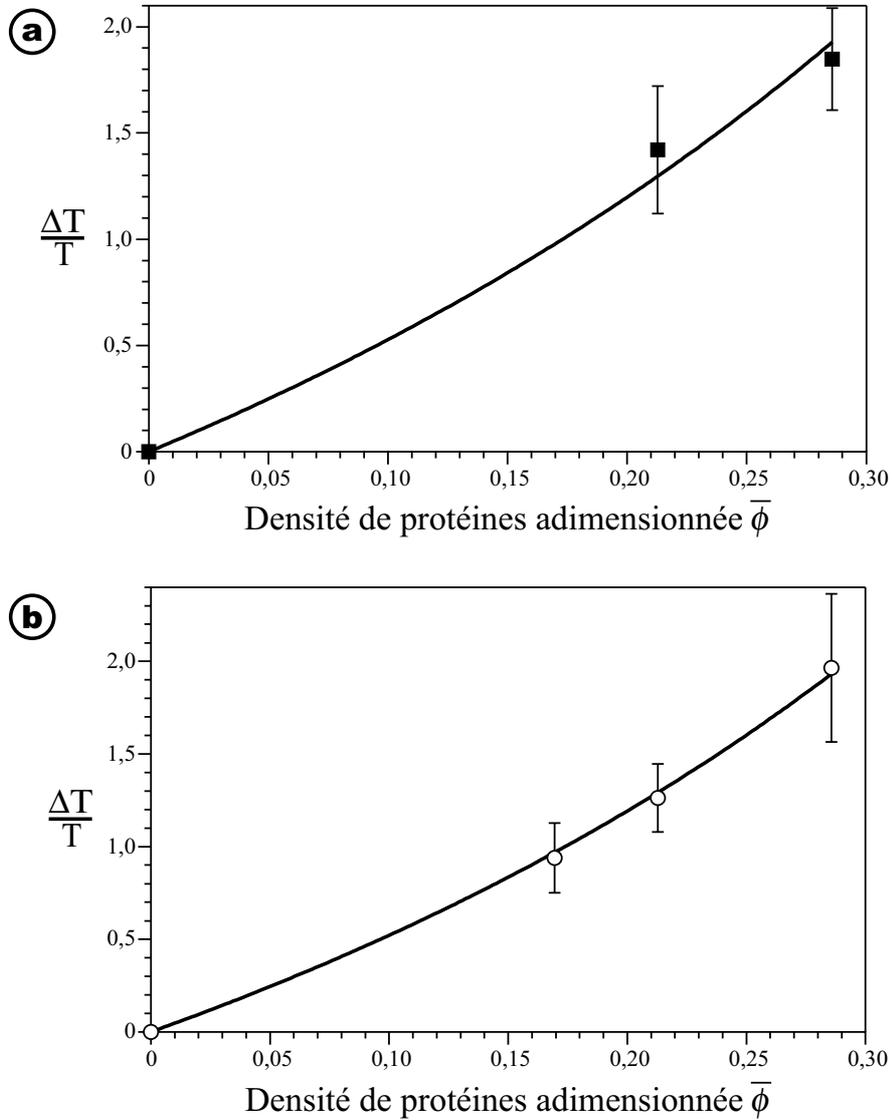


FIG. V.13 - Variation relative de la température effective en fonction de la densité adimensionnée $\bar{\phi} = w^2\phi$ d'ATPase- Ca^{2+} reconstituées dans des vésicules SOPC (a) et des vésicules EYPC-EYPA (b). Les données expérimentales sont fittées par la relation (V.8) donnant la valeur de $\mathcal{P}_a = (9,0 \pm 1,0) \times k_B T$ pour SOPC et de $\mathcal{P}_a = (8,3 \pm 0,7) \times k_B T$ pour EYPC-EYPA. D'après [Girard et al., 2004a].

et avec $l_2 \sim w$, nous obtenons \mathcal{P}_a de l'ordre de quelques $k_B T$ qui est en bon accord avec les valeurs expérimentales.

V.4 Conclusion et perspectives

V.4.1 Différentes améliorations possibles

Bien que le système utilisé, à savoir lipides+ATPase- Ca^{2+} , soit très bien caractérisé sur de nombreux points, certaines améliorations restent tout de même envisageables. Nous pouvons modifier certains paramètres expérimentaux pour observer leurs effets sur les résultats précédents :

✘ Effet d'une force ionique : au cours du pompage de 2 ions calcium dans un sens et de deux protons dans l'autre sens, une différence de pH et de potentiel électrique s'établit entre l'intérieur et l'extérieur de la vésicule ce qui pourrait inhiber l'activité de la protéine. L'étude des forces ioniques est toutefois limitée par la technique de formation de vésicules géantes puisque l'électroformation n'est possible que pour des concentrations de 5 mM pour des ions monovalents et de 1 mM pour des ions divalents [Luisi and Walde, 2000].

✘ Effet du glycérol : l'ajout de glycérol dans le milieu extérieur provoque une diminution de la viscosité et du coefficient de perméation λ_p . Ces coefficients ne pouvant jouer de rôle qu'en présence de bruit hors équilibre, une modification de ceux-ci permet de tester la présence d'effets hors-équilibre dans nos expériences. Ainsi l'observation d'un changement des résultats avec et sans glycérol serait une preuve supplémentaire de l'existence d'une activité, qui est une source de bruit hors-équilibre. De plus, la présence de glycérol pourrait modifier le fonctionnement de l'ATPase- Ca^{2+} , en changeant par exemple le rendement de pompage. Dans ce cas, on s'attend à observer un effet de l'addition du glycérol uniquement dans le cas où la protéine serait active.

✘ Effet de l'ATP- γ_s : il s'agit d'un ATP peu hydrolysable donc inutilisable par la protéine. Il nous permettrait de comparer les effets en présence d'ATP non-hydrolysable et en présence d'ATP hydrolysable.

✘ Utilisation de mutants de l'ATPase- Ca^{2+} : pour obtenir un contrôle de l'ATPase- Ca^{2+} , il serait intéressant d'utiliser des mutants ayant les sites de fixation du calcium altérés par exemple (E309Q, E771Q, D800N) qui ont été récemment purifiés par le groupe de P. Falson (URA CEA/CNRS 2096) et obtenus en quantité pondérable satisfaisant aux exigences de nos expériences.

V.4.2 Conclusion

Dans nos expériences, nous avons pu mesurer, dans des conditions contrôlées de concentration de protéines, une diminution significative du module de courbure en fonction de la densité de protéines insérées dans des membranes

SOPC et EYPC-EYPA (9:1). Cette diminution a permis de mesurer un coefficient de couplage entre la courbure et la densité de pompes dont nous nous sommes servi pour déterminer l'asymétrie géométrique de la protéine. Nos résultats semblent être en assez bon accord avec la géométrie de la protéine [Toyoshima et al., 2000, Toyoshima and Nomura, 2002].

Les expériences de micropipettes que nous avons réalisées illustrent le cas d'une membrane active libre, sans interaction avec des parois. Le système modèle de membrane active utilisé dans ces expériences a permis de mettre en évidence de façon claire des effets importants de l'activité biologique hors-équilibre d'une pompe à calcium, l'ATPase- Ca^{2+} , sur les fluctuations de forme d'une membrane lipidique. Ce résultat vient s'ajouter à celui de J.-B. Manneville [Manneville, 1999] qui a également observé des effets de l'activité d'une pompe à protons, la bactériorhodopsine (BR). Toutefois, à concentration équivalente, nous avons observé des effets beaucoup plus importants que sur la BR. Cette remarque va bien dans le sens que l'amplitude des changements conformationnels est plus élevée dans le cas de l'ATPase- Ca^{2+} .

Nous avons aussi montré l'effet de la concentration de protéines d'une vésicule sur la température effective. Pour la BR, aucun effet n'a pu être observé lié probablement au fait qu'avec le protocole utilisé par [Manneville, 1999], la concentration de BR incorporées était mal contrôlée. La comparaison théorie-expérience a permis aussi d'estimer certaines caractéristiques de l'activité de la protéine comme l'énergie dissipée par l'activité hors-équilibre $\mathcal{P}_a \sim 8-9 \times k_B T$. C'est la première fois qu'une telle mesure a pu être faite sur une protéine, les études sur la BR n'ayant permis qu'une estimation grossière de cette quantité (environ $10 \times k_B T$). Toutefois, les mesures faites ici, avec la technique de micropipettes, ne permettent pas de savoir si nous observons simplement une renormalisation du module de courbure par l'activité de la protéine ou bien s'il s'agit de l'effet d'un dipôle de force. Seule l'obtention du spectre des fluctuations pourrait trancher entre ces deux effets. La mesure de ce spectre des fluctuations en utilisant une technique de détection de contour en temps réel mise au point par J. Pécéréaux [Pécéréaux, 2004] est en cours.

Les résultats que nous avons obtenus sur un système totalement contrôlé et caractérisé, concordent assez bien avec le modèle théorique des membranes actives confirmant et renforçant ainsi sa validité.

V.4.3 Perspectives

La démonstration sur ce système modèle, impliquant une protéine de structure connue, que la mesure du froissage de la membrane active permet de remonter au dipôle de force, nous permettra par la suite d'utiliser cette technique sur des protéines membranaires pour lesquelles l'amplitude des changements conformationnels n'est pas connue comme les récepteurs, les canaux ioniques et les transporteurs multi-drogues ABC (transportant une large variété de substrats :

ions, métaux lourds, drogues anticancéreuses, stéroïdes, glucocorticoïdes, acides biliaires, mycotoxines, antibiotiques et peptides). Par exemple, dans le cas des transporteurs ABC, deux types de changements conformationnels sont envisagés au cours du transport, l'un de grande amplitude passant d'une position ouverte en forme de "V" à une position fermée en forme de "I" (voir Fig. V.14) engendrant des effets importants sur le solvant [Chang, 2003], et l'autre de plus faible amplitude (voir Fig. V.15) avec un transport s'effectuant par un mécanisme de type « flippase » [Locher et al., 2002, Bass et al., 2003]. La mesure de l'effet de l'activité de ces transporteurs ABC sur le froissage de la vésicule, à condition que l'on puisse reconstituer ces protéines dans des liposomes géants, pourrait, en toute rigueur, trancher entre ces deux types de mécanismes. Mais il faut tout de même rester prudent quant au lien entre les effets collectifs, que nous mesurons ici avec la technique des micropipettes, et les effets à l'échelle moléculaire, auxquelles nous remontons grâce au modèle théorique.

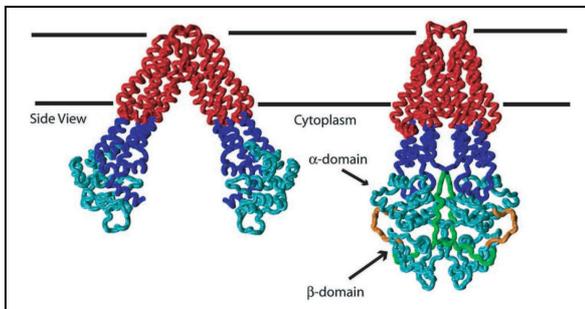


FIG. V.14 - Vues schématiques de la structure de MsbA, un transporteur ABC, dans ses configurations ouverte en forme de "V" (à gauche) et fermée en forme de "I" (à droite). La position approximative de la membrane est représentée par des traits continus noirs. Adapté de [Chang, 2003].

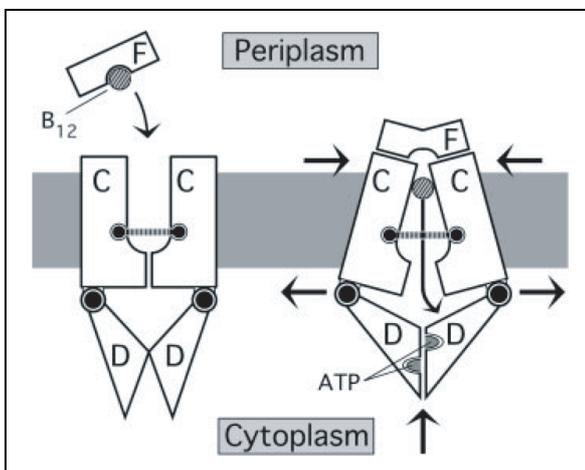


FIG. V.15 - Mécanisme schématique du transporteur BtuCD, un transporteur ABC. À gauche est représenté l'état du transporteur où le nucléotide est libre. À droite est proposé un réarrangement conformationnel de faible amplitude pour transporter la vitamine B₁₂. Adapté de [Locher et al., 2002].

Conclusion

Les membranes biologiques sont des objets très complexes : lorsque l'on cherche à les étudier du point de vue du physicien, on est forcément limité à des modèles très simplifiés. Ces modèles ont été utilisés de manière intensive pour décrire les propriétés d'équilibre des membranes. Pourtant, une description physique plus complète des membranes doit tenir compte des phénomènes hors-équilibres caractéristiques des membranes biologiques. Nous nous sommes intéressés dans la majorité de ce travail à l'influence de phénomènes hors-équilibres sur les fluctuations de forme de membranes. Le rôle des fluctuations thermiques peut paraître secondaire d'un point de vue biologique. Il n'est d'ailleurs pas évident que les concepts développés ici jouent un rôle important dans les systèmes biologiques. La problématique est donc essentiellement une problématique physicienne. Le choix d'étudier les fluctuations a été motivé par son importance théorique et par le grand nombre d'outils tant théoriques qu'expérimentaux à notre disposition pour les traiter. Nous avons montré que la physique des fluctuations d'une membrane hors-équilibre est complètement différente de celle d'une membrane à l'équilibre thermodynamique. Pour cela, nous nous sommes appuyés sur des modèles théoriques et des techniques expérimentales simples et originaux. À partir de questions inspirées directement de la biologie, nous avons construit un problème de physique statistique qui renouvelle la question des fluctuations de membranes.

Dans le chapitre III, est exposé le modèle théorique des « membranes actives » [Prost and Bruinsma, 1996, Ramaswamy et al., 2000] que nous avons adapté au cas des pompes incorporées dans la membrane. Ce modèle prédit entre autre l'amplification des fluctuations par l'activité hors-équilibre de la membrane. Pour vérifier ces prévisions théoriques, nous avons choisi un modèle assez simple à savoir une protéine transmembranaire, l'ATPase- Ca^{2+} . Toute la difficulté a été de mettre au point un protocole expérimental pour reconstituer, de manière contrôlée et non invasive, cette protéine dans la membrane de vésicules géantes unilamellaires tout en préservant son activité. Nous avons développé un tel protocole de reconstitution qui se décompose en trois phases (chapitre IV) : (i) reconstitution

des protéines dans des petits protéoliposomes, puis (ii) séchage partiel sous atmosphère contrôlée, et enfin (iii) électroformation des vésicules géantes. Nous avons alors étudié les caractéristiques de ce système en termes de morphologie, d'unilamellarité, d'homogénéité de protéines reconstituées et d'activité (hydrolytique et de pompage). Ce protocole appliqué à l'ATPase- Ca^{2+} a été efficace dans une large gamme de concentrations de protéines (avec des rapports molaires lipide/protéine compris entre 480 et 5500) et reproductible. Par rapport aux autres protocoles décrits dans la littérature, le notre remédie à la plupart de leurs défauts : les vésicules sont suffisamment grosses pour être manipulables et observables par les techniques optiques, nous n'incorporons pas dans la membrane d'agents comme les peptides de fusion qui fausseraient les mesures que nous voulons effectuer, nous contrôlons assez bien la quantité de protéines reconstituées, nous n'observons pas d'agrégats de protéines. La seule contrainte imposée par la technique d'électroformation est le fait que nous devons travailler à basse force ionique.

Disposant de ce système « actif » (ou plus exactement activable), nous avons logiquement observé l'effet du pompage de l'ATPase- Ca^{2+} sur les fluctuations de forme des vésicules. À cette fin, nous avons utilisé la technique d'aspiration des micropipettes (chapitre V) qui intègre tous les modes de fluctuations d'une vésicule et donc quantifie l'amplitude de ces fluctuations. Ces expériences ont pu mettre en évidence deux effets importants. D'une part, lorsque la protéine n'est pas activée, nous avons observé une diminution du module de courbure lié à l'incorporation de protéines dans la membrane permettant une mesure du coefficient de couplage entre la courbure moyenne et la concentration de protéines. C'est la première fois qu'une telle mesure a pu être faite sur le système vésicule-protéine et de manière aussi contrôlée. D'autre part, nous avons constaté une augmentation de l'excès de surface dû aux fluctuations lors du pompage de calcium et, de fait, nous avons montré que l'activité biologique hors-équilibre a un effet important sur les fluctuations des membranes. Ces résultats sont en bon accord avec les prédictions théoriques et l'origine hors-équilibre des effets observés a été démontrée de manière explicite. La comparaison quantitative entre théorie et expérience a permis une mesure raisonnable du dipôle de force \mathcal{P}_a de $8 - 9 \times k_B T$.

Dans le chapitre III, nous avons établi un modèle solide et général permettant de rendre compte des échanges de matériels biologiques (lipides, enzymes, etc.) entre la membrane et le fluide environnant, et nous l'avons étudié dans le cas d'une membrane plane proche de l'équilibre. Malgré la relative simplicité de cette situation, les calculs analytiques ne sont pas évidents notamment parce que le problème est non-local et non-linéaire. Nous avons montré que la membrane plane présente une instabilité morphologique pour des valeurs particulières des coefficients cinétiques et que la pression osmotique joue un rôle important dans l'apparition de cette instabilité. Une analyse linéaire rend compte d'instabilités tubulaires dans la membrane qui s'apparenteraient à ce qui est observé par J. Solon (équipe de P. Bassereau) [Solon, 2004]. La comparaison entre les observations

et le modèle théorique, adapté à cette situation, semble en assez bon accord sur quelques points. En effet, les résultats expérimentaux semblent confirmer le fait que l'instabilité soit déclenchée par le changement de signe de la tension effective de la vésicule (qui devient négative) comme le prédit notre modèle. Celui-ci rend donc bien compte des premières étapes de processus qui s'apparentent à l'exocytose. Mais il reste encore beaucoup à faire pour connaître et comprendre tous les mécanismes physiques entrant en jeu dans ce type de systèmes.

Un autre cas d'étude intéressante et qui constitue un prolongement de ce modèle théorique est le film lipidique suspendu séparant deux milieux de concentrations salines différentes. Les effets de bords auraient pour conséquence d'induire des échanges de lipides d'une part entre les bords et le reste de la membrane, et d'autre part entre les bords et le fluide. Cette étude est actuellement en cours de traitement dans notre équipe.

Annexe **A**

Eléments de géométrie différentielle

Dans cette annexe, nous allons tout d'abord introduire les notions liées à la description mathématique des surfaces courbées ainsi que leurs propriétés générales. Pour obtenir le détail complet de ces résultats, je vous renvoie aux traités de géométrie différentielle de M. Do Carmo [do Carmo, 1976] et de F. David ([Nelson et al., 1989, p.158-223]). Puis dans la seconde section, nous utiliserons ces concepts pour exprimer les dérivées fonctionnelles des différents termes de l'énergie par rapport à la position de la membrane.

A.1 Introduction

A.1.1 Définitions et notations

Paramétrisation

Une surface \mathcal{S} est définie comme un objet bidimensionnel plongé dans un espace euclidien \mathbb{R}^3 . Nous supposerons que cette surface est lisse, c'est-à-dire aussi dérivable que nécessaire sans trou ni intersection.

Chaque point de cette surface est repéré par un vecteur tridimensionnel $\mathbf{r}(\tilde{u})$ dont les composantes sont fonctions des deux scalaires (u^1, u^2) . C'est ce qui définit une paramétrisation. La base locale du plan tangent à la surface en ce point est définie par les deux vecteurs suivants :

$$\mathbf{r}_i = \partial_i \mathbf{r} \quad i = 1, 2 \quad (\text{A.1})$$

où $\partial_i = \partial / \partial u^i$. Toutes les propriétés locales de la surface peuvent être exprimées par ces vecteurs tangents et par la façon dont ils varient au voisinage du point \mathbf{r} . Tous les vecteurs qui s'écrivent sur la base de ces vecteurs tangents sont dits *covariants* et ceux qui s'expriment sur une base de l'espace ambiant sont dits

contravariants. En fait, les termes covariant et contravariant évoquent la manière dont les coordonnées varient avec un changement de paramétrisation.

Métrie

Les deux vecteurs tangents déterminent le tenseur métrique (ou la première forme fondamentale) ayant pour composantes :

$$g_{ij} = \mathbf{r}_i \cdot \mathbf{r}_j \quad (\text{A.2})$$

avec lequel nous pouvons exprimer la distance infinitésimale ds séparant deux points de coordonnées respectives \tilde{u} et $\tilde{u} + d\tilde{u}$:

$$ds^2 = |\mathbf{r}(\tilde{u} + d\tilde{u}) - \mathbf{r}(\tilde{u})|^2 = g_{ij} du^i du^j \quad (\text{A.3})$$

Le tenseur métrique caractérise la géométrie intrinsèque à la surface. Son inverse $g^{ij} = (g^{-1})_{ij}$ satisfait à la relation :

$$g^{il} g_{lj} = \delta_j^i \quad (\text{A.4})$$

et permet de définir les vecteurs tangents contravariants : $\mathbf{r}^i = g^{ij} \mathbf{r}_j$.

Courbure moyenne et courbure gaussienne

Le vecteur unitaire normal \mathbf{n} à la surface peut être construit à partir des vecteurs tangents covariants :

$$\mathbf{n} = \frac{\mathbf{r}_1 \wedge \mathbf{r}_2}{|\mathbf{r}_1 \wedge \mathbf{r}_2|} \quad (\text{A.5})$$

La surface élémentaire dA balayée par l'accroissement infinitésimal $d\tilde{u}$ est celle du parallépipède définie par les vecteurs tangents covariants :

$$dA = \mathbf{n} \cdot (\mathbf{r}_1 du^1 \wedge \mathbf{r}_2 du^2) = \sqrt{g} du^1 du^2 \quad (\text{A.6})$$

où $g = \det g_{ij}$ est la métrique.

Comme dans tout développement limité, notre surface s'écarte de son plan tangent d'une quantité quadratique avec la position. Cet écart mesure comment la surface est localement courbée, c'est-à-dire comment varie localement la normale \mathbf{n} le long de chaque courbe tracée sur la surface passant par \mathbf{r} . La forme quadratique qui décrit cet écart au plan tangent est le tenseur de courbure :

$$\mathbf{K}_{ij} = K_{ij} \mathbf{n} = \mathcal{D}_i \mathcal{D}_j \mathbf{r} \quad (\text{A.7})$$

A partir de ce tenseur, nous pouvons construire deux scalaires invariants qui sont la courbure moyenne⁽¹⁾ :

$$H = \text{Tr}(K_i^j) = K_i^i = c_1 + c_2 \quad (\text{A.8})$$

⁽¹⁾En toute rigueur, il faudrait prendre, comme définition de la courbure moyenne, l'expression suivante : $H = -(c_1 + c_2)/2$.

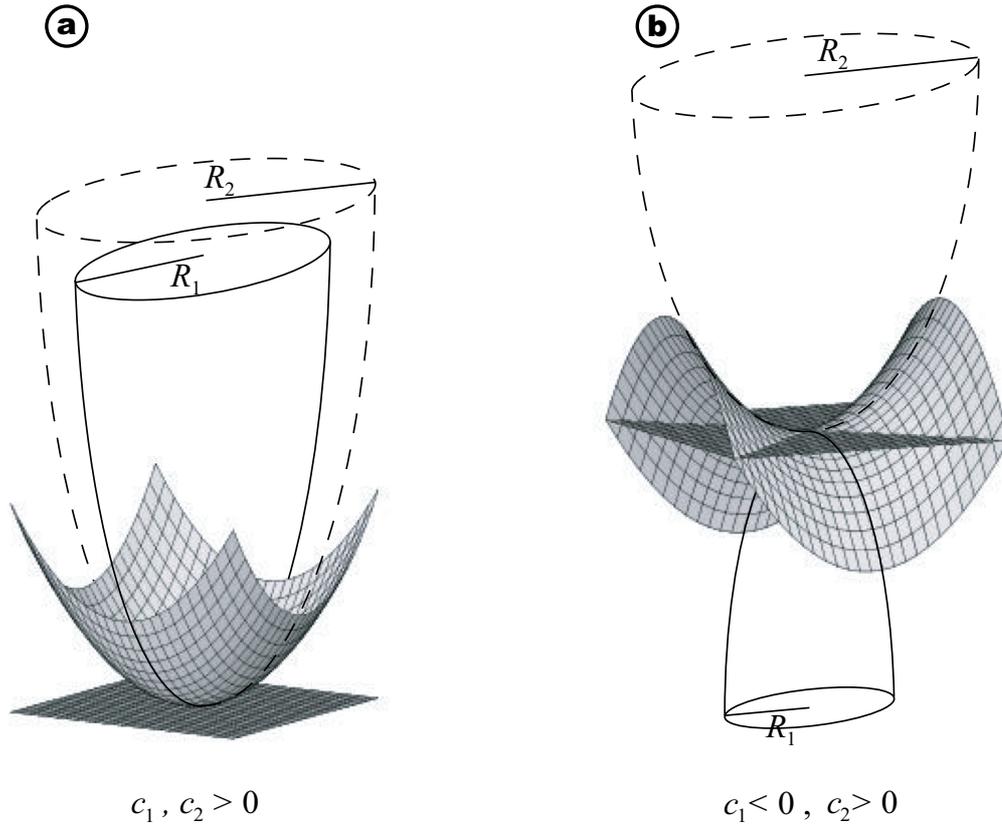


FIG. A.1 - La surface adopte (a) une forme ellipsoïdale d'une surface dans le cas $c_1 = 1/R_1 > 0$, $c_2 = 1/R_2 > 0$ et (b) une forme de « selle de cheval » dans le cas $c_1 = -1/R_1 < 0$, $c_2 = 1/R_2 > 0$. Tracées avec *Mathematica* © 2004 Wolfram Research, Inc.

et la courbure gaussienne :

$$K = \det(K_i^j) = c_1 c_2 \quad (\text{A.9})$$

où c_1 et c_2 sont les courbures principales et définissent les propriétés extrinsèques de la surface. Ces dernières sont à un signe près, suivant la surface, égaux à l'inverse des rayons de courbure R_1 et R_2 peuvent être de même signe auquel cas la surface est localement ellipsoïdale ($c_1 = 1/R_1 > 0$ et $c_2 = 1/R_2 > 0$, voir Fig. A.1(a)), ou bien de signes opposés auquel cas la surface prend la forme d'une « selle de cheval » ($c_1 = -1/R_1 < 0$ et $c_2 = 1/R_2 > 0$, voir Fig. A.1(b)).

Introduisons le tenseur antisymétrique γ_{ij} défini par :

$$\mathbf{r}_i \wedge \mathbf{r}_j = \gamma_{ij} \mathbf{n} \quad (\text{A.10})$$

$$\mathbf{r}_k \wedge \mathbf{r}_{ij} = \gamma_{kl} [\Gamma_{ij}^l \mathbf{n} - K_{ij} \mathbf{r}^l] \quad (\text{A.11})$$

et ayant pour relations de fermeture :

$$\gamma^{ik}\gamma_k^j = g^{ij} \quad (\text{A.12})$$

$$\gamma^{ik}\gamma_{kj} = -\delta_j^i. \quad (\text{A.13})$$

Il est relié au tenseur totalement antisymétrique ε_{ij} :

$$\varepsilon_{11} = \varepsilon_{22} = 0 \quad \text{et} \quad \varepsilon_{21} = -\varepsilon_{12} = 1 \quad (\text{A.14})$$

par les relations suivantes :

$$\gamma_{ij} = \sqrt{g}\varepsilon_{ij} \quad \text{et} \quad \gamma^{ij} = \frac{\varepsilon_{ij}}{\sqrt{g}} \quad (\text{A.15})$$

A.1.2 Dérivée covariante

Considérons un champ de vecteur \mathbf{V} du plan tangent au point \check{u} de la surface. Au point infiniment voisin $\check{u}' = \check{u} + d\check{u}$ sur cette surface, ce champ est représenté par \mathbf{V}' du plan tangent correspondant. La dérivée de $\mathbf{V}(\check{u})$ dans la direction $\check{u} \rightarrow \check{u}'$ est reliée à la variation du vecteur \mathbf{V} par rapport à son transport parallèle le long de la surface qui n'est autre que \mathbf{V}' :

$$\mathcal{D}_j V^i(\check{u})\delta u^j = V^i(\check{u} + d\check{u}) - [V^i(\check{u}) - \Gamma_{jk}^i(\check{u})V^k(\check{u})\delta u^j]$$

soit

$$\mathcal{D}_j V^i = \partial_j V^i + \Gamma_{jk}^i V^k \quad (\text{A.16})$$

où la quantité Γ_{jk}^i est le symbole de Christoffel définis par :

$$\Gamma_{jk}^i(\check{u}) = \frac{1}{2}g^{il}(\partial_k g_{jl} + \partial_j g_{lk} - \partial_l g_{jk}) \quad (\text{A.17})$$

Et nous avons les propriétés très importantes suivantes :

- ① les dérivées covariantes ne commutent pas sauf lorsque nous les appliquons à un objet indépendant du plan tangent : un scalaire ou un vecteur de l'espace ambiant, dans ce cas les dérivées covariantes sont identiques aux dérivées partielles : $\mathcal{D}_i \mathbf{r} = \partial_i \mathbf{r}$, $\mathcal{D}_i \mathbf{n} = \partial_i \mathbf{n}$,
- ② les dérivées covariantes du tenseur métrique et du tenseur antisymétrique sont nulles : $\mathcal{D}_i g_{jk} = 0$, $\mathcal{D}_i g^{jk} = 0$, $\mathcal{D}_i \gamma_{jk} = 0$.

Plus généralement, la dérivée covariante d'un tenseur de type $\begin{pmatrix} p \\ q \end{pmatrix}$ est définie par :

$$\mathcal{D}_k T_{j_1 \dots j_p}^{i_1 \dots i_p} = \partial_k T_{j_1 \dots j_p}^{i_1 \dots i_p} + \sum_{\alpha=1}^p \Gamma_{kl}^{\alpha} T_{j_1 \dots j_p}^{i_1 \dots i_{\alpha-1} l i_{\alpha+1} \dots i_p} - \sum_{\beta=1}^q \Gamma_{k j_{\beta}}^l T_{j_1 \dots j_{\beta-1} l j_{\beta+1} \dots j_p}^{i_1 \dots i_p} \quad (\text{A.18})$$

Nous pouvons alors en déduire la dérivée covariante d'un vecteur covariant

$$\mathcal{D}_j V_i = \partial_j V_i - \Gamma_{ij}^k V_k, \quad (\text{A.19})$$

la divergence d'un vecteur

$$\nabla \cdot \mathbf{V} = \mathcal{D}_i V^i = \frac{1}{\sqrt{g}} \partial_i (\sqrt{g} V^i) \quad (\text{A.20})$$

et le Laplacien (opérateur de Laplace-Beltrami) d'un scalaire

$$\mathcal{D}^2 \phi = \frac{1}{\sqrt{g}} \partial_i (g^{ij} \sqrt{g} \partial_j \phi) \quad (\text{A.21})$$

A.1.3 Relations usuelles

Les dérivées partielles des vecteurs tangents et normal sont dictées par les équations de Gauss-Weingarten :

$$\begin{cases} \partial_i \mathbf{n} &= -K_{ij} \mathbf{r}^j = -K_i^j \mathbf{r}_j \\ \mathbf{r}_{ij} &= \partial_i \partial_j \mathbf{r} = \Gamma_{ij}^k \mathbf{r}_k + K_{ij} \mathbf{n} \end{cases} \quad (\text{A.22})$$

Les dérivées partielles et covariantes des composantes du tenseur métrique :

$$\begin{aligned} \mathcal{D}_k g_{ij} = 0 &\Rightarrow \partial_k g_{ij} = g_{il} \Gamma_{jk}^l + g_{jl} \Gamma_{ik}^l \\ \mathcal{D}_k g^{ij} = 0 &\Rightarrow \partial_k g^{ij} = -g^{il} \Gamma_{kl}^j - g^{jl} \Gamma_{kl}^i \end{aligned} \quad (\text{A.23})$$

$$\partial_k g = 2g \Gamma_{ki}^i \quad \partial_k \sqrt{g} = \sqrt{g} \Gamma_{ki}^i \quad (\text{A.24})$$

et ses dérivées par rapport aux vecteurs tangents :

$$\frac{\partial g^{ij}}{\partial \mathbf{r}_k} = -(g^{jk} g^{il} + g^{jl} g^{ik}) \mathbf{r}_l \quad (\text{A.25})$$

$$\frac{\partial g}{\partial \mathbf{r}_k} = 2g g^{ki} \mathbf{r}_i \quad \frac{\partial \sqrt{g}}{\partial \mathbf{r}_k} = \sqrt{g} g^{ki} \mathbf{r}_i \quad (\text{A.26})$$

De cette dernière relation, il en résulte que, pour un tenseur symétrique A_{ij} :

$$A_{ij} \frac{\partial g^{jl}}{\partial \mathbf{r}_k} = -(A_i^k g^{lj} + A_i^j g^{lk}) \mathbf{r}_j \quad (\text{A.27})$$

notamment

$$A_{ij} \frac{\partial g^{jj}}{\partial \mathbf{r}_k} = -2A^{jk} \mathbf{r}_j \quad (\text{A.28})$$

Les géométries extrinsèque et intrinsèque sont reliées par les équations de Gauss-Codazzi-Mainardi :

$$\mathcal{D}_i K_{jl} - \mathcal{D}_j K_{il} = 0 \quad K_{ij} K^{ij} = H^2 - 2K \quad (\text{A.29})$$

A.2 Calculs de dérivées fonctionnelles

Dérivée fonctionnelle de $\mathcal{H}_H = \int dS f(H)$

Lors d'une transformation $\mathbf{r} \longrightarrow \mathbf{r} + \delta\mathbf{r}$, la variation d'énergie s'écrit :

$$\delta\mathcal{H}_H = \int d^2\tilde{u} \left\{ \frac{\partial(\sqrt{g}f)}{\partial\mathbf{r}_i} \delta\mathbf{r}_i + \frac{\partial(\sqrt{g}f)}{\partial\mathbf{r}_{ij}} \delta\mathbf{r}_{ij} \right\}, \quad (\text{A.30})$$

et par multiple intégration par parties, cette expression devient :

$$\delta\mathcal{H}_H = \int d^2\tilde{u} \left\{ -\partial_i \left(\frac{\partial(\sqrt{g}f)}{\partial\mathbf{r}_i} \right) + \partial_{ij} \left(\frac{\partial(\sqrt{g}f)}{\partial\mathbf{r}_{ij}} \right) \right\} \delta\mathbf{r}. \quad (\text{A.31})$$

La dérivée fonctionnelle de l'énergie se met alors sous la forme :

$$\frac{\delta\mathcal{H}_H}{\delta\mathbf{r}} = -\partial_i \left(\frac{\partial(\sqrt{g}f)}{\partial\mathbf{r}_i} \right) + \partial_{ij} \left(\frac{\partial(\sqrt{g}f)}{\partial\mathbf{r}_{ij}} \right) \quad (\text{A.32})$$

qui se développe assez facilement :

$$\frac{\delta\mathcal{H}_H}{\delta\mathbf{r}} = A_0 f(H) + A_1 f'(H) + A_2 f''(H) + A_3 f'''(H). \quad (\text{A.33})$$

Calcul de $A_0 = -\partial_i \left(\frac{\partial(\sqrt{g})}{\partial\mathbf{r}_i} \right)$

Avec l'expression (A.26), il vient immédiatement :

$$A_0 = -\frac{1}{2} \partial_i \left(\frac{1}{\sqrt{g}} \frac{\partial g}{\partial\mathbf{r}_i} \right) \quad (\text{A.34})$$

$$= -\partial_i (\sqrt{g} g^{ij} \mathbf{r}_j), \quad (\text{A.35})$$

soit en développant :

$$A_0 = -\sqrt{g} g^{ij} \mathbf{r}_{ij} - \frac{1}{2\sqrt{g}} \partial_i g g^{ij} \mathbf{r}_j - \sqrt{g} \partial_i g^{ij} \mathbf{r}_j \quad (\text{A.36})$$

En utilisant la relation (A.24), nous trouvons :

$$A_0 = -\sqrt{g} g^{ij} K_{ij} \mathbf{n} - \sqrt{g} [g^{ik} \Gamma_{ik}^j \mathbf{r}_j + (g^{ik} \Gamma_{ji}^j + \partial_i g^{ik}) \mathbf{r}_k]. \quad (\text{A.37})$$

Maintenant, nous allons montrer que le terme entre crochets que nous noterons \mathbf{B} est nul. Il est évident que $\mathbf{B} \cdot \mathbf{n} = 0$, aussi suffit-il de montrer que $\mathbf{B} \cdot \mathbf{r}_l = 0$:

$$\mathbf{B} \cdot \mathbf{r}_l = g^{ik} \Gamma_{ik}^j g_{jl} + (g^{ik} \Gamma_{ji}^j + \partial_i g^{ik}) g_{kl} \quad (\text{A.38})$$

$$= g^{ik} g_{jl} \Gamma_{ik}^j + \Gamma_{jl}^j + g_{kl} \partial_i g^{ik} \quad (\text{A.39})$$

en raison de relation de fermeture $g^{ik}g_{kl} = \delta_k^i$. Avec la relation (A.23), il vient que :

$$\mathbf{B} \cdot \mathbf{r}_l = g^{ik}g_{jl}\Gamma_{ik}^j + \Gamma_{jl}^j - g^{ij}g_{kl}\Gamma_{ij}^k - g^{kj}g_{kl}\Gamma_{ij}^i. \quad (\text{A.40})$$

Le premier terme de gauche se compense avec le troisième terme, et en utilisant de nouveau la relation de fermeture dans le dernier terme, nous obtenons finalement $\mathbf{B} \cdot \mathbf{r}_l = 0$. Par conséquent, l'expression de A_0 se réduit à :

$$A_0 = -\sqrt{g}g^{ij}K_{ij}\mathbf{n}, \quad (\text{A.41})$$

ou plus exactement en remarquant que $H = g^{ij}K_{ij}$:

$$A_0 = -\sqrt{g}H\mathbf{n}. \quad (\text{A.42})$$

Calcul de $A_1 = -\left[\frac{\partial\sqrt{g}}{\partial\mathbf{r}_i}\partial_i H + \partial_i\left(\sqrt{g}\frac{\partial H}{\partial\mathbf{r}_i} - \partial_j\left(\sqrt{g}\frac{\partial H}{\partial\mathbf{r}_{ij}}\right)\right)\right]$

Pour calculer A_1 , nous avons besoin de connaître l'expression de $\partial H/\partial\mathbf{r}_i$ et de $\partial H/\partial\mathbf{r}_{ij}$. En partant des définitions de H et de K , nous obtenons :

$$\frac{\partial H}{\partial\mathbf{r}_{ij}} = g^{ij}\mathbf{n}, \quad (\text{A.43})$$

et

$$\frac{\partial H}{\partial\mathbf{r}_i} = \frac{\partial}{\partial\mathbf{r}_i}(g^{jk}\mathbf{n} \cdot \mathbf{r}_{jk}) \quad (\text{A.44})$$

$$= K_{jk}\frac{\partial g^{jk}}{\partial\mathbf{r}_i} + g^{jk}\frac{\partial K_{jk}}{\partial\mathbf{r}_i}. \quad (\text{A.45})$$

Avant de poursuivre, il faut déterminer $\partial K_{jk}/\partial\mathbf{r}_i$:

$$\frac{\partial K_{jk}}{\partial\mathbf{r}_i} = \frac{\partial}{\partial\mathbf{r}_i}\left(\mathbf{r}_{jk} \cdot \frac{\mathbf{r}_1 \times \mathbf{r}_2}{\sqrt{g}}\right) \quad (\text{A.46})$$

$$= -\frac{1}{2}\mathbf{r}_{jk} \cdot \mathbf{n}\frac{1}{g}\frac{\partial g}{\partial\mathbf{r}_i} + \frac{1}{\sqrt{g}}[\delta_2^i\mathbf{r}_{jk} \times \mathbf{r}_1 - \delta_1^i\mathbf{r}_{jk} \times \mathbf{r}_2] \quad (\text{A.47})$$

Dans ce cas, le terme entre crochets dans l'éq.(A.47) peut s'écrire à l'aide du tenseur antisymétrique ε_{ij} sous la forme : $\varepsilon_{li}\mathbf{r}_{jk} \times \mathbf{r}_l$. En utilisant la formule (A.26), l'éq.(A.47) devient :

$$\frac{\partial K_{jk}}{\partial\mathbf{r}_i} = -K_{jk}g^{il}\mathbf{r}_l + \gamma^{li}\mathbf{r}_{jk} \times \mathbf{r}_l, \quad (\text{A.48})$$

que nous pouvons transformer à l'aide des éqs.(A.11,A.13) sous la forme :

$$\frac{\partial K_{jk}}{\partial\mathbf{r}_i} = -K_{jk}\mathbf{r}^i - \Gamma_{jk}^i\mathbf{n} + K_{jk}\mathbf{r}^i, \quad (\text{A.49})$$

soit :

$$\frac{\partial K_{jk}}{\partial \mathbf{r}_i} = -\Gamma_{jk}^i \mathbf{n}. \quad (\text{A.50})$$

Avec ce résultat et l'éq.(A.28), l'éq.(A.45) se met sous la forme :

$$\frac{\partial H}{\partial \mathbf{r}_i} = -2K^{ki} \mathbf{r}_k - g^{jk} \Gamma_{jk}^i \mathbf{n}. \quad (\text{A.51})$$

Nous allons maintenant nous intéresser au dernier terme de A_1 :

$$\partial_j \left(\sqrt{g} \frac{\partial H}{\partial \mathbf{r}_{ij}} \right) = \partial_j (\sqrt{g} g^{ij} \mathbf{n}) \quad (\text{A.52})$$

$$= (\partial_j \sqrt{g}) g^{ij} \mathbf{n} + \sqrt{g} (\partial_j g^{ij}) \mathbf{n} + \sqrt{g} g^{ij} (\partial_j \mathbf{n}) \quad (\text{A.53})$$

$$= \sqrt{g} \Gamma_{kj}^k g^{ij} \mathbf{n} - \sqrt{g} (g^{ik} \Gamma_{jk}^j + g^{jk} \Gamma_{jk}^i) \mathbf{n} - \sqrt{g} g^{ij} K_j^k \mathbf{r}_k \quad (\text{A.54})$$

$$= -\sqrt{g} (g^{jk} \Gamma_{jk}^i \mathbf{n} + K^{ik} \mathbf{r}_k). \quad (\text{A.55})$$

A partir des résultats obtenus dans les deux paragraphes précédents, il vient que :

$$\sqrt{g} \frac{\partial H}{\partial \mathbf{r}_i} - \partial_j \left(\sqrt{g} \frac{\partial H}{\partial \mathbf{r}_{ij}} \right) = -\sqrt{g} K^{ik} \mathbf{r}_k. \quad (\text{A.56})$$

Par conséquent :

$$A_1 = \sqrt{g} g^{ij} \mathbf{r}_j \partial_i H + \partial_i (\sqrt{g} K^{ij} \mathbf{r}_j), \quad (\text{A.57})$$

et en développant la dernière dérivée :

$$A_1 = [-\sqrt{g} g^{ij} \partial_i H + \partial_i (\sqrt{g} K^{ij}) + \sqrt{g} K^{ik} \Gamma_{ik}^j] \mathbf{r}_j + \sqrt{g} K^{ij} K_{ij} \mathbf{n}. \quad (\text{A.58})$$

Nous pouvons remarquer que $\frac{\delta H}{\delta \mathbf{r}}$ est un vecteur de l'espace 3D et que, de ce fait, il se comporte comme un scalaire sous une transformation de jauge. Le terme entre crochets est un vecteur contravariant, dont le produit avec le vecteur covariant \mathbf{r}_j donne un scalaire. Or un vecteur contravariant qui disparaît dans un système de coordonnées doit disparaître dans tout système de coordonnées. C'est pour cette raison que le terme entre crochets doit être nul ce qui réduit l'expression de A_1 à :

$$A_1 = \sqrt{g} (H^2 - 2K) \mathbf{n}. \quad (\text{A.59})$$

$$\text{Calcul de } A_2 = - \left[\left(\sqrt{g} \frac{\partial H}{\partial \mathbf{r}_i} - \partial_j \left(\sqrt{g} \frac{\partial H}{\partial \mathbf{r}_{ij}} \right) \right) \partial_i H - \partial_i \left(\sqrt{g} \frac{\partial H}{\partial \mathbf{r}_{ij}} \partial_j H \right) \right]$$

Pour calculer A_2 , nous pouvons utiliser les relations (A.43) et (A.56) :

$$A_2 = \sqrt{g} K^{ij} \partial_i (H) \mathbf{r}_j + \partial_i (\sqrt{g} g^{ij} \partial_j (H) \mathbf{n}). \quad (\text{A.60})$$

Développons le dernier terme avec l'éq.(A.22) :

$$A_2 = \sqrt{g} K^{ij} \partial_i H \mathbf{r}_j - \sqrt{g} g^{ij} \partial_i H K_{ik} \mathbf{r}^k + \partial_i (\sqrt{g} g^{ij} \partial_j H) \mathbf{n}. \quad (\text{A.61})$$

Les deux premiers termes se compensent et il ne reste que le dernier dans lequel nous reconnaissons l'opérateur de Laplace-Beltrami $\mathcal{D}^2 = \frac{1}{\sqrt{g}}\partial_i(\sqrt{g}g^{ij}\partial_j)$:

$$A_2 = \sqrt{g}\mathcal{D}^2 H \mathbf{n}. \quad (\text{A.62})$$

Calcul de $A_3 = \sqrt{g}\frac{\partial H}{\partial \mathbf{r}_{ij}}\partial_i H \partial_j H$

La relation (A.43) nous donne directement :

$$A_3 = \sqrt{g}g^{ij}\partial_i H \partial_j H \mathbf{n}, \quad (\text{A.63})$$

soit

$$A_3 = \sqrt{g}(\nabla H)^2 \mathbf{n}. \quad (\text{A.64})$$

Bilan

La différentielle fonctionnelle de l'énergie vaut alors :

$$\boxed{\frac{1}{\sqrt{g}}\frac{\delta \mathcal{H}_H}{\delta \mathbf{r}} = [-Hf(H) + (H^2 - 2K)f'(H) + \mathcal{D}^2 H f''(H) + (\nabla H)^2 f'''(H)] \mathbf{n}}$$

Dans le cas du hamiltonien de courbure : $f(H) = H^2/2$, cette dérivée fonctionnelle donne la force élastique exercée sur la membrane :

$$\frac{1}{\sqrt{g}}\frac{\delta \mathcal{H}_H}{\delta \mathbf{r}} = \left(\mathcal{D}^2 H + \frac{1}{2}H^3 - 2HK \right) \mathbf{n}. \quad (\text{A.65})$$

Dérivée fonctionnelle de $\mathcal{H}_\phi = \int dS f(\phi(\tilde{u}, t))$

Lors d'une transformation $\mathbf{r} \rightarrow \mathbf{r} + \delta \mathbf{r}$, la variation d'énergie s'écrit :

$$\delta \mathcal{H}_\phi = \int d^2 \tilde{u} [\delta(\sqrt{g})f(\phi) + \sqrt{g}f'(\phi)\delta\phi]. \quad (\text{A.66})$$

Cette transformation se fait à $\sqrt{g}\phi$ constant, ce qui veut dire que $\delta(\sqrt{g})\phi + \sqrt{g}\delta\phi = 0$. Ceci nous permet d'écrire la variation d'énergie sous la forme :

$$\delta \mathcal{H}_\phi = \int d^2 \tilde{u} [f(\phi) - \phi f'(\phi)] \sqrt{g}g^{ij} \mathbf{r}_j \cdot \delta \mathbf{r}_i. \quad (\text{A.67})$$

La formule de Stokes (l'équivalent de l'intégration par parties sur une surface) nous donne en posant $p(\phi) = -f(\phi) + \phi f'(\phi)$:

$$\delta \mathcal{H}_\phi = \int d^2 \tilde{u} \sqrt{g} \mathcal{D}_i [p(\phi) \mathbf{r}^i] \cdot \delta \mathbf{r}. \quad (\text{A.68})$$

La différentielle fonctionnelle s'écrit alors sous la forme :

$$\frac{1}{\sqrt{g}} \frac{\delta \mathcal{H}_\phi}{\delta \mathbf{r}} = \partial_i(p) \mathbf{r}^i + p(\phi) \mathcal{D}_i \mathbf{r}^i \quad (\text{A.69})$$

que l'on peut transformer sous la forme :

$$\boxed{\frac{1}{\sqrt{g}} \frac{\delta \mathcal{H}_\phi}{\delta \mathbf{r}} \Big|_{\sqrt{g}\phi} = \partial_i(p) \mathbf{r}^i + p(\phi) H \mathbf{n}}$$

Dérivée fonctionnelle de $\mathcal{H}_{H\phi} = \int dS \phi(\check{u}, t) H$

Lors d'une transformation $\mathbf{r} \longrightarrow \mathbf{r} + \delta \mathbf{r}$, la variation d'énergie s'écrit à $\sqrt{g}\phi$ constant :

$$\delta \mathcal{H}_{H\phi} = \int d^2 \check{u} \sqrt{g} \phi \left\{ \frac{\partial H}{\partial \mathbf{r}_i} \delta \mathbf{r}_i + \frac{\partial H}{\partial \mathbf{r}_{ij}} \delta \mathbf{r}_{ij} \right\} \quad (\text{A.70})$$

et par la formule de Stokes, cette expression devient :

$$\delta \mathcal{H}_{H\phi} = \int d^2 \check{u} \sqrt{g} \left\{ -\mathcal{D}_i \left(\phi \frac{\partial H}{\partial \mathbf{r}_i} \right) + \mathcal{D}_i \mathcal{D}_j \left(\phi \frac{\partial H}{\partial \mathbf{r}_{ij}} \right) \right\} \delta \mathbf{r}. \quad (\text{A.71})$$

La dérivée fonctionnelle de l'énergie se met alors sous la forme :

$$\frac{1}{\sqrt{g}} \frac{\delta \mathcal{H}_{H\phi}}{\delta \mathbf{r}} = -\mathcal{D}_i \left(\phi \frac{\partial H}{\partial \mathbf{r}_i} \right) + \mathcal{D}_i \mathcal{D}_j \left(\phi \frac{\partial H}{\partial \mathbf{r}_{ij}} \right) \quad (\text{A.72})$$

A l'aide des équations (A.51) et (A.43), elle devient :

$$\frac{1}{\sqrt{g}} \frac{\delta \mathcal{H}_{H\phi}}{\delta \mathbf{r}} = \mathcal{D}_i \left[\phi g^{jl} \Gamma_{jl}^i \mathbf{n} + 2\phi K^{ij} \mathbf{r}_j + \mathcal{D}_j(\phi g^{ij} \mathbf{n}) \right] \quad (\text{A.73})$$

soit avec la relation (A.23)

$$\frac{1}{\sqrt{g}} \frac{\delta \mathcal{H}_{H\phi}}{\delta \mathbf{r}} = \mathcal{D}_i \left[\phi g^{jl} \Gamma_{jl}^i \mathbf{n} + \phi K^{ij} \mathbf{r}_j + g^{ij} \partial_j(\phi) \mathbf{n} \right] \quad (\text{A.74})$$

Nous utiliserons le tenseur a^{ij} d'ordre 2 et le vecteur b^i qui nous permettent d'exprimer le terme entre crochets sous la forme : $a^{ij} \mathbf{r}_j + b^i \mathbf{n}$ et qui sont définis par les relations suivantes :

$$\begin{cases} a^{ij} &= \phi K^{ij} \\ b^i &= \phi g^{jl} \Gamma_{jl}^i + g^{ij} \partial_j(\phi) \end{cases} \quad (\text{A.75})$$

Nous avons

$$\begin{aligned} \mathcal{D}_i a^{ij} &= K^{ij} \partial_i \phi + \phi g^{jl} \mathcal{D}_i K_l^i \\ &= K^{ij} \partial_i \phi + \phi g^{jl} \mathcal{D}_l K_i^i \\ &= K^{ij} \partial_i \phi + \phi \mathcal{D}^j H \end{aligned} \quad (\text{A.76})$$

De même, on obtient :

$$\begin{aligned}\mathcal{D}_i b^i &= \Gamma_j^{ij} \partial_i \phi + \phi \mathcal{D}_i \Gamma_j^{ij} + \mathcal{D}_i (g^{ij} \partial_j (\phi)) \\ &= \Gamma_j^{ij} \partial_i \phi + \phi \mathcal{D}_i \Gamma_j^{ij} + \mathcal{D}^2(\phi)\end{aligned}\quad (\text{A.77})$$

Ainsi, en utilisant la relation (A.7), nous pouvons écrire :

$$\frac{1}{\sqrt{g}} \frac{\delta \mathcal{H}_{H\phi}}{\delta \mathbf{r}} = (\mathcal{D}_i (a^{ij}) - b^i K_i^j) \mathbf{r}_j + (a^{ij} K_{ij} + \mathcal{D}_i (b^i)) \mathbf{n} \quad (\text{A.78})$$

En conclusion :

$$\boxed{\frac{1}{\sqrt{g}} \frac{\delta \mathcal{H}_{H\phi}}{\delta \mathbf{r}} \Big|_{\sqrt{g}\phi} = \phi (\mathcal{D}^j H - K^{ij} \Gamma_{il}^l) \mathbf{r}_j + [\phi (H^2 - 2K) + \mathcal{D}_i (\phi \Gamma_j^{ij}) + \mathcal{D}^2(\phi)] \mathbf{n}}$$

Annexe **B**

Les phospholipides

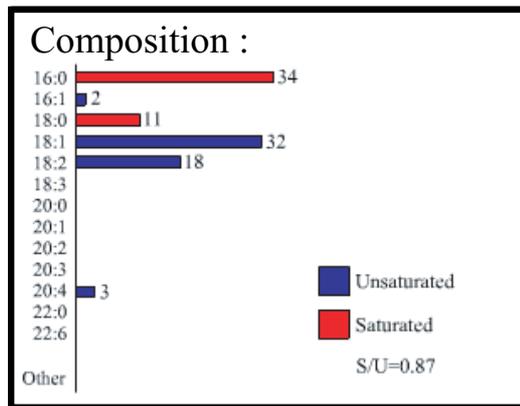
B.1 Préparation des lipides

Les phospholipides sont des produits sensibles à l'hydrolyse et à l'oxydation, et en particulier les lipides insaturés. Nous les conservons à -80°C à l'abri de l'air et de l'humidité. Ils sont conditionnés sous argon, à l'état de poudre. Les solutions mères sont préparées à 10 mg/ml dans le chloroforme que l'on stocke sous argon à -20°C .

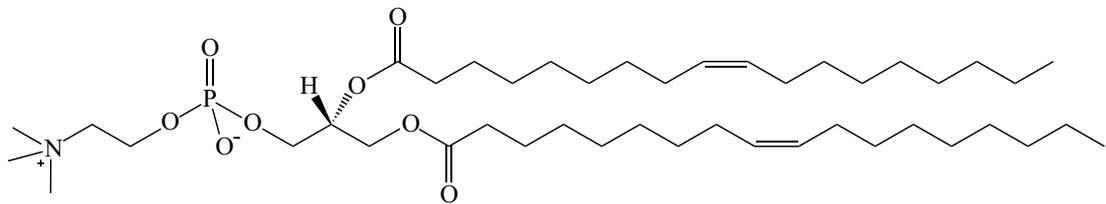
Pour préparer nos solutions de SUVs dans de l'eau, il est nécessaire d'éliminer tout le chloroforme. Pour cela, nous mélangeons 4 mg de lipides dans le rapport voulu dans 2 ml de chloroforme dans un ballon. On fait évaporer le chloroforme à l'évaporateur rotatif pendant 30 min à 120 rpm dans un bain à 37°C , puis on place le ballon dans une enceinte à vide pendant 1h. On constate alors qu'il ne reste plus qu'un film sur le fond du ballon. Ensuite, on ajoute 1 ml d'eau pour obtenir une concentration finale de 4 mg/ml et on resuspend les bicouches lipides en plaçant le ballon sous vortex. On obtient ainsi très rapidement des vésicules multilamellaires de forte hétérogénéité en taille, mais de bonne homogénéité en composition. On sonique alors la solution pendant 3-4 min en positionnant la pointe le plus bas possible dans le ballon sans que celle-ci ne touche le fond du ballon. De plus ce dernier doit être placé dans un récipient rempli de glace pour éviter que la solution ne chauffe trop durant la sonication. L'utilisation de la sonication permet de réduire la taille des vésicules et de rendre la suspension moins polydisperse en taille. La solution ainsi formée se conserve au moins 1 mois en aliquot congelé au -80°C .

B.2 Lipides neutres⁽¹⁾

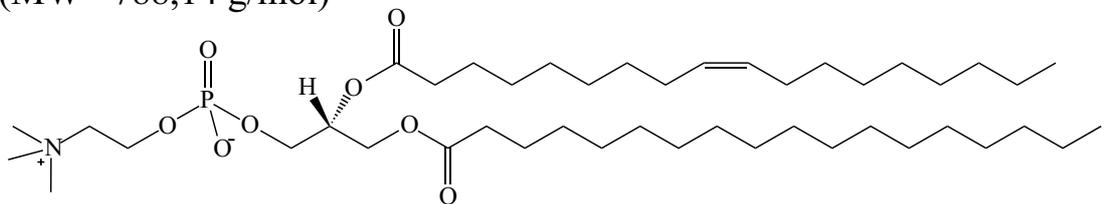
EYPC : Egg yolk L- α -phosphatidylcholine
(MW=760,09 g/mol)



DOPC ou **18:1 PC (cis)** : 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine
(MW =786,13 g/mol)



SOPC ou **18:0/1 PC** : 1-stearoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine
(MW =788,14 g/mol)

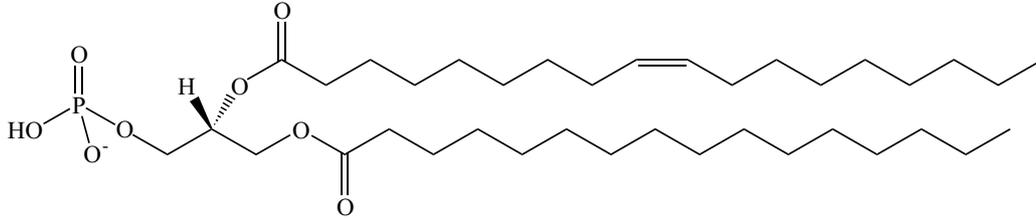


⁽¹⁾ On note par convention $C_n : m$ avec n le nombre de groupement méthylènes et m le nombre d'insaturation des chaînes paraffiniques.

B.3 Lipides chargés

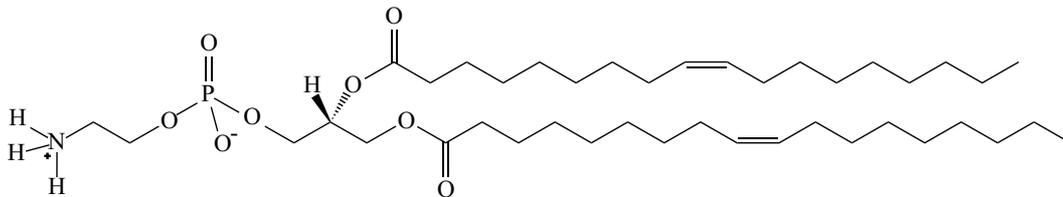
EYPA : Egg yolk L- α -phosphatidic acid.

(MW = 696,92 g/mol)



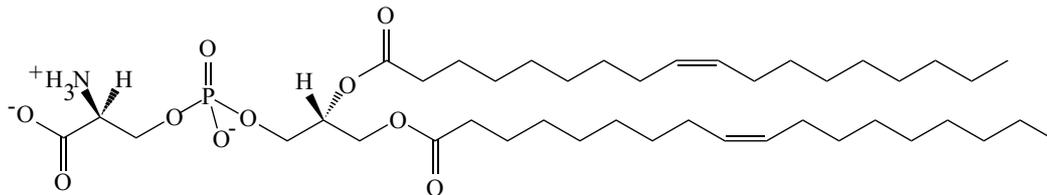
DOPE ou **18:1 PE** : 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine

(MW = 744,05 g/mol)



DOPS ou **18:1 PS** : 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-[phospho-L-serine].

(MW = 810,04 g/mol)



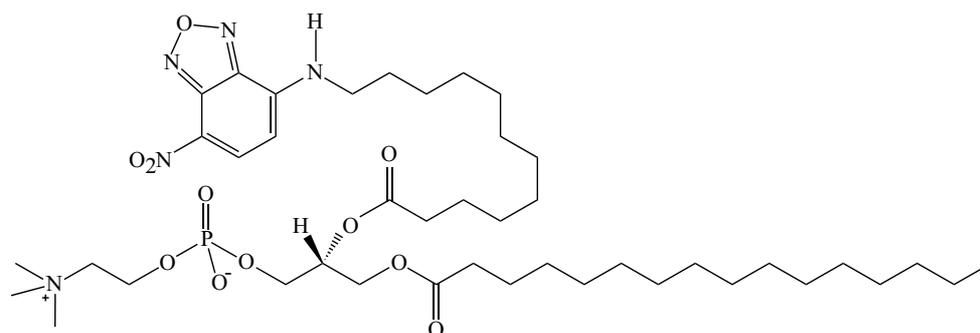
B.4 Lipide fluorescent

NBD-C12-HPC ou **Acyl 12:0 NBD PC** :

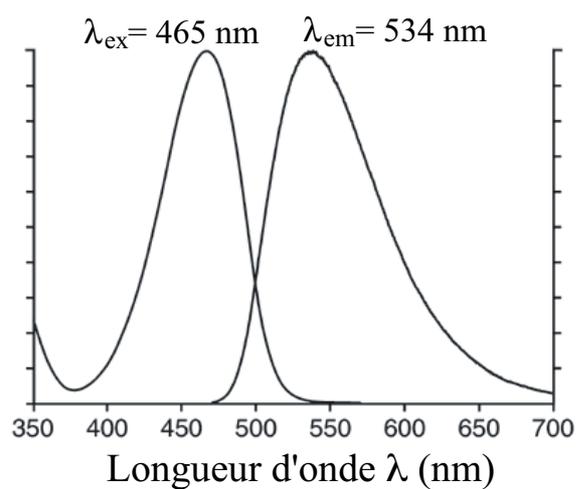
2-(12-(7-nitro-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino)dodecanoyl-

1-hexadecanoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine

(MW = 856,05 g/mol)



Spectre :



Annexe C

Compléments sur les membranes actives

C.1 Résolution de l'équation de Stokes

Lorsqu'une membrane contenant des pompes actives est plongée dans un solvant incompressible, nous avons vu dans le paragraphe III.1.2 que la dynamique du solvant est alors décrite, dans le régime visqueux, par l'équation de Stokes :

$$\begin{aligned}\eta \nabla^2 \mathbf{v}_s(\mathbf{r}, t) &= \nabla P(\mathbf{r}, t) - \mathbb{F}(\mathbf{r}, t) \hat{\mathbf{e}}_z - \mathbf{f}_h(\mathbf{r}, t) \\ \nabla \cdot \mathbf{v}_s(\mathbf{r}, t) &= 0\end{aligned}\quad (\text{C.1})$$

avec la densité de force :

$$\mathbb{F}(\mathbf{r}, t) = (-\kappa \nabla^4 h + \sigma \nabla^2 h + \Xi \nabla^2 \psi) \delta(z - h) + (F_a \psi + \ell_2 F_a \phi \nabla^2 h) g(z) \quad (\text{C.2})$$

et la fonction $g(z) = \delta(z - w^\uparrow) - \delta(z + w^\downarrow)$.

Nous allons définir la transformée de Fourier tridimensionnelle par :

$$f(\mathbf{r}, t) = \int \frac{d^3 \mathbf{k}}{(2\pi)^3} f(\mathbf{k}, t) e^{-i\mathbf{k} \cdot \mathbf{r}} \quad (\text{C.3})$$

et la transformée de Fourier bidimensionnelle par :

$$h(\mathbf{x}, t) = \int \frac{d^2 \mathbf{q}}{(2\pi)^2} h(\mathbf{q}, t) e^{-i\mathbf{q} \cdot \mathbf{x}} \quad (\text{C.4})$$

avec le vecteur d'onde $\mathbf{k} = (\mathbf{q}, k_z)$. Avec ces conventions, l'équation (C.1), dans l'approximation linéaire en h , devient :

$$\begin{aligned}-\eta k^2 \mathbf{v}_s(\mathbf{k}, t) &= -i\mathbf{k}P(\mathbf{k}, t) + (\kappa q^4 + \sigma q^2) h(\mathbf{q}, t) \hat{\mathbf{e}}_z + \Xi q^2 \psi(\mathbf{q}, t) \hat{\mathbf{e}}_z \\ &\quad + F_a (\psi - \ell_2 \phi q^2 h(\mathbf{q}, t)) \check{g}(k_z) \hat{\mathbf{e}}_z + \mathbf{f}_h(\mathbf{k}, t) \\ \mathbf{k} \cdot \mathbf{v}_s(\mathbf{k}, t) &= 0\end{aligned}\quad (\text{C.5})$$

où $\check{g}(k_z) = e^{ik_z w^\uparrow} - e^{-ik_z w^\downarrow}$ est la transformée de Fourier à une dimension de $g(z)$.

Expression du saut de pression à travers la membrane

En projetant la relation (C.5) sur \mathbf{k} , nous obtenons l'expression de la pression :

$$P(\mathbf{k}, t) = \left[\kappa q^4 + \sigma q^2 + \ell_2 F_a \phi q^2 \check{g}(k_z) \right] \frac{k_z}{ik^2} h(\mathbf{q}, t) + \left[\Xi q^2 - F_a \check{g}(k_z) \right] \frac{k_z}{ik^2} \psi(\mathbf{q}, t) - \frac{\mathbf{k}}{ik^2} \cdot \mathbf{f}_h(\mathbf{k}, t) \quad (\text{C.6})$$

En sommant dans le plan complexe sur tous les k_z , l'expression du saut de pression à travers la membrane s'écrit dans l'approximation $qw^{\uparrow/\downarrow} \ll 1$:

$$\begin{aligned} \delta P(\mathbf{q}, t) &= P(\mathbf{q}, z = 0^+, t) - P(\mathbf{q}, z = 0^-, t) \\ &= -\left(\kappa q^4 + \sigma q^2 - \ell_2 F_a \phi q^4 \frac{w^{\uparrow 2} - w^{\downarrow 2}}{2} \right) h(\mathbf{q}, t) \\ &\quad - \left(\Xi + F_a \frac{w^{\uparrow 2} - w^{\downarrow 2}}{2} \right) q^2 \psi(\mathbf{q}, t) \end{aligned} \quad (\text{C.7})$$

soit en introduisant les coefficients renormalisés par l'activité des pompes $\kappa_a = \kappa - \ell_2 \mathcal{P}_a w \phi$ et $\Xi_a = \Xi + \mathcal{P}_a w$ avec $\mathcal{P}_a = F_a \frac{w^{\uparrow 2} - w^{\downarrow 2}}{2w}$, le saut de pression devient :

$$\delta P(\mathbf{q}, t) = -(\kappa_a q^4 + \sigma q^2) h(\mathbf{q}, t) - \Xi_a q^2 \psi(\mathbf{q}, t) \quad (\text{C.8})$$

Expression de la composante v_{sz} de la vitesse

En projetant la relation (C.5) sur \mathbf{q} , nous obtenons :

$$v_{sz}(\mathbf{k}, t) = -\frac{1}{\eta k^2 k_z} \left(iq^2 P(\mathbf{k}, t) + \mathbf{q} \cdot \mathbf{f}_h(\mathbf{k}, t) \right) \quad (\text{C.9})$$

et avec l'expression (C.6), nous pouvons éliminer la pression :

$$\begin{aligned} v_{sz}(\mathbf{k}, t) &= -\frac{1}{\eta k^4} \left[(\kappa q^4 + \sigma q^2 + \ell_2 F_a \phi q^2 \check{g}(k_z)) h(\mathbf{q}, t) \right. \\ &\quad \left. + (\Xi q^2 - F_a \check{g}(k_z)) \psi(\mathbf{q}, t) - \mathbf{k} \cdot \mathbf{f}_h(\mathbf{k}, t) q^2 + \mathbf{q} \cdot \mathbf{f}_h(\mathbf{k}, t) k^2 \right] \end{aligned} \quad (\text{C.10})$$

Pour obtenir la vitesse au niveau de la membrane, il suffit de sommer la relation (C.10) sur tous les k_z et de passer à la limite $z \rightarrow 0$. Ainsi en utilisant l'expression de la transformée de Fourier inverse à une dimension :

$$\int \frac{dk_z}{2\pi} \check{g}(k_z) \frac{e^{-ik_z z}}{(k_z^2 + q^2)^2} \xrightarrow{z \rightarrow 0} -\frac{w^{\uparrow 2} - w^{\downarrow 2}}{8q} \quad (\text{C.11})$$

nous obtenons la composante v_{sz} de la vitesse :

$$v_{sz}(\mathbf{k}, t) = -\frac{1}{\eta q} \left[(\kappa_a q^4 + \sigma q^2) h(\mathbf{q}, t) - \Xi_a q^2 \psi(\mathbf{q}, t) \right] - \frac{1}{2\eta \pi} \int dk_z \frac{\mathbf{f}_h(\mathbf{k}, t) \cdot \hat{\mathbf{e}}_z}{k^2} \quad (\text{C.12})$$

C.2 Différence de pression osmotique

Les ions qui se trouvent dans le fluide environnant et qui sont sélectivement transportés par les pompes diffusent librement avec un coefficient de diffusion D_{ions} . Le mouvement des ions est alors décrit par une équation classique de convection-diffusion :

$$\partial_t n(\mathbf{r}, t) + \underline{\nabla} \cdot \mathbf{J}_{ions} = 0 \quad \text{avec } \mathbf{J}_{ions}(\mathbf{r}, t) = n(\mathbf{r}, t)\mathbf{v}_s - D_{ions}\underline{\nabla}n(\mathbf{r}, t) \quad (\text{C.13})$$

avec $n(\mathbf{r}, t)$ la concentration d'ions. Toutefois, $n(\mathbf{r}, t)$ et \mathbf{v}_s étant des quantités assez petites, le terme convectif est une correction d'ordre 2 et peut donc être négligé. Dans l'approximation « coarse-grainée », le flux d'ions à travers la membrane est relié au taux de pompage \dot{a} par la relation :

$$\mathbf{J}_{ions}(\mathbf{x}, z \simeq 0^\pm, t) \cdot \hat{\mathbf{e}}_z = \psi(\mathbf{x}, t)\dot{a} \quad (\text{C.14})$$

En effectuant une transformation de Fourier spatiale bidimensionnelle puis temporelle définie par :

$$n(\mathbf{r}, t) = \int \frac{d\omega}{2\pi} n(\mathbf{r}, \omega) e^{i\omega t} \quad (\text{C.15})$$

les équations (C.13) et (C.14) deviennent :

$$\begin{aligned} i\omega n(\mathbf{q}, z, \omega) + D_{ions}q^2 n(\mathbf{q}, z, \omega) - D_{ions}\partial_{zz}^2 n(\mathbf{q}, z, \omega) &= 0 \\ -D_{ions}\partial_z n(\mathbf{q}, z = 0^+, \omega) &= -D_{ions}\partial_z n(\mathbf{q}, z = 0^-, \omega) = \psi(\mathbf{q}, t)\dot{a} \end{aligned} \quad (\text{C.16})$$

On trouve alors le saut de concentrations à travers la membrane sous la forme :

$$\delta n(\mathbf{q}, t) n(\mathbf{q}, z = 0^+, \omega) - n(\mathbf{q}, z = 0^-, \omega) = \frac{2\psi(\mathbf{q}, t)\dot{a}}{D_{ions}(q^2 + i\omega/D_{ions})^{1/2}} \quad (\text{C.17})$$

Dans le cas d'une solution diluée, cette quantité est reliée au saut de pression osmotique :

$$\delta\Pi(\mathbf{q}, t) = k_B T \delta n(\mathbf{q}, t) = \frac{2k_B T \psi(\mathbf{q}, t)\dot{a}}{D_{ions}(q^2 + i\omega/D_{ions})^{1/2}} \quad (\text{C.18})$$

La fréquence typique sur lequel varie $\psi(\mathbf{q}, t)$ est Dq^2 où $D = \Lambda\chi$ est le coefficient de diffusion des pompes dans la membrane (de l'ordre de $10^{-12} \text{ m}^2/\text{s}$ [Prost and Bruinsma, 1996]). Cette fréquence est beaucoup plus petite que $D_{ions}q^2$, le terme ω/D_{ions} dans l'équation (C.18) peut donc être omis :

$$\delta\Pi(\mathbf{q}, t) \simeq \frac{2k_B T \psi(\mathbf{q}, t)\dot{a}}{D_{ions}q} \quad (\text{C.19})$$

Bibliographie

- [Abdelghani-Jacquin et al., 2002] Abdelghani-Jacquin, C., Abdelghani, A., Kantlehner, M., and Sackmann, E. (2002). Decorated surfaces by biofunctionalized gold beads : application to cell adhesion studies. *Eur. Biophys. J.*, **2**, 102–110.
- [Ajouz et al., 2000] Ajouz, B., Berrier, C., Besnard, M., Martinac, B., and Ghazi, A. (2000). Contributions of the different extramembranous domains of the mechanosensitive ion channel MscL to its response to membrane tension. *J. Biol. Chem.*, **275**, 1015–1022.
- [Akashi et al., 1998] Akashi, K., Miyata, H., Itoh, H., and Kinoshita, K. (1998). Formation of giant liposomes promoted by divalent cations : Critical role electrostatic repulsion. *Biophys. J.*, **74**, 2973–2982.
- [Alberts et al., 2002] Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Walter, P. (2002). *Molecular biology of the cell*. Garland Publishing Inc., New York, 4ème édition.
- [Andelman et al., 1987] Andelman, D., Brochard, F., and Joanny, J.-F. (1987). Phase transitions in Langmuir monolayers of polar molecules. *J. Chem. Phys.*, **86**, 3673–3681.
- [Andelman et al., 1992] Andelman, D., Kawakatsu, T., and Kawasaki, K. (1992). Equilibrium shape of two-component unilamellar membranes and vesicles. *Europhys. Lett.*, **19**, 57–62.
- [Angelova and Dimitrov, 1986] Angelova, M. and Dimitrov, D. (1986). Liposome electroformation. *Faraday Discuss. Chem. Soc.*, **81**, 303–311.
- [Bacri et al., 1996] Bacri, J.-C., Cabuil, V., Cebers, A., Ménager, C., and Perzynski, R. (1996). Flattening of ferro-vesicle undulations under magnetic field. *Europhys. Lett.*, **33**, 235–240.
- [Baeriswyl et al., 1986] Baeriswyl, D., Droz, M., Malaspina, A., and Martinoli, P., eds. (1986). *Tenth Gwatt Workshop : Physics in Living Matter*, volume 284, Switzerland. Springer-Verlag.

- [Barth et al., 2003] Barth, F., Humphrey, J., and Secomb, T., eds. (2003). *Sensors and Sensing in Biology and Engineering*. Springer-Verlag, New York.
- [Bass et al., 2003] Bass, R., Lochera, K., Borthsa, E., Poona, Y., Stropa, P., Lee, A., and Rees, D. C. (2003). The structures of BtuCD and MscS and their implications for transporter and channel function. *FEBS Lett.*, **555**, 111–115.
- [Baumgart et al., 2003] Baumgart, T., Hess, S., and Webb, W. (2003). Imaging coexisting fluid domains in biomembrane models coupling curvature and line tension. *Nature*, **425**, 821–824.
- [Berndl et al., 1990] Berndl, K., Käs, K., Lipowsky, R., Sackmann, E., and Seifert, U. (1990). Shape transformations of giant vesicles : Extreme sensitivity to bilayer asymmetry. *Europhys. Lett.*, **13**, 659–664.
- [Bloom et al., 1991] Bloom, M., Evans, E., and Mouritsen, O. (1991). Physical properties of the fluid lipid-bilayer component of cell membranes : a perspective. *Quat. Rev. Biophys.*, **24**, 293–397.
- [Blumenthal et al., 2003] Blumenthal, R., Clague, M., Durell, S., and Epanand, R. (2003). Membrane fusion. *Chem. Rev.*, **103**, 53–59.
- [Bo and Waugh, 1989] Bo, L. and Waugh, R. (1989). Determination of bilayer membrane bending stiffness by tether formation from giant, thin-walled vesicles. *Biophys. J.*, **55**, 509–517.
- [Brochard and Lennon, 1975] Brochard, F. and Lennon, J.-F. (1975). Frequency spectrum of the flicker phenomenon in erythrocytes. *J. Phys. (Paris)*, **36**, 1035–1047.
- [Cai and Lubensky, 1994] Cai, W. and Lubensky, T. (1994). Covariant hydrodynamics of fluid membranes. *Phys. Rev. Lett.*, **73**, 1186–1189.
- [Cai and Lubensky, 1995] Cai, W. and Lubensky, T. (1995). Hydrodynamics and dynamic fluctuations of fluid membrane. *Phys. Rev. E*, **52**, 4251–4266.
- [Canham, 1970] Canham, P. (1970). The minimum energy of bending as a possible explanation of biconcave shape of the human red blood cell. *J. Theor. Biol.*, **26**, 61–81.
- [Champeil et al., 1985] Champeil, P., Guillain, F., Vénien, C., and Gingold, M. (1985). Interaction of magnesium and inorganic phosphate with calcium-deprived sarcoplasmic reticulum adenosinetriphosphatase as reflected by organic solvent induced perturbation. *Biochemistry*, **24**, 69–81.
- [Chang, 2003] Chang, G. (2003). Multidrug resistance ABC transporters. *FEBS Lett.*, **555**, 102–105.
- [Darszon et al., 1980] Darszon, A., Vandenberg, C., Schonfeld, M., Ellisman, M., Spitzer, N., and Montal, M. (1980). Reassembly of protein-lipid complexes into large bilayer vesicles : perspectives for membrane reconstitution. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **77**, 239–243.

- [de Gennes and Taupin, 1982] de Gennes, P.-G. and Taupin, C. (1982). Microemulsions and the flexibility of oil/water interfaces. *J. Phys. Chem.*, **86**, 2294–2304.
- [de Groot and Mazur, 1984] de Groot, S. and Mazur, P. (1984). *Non-Equilibrium Thermodynamics*. Dover Publications, New York.
- [de Meiss, 1981] de Meiss, L. (1981). *The sarcoplasmic reticulum*. Wiley, New York.
- [Devaux, 1991] Devaux, P. (1991). Static and dynamic lipid asymmetry in cell membranes. *Biochemistry*, **30**, 1163–1173.
- [Dietrich et al., 2001] Dietrich, C., Bagatolli, L., Volovyk, Z., Thompson, N., Levi, M., Jacobson, K., and Gratton, E. (2001). Lipid rafts reconstituted in model membranes. *Biophys. J.*, **80**, 1417–1428.
- [Discher et al., 1999] Discher, B., Won, Y.-Y., Ege, D., Lee, J. C.-M., Bates, F., Discher, D., and Hammer, D. (1999). Polymersomes : Tough vesicles made from diblock copolymers. *Science*, **284**, 1143–1146.
- [Divet et al., 2002] Divet, F., Biben, T., Cantat, I., Stephanou, A., Fourcade, B., and Misbah, C. (2002). Fluctuations of a membrane interacting with a diffusion field. *Europhys. Lett.*, **60**, 795–801.
- [do Carmo, 1976] do Carmo, M. (1976). *Differential Geometry of Curves and Surfaces*. Prentice-Hall, New Jersey.
- [Doi and Edwards, 1986] Doi, M. and Edwards, S. (1986). *The Theory of Polymer Dynamics*. Clarendon Press, Oxford.
- [Dupont and Leigh, 1978] Dupont, Y. and Leigh, J. (1978). Transient kinetics of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} + Mg^{2+} ATPase studied by fluorescence. *Nature*, **273**, 396–398.
- [Döbereiner et al., 1997] Döbereiner, H.-G., Evans, E., Kraus, M., Seifert, U., and Wortis, M. (1997). Mapping vesicle shapes into the phase diagram : A comparison of experiment and theory. *Phys. Rev. E*, **55**, 4458–4479.
- [Evans, 1973] Evans, E. (1973). A new material concept for the red cell membrane. *Biophys. J.*, **13**, 926–940.
- [Evans et al., 1976] Evans, E., Waugh, R., and Melnik, L. (1976). Elastic area compressibility modulus of red blood cell membrane. *Biophys. J.*, **16**, 585–595.
- [Evans and Hochmuth, 1977] Evans, E. and Hochmuth, R. (1977). A solid-liquid composite model of the red cell membrane. *J Membr Biol.*, **30**, 351–362.
- [Evans, 1989] Evans, E. (1989). Structure and deformation properties of red blood cells : concepts and quantitative methods. *Methods Enzymol.*, **73**, 3–35.
- [Evans and Rawicz, 1990] Evans, E. and Rawicz, W. (1990). Entropy-driven tension and bending elasticity in condensed-fluid membranes. *Phys. Rev. Lett.*, **64**, 2094–2097.

- [Fa, 2003] Fa, N. (2003). *Micro-rhéologie de vésicules géantes*. Thèse de Doctorat, Université Strasbourg I.
- [Falson et al., 1997] Falson, P., Menguy, T., Corre, F., Bouneau, L., de Garcia, A. G., Soulié, S., Centeno, F., Möller, J., Champeil, P., and le Maire, M. (1997). The cytoplasmic loop between putative transmembrane segments 6 and 7 in sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase binds Ca^{2+} and is functionally important. *J. Biol. Chem.*, **272**, 17258–17262.
- [Farge and Devaux, 1992] Farge, E. and Devaux, P. (1992). Shape changes of giant liposomes induced by an asymmetric transmembrane distribution of phospholipids. *Biophys. J.*, **61**, 347–357.
- [Farge et al., 1999] Farge, E., Ojcius, D., Subtil, A., and Dautry-Varsat, A. (1999). Enhancement of endocytosis due to aminophospholipid transport across the plasma membrane of living cells. *Am. J. Physiol.*, **276**, C725–733.
- [Faucon et al., 1989] Faucon, J., Mitov, M., Méléard, P., Bivas, I., and Bothorel, P. (1989). Bending elasticity and thermal fluctuations of lipid membranes. Theoretical and experimental requirements. *J. Phys. France*, **50**, 2389–2412.
- [Forgac, 2000] Forgac, M. (2000). Structure, mechanism and regulation of the clathrin-coated vesicle and yeast vacuolar H^{+} -ATPases. *J. Exp. Biol.*, **203**, 71–80.
- [Forge et al., 1995] Forge, V., Mintz, E., Canet, D., and Guillain, F. (1995). Lumenal Ca^{2+} dissociation from the phosphorylated Ca^{2+} -ATPase of the sarcoplasmic reticulum is sequential. *J. Biol. Chem.*, **270**, 18271–18276.
- [Forstner et al., 2003] Forstner, M., Martin, D., Navar, M., and Kas, J. (2003). Simultaneous single-particle tracking and visualization of domain structure on lipid monolayers. *Langmuir*, **19**, 4876–4879.
- [Fournier et al., 2001] Fournier, J.-B., Ajdari, A., and Peliti, L. (2001). Effective area-elasticity and tension of micro-manipulated membranes. *Phys. Rev. Lett.*, **86**, 4970–4973.
- [Gerbeaud, 1998] Gerbeaud, C. (1998). *Effet de l'insertion de protéines et de peptides membranaires sur les propriétés mécaniques et les changements morphologiques de vésicules géantes*. Thèse de Doctorat, Université Bordeaux I.
- [Giardini et al., 2002] Giardini, P., Fletcher, D., and Theriot, J. (2002). Compression forces generated by actin comet tails on lipid vesicles. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **100**, 6493–6498.
- [Girard et al., 2004a] Girard, P., Prost, J., and Bassereau, P. (2004a). Active pumping effects on vesicle fluctuations. *En préparation et proposé à Phys. Rev. Lett.*
- [Girard et al., 2004b] Girard, P., Jülicher, F., and Prost, J. (2004b). Fluid membranes exchanging materials with external reservoirs. *Soumis à Eur. Phys. J. E*.

- [Girard et al., 2004c] Girard, P., Pécéréaux, J., Lenoir, G., Falson, P., Rigaud, J.-L., and Bassereau, P. (2004c). A new method for the reconstitution of membrane proteins into giant unilamellar vesicles. *Biophys. J. (à paraître)*.
- [Grotehans and Lipowsky, 1990] Grotehans, S. and Lipowsky, R. (1990). Absence of first-order unbinding transitions of fluid and polymerized membranes. *Phys. Rev. A*, **41**, 4574–4577.
- [Gruber and Schindler, 1994] Gruber, H. and Schindler, H. (1994). External surface and lamellarity of lipid vesicles : a practice-oriented set of assay methods. *Biochim. Biophys. Acta*, **1189**, 212–224.
- [Grüber et al., 2001] Grüber, G., Wieczorek, H., Harvey, W., and Müller, V. (2001). Structure-function relationships of A-, F- and V-ATPases. *J. Exp. Biol.*, **204**, 2597–2605.
- [Happel and Brenner, 1991] Happel, J. and Brenner, H. (1991). *Low Reynolds number hydrodynamics*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- [Harbich and Helfrich, 1990] Harbich, W. and Helfrich, W. (1990). Phases of egg lecithin in an abundance of water. *Chem. Phys. Lipids*, **55**, 191–205.
- [Helfrich, 1973] Helfrich, W. (1973). Elastic properties of lipid bilayers : Theory and possible experiments. *Z. Naturforsch C*, **28**, 693–703.
- [Helfrich, 1978] Helfrich, W. (1978). Steric interaction of fluid membrane in multilayer systems. *Z. Naturforsch A*, **33**, 305–315.
- [Helfrich and Servuss, 1984] Helfrich, W. and Servuss, R.-M. (1984). Undulations, steric interaction and cohesion of fluid membranes. *Il Nuovo Cimento*, **3D**, 137–151.
- [Helfrich et al., 1999] Helfrich, W., Klösgen, B., and Thimmel, J. (1999). The fragmented state of lipid bilayers in water : Discovery of a lower consolute point. *Pramana-J. Physique*, **53**, 13–23.
- [Heyn, 1979] Heyn, M. (1979). Determination of lipid order parameters and rotational correlation times from fluorescence depolarization experiments. *FEBS Lett.*, **108**, 359–364.
- [Hu and Granek, 1996] Hu, J.-G. and Granek, R. (1996). Buckling of amphiphilic monolayers induced by head-tail asymmetry. *J. Phys. II France*, **6**, 999–1022.
- [Häckl et al., 1997] Häckl, W., Seifert, U., and Sackmann, E. (1997). Effects of fully and partially solubilized amphiphiles on bilayer bending stiffness and temperature dependence of the effective tension of giant vesicles. *J. Phys. II France*, **7**, 1141–1157.
- [Israelachvili, 1994] Israelachvili, J. (1994). *Intermolecular and surface force*. Academic Press, San Diego, 4ème édition.
- [Jansen and Blume, 1995] Jansen, M. and Blume, A. (1995). A comparative study of diffusive and osmotic water permeation across bilayers composed of

- phospholipids with different head groups and fatty acyl chains. *Biophys. J.*, **68**, 997–1008.
- [Jiang et al., 2000] Jiang, Y., Lookman, T., and Saxena, A. (2000). Phase separation and shape deformation of two-phase membranes. *Phys. Rev. E*, **61**, R57–R60.
- [Jones, 1998] Jones, D. (1998). Do transmembrane protein superfolds exist? *FEBS Lett.*, **423**, 281–285.
- [Jutila and Kinnunen, 1997] Jutila, A. and Kinnunen, P. (1997). Novel features of the main transition of dimyristoylphosphatidylcholine bilayers revealed by fluorescence spectroscopy. *J. Phys. Chem. B*, **101**, 7635–7640.
- [Jülicher and Lipowsky, 1996] Jülicher, F. and Lipowsky, R. (1996). Shape transformations of vesicles with intramembrane domains. *Phys. Rev. E*, **53**, 2670–2683.
- [Kahya et al., 2001] Kahya, N., Pécheur, E.-I., de Boeij, W., Wiersma, D., and Hoekstra, D. (2001). Reconstitution of membrane proteins into giant unilamellar vesicles via peptide-induced fusion. *Biophys. J.*, **34**, 1464–1474.
- [Karatekin et al., 2003] Karatekin, E., Sandre, O., Guitouni, H., Borghi, N., Puech, P.-H., and Brochard-Wyart, F. (2003). Cascade of transient pores in giant vesicles : Line tension and transport. *Biophys. J.*, **84**, 1734–1749.
- [Karlsson et al., 2001] Karlsson, A., Karlsson, R., Karlsson, M., Cans, A.-S., Strömberg, A., Ryttsén, F., and Orwar, O. (2001). Molecular engineering : Networks of nanotubes and containers. *Nature*, **409**, 150–152.
- [Kim and Martin, 1981] Kim, S. and Martin, G. (1981). Preparation of cell-size unilamellar liposomes with high captured volume and defined size distribution. *Biochim. Biophys. Acta*, **646**, 1–9.
- [Kirchhausen, 2000] Kirchhausen, T. (2000). Three ways to make a vesicle. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, **1**, 187–198.
- [Kloesgen and Helfrich, 1993] Kloesgen, B. and Helfrich, W. (1993). Special features of phosphatidylcholine vesicles as seen in cryo-transmission electron microscopy. *Eur. Biophys. J.*, **22**, 329–340.
- [Kornberg and McConnell, 1971] Kornberg, R. and McConnell, H. (1971). Biochemistry. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, **10**, 1111–1120.
- [Kumar and Rao, 1998] Kumar, P. S. and Rao, M. (1998). Shape instabilities in the dynamics of a two-component fluid membrane. *Phys. Rev. Lett.*, **80**, 2489–2492.
- [Kumar et al., 2001] Kumar, P. S., Gompper, G., and Lipowsky, R. (2001). Budding dynamics of multicomponent membranes. *Phys. Rev. Lett.*, **86**, 3911–3914.
- [Kummrow and Helfrich, 1991] Kummrow, M. and Helfrich, W. (1991). Deformation of giant lipid vesicles by electric field. *Phys. Rev. A*, **44**, 8356–8360.

- [Kusumi et al., 1993] Kusumi, A., Sako, Y., and Yamamoto, M. (1993). Confined lateral diffusion of membrane receptors as studied by single particle tracking (nanovid microscopy). Effects of calcium-induced differentiation in cultured epithelial cells. *Biophys. J.*, **65**, 2021–2040.
- [Kwok and Evans, 1981] Kwok, R. and Evans, E. (1981). Thermoelasticity of large lecithin bilayer vesicles. *Biophys. J.*, **35**, 637–652.
- [Lasic, 1995] Lasic, D. (1995). *Liposomes : from physics to applications*. Elsevier, Amsterdam, 2nde édition.
- [Lee, 2002] Lee, A. (2002). Ca^{2+} -ATPase structure in the E1 and E2 conformations : mechanism, helix-helix and helix-lipid interactions. *Biochim. Biophys. Acta*, **1565**, 246–266.
- [Leibler, 1986] Leibler, S. (1986). Curvature instability in membranes. *J. Phys. (Paris)*, **47**, 507–516.
- [Leibler and Andelman, 1987] Leibler, S. and Andelman, D. (1987). Ordered and curved meso-structures in membranes and amphiphilic films. *J. Phys. (Paris)*, **48**, 2013–2018.
- [Levy et al., 1990] Levy, D., Seigneuret, M., Bluzat, A., and Rigaud, J.-L. (1990). Evidence for proton countertransport by the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase during calcium transport in reconstituted proteoliposomes with low ionic permeability. *J. Biol. Chem.*, **265**, 19524–19534.
- [Levy et al., 1992] Levy, D., Gulik, A., Bluzat, A., and Rigaud, J.-L. (1992). Reconstitution of the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase : mechanisms of membrane protein insertion into liposomes during reconstitution procedures involving the use of detergents. *Biochim. Biophys. Acta*, **1107**, 283–298.
- [Lipowsky and Leibler, 1986] Lipowsky, R. and Leibler, S. (1986). Unbinding transition of interacting membranes. *Phys. Rev. Lett.*, **56**, 2541–2544.
- [Lipowsky, 1992] Lipowsky, R. (1992). Budding of membranes induced by intramembrane domains. *J. Phys. II France*, **2**, 1825–1840.
- [Lipowsky, 1993] Lipowsky, R. (1993). Domain-induced budding of fluid membranes. *Biophys. J.*, **64**, 1133–1138.
- [Lipowsky et al., 1998] Lipowsky, R., Döbereiner, H.-G., Hiergeist, C., and Indriani, V. (1998). Membrane curvature induced by polymers and colloids. *Physica A*, **249**, 536–543.
- [Lipowsky and Sackmann, 1995] Lipowsky, R. and Sackmann, E., eds. (1995). *Structure and Dynamics of Membranes, Handbook of Biological Physics*, volume 1. Elsevier, North Holland.
- [Locher et al., 2002] Locher, K., Lee, A., and Rees, D. (2002). The E. coli BtuCD structure : A framework for ABC transporter architecture and mechanism. *Science*, **296**, 1091–1098.

- [Luisi and Walde, 2000] Luisi, P. and Walde, P., eds. (2000). *Giant vesicles*, volume 6 de *Perspectives in supramolecular chemistry*. John Wiley & Sons, Chichester.
- [MacDonald et al., 1991] MacDonald, R., MacDonald, R., Menco, B., Takeshita, K., Subarao, N., and Hu, L.-R. (1991). Small-volume extrusion apparatus for preparation of large, unilamellar vesicles. *Biochim. Biophys. Acta*, **1061**, 297–303.
- [MacKintosh, 1994] MacKintosh, F. (1994). Mixed fluid bilayers : Effects of confinement. *Phys. Rev. E*, **50**, 2891–2897.
- [MacLennan et al., 1985] MacLennan, D., Brandl, C., Korczak, B., and Green, N. (1985). Amino-acid sequence of a $\text{Ca}^{2+}+\text{Mg}^{2+}$ -dependent ATPase from rabbit muscle sarcoplasmic reticulum, deduced from its complementary DNA sequence. *Nature*, **316**, 696–700.
- [MacLennan et al., 1997] MacLennan, D., Rice, W., and Green, N. (1997). The mechanism of Ca^{2+} transport by sarco(endo)-plasmic reticulum Ca^{2+} -ATPases. *J. Biol. Chem.*, **272**, 28815–28818.
- [Maingret et al., 1999a] Maingret, F., Patel, A., Lesage, F., Lazdunski, M., and Honore, E. (1999a). Mechano- or acid stimulation, two interactive modes of activation of the TREK-1 potassium channel. *J. Biol. Chem.*, **274**, 26691–26696.
- [Maingret et al., 1999b] Maingret, F., Fosset, M., Lesage, F., Lazdunski, M., and Honore, E. (1999b). TRAAK is a mammalian neuronal mechano-gated k^+ channel. *J. Biol. Chem.*, **274**, 1381–1387.
- [Manneville et al., 1999] Manneville, J.-B., Bassereau, P., Lévy, D., and Prost, J. (1999). Activity of transmembrane proteins induces magnification of shape fluctuations of lipid membranes. *Phys Rev. Lett.*, **82**, 4356–4359.
- [Manneville, 1999] Manneville, J.-B. (1999). *Fluctuations de membranes actives*. Thèse de Doctorat, Université Paris 7.
- [Manneville et al., 2001] Manneville, J.-B., Bassereau, P., Ramaswamy, S., and Prost, J. (2001). Active membrane fluctuations studied by micropipet aspiration. *Phys Rev. E*, **64**, 021908.
- [Mathivet et al., 1996] Mathivet, L., Cribier, S., and Devaux, P. (1996). Shape change and physical properties of giant phospholipid vesicles prepared in the presence of an AC electric field. *Biophys. J.*, **70**, 1112–1121.
- [Menguy et al., 2002] Menguy, T., Corre, F., Juul, B., Bouneau, L., Lafitte, D., Derrick, P., Sharma, P., Falson, P., Levine, B., Möller, J., and le Maire, M. (2002). Involvement of the cytoplasmic loop L6-7 in the entry mechanism for transport of Ca^{2+} through the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase. *J. Biol. Chem.*, **277**, 13016–13028.

- [Miao et al., 1994] Miao, L., Seifert, U., Wortis, M., and Döbereiner, H.-G. (1994). Budding transitions of fluid-bilayer vesicles : The effect of area-difference elasticity. *Phys. Rev. E*, **49**, 5389–5407.
- [Michalet, 1994] Michalet, X. (1994). *Etude expérimentale de vésicules phospholipidiques de genre topologique non sphérique*. Thèse de Doctorat, Université Paris 7.
- [Milner et al., 1989] Milner, S., Joanny, J.-F., and Pincus, P. (1989). Buckling of langmuir monolayers. *Europhys. Lett.*, **9**, 495–500.
- [Mitchinson et al., 1982] Mitchinson, C., Wilderspin, A., Trinnaman, B., and Green, N. (1982). Identification of a labelled peptide after stoichiometric reaction of fluorescein isothiocyanate with the Ca^{2+} -dependant adenosine triphosphatase of sarcoplasmic reticulum. *FEBS Lett.*, **146**, 87–92.
- [Mohandas and Evans, 1994] Mohandas, N. and Evans, E. (1994). Mechanical properties of the red cell membrane in relation to molecular structure and genetic defects. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **23**, 787–818.
- [Moscho et al., 1996] Moscho, A., Owar, O., Chiu, D., Modi, B., and Zare, R. (1996). Rapid preparation of giant unilamellar vesicles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 11443–11447.
- [Mutz and Bensimon, 1991] Mutz, M. and Bensimon, D. (1991). Observation of toroidal vesicles. *Phys. Rev. A*, **43**, 4525–4527.
- [Méléard et al., 1992] Méléard, P., Faucon, J., Mitov, M., and Bothorel, P. (1992). Pulsed-light microscopy applied to the measurement of the bending elasticity of giant liposomes. *Europhys. Lett.*, **19**, 267–271.
- [Méléard et al., 1998] Méléard, P., Gerbeaud, C., Bardusco, P., Jeanaine, N., Mitov, M., and Fernandez-Puente, L. (1998). Mechanical properties of model membranes studied from shape transformations of giant vesicles. *Biochimie*, **80**, 401–413.
- [Méléard et al., 2000] Méléard, P., Gerbeaud, C., Pott, T., and Mitov, M. (2000). *Electromechanical properties of model membranes and giant vesicle deformations*, chapitre 13. Giant vesicles. John Wiley & Sons.
- [Möller et al., 1979] Möller, J., End, K., and Anderse, J. (1979). Enzyme kinetics and substrate stabilization of detergent-solubilized and membraneous ($\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+}$)-activated ATPase from sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.*, **255**, 1912–1920.
- [Needham and Evans, 1988] Needham, D. and Evans, E. (1988). Structure and mechanical properties of giant lipid (dmpc) vesicles bilayers from 20°C below to 10°C above the liquid crystal-crystalline phase transition at 24°C. *Biochemistry*, **27**, 8261–8269.
- [Nelson et al., 1989] Nelson, D., Piran, T., and Weinberg, S. (1989). *Statistical Mechanics of Membranes and Surfaces*, volume 5. World Scientific, Singapore.

- [Niggemann et al., 1995] Niggemann, G., Kummrow, M., and Helfrich, W. (1995). The bending rigidity of phosphatidylcholine bilayers : Dependences on experimental method, sample cell sealing and temperature. *J. Phys. II France*, **5**, 413–425.
- [Odermatt et al., 1996] Odermatt, A., Taschner, P., Khanna, V., Busch, H., Kaptani, G., Jablecki, C., Breuning, M., and MacLennan, D. (1996). Mutations in the gene-encoding SERCA1, the fast-twitch skeletal muscle sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase, are associated with Brody disease. *Nature Genet.*, **14**, 191–194.
- [Olbrich et al., 2000] Olbrich, K., Rawicz, W., Needham, D., and Evans, E. (2000). Water permeability and mechanical strength of polyunsaturated phosphatidylcholine bilayers. *Biophys. J.*, **79**, 321–327.
- [Onsager, 1931a] Onsager, L. (1931a). Reciprocal relations in irreversible processes I. *Phys. Rev.*, **37**, 405–426.
- [Onsager, 1931b] Onsager, L. (1931b). Reciprocal relations in irreversible processes II. *Phys. Rev.*, **38**, 2265–2279.
- [Pelkmans and Helenius, 2002] Pelkmans, L. and Helenius, A. (2002). Endocytosis via caveola. *Traffic*, **3**, 311–320.
- [Petrov, 1984] Petrov, A. (1984). Flexoelectricity of lyotropics and biomembranes. *Il Nuovo Cimento D*, **3**, 174–191.
- [Piknova et al., 1993] Piknova, B., Pérochon, E., and Tocanne, J.-F. (1993). Hydrophobic mismatch and long-range protein/lipid interactions in bacteriorhodopsin/phosphatidylcholine vesicles. *Eur. J. Biochem.*, **218**, 385–396.
- [Prost and Bruinsma, 1996] Prost, J. and Bruinsma, R. (1996). Shape fluctuations of active membranes. *Europhys. Lett.*, **33**, 321–326.
- [Prost et al., 1998] Prost, J., Manneville, J.-B., and Bruinsma, R. (1998). Fluctuation-magnification of non-equilibrium membranes near a wall. *Eur. Phys. J. E*, **1**, 465–480.
- [Puech, 2003] Puech, P.-H. (2003). *Vésicules géantes décorées : adhésion et transport*. Thèse de Doctorat, Université Paris 6.
- [Pécéréaux, 2004] Pécéréaux, J. (2004). *Mesure du spectre de fluctuations de vésicules géantes par analyse de contour : application aux membranes passives et actives*. Thèse de Doctorat, Université Paris 6.
- [Pécéréaux et al., 2004] Pécéréaux, J., Döbereiner, H.-G., Prost, J., Joanny, J.-F., and Bassereau, P. (2004). Refined contour analysis of giant unilamellar vesicles. *Eur. Phys. J. E* (à paraître).
- [Ramaswamy et al., 2000] Ramaswamy, S., Toner, J., and Prost, J. (2000). Nonequilibrium fluctuations, traveling waves, and instabilities in active membranes. *Phys. Rev. Lett.*, **84**, 3494–3497.

- [Ramaswamy and Rao, 2001] Ramaswamy, S. and Rao, M. (2001). The physics of active membrane (special issue on Physics at the Scale of the Cell). *C. R. Acad. Sci. (Paris)*, t. **2(Sér. IV)**, 817–839.
- [Ramaswamy, 2003] Ramaswamy, S. (2003). communications personnelles.
- [Rand and Burton, 1964] Rand, R. and Burton, A. (1964). Mechanical properties of the red cell membrane. I. Membrane stiffness and intracellular pressure. *Biophys. J.*, **45**, 115–135.
- [Rao and Sarasij, 2001] Rao, M. and Sarasij, R. (2001). Active fusion and fission processes on a fluid membrane. *Phys. Rev. Lett.*, **87**, 128101.
- [Rauch and Farge, 2000] Rauch, C. and Farge, E. (2000). Endocytosis switch controlled by transmembrane osmotic pressure and phospholipid number asymmetry. *Biophys. J.*, **78**, 3036–3047.
- [Rauch, 2001] Rauch, C. (2001). *Forces mécaniques endogènes et exogènes régulatrices de l'activité d'endocytose : rôle dans la différenciation cellulaire*. Thèse de Doctorat, Université Paris 7.
- [Rawicz et al., 2000] Rawicz, W., Olbrich, K., McIntosh, T., Needham, D., and Evans, E. (2000). Effect of chain length and unsaturation on elasticity of lipid bilayers. *Biophys. J.*, **79**, 328–339.
- [Rigaud et al., 1988] Rigaud, J.-L., Paternostre, M., and Bluzat, A. (1988). Mechanisms of membrane protein insertion into liposomes during reconstitution procedures involving the use of detergents. 2. incorporation of the light-driven proton pump bacteriorhodopsin. *Biochemistry*, **27**, 2677–2688.
- [Rigaud et al., 1995] Rigaud, J.-L., Levy, D., Mosser, G., and Lambert, O. (1995). Reconstitution of membrane proteins into liposomes : application to energy-transducing membrane proteins. *Biochim. Biophys. Acta*, **1231**, 223–246.
- [Rigaud et al., 1998] Rigaud, J.-L., Pitard, B., and Levy, D. (1998). Detergent removal by non-polar polystyrene beads : Application to membrane reconstitution and two-dimensional crystallization. *Eur. Biophys. J.*, **27**, 305–319.
- [Rigaud et al., 2000] Rigaud, J.-L., Chami, M., Lambert, O., and Levy, D. (2000). Use of detergents in two-dimensional crystallization of membrane proteins. *Biochim. Biophys. Acta*, **1508**, 112–118.
- [Rigaud and Levy, 2003] Rigaud, J.-L. and Levy, D. (2003). Reconstitution of membrane proteins into liposomes. *Methods Enzymol.*, **372**, 65–86.
- [Rädler et al., 1995] Rädler, J., Feder, T., Strey, H., and Sackmann, E. (1995). Fluctuation analysis of tension-controlled undulation forces between giant vesicles and solid substrates. *Phys. Rev. E*, **51**, 4526–4536.
- [Saffman and Delbrück, 1975] Saffman, P. and Delbrück, M. (1975). Brownian motion in biological membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **72**, 3111–3113.

- [Sakuntabhai et al., 1999] Sakuntabhai, A., Ruiz-Perez, V., Carter, S., Jacobsen, N., Burge, S., Monk, S., Smith, M., Munro, C., O'Donovan, M., Craddock, N., Kucherlapati, R., Rees, J., Owen, M., Lathrop, G., Monaco, A., Strachan, T., and Hovnanian, A. (1999). Mutations in ATP2A2, encoding a Ca^{2+} pump, cause Darier disease. *Nature Genet.*, **21**, 271–277.
- [Sandre et al., 2000] Sandre, O., Ménager, C., Prost, J., Cabuil, V., Bacri, J.-C., and Cebers, A. (2000). *Oblate-prolate transition of ellipsoidal giant magnetoliposomes : Experiments showing an anisotropic spontaneous curvature*, chapitre 11. Giant vesicles. John Wiley & Sons.
- [Sandre, 2000] Sandre, O. (2000). *Pores transitoires, adhésion et fusion des vésicules géantes*. Thèse de Doctorat, Université Paris 6.
- [Sankararaman et al., 2002] Sankararaman, S., Menon, G., and Kumar, S. (2002). Two-component fluid membranes near repulsive walls : linearized hydrodynamics of equilibrium and nonequilibrium states. *Phys. Rev. E*, **66**, 031914.
- [Scarborough, 1999] Scarborough, G. (1999). Structure and function the P-type ATPases. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **11**, 517–522.
- [Scarpa and Inesi, 1972] Scarpa, A. and Inesi, G. (1972). Ionophore mediated equilibration of calcium ion gradients in fragmented-sarcoplasmic reticulum. *FEBS Lett.*, **22**, 273–276.
- [Schneider et al., 1984] Schneider, M., Jenkins, J., and Webb, W. (1984). Thermal fluctuations of large quasi-spherical bimolecular phospholipid vesicles. *J. Phys. (Paris)*, **45**, 1457–1472.
- [Sciaky et al., 1997] Sciaky, N., Presley, J., Smith, C., Zaal, Z., Cole, N., Moreira, J., Terasaki, M., Siggia, E., and Lippincott-Schwartz, J. (1997). Golgi tubule traffic and the effects of brefeldin A visualized in living cells. *J. Cell. Biol.*, **139**, 1137–1155.
- [Seifert et al., 1991] Seifert, U., Berndl, K., and Lipowsky, R. (1991). Shape transformations of vesicles : Phase diagram for spontaneous-curvature and bilayer-coupling models. *Phys. Rev. A*, **44**, 1182–1202.
- [Seifert, 1991] Seifert, U. (1991). Vesicles of toroidal topology. *Phys. Rev. Lett.*, **66**, 2404–2407.
- [Seifert, 1997] Seifert, U. (1997). Configurations of fluid membranes and vesicles. *Adv. Phys.*, **46**, 13–137.
- [Seifert, 1999] Seifert, U. (1999). Fluid membranes in hydrodynamic flow fields : Formalism and an application to fluctuating quasispherical vesicles in shear flow. *Eur. Phys. J. B*, **8**, 405–415.
- [Seul and Andelman, 1995] Seul, M. and Andelman, D. (1995). Domain shapes and patterns : The phenomenology of modulated phases. *Science*, **267**, 476–483.

- [Sever et al., 2000] Sever, S., Damke, H., and Schmid, S. (2000). Garrotes, springs, ratchets, and whips : putting dynamin models to the test. *Traffic*, **1**, 385–392.
- [Shibuya et al., 2002] Shibuya, A., Saito, Y., and Hyuga, H. (2002). Morphology of axisymmetric vesicles with encapsulated filaments and impurities. *J. Phys. Soc. Jpn.*, **71**, 1780–1788.
- [Singer and Nicolson, 1972] Singer, S. and Nicolson, G. (1972). The fluid mosaic model of the structure of cell. *Science*, **175**, 720–731.
- [Smith et al., 1982] Smith, J., Mohandas, N., and Shohet, S. (1982). Interaction of amphipathic drugs with erythrocytes from various species. *Am. J. Vet. Res.*, **43**, 1041–1048.
- [Solon, 2004] Solon, J. (2004). *Interaction entre membranes lipidiques chargées : instabilités, déformations et mouvement*. Thèse de Doctorat, Université Paris 6.
- [Stewart and MacLennan, 1974] Stewart, P. and MacLennan, D. (1974). Surface particles of sarcoplasmic reticulum membranes. Structural features of the adenosine triphosphatase. *J. Biol. Chem.*, **249**, 985–993.
- [Sudbrak et al., 2000] Sudbrak, R., Brown, J., Dobson-Stone, C., Carter, S., Ramser, J., White, J., Healy, E., Dissanayake, M., Larregue, M., Perrusel, M., Lehrach, H., Munro, C., Strachan, T., Burge, S., Hovnanian, A., and Monaco, A. (2000). Hailey-Hailey disease is caused by mutation in ATP2C1 encoding a novel Ca^{2+} pump. *Hum. Mol. Genet.*, **9**, 1131–1140.
- [Szleifer et al., 1990] Szleifer, I., Kramer, D., and Ben-Shaul, A. (1990). Molecular theory of curvature elasticity in surfactant films. *J. Chem. Phys.*, **92**, 6800–6817.
- [Takeo et al., 1991] Takeo, Y., Takuya, K., and Eiji, K. (1991). Vesiculation induced by hydrostatic pressure in human erythrocyte. *J. Biochem.*, **110**, 355–359.
- [Taniguchi et al., 1994] Taniguchi, T., Kawasaki, K., Andelman, D., and Kawakatsu, T. (1994). Equilibrium shape deformation of two-component vesicles. *J. Phys. II France*, **4**, 1333–1362.
- [Taniguchi, 1996] Taniguchi, T. (1996). Shape deformation and phase separation dynamics of two-component vesicles. *Phys. Rev. Lett.*, **76**, 4444–4447.
- [Toyoshima et al., 2000] Toyoshima, C., Nagasako, M., Nomura, H., and Ogawa, H. (2000). Crystal structure of the calcium pump of sarcoplasmic reticulum at 2.6 Å resolution. *Nature*, **405**, 647–655.
- [Toyoshima and Nomura, 2002] Toyoshima, C. and Nomura, H. (2002). Structural changes in the calcium pump accompanying the dissociation of calcium. *Nature*, **418**, 605–611.

- [Vereb et al., 2003] Vereb, G., Szollosi, J., Matko, J., Nagy, P., Farkas, T., Vigh, L., Mátyus, L., and Waldmann, T. (2003). Dynamic, yet structured : The cell membrane three decades after the Singer-Nicolson model. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 8053–8058.
- [Wintz et al., 1996] Wintz, W., Döbereiner, H.-G., and Seifert, U. (1996). Starfish vesicles. *Europhys. Lett.*, **33**, 403–408.
- [Zachowski, 1993] Zachowski, A. (1993). Phospholipids in animal eukaryotic membranes : transverse asymmetry and movement. *Biochem. J.*, **294**, 1–14.
- [Zhelev et al., 1994] Zhelev, D., Needham, D., and Hochmuth, R. (1994). A novel micropipet method for measuring the bending modulus of vesicle membranes. *Biophys. J.*, **67**, 720–727.

Membranes hors d'équilibre : échanges et transport actif

Résumé : Les membranes biologiques sont le centre de nombreux phénomènes hors équilibres qui sont essentiels pour les cellules. Pour une description physique plus complète des biomembranes, nous avons étudié, théoriquement et expérimentalement, les effets de deux processus hors équilibres sur les propriétés de membranes artificielles.

Premièrement, nous avons développé une théorie, complètement covariante, des membranes qui sont soumises à des échanges de matériels biologiques (*i.e.* lipides, enzymes et protéines membranaires). Avec cette description, l'étude des fluctuations de telles membranes nous a montré que, sous certaines conditions, celles-ci peuvent devenir instables en développant un long et fin tubule qui présente certaines similitudes morphologiques avec les membranes des organelles. Nous avons appliqué ce modèle avec succès pour décrire le phénomène de fusion observé expérimentalement entre de petites et de grosses vésicules chargées mimant le phénomène d'endocytose.

Deuxièmement, nous avons étudié les effets de l'activité des protéines membranaires sur le spectre des fluctuations. Un modèle théorique qui prend en compte l'activité hors-équilibre des protéines prévoit une amplification des fluctuations lorsqu'un bruit hors-équilibre s'ajoute au bruit thermique. Pour tester expérimentalement ces prévisions, nous avons reconstitué une pompe ATP-dépendante, l'ATPase-Calcium dans des vésicules géantes unilamellaires. Puis grâce à la technique d'aspiration par micropipette, nous avons mis en évidence à la fois une décroissance du module de courbure liée à la présence des protéines dans la membrane, et une augmentation des fluctuations dans les membranes actives.

Mots-clefs : membranes, vésicules géantes, fluctuations hors-équilibres, pompe active, processus de transport, échanges de biomatériels, reconstitution.

Nonequilibrium membranes : exchanges and active transport

Abstract : Biological membranes are subjected to many nonequilibrium phenomena that are essential for living cells. In order to get a more complete physical description of these membranes, we have studied both theoretically and experimentally the effect of two nonequilibrium processes on the properties and dynamics of membranes.

In a first part, we propose a general theory, completely covariant, of fluid membranes which are subjected to exchanges of biological materials (*e.g.* lipid vesicles, enzymes or membrane proteins). Using this phenomenology to study fluctuations of such membranes, we have shown that under certain conditions these develops an instability and shoots out a long thin tubule which bear a morphological resemblance to membranes of eukaryotic organelles. We have also applied successfully this model to describe the fusion phenomenon experimentally observed between small and giant charged vesicles mimicking endocytosis phenomena described in living cells.

In a second part, we have considered the modification of fluctuations spectrum of membranes induced by transmembrane proteins activity. A theoretical model, developed in labs, taking into account the non-equilibrium activity predicts that the shape fluctuations should be amplified in presence of an additional nonequilibrium noise source. To test experimentally these predictions, we have developed a new general method for the reconstitution of transmembrane proteins as the ATP-driven pump, Calcium-ATPase into giant unilamellar vesicles. Using micropipet technique, we have measured both a bending rigidity decrease due to the presence of proteins into the membrane, and an enhanced fluctuation level in active membranes.

Keywords : membranes, giant vesicles, nonequilibrium fluctuations, active pump, transport processes, biomaterial exchanges, reconstitution.
