HAL
open science

DYNAMIQUE DES MEMBRANES HETEROGENES ET EFFETS DES MOLECULES D'ASYMETRIE STERIQUE POSITIVE. ETUDES SUR DES VESICULES GEANTES

Galya Staneva

To cite this version:

Galya Staneva. DYNAMIQUE DES MEMBRANES HETEROGENES ET EFFETS DES MOLECULES D'ASYMETRIE STERIQUE POSITIVE. ETUDES SUR DES VESICULES GEANTES. Autre [q-bio.OT]. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2004. Français. NNT : . tel-00007282v2

HAL Id: tel-00007282

https://theses.hal.science/tel-00007282v2

Submitted on 3 Nov 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 **de PARIS VI** « Pierre et Marie Curie »

ÉCOLE DOCTORALE **INTER///BIO**

Spécialité
BIOPHYSIQUE

Présentée par **Galya STANEVA**

Pour obtenir le titre de

DOCTEUR de l'UNIVERSITÉ de PARIS VI « Pierre et Marie Curie »

Dynamique des membranes hétérogènes et effets des molécules d'asymétrie stérique positive. Étude sur des vésicules géantes

Soutenue le 27 septembre 2004 devant le jury composé de

M.	B. GOUD	Rapporteur
M.	M. MITOV	Rapporteur
M.	G. TRUGNAN	Président du jury
Mme	A. MOMCHILOVA-PANKOVA	Examinateur
Mme	M. ANGELOVA	Co-directeur français
M.	K. KOUMANOV	Co-directeur bulgare

Remerciements

Cette thèse, thèse en cotutelle franco-bulgare a été réalisée à l'Institut de Biophysique de l'Académie des Sciences de Bulgarie et aux laboratoires L.P.B.C. / de l'Université Pierre et Marie Curie / CNRS UMR 7030 et de l'Unité 538 / INSERM. Pendant ces quatre années de thèse, j'ai bénéficié de l'aide et des conseils de nombreuses personnes que je souhaiterais sincèrement remercier.

Je tiens à exprimer en premier lieu ma reconnaissance au laboratoire Franco-Bulgare "Vésicules et Membranes" crée dans le cadre d'une coopération entre le CNRS et l'Académie des Sciences de Bulgarie. Cette coopération a permis à des étudiants bulgares d'effectuer leur thèse, thèses franco-bulgares, dont j'étais actuellement la dernière représentante. Je remercie M. Bothorel, M. Yakimov et Mme Grigorova d'avoir été toujours disponibles et prêts de coopérer au nom des relations scientifiques Franco-Bulgare. Je voudrais également remercier M. Meleard grâce à qui cette thèse s'est achevée avec succès.

Je tiens à remercier M. Trugnan de m'avoir fait l'honneur de bien vouloir juger ce travail et de présider le jury de cette thèse, je lui en suis respectueusement reconnaissante.

Je remercie vivement M. Bruno Goud et M. Marin Mitov d'avoir acceptés la lourde tâche de relire mon manuscrit et de juger de mon travail en tant que rapporteurs. Merci sincèrement pour la grande patience d'avoir lu ce texte en français avec des phrases construites complètement selon les règles de la langue bulgare. Ecrire des phrases françaises, c'est encore un pilotage supérieur pour moi.

Je suis très reconnaissante à mes directeurs de thèse, Mme M. Anguelova et M. K. Koumanov.

Grâce au Pr. Miglena Anguelova j'ai découvert l'art appelé « Vésicules Géantes Unilamellaires ». Je vous assure que les VGUs ne sortaient pas de toute la main.

Pour savoir créer ce chef-d'œuvre, il est nécessaire que l'élève possède 1% de talent (faire l'art) et 99% d'obstination. Tout d'abord, remarquez qu'il est nécessaire que vous disposiez d'un bon professeur de VGUs, 99% de qualité et au moins 1 % de patience pour pouvoir attendre le moment du premier « chef-d'œuvre ». En bref, j'ai eu la grande chance d'apprendre du meilleur professeur, le maître des VGUs - Miglena Anguelova.

Merci Miglena !

L'académicien Kamen Koumanov, avec son immense culture scientifique et sa grande disponibilité à chaque instant de la journée, m'a fait découvrir le monde des enzymes particulièrement celui de la phospholipase A_2, de la sphingomyélinase et finalement mais pas à la dernière place la « lipidomics » et le grand sujet des « rafts ». Je vous remercie aujourd'hui pour la qualité de votre encadrement envers un physicien dans le domaine de la biologie. Merci pour le courage quand je doutais de mes forces. Merci pour le grand travail sur mon manuscrit de thèse en français.

Merci Kamen !

Je tiens à remercier mes directeurs de thèse pour le sujet de recherche passionnant qu'ils m'ont proposé, pour le bon équilibre entre les conseils pertinents lorsque j'en avais besoin et la liberté de travail dans les bonnes périodes.

Je pense que notre travail est un exemple d'une symbiose successive entre l'étude au niveau cellulaire et l'étude au niveau des systèmes modèles. Nous avons confirmé la grande phrase d'Aristote que « la pensée n'est pas possible sans images ».

Au cours de cette thèse, nous avons collaboré avec l'équipe de Martine Ben Amar. Je voudrais bien remercier Mme Ben Amar et Jean-Marc pour les discussions « chaudes » et si utiles entre eux, les « vrais » physiciens et moi la biophysicienne. J'espère qu'on trouvera finalement le consensus pour le mécanisme moléculaire du bourgeonnement et de la fission des domaines L_o.

Au cours de cette thèse, j'ai eu l'occasion d'être éclairée par des discussions fructueuses avec M. Seigneuret, M. Trugnan, M. Wolf, M. Bivas, M. Mitov, M. Petrov, Mme Tzoneva, Mme Mutafchieva, Mme Nikolova et Mme Vitkova.

Je voudrais également remercier l'ensemble des membres de la « Mig's Team » pour la bonne humeur générale et l'esprit de camaraderie. Ils ont rendu mes séjours en France très agréables. Merci donc à Virginie, Nicolas et Antonin.

Enfin, je tiens à remercier l'Unité 538 / INSERM (Trugnan's Team) et L.P.B.C. / l'Université Pierre et Marie Curie / CNRS UMR 7030 pour le bon environnement humain et scientifique. Je suis très reconnaissante à Cédric, Nicolas, Agnès, Jean-Marc qui ont eu la grande patience d'avoir lu tout mon manuscrit de thèse et d'avoir corrigé les fautes d'orthographes mais également la structure des phrases. Nicolas, merci aussi pour tes remarques sur mon exposé, elles étaient vraiment très constructives. Merci à tous d'avoir partagé vos connaissances scientifiques.

Je tiens à remercier bien chaleureusement pour la grande amitié et pour le soutien permanent de Cédric et Virginie, pour le temps précieux que vous m'avez consacré, pour les moments si agréables passés ensemble.

Du fond du cœur, merci à tous pour votre bonjour chaque jour, pour vos sourires et pour votre envie de m'apporter du bonheur.

A mon mari Georgi

Merci pour ton soutien sans réserve de tous les jours !

Благодаря ти за безрезервната подкрепа!

et

A mon fils Niki

Pardonne ta jeune maman !

Ники, извини твоята млада майка!

Tables des matières

Abréviations _____ *10*

I Introduction générale _____ *12*

I.1 Séparation de phase et formation des domaines dans des bicouches lipidiques modèles _____ **15**

I.2 Composition et structure des membranes biologiques _____ **16**

I.2.1 Les Glycérophospholipides _____ 16

I.2.2 Les Sphingolipides _____ 17

I.2.3 Le Cholestérol _____ 18

I.3 Les différents états physiques et thermodynamiques des membranes lipidiques _____ **21**

I.3.1 Le concept de forme _____ 21

I.3.2 Les phases gel (solide - ordonnée) (L_β) et fluide (liquide - désordonnée) (L_α) ____ 23

I.3.3 Le rôle du cholestérol dans la formation de phase liquide-ordonnée au sein des membranes lipidiques _____ 24

I.4 L'origine de la séparation de phase _____ **25**

I.4.1 Mélanges binaires des composants lipidiques structurellement semblables _____ 26

I.4.2 Mélanges binaires des lipides structurellement différents _____ 28

I.4.2.1 Mélanges des lipides chargés et/ou neutres _____ 28

I.4.2.2 Lipides dont la différence aux températures de transition de phase est grande _ 29

I.4.2.3 Le cholestérol: Influence sur des phospholipides _____ 31

I.4.2.4 Mélanges de Cholestérol - Sphingolipide _____ 32

I.4.3 Mélanges ternaires _____ 33

I.4.4 Corrélation entre la morphologie des domaines solides et la composition binaire des mélanges _____ 34

I.5 Rafts _____ **38**

I.5.1 Les cavéoles : un exemple de raft « spécialisé » _____ 38

I.5.2 Rafts _____ 39

I.5.2.1 L'association du cholestérol et des lipides à chaînes saturées conditionne la formation de phases L_o insolubles aux détergents _____ 39

I.5.2.2 Les rafts dans les membranes des cellules eucaryotes : réalité ou artefact ? ___ 41

I.5.2.3 Quelle est la composition des rafts ? Méthode différente, réponse différente __ 42

I.5.2.4 Méthodes sans utilisation de détergents _____ 42

I.5.2.5 Modèles de composition de raft basés sur des résultats de différents protocoles d'isolement de raft 43
I.5.3 Domaines lipidiques 46
Propriétés et description des domaines en phase L_o 46
I.5.3.1 Formation des domaines en phase L_o dans VGUs 46
I.5.3.2 Taille des domaines en phase L_o et rafts 48
I.5.4 Impacts biologiques de séparation de phase 49
I.5.4.1 Protéines au sein des rafts 49
I.5.4.2 La séparation de phase comme modulateur de l'activité enzymatique 50
I.5.4.3 Introduction de la fonction des rafts 53
I.5.4.3.1 Méthyl-β-cyclodextrine 54
I.5.4.3.2 Sphingomyélinase 56

I.6 Propriétés physicochimiques des membranes lipidiques modèles 58
I.6.1 Approche thermodynamique 58
Auto–association des lipides 58
I.6.2 Approche géométrique 60
I.6.3 Approche mécanique 64
I.6.3.1 Les ondulations membranaires provoquées par l'agitation thermique 65
I.6.3.2 La technique de micropipette 67
I.6.3.3 Modules élastiques k_c et K_S 68
I.6.4 Bourgeonnement et Fission des domaines : approche théorique 69
I.6.4.1 L'énergie de bord et la tension de ligne 70
I.6.4.2 L'énergie de bord contre l'énergie de courbure 70

I.7 Objectifs de la thèse 72

II Matériels et méthodes 74

II.1 Matériels utilisés 74

II.2 Formation et visualisation des vésicules géantes unilamellaires (VGU) 76
II.2.1 Electroformation 76
II.2.2 Visualisation des VGUs par la microscopie optique 78
II.2.2.1 Contraste de phase 79
II.2.2.2 Microscopie de fluorescence 80
II.2.2.3 Vidéomicroscopie 81

II.3 Microinjection des macromolécules actives 81

III Résultats et discussions _____ *85*

III.1 Formation et stabilité des domaines en phase L_o _____ **85**

III.1.1 La morphologie de phase, dynamique des domaines _____ 85

III.1.2 La stabilité des domaines en phase L_o _____ 91

III.1.2.1 Motivation de l'étude _____ 91

III.1.2.1.1 La déplétion de cholestérol au niveau cellulaire _____ 91

III.1.2.1.2 Sphingomyélinases et rafts au niveau cellulaire _____ 93

III.1.2.2 La déplétion de cholestérol par la méthyl β-cyclodextrine _____ 94

III.1.2.2.1 Résultats _____ 94

III.1.2.2.2 Discussion _____ 95

III.1.2.3 L'hydrolyse de la sphingomyéline par la sphingomyélinase _____ 97

III.1.2.3.1 Résultats _____ 97

III.1.2.3.2 Discussion _____ 99

III.2 La $sPLA_2$ induit le bourgeonnement et la fission des domaines en phase L_o à partir des vésicules géants unilamellaires _____ **105**

III.2.1 Résultats _____ 105

III.2.1.1 $sPLA_2$ et VGUs hétérogènes _____ 105

III.2.1.2 Bourgeonnement et Fission en fonction de la température _____ 107

III.2.1.3 Influence de l'activité enzymatique _____ 111

III.2.1.4 $sPLA_2$ et VGUs composées de EYPC _____ 113

III.2.1.5 Effet inhibiteur de la SM _____ 116

III.2.1.6 Effet du DPPC _____ 120

III.2.1.7 Effet du Céramide _____ 123

III.2.2 Discussion _____ 127

III.2.2.1 Interaction de la $sPLA_2$ avec des VGUs homogènes, transformations morphologiques _____ 127

III.2.2.1.1 VGUs composées d'une seule espèce lipidique _____ 127

Une approche moléculaire _____ 127

Une approche mécanique _____ 131

III.2.2.1.2 VGUs composées de deux espèces lipidiques _____ 135

Le rôle inhibiteur de la sphingomyéline _____ 135

III.2.2.2 Interaction de la $sPLA_2$ avec des VGUs hétérogènes. La $sPLA_2$ induit le bourgeonnement et la fission des domaines en phase L_o à partir des vésicules _____ 137

III.2.2.2.1 VGUs ternaires : séparation de phase L_d /L_o _____ 137

III.2.2.2.2 Le Céramide comme modulateur de l'activité enzymatique _____ 141

III.2.2.3 Modulation du bourgeonnement et de la fission par l'activité enzymatique et par la morphologie de phase ____ 144

III.3 Interaction de molécules actives au bord (edge-active molecules) avec des VGUs contenant des rafts ____ 146

III.3.1 Résultats ____ 146

III.3.1.1 Interaction de Lyso PC avec des VGUs hétérogènes ____ 146

III.3.1.2 Interaction de détergents avec des VGUs hétérogènes ____ 149

III.3.1.2.1 Brij 98 à 34°C ____ 149

III.3.1.2.2 Triton X-100 à 34°C ____ 151

III.3.1.2.3 Brij 98 à 4°C ____ 153

III.3.1.2.4 Triton X-100 à 4°C ____ 154

III.3.2 Discussion ____ 155

Mécanisme possible et Modèle pour le bourgeonnement et la fission des domaines en phase L_o ____ 155

IV Conclusions générales et Perspectives ____ 167

Références ____ 172

Liste des Figures ____ 186

Liste des Tableaux ____ 191

Articles ____ 192

Abréviations

VGU (GUV)	Vésicules géantes unilamellaires
LUV	Vésicules larges unilamellaires
SUV	Vésicules petites unilamellaires
MLV	Vésicules multilamellaires
EYPC	Phosphatidylcholine du jaune d'œuf
EYSM	Sphingomyéline du jaune d'œuf
EYCER	Céramide du jaune d'œuf
BBCER	Céramide du cerveau de bœuf
PC	Phosphatidylcholine
PC*	C_{12}-NBD- Phosphatidylcholine
PE	Phosphatidylethanolamine
SM	Sphingomyéline
Cer	Céramide
Chol	Cholestérol
POPC	Palmitoyl, oleoyl phosphatidylcholine
DPPC	Dipalmitoyl phosphatidylcholine
DOPC	Dioleoyl phosphatidylcholine
DMPC	Dimyristoyl phosphatidylcholine
DLPC	Dilauroyl phosphatidylcholine
DSPC	Distearoyl phosphatidylcholine
DAPC	Diarachidoyl phosphatidylcholine
DPPE	Dipalmitoyl phosphatidylethanolamine
D-DPPC	D -α - Dipalmitoyl phosphatidylcholine
LysoPC	Lysophosphatidylcholine
LysoPPC	1-palmitoyl-2-hydroxy-*sn*-phosphocholine
LysoOPC	1-oleoyl-2-hydroxy-*sn*- phosphocholine
PA	Palmitic acid
GSLs	Glycosphingolipides
SMase	Sphingomyélinase

ASMase	Sphingomyélinase acide
NSMase	Sphingomyélinase neutre
$sPLA_2$	Phospholipase A_2 sécrétée
DRM	Membrane résistante au détergent
L_o	Phase liquide ordonnée
L_d	Phase liquide désordonnée (phase fluide)
L_β	Phase solide ordonnée (phase gel)
PI	Phosphatidylinositol
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
T_M	Température de transition de la phase L_d à la L_β
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
AFM	Atomic force microscopy
SPT	Single particle tracking
NMR	Nuclear magnetic resonance
cmc	Concentration micellaire critique

I Introduction générale

Depuis plus de trente ans, la structure et les fonctions des membranes biologiques sont l'objet d'investigations intensives. A l'heure actuelle, la conception que ces membranes sont constituées sur la base d'une bicouche lipidique est largement admise. Les composants lipidiques membranaires, avec toute leur diversité compositionnelle et structurale ont attiré largement l'intérêt des chercheurs.

Les assemblages lipidiques sont plus complexes que d'autres constituants biologiques, tels que les polynucléotides, les protéines et les polysaccharides dont les unités sont liées par des liaisons covalentes et qui ne peuvent pas subir des réarrangements rapides de leur séquence. En revanche, l'autoassemblage lipidique non covalent, dans les membranes, permet aux molécules lipidiques d'effectuer différents mouvements (Figure I-1 a). Une molécule lipidique peut se déplacer dans le plan d'une des deux monocouches, ce qu'on appelle «diffusion latérale ». La molécule peut effectuer également un mouvement transversal d'une monocouche vers l'autre « le flip–flop ». Elle peut aussi quitter la bicouche lipidique suivant la structure lipidique et les conditions. Enfin, une molécule peut exercer un mouvement de rotation autour de son axe (diffusion rotationnelle). La diffusion latérale dans le plan membranaire et la diffusion rotationnelle donnent à la bicouche la fluidité d'un liquide, un liquide particulier, puisque ses molécules et en particulier leurs chaînes hydrophobes, restent parallèles entre elles et perpendiculaires à la surface membranaire. Cette ordonnance est celle qu'on trouve dans un cristal et c'est pourquoi on parle de cristal liquide pour définir la phase lipidique de la membrane. Ainsi, les propriétés membranaires sont largement déterminées par la liberté de mouvement des composants lipidiques.

Si une membrane est composée de deux ou plusieurs lipides, alors il existe la possibilité qu'un des composants lipidiques ségrège dans un domaine. Certains domaines (radeaux lipidiques, un terme connu dans la littérature sous le nom « rafts ») sont riches en cholestérol et en sphingolipides et ont été impliqués récemment dans la transduction des signaux et dans le trafic membranaire (Anderson, 2002).

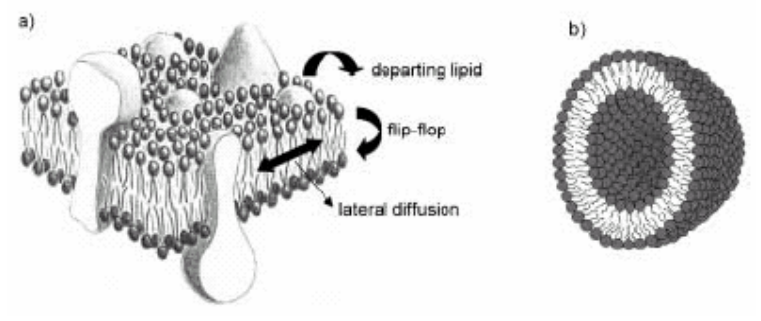


Figure I-1 a) Arrangement d'une bicouche de membrane biologique; b) Coupe d'une vésicule (demi vésicule) constituée d'une bicouche lipidique. D'après (Binder, 2003)

Les vésicules (également appelées des liposomes) sont des sphères fermées et creuses dont l'enveloppe est composée d'une ou plusieurs bicouches lipidiques (Figure I-1 b). Il existe plusieurs méthodes pour la formation des vésicules mais il faut noter que les lipides possèdent une propension naturelle d'autoassemblage en vésicules. L'agitation physique, par exemple, provoquée par ultrasons ou par filtration à travers une membrane poreuse (filtre) peut faciliter le processus. Le choix approprié du lipide ou du mélange lipidique permet de contrôler finement les propriétés membranaires, telles que la stabilité thermique, la rigidité, la charge électrique, la rugosité superficielle, et enfin la taille vésiculaire. Ainsi, des types différents de vésicules sont décrits dans la littérature: petites vésicules unilamellaires (SUVs), de diamètre vésiculaire de l'ordre de 30 - 100 nm ; grandes vésicules unilamellaires (LUVs), de diamètre vésiculaire de l'ordre de 100 - 200 nm ; vésicules géantes (GUVs), de diamètre de l'ordre de 1 - 100 µm bien visibles par microscopie optique. Les vésicules représentent une imitation accessible, reproductible et approximative des biomembranes. Voila pourquoi elles sont devenues un outil important dans la recherche des domaines et des rafts.

Les composants lipidiques principaux des biomembranes sont les glycérophospholipides, les sphingolipides, le cholestérol et un grand nombre de composants mineurs comme les lysolipides, les glycolipides et les cérébrosides. Les lipides avec les protéines associées à la membrane (qui peuvent occuper jusqu'à 70% de la surface membranaire) représentent une entité extrêmement complexe. Chaque type de cellule et chaque type de membrane ont leur propre composition lipidique (van Meer, 1998). La

composition lipidique peut également changer au cours de la croissance et du développement des cellules, même à jeun (Simons, 2000).

Il a été supposé que les forces intermoléculaires entre les molécules lipidiques, plutôt faibles, favoriseraient une distribution statistique des lipides dans la membrane. Comme nous l'avons déjà mentionné ci-dessus, la formation des domaines ou des rafts détermine à un certain degré les propriétés des biomembranes. La Figure I-2 révèle les conséquences des effets de miscibilité et d'immiscibilité dans une bicouche composée de deux différents lipides. Il y a au moins deux types d'immiscibilité: a) les lipides d'une seule monocouche peuvent se rassembler (ségrégation de phase latérale) pour former des domaines et des rafts, et b) les monocouches opposées d'une bicouche peuvent avoir des compositions différentes (ségrégation de phase verticale). Les deux processus se produisent dans les systèmes naturelles (cellules) et modèles (vésicules).

Si plus de deux lipides sont impliqués, le mécanisme de formation des domaines/rafts peut devenir bien plus complexe en raison des interactions multiples. Quoi qu'il arrive, la formation d'un domaine/raft ressemble à un processus de ségrégation (séparation) de phase qui est déclenché par des stimuli externes comme un changement de la température, de la force ionique, ou de la pression latérale, etc... L'intégration d'une macromolécule dans une bicouche peut également favoriser un réarrangement des molécules lipidiques qui correspond à la formation d'un domaine/raft.

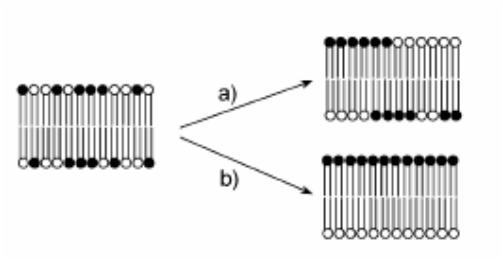


Figure I-2 Bicouche lipidique mélangée avec deux types principaux de séparation de phase des lipides biquatérnaires: a) séparation de phase latérale, b) séparation de phase verticale. D'après (Binder, 2003)

I.1 Séparation de phase et formation des domaines dans des bicouches lipidiques modèles

La séparation de phase latérale (dans le plan des monocouches) et la séparation de phase verticale (entre les monocouches) peuvent se produire spontanément ou sous l'action de stimuli externes. Ces processus peuvent être couplés entre eux ou se produire séparément.

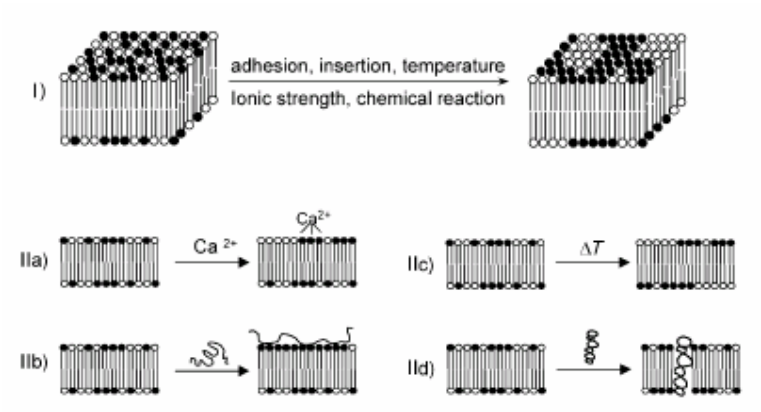


Figure I-3 Les différents modes de la séparation de phase dans des bicouches lipidiques: I) Séparation de phase latérale de deux lipides; II) divers stimuli externes menant à différents modes de séparation de phase: a) séparation de phase latérale dans la monocouche externe induite par des ions, b) séparation de phase verticale induite par l'adsorption des polymères, c) séparation de phase latérale dans les deux monocouches induite par la température, et d) séparation de phase latérale autour d'une macromolécule incorporée dans la bicouche. D'après (Binder, 2003)

Comme la Figure I-3 le représente la variété des stimuli externes peut mener à la séparation de phase et ensuite à une modification de la structure membranaire. En principe, deux types différents d'interactions peuvent être impliqués: des forces entre les têtes polaires et des forces entre les chaînes lipidiques. Par exemple, un changement de la valeur de pH externe change la charge de la tête polaire ou l'hydratation, ce qui diminue les forces attractives entre deux têtes polaires voisines. Les ions (Ca^{2+} par exemple) peuvent également mener à une redistribution des lipides en raison de la formation de complexes entre les têtes polaires et l'ion métallique. L'adsorption des polymères ioniques peut augmenter la densité d'empilement des lipides, attirés d'une manière électrostatique.

Les forces agissant principalement dans la région hydrophobe de la bicouche lipidique peuvent induire la séparation de phase d'une façon semblable. Par exemple, un

changement de la température peut mener à la séparation de phase de deux lipides dont les températures de fusion (T_M) sont différentes. Les molécules qui pénètrent la bicouche peuvent induire la formation des domaines en s'entourant d'une population lipidique non statistique.

I.2 Composition et structure des membranes biologiques

Les membranes biologiques isolent le milieu intracellulaire du milieu extérieur tout en assurant une perméabilité sélective vis-à-vis des molécules présentes dans ce milieu. Elles ont aussi un rôle de réception des signaux extracellulaires essentiels à l'adaptation du métabolisme cellulaire en fonction des conditions de son milieu.

Les membranes biologiques comportent deux feuillets de lipides dont les parties hydrophobes se font face en raison de leur affinité réciproque et dont les têtes sont dirigées vers l'eau, principal constituant des cellules et du milieu extracellulaire. Cet édifice est maintenu par des liaisons chimiques de faible énergie, principalement des interactions hydrophobes et des interactions de van der Waals. En ce sens, les membranes biologiques définissent les limites des compartiments intracellulaires ainsi que de la cellule elle-même. On trouve dans les membranes biologiques une très grande variété de substances lipidiques. Les lipides qui entrent dans leur structure appartiennent aux trois catégories suivantes : les glycérophospholipides, les sphingolipides et les stérols.

I.2.1 Les Glycérophospholipides

Cette famille de lipides est la plus répandue dans les membranes biologiques (Figure I-4). Le squelette de ces lipides est le glycérol. Deux des fonctions alcool, dont la fonction secondaire, sont estérifiées par des acides gras à longue chaîne (principalement supérieure à 16 atomes de carbone). Ces acides gras sont essentiellement insaturés sur une ou plusieurs positions, parfois en *trans*, le plus souvent en *cis*. Les glycérophospholipides sont enfin constitués d'une partie hydrophile ou « tête polaire », celle-ci déterminant leur classification. La tête est parfois un éther de mono ou di–galactoside ; on a alors des glycolipides. Le plus souvent la troisième fonction OH du glycérol est estérifiée par l'acide

phosphorique (on a alors l'acide phosphatidique) qui peut lui-même être estérifié par différents groupements, souvent azotés. Il s'agit alors de la classe très importante des glycérophospholipides. Les glycérophospholipides majoritaires sont les phosphatidylcholines (PC), les phosphatidyléthanolamines (PE) et les phosphatidylsérines (PS) (Boesze-Battaglia, 1997).

Tous ces lipides, à l'exception de PE, forment spontanément des membranes planaires de bicouche en raison de leur forme cylindrique (c'est-à-dire, la tête polaire et la somme des deux chaînes ont approximativement la même section). L'aire de la tête polaire varie de 40 à 60 $Å^2$ selon l'état de phase du lipide. Ainsi, les aires sont plus petites lorsque la membrane est en état solide (gel) où toutes les chaînes sont bien ordonnées en lattice cristalline hexagonale et adoptent une conformation *trans*. Une expansion de la tête polaire environ de 5 - 10 $Å^2$ est observée lors de la fusion, au-dessus de la température de transition, et mène à la phase liquide (cristalline liquide) où une ou plusieurs des liaisons C-C se tordent dans une conformation de *gauche*. La température de cette transition change avec la longueur et le degré de saturation des chaînes acyles. Ainsi, les températures de transition inférieures sont associées avec les chaînes plus courtes et avec le degré plus élevé d'insaturation, par exemple, DMPC (T_M=24°C), DPPC (T_M = 42°C) et DOPC (T_M= -22°C). La diffusion latérale n'est pas néanmoins considérablement influencée par la nature des chaînes acyles. L'épaisseur de la bicouche lipidique dépend de la longueur des chaînes (plus les chaînes sont longues, plus la bicouche est épaisse). Si les deux chaînes d'un lipide ont des longueurs différentes, alors la formation de bicouche peut impliquer l'interdigitation des chaînes pour mieux remplir l'espace.

I.2.2 Les Sphingolipides

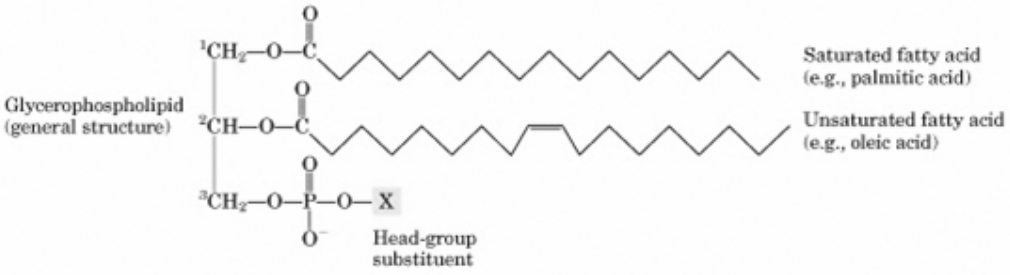
La structure de base est un amino-alcool à longue chaîne : la sphingosine (Figure I-5). Sur la fonction amine est greffé, par une liaison amide, un acide gras, le plus souvent saturé et on obtient un céramide. Sur la fonction alcool secondaire de la sphingosine vient se greffer le groupement polaire. C'est le plus souvent la phosphorylcholine, et on obtient la sphingomyéline. On peut également obtenir des glycosphingolipides (GSLs) (respectivement cérébrosides et gangliosides) par addition

d'un ou plusieurs groupements glucidiques. Les gangliosides peuvent également voir se brancher un ou plusieurs acides sialiques sur leur partie sucrée. Telle est par exemple la structure de GM1 (ganglioside monosialide 1). Bien que les dimensions effectives dans la bicouche lipidique soient comparables aux glycérophospholipides (l'aire de la tête polaire entre 45 et 57 $Å^2$) (Li, 2000), la longueur de l'acide gras peut être beaucoup plus longue (par exemple, les lignoceroylsphingosines ont 24 atomes de carbone). Les températures de fusion des chaînes de sphingolipides sont habituellement plus élevées que celles des glycérophospholipides et peuvent excéder 60°C (Holopainen, 1997).

I.2.3 Le Cholestérol

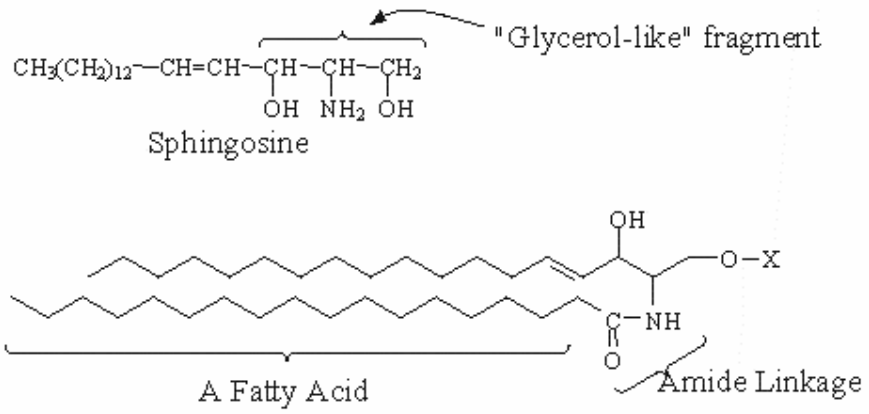
Les stérols sont des composés ubiquitaires des membranes des cellules eucaryotes (Figure I-6). Leur structure varie cependant fortement suivant l'organisme considéré. Le cholestérol est l'unique stérol des membranes plasmiques de mammifères, mais également présent chez nombre d'eucaryotes. Chez les levures et les plantes, ce dernier est respectivement remplacé par l'ergostérol et des phytostérols comme le sitostérol ou le stigmastérol (Yeagle, 1993). Le cholestérol ne présente pas une distribution homogène au sein des cellules des mammifères et se retrouve extrêmement concentré au sein de la membrane plasmique (Liscum, 1995; Schroeder, 1996) alors qu'il est très peu présent dans les membranes internes (Lange, 1996; 1999).

Le cholestérol est une molécule au caractère hydrophobe nettement marqué, cela explique son enrichissement au sein des membranes. Quatre cycles rigides et plans se poursuivant par une chaîne à 8 atomes de carbone constituent le squelette hydrocarboné de la molécule de cholestérol. Un hydroxyle, greffé en position 3 du premier cycle, représente la seule partie polaire du cholestérol. Ce dernier, ainsi constitué, s'insère perpendiculairement dans les membranes avec le groupement hydroxyle afférant au niveau de la partie polaire des phospholipides et son corps hydrophobe plan au contact des chaînes d'acides gras (de Kruyff, 1975; Yeagle, 1985).



Name of glycerophospholipid	Name of X	Formula of X	Net charge (at pH 7)
Phosphatidic acid	—	—H	−1
Phosphatidylethanolamine	Ethanolamine	$-CH_2-CH_2-\overset{+}{N}H_3$	0
Phosphatidylcholine	Choline	$-CH_2-CH_2-\overset{+}{N}(CH_3)_3$	0
Phosphatidylserine	Serine	$-CH_2-CH(COO^-)-\overset{+}{N}H_3$	−1
Phosphatidylglycerol	Glycerol	$-CH_2-CH(OH)-CH_2-OH$	−1
Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate	*myo*-Inositol 4,5-bisphosphate		−4
Cardiolipin	Phosphatidyl-glycerol		−2

Figure I-4 Structures des principaux lipides des membranes de mammifères : les glycérophospholipides



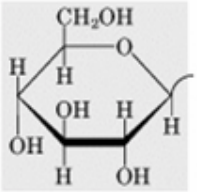
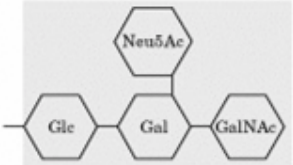
Name of sphingolipid	Name of X	Formula of X
Ceramide	—	—H
Sphingomyelin	Phosphocholine	$-P(=O)(O^-)-O-CH_2-CH_2-\overset{+}{N}(CH_3)_3$
Neutral glycolipids Glucosylcerebroside	Glucose	
Lactosylceramide (a globoside)	Di-, tri-, or tetrasaccharide	
Ganglioside GM2	Complex oligosaccharide	

Figure I-5 Structures des principaux lipides des membranes de mammifères : les sphingolipides

La longueur du cholestérol, environ 17.5 Å, est plus courte que la longueur des chaînes de sphingo- et glycérolipides, et aussi plus courte que la longueur des queues de la

plupart des lipides non stéroïdes (Houslay, 1982). Le cholestérol tend à augmenter la rigidité membranaire tout en augmentant la mobilité latérale d'autres composants membranaires.

Comme nous le verrons, grâce à ses interactions ainsi mises en jeu avec les phospholipides avoisinants, le cholestérol modulera profondément les propriétés physiques, structurales et dynamiques, des membranes qui le contiennent.

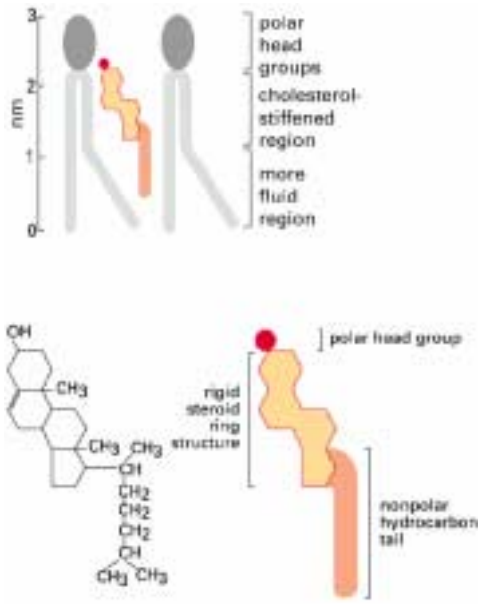


Figure I-6 Structure des principaux lipides des membranes de mammifères: le cholestérol

I.3 Les différents états physiques et thermodynamiques des membranes lipidiques

I.3.1 Le concept de forme

Les lipides s'arrangent spontanément de manière à minimiser les contacts de leur partie hydrophobe avec le milieu aqueux. Suivant la structure du lipide considéré, mais également les conditions de température et d'hydratation, les arrangements des lipides entre eux pourront différer. Ces agencements lipidiques, que l'on peut caractériser

expérimentalement, notamment selon leur organisation à longue distance, par la dynamique des lipides qui les constituent ou l'organisation des chaînes acyles grasses de ceux-ci, sont le plus souvent qualifiés de phases lipidiques, terme que nous reprendrons dans la suite de l'exposé (Cullis, 1979).

Le concept de forme basé sur l'importance relative des parties hydrophobes et hydrophiles des lipides permet d'entrevoir la préférence de phase adoptée par un lipide particulier. Le volume moléculaire occupé par la tête polaire dépend 1) de son inclinaison par rapport au plan de la membrane, 2) de la vitesse de son mouvement rotatif et 3) de son hydratation. Le volume moléculaire occupé par les chaînes acyles est en particulier fonction du nombre d'insaturations en *cis* présentes dans ses chaînes. Plus celles-ci sont nombreuses et proches du centre de la chaîne grasse, plus le désordre des chaînes acyles augmente (du fait des rotations autour des doubles liaisons C=C) et plus le volume moléculaire occupé par cette chaîne grasse est grand. De même, plus le nombre d'isomérisations *trans-gauches* augmente, plus le volume moléculaire des chaînes acyles augmente. Lorsque les parties hydrophobes et hydrophiles s'équilibrent, on peut schématiser les lipides sous forme de cylindres et le type de phase adopté est alors la phase lamellaire (L_α) qui correspond à un empilement de bicouches phospholipidiques espacées par des couches aqueuses. Par contre, si la partie hydrophobe du lipide est plus importante que la partie hydrophile, celui-ci est représenté par une forme conique avec la tête polaire au sommet du cône, et une phase dite hexagonale est préférentiellement adoptée. Les lipides en phase aqueuse hexagonale H_{II}, sont organisés sous forme de cylindres (de symétrie hexagonale) constitués de canaux aqueux vers lesquels les têtes polaires s'orientent. Ainsi, selon le concept de forme, dans des conditions physiologiques, la PC, la SM, la PS et la PI adoptent préférentiellement une phase lamellaire (L_α) tandis que la PE adopte spontanément une phase hexagonale H_{II} et la LysoPC forme des micelles (L_1) (Tableau I-2, page 57).

Dans les systèmes mixtes PC/PE à rapports molaires élevés en PE, la présence de la PC stabilise la phase lamellaire (Cullis, 1978). La PS, la SM et la PI possèdent également cette capacité stabilisatrice de la phase lamellaire dans des systèmes contenant la PE (Yeagle, 1990). La forme conique de la PE retrouvée au sein des membranes biologiques et la forme cylindrique des autres lipides sont dans ce cas complémentaires, ce qui explique

que les membranes biologiques se retrouvent en phase lamellaire. On parle alors de compensation de forme.

I.3.2 Les phases gel (solide - ordonnée) (L_β) et fluide (liquide - désordonnée) (L_α)

Lors de la reconstitution de membranes phospholipidiques *in vitro*, les différents états thermodynamiques des membranes ont pu être mis en évidence. En fonction de la température, on distingue: une phase lamellaire solide–ordonnée ou phase gel (L_β), où les interactions de van der Waals entre les chaînes d'acides gras sont optimisées et où la diffusion translationnelle de lipides est très faible; une phase lamellaire fluide ou liquide–désordonnée (L_α), où le niveau d'entropie des chaînes d'acides gras et de diffusion translationnelle des lipides sont élevés (Mouritsen, 1991). La température de transition (T_M, « melting température ») de phase est définie comme étant la température pour laquelle les variations d'enthalpie contrebalancent le gain d'entropie généré, principalement par le désordre conformationnel des chaînes (à la transition, $\Delta H=T_M.\Delta S$). Globalement, elle rend compte de la quantité d'énergie qu'il a fallu fournir pour rompre la haute cohésion moléculaire caractéristique d'un système membranaire dans un état ordonné. En cela, la T_M d'un lipide donné est la température à laquelle une membrane composée de ce seul lipide passe d'une phase solide–ordonnée à une phase liquide désordonnée. La cohésion des ensembles membranaires est assurée par des liaisons de faible énergie tant au niveau des chaînes hydrophobes (liaison de van der Waals), que des parties polaires (attractions électrostatiques, liaisons hydrogènes). La T_M varie en fonction de la longueur et du degré d'insaturation des chaînes d'acides gras, ainsi que de la nature du groupement polaire (Silvius, 1979). Pour des lipides ayant une même tête polaire, la température de transition s'élève avec le nombre de carbones, car les interactions de van der Waals augmentent. De même, l'introduction de doubles liaisons (particulièrement celles en *cis*), écarte les chaînes les unes des autres, diminue la température de transition (Silvius, 1979). A chaîne carbonée identique, la température de transition peut être considérablement modifiée par la nature des têtes polaires et leur orientation par rapport au plan de la bicouche.

I.3.3 Le rôle du cholestérol dans la formation de phase liquide-ordonnée au sein des membranes lipidiques

Alors que des coexistences entre les phases L_α et L_β ont été bien caractérisées sur les membranes modèles, la phase gel ne semble pas exister dans les membranes biologiques (Parasassi, 1993). Des coexistences de phases fluides différentes ont pu être mises en évidence *in vitro* dans un système binaire composé d'un lipide à chaîne acyle saturée et de cholestérol (Vist, 1990). Dans ce cas, au delà d'une certaine concentration en cholestérol, une phase liquide ordonnée (L_o) se sépare de la phase liquide désordonnée au dessus de la T_M du lipide considéré. De la même façon, en dessous de la T_M de ce même lipide, une phase L_o se sépare de la phase gel lorsque la quantité de cholestérol membranaire augmente.

Dans la phase L_o, les chaînes acyles des lipides ont des propriétés intermédiaires entre celles des phases L_α et L_β. Elles sont allongées à leur maximum, comme dans la phase gel, mais présentent une mobilité latérale dans la bicouche lipidique, analogue à la phase liquide désordonnée (Mouritsen, 1991; Almeida, 1992). Dans la phase liquide désordonnée, les stérols contraignent, et en ce sens, ordonnent les chaînes acyles des phospholipides en diminuant la probabilité d'isomérisation *trans-gauche*. Cette propriété du cholestérol a pour conséquence de diminuer le volume moléculaire occupé par les chaînes acyles des lipides en phase liquide désordonnée, en provoquant une augmentation de l'épaisseur hydrophobe de la bicouche lipidique. Dans les phases gels, les stérols inhibent le compactage optimal en configuration *trans* des chaînes des sphingolipides en provoquant l'écartement des têtes polaires des lipides adjacents, ce qui a pour conséquence de diminuer le paramètre d'ordre des chaînes acyles des lipides présents dans cet état (Vist, 1990).

En ce sens, le cholestérol tamponne la capacité des différents lipides à former des phases fluide et gel et conditionne l'apparition de la phase liquide ordonnée.

I.4 L'origine de la séparation de phase

La miscibilité de deux (ou plus) lipides dans une membrane lipidique de bicouche est graphiquement représentée par des diagrammes de phase simples (Welti, 1994).

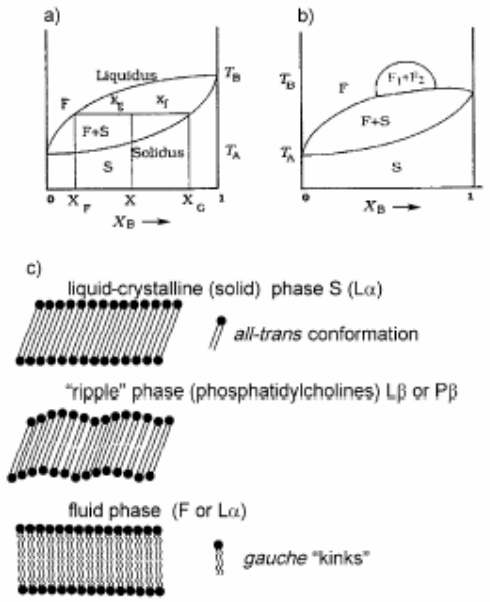


Figure I-7 Comportement de phase des mélanges lipidiques (lipide A et lipide B): a) miscibilité complète des lipides en état liquide et b) immiscibilité partielle des lipides en état liquide. D'après (Welti, 1994)

La Figure I-7 (a) montre un exemple de deux lipides A et B qui sont miscibles à l'état liquide aussi bien qu'à l'état de gel. Supposons que le lipide A ait une température de transition (T_A) inférieure au lipide B (T_B), et que la phase liquide et la phase gel coexistent entre les températures de fusion pures des deux lipides (notamment, entre T_A et T_B). Si on commence par un mélange lipidique (1/1) en phase gel (x_B=0.5), alors la phase liquide est enrichie en lipide dont la température de fusion est plus basse (lipide A), alors que la phase gel est enrichie en lipide dont la T_M est plus élevée (lipide B). Comme la glace, les domaines gel (enrichis en lipide B) flotteront dans l'environnement fluide (enrichi en lipide A). C'est peut être le mode le plus simple de formation des domaines dans des membranes lipidiques. La miscibilité lipidique complète est atteinte au-dessus de la température de fusion du lipide B. L'autre cas (Figure I-7 b) démontre l'immiscibilité en

phase liquide. On observe la séparation additionnelle au-dessus de la température de fusion du lipide B. Ce type de formation des domaines est différent de celui montré dans la Figure I-7 (a), parce que la séparation de phase n'est pas induite par l'empilement cristallin de la phase gel, mais plutôt par des forces attractives faibles de l'état liquide. De même, l'immiscibilité en phase gel se produit lorsque les molécules sont séparées au-dessous de la température de fusion du lipide A. Cela produit deux différents empilements lipidiques des lattices ordonnées hexagonales dans la phase cristalline, solide (gel). En résumé, les domaines peuvent être formés par des incompatibilités de solide/fluide, de fluide/fluide, ou de solide/solide.

I.4.1 Mélanges binaires des composants lipidiques structurellement semblables

La séparation de phase peut se produire même lorsqu'il y a des petites variations dans la structure lipidique. Un exemple classique de ce type est un mélange des phosphatidylcholines avec différentes longueurs des chaînes acyles. Le comportement non idéal de ces mélanges est provoqué par le mésappariement hydrophobe des chaînes acyles puisque les têtes polaires sont identiques. Knoll et al. (1991) et Silvius et al. (1996) ont étudié les diagrammes de phase en faisant varier systématiquement la longueur des chaînes et en augmentant de cette manière le mésappariement hydrophobe entre les deux lipides. La séparation de phase latérale a été trouvée quand la longueur des chaînes acyles différait de quatre groupes CH_2 ou plus. Le diagramme de phase sur Figure I-8 (a) montre le cas de DLPC (C_{12})/DPPC (C_{16}). Il y a une immiscibilité distincte en phase gel qui mène à la séparation de solide/solide à partir de 60 à 100 mol% DPPC, et les deux phases solides coexistent entre 0 et 60 mol% DPPC. Il y a une miscibilité complète à l'état liquide, avec des phases coexistant entre les températures de transition de phase $T_{M,A}$ et $T_{M,B}$ sur l'intervalle entier de composition.

On retrouve une image semblable la Figure I-8 (b) pour les homologues plus élevés où les longueurs des deux lipides sont augmentées par deux unités supplémentaires CH_2: DMPC (C_{14}) mélangé à DSCP (C_{18}). La région de la coexistence entre les phases liquides et solides forme des domaines qui peuvent être détectés par des différentes méthodes. Les

tailles de ces domaines varient entre plusieurs nanomètres et plusieurs micromètres. Ainsi, de 100 à plus de 100 000 molécules lipidiques peuvent résider dans ces domaines.

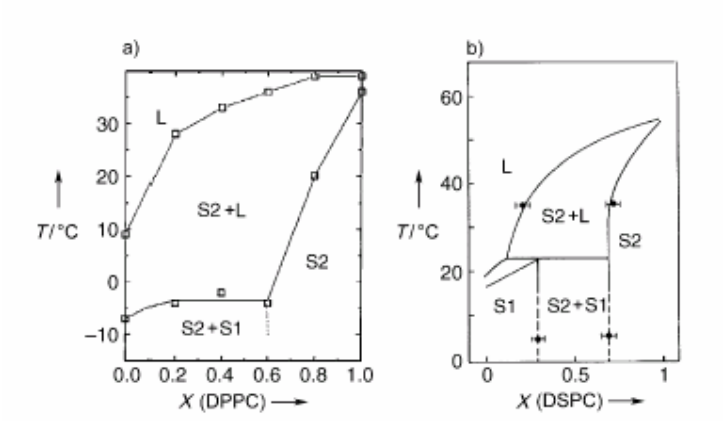


Figure I-8 Diagramme de phase de DMPC/DPPC (a) et de DLPC/DSPC (b). D'après (Knoll, 1991) et (Silvius, 1996).

Un autre type de mélange lipidique, composé d'un lipide symétrique (DSPC) et d'un lipide dont la tête polaire est la même mais dont la longueur des chaînes est différente (C_{18}-C_{10}-PC), a été étudié par (Mason, 1988) (Figure I-9).

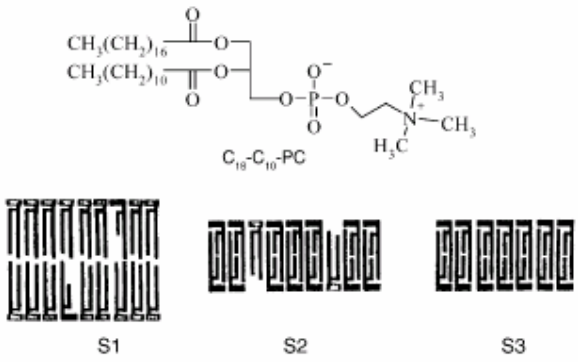


Figure I-9 Miscibilité de DSPC et C_{18}-C_{10}-PC. D'après (Mason, 1988)

L'une des deux chaînes perturbe la bicouche lipidique en raison de sa longueur plus courte de huit groupes CH_2 ce qui mène à un comportement de phase très différent. Voilà pourquoi on observe trois immiscibilités différentes à l'état solide (S1, S2, et S3). A l'état solide S1 lorsque la quantité du lipide asymétrique est petite, il se forme une bicouche lipidique « normale » dans laquelle les défauts causés par le lipide grandement asymétrique

ne se compensent pas. Aux concentrations supérieure à 50 mol% C_{18}-C_{10}-PC, deux phases coexistent : une phase S2 où la bicouche lipidique est interdigitée partiellement en laissant des « trous » pour la DSPC symétrique, et la phase S3, composée seulement de C_{18}-C_{10}-PC interdigitées. La séparation de phase de C_{18}-C_{10}-PC se produit donc à l'état solide en raison des forces faibles entre les chaînes plus longues C_{18} du lipide asymétrique favorisant la cristallisation séparée des composants identiques.

En résumé : la longueur et le niveau d'ordre des chaînes acyles des différents lipides en présence au sein d'une membrane vont influer sur la partition latérale de ces lipides. Si la différence de taille des chaînes acyles de deux lipides en présence est très importante, il peut survenir un mésappariement hydrophobe entraînant une séparation de phase, de manière à diminuer au maximum le niveau d'énergie du système : les lipides présentant des longueurs de chaînes compatibles se distribueront préférentiellement entre eux.

I.4.2 Mélanges binaires des lipides structurellement différents

Les exemples les plus communs de la formation des domaines impliquent des situations où les deux composants lipidiques diffèrent sensiblement. Ceci pourrait résulter : a) de différents types des têtes polaires, b) des lipides dont la différence aux températures de transition de phase est grande, et c) des mélanges des phospholipides et du cholestérol.

I.4.2.1 Mélanges des lipides chargés et/ou neutres

Silvius et al. (1986) ont publié un certain nombre d'études où les miscibilités des lipides avec différentes têtes polaires mais avec une longueur identique des chaînes acyles ont été analysées. Dans l'ordre, des paires de lipides (chargé/neutre ou neutre/neutre) sont comparées deux à deux (PE, phosphatidylethanolamine ; PS, phosphatidylserine ; PA, acide phosphatidique, et PC, phosphatidylcholine). D'une façon générale, la miscibilité de (PE, PS) est égale à celle de (PE, PA) tandis que (PC, PS) et (PC, PA) sont moins miscibles, et (PE, PC) est encore moins miscible. La plupart des systèmes ont montré une immiscibilité solide/solide mais une miscibilité complète à l'état liquide. De plus, il y a une large région de coexistence entre les phases liquides et solides des lipides différents en

raison des températures de transition de phase grandement différentes. Les auteurs ont conclu que les différences chimiques dans les têtes polaires ne sont pas assez significatives pour induire le phénomène d'une séparation de phase dans ces mélanges lipidiques.

I.4.2.2 Lipides dont la différence aux températures de transition de phase est grande

Les sphingolipides et les glycérophospholipides ont des structures très différentes en ce qui concerne leurs têtes polaires et leurs queues hydrophobes. Ce fait détermine une grande capacité pour une séparation de phase latérale. Les glycosphingolipides (GSLs) et la sphingomyéline possèdent une température de transition de la phase gel à la phase liquide plus élevée que les glycérophospholipides existant dans les membranes biologiques (Boggs, 1987). Ce fait résulte d'une cohésion latérale plus forte de ces lipides entre eux à température physiologique. Les raisons avancées et qui permettent d'expliquer ce caractère particulier des sphingolipides semblent être multiples :

a) Concernant les GSLs, la ségrégation préférentielle des sphingolipides entre eux peut être le fait d'interactions entre les têtes oligosacharridiques (Terzaghi, 1993). Cette hypothèse a été vérifiée dans des modèles de membranes reconstituées où l'augmentation de la ségrégation des GSLs est en corrélation avec une augmentation des groupements sacharridiques de ces lipides (Masserini, 1989).

b) La présence d'un groupement hydroxyle et d'un groupe amide dans le squelette céramide confère à chaque molécule de sphingolipides la capacité d'agir à la fois en tant que donneur et accepteur de liaisons hydrogènes (Boggs, 1987; Rock, 1991). Ceci est un caractère propre aux sphingolipides. Les autres lipides membranaires, tels les glycérophospholipides, ne peuvent être qu'accepteurs.

c) La taille et le degré d'insaturation des chaînes acyles sont très différents entre les sphingolipides et les glycérophospholipides. Les chaînes acyles des sphingolipides varient généralement entre 20 et 26 atomes de carbones, tandis que celles des glycérophospholipides sont plus courtes (C_{16} à C_{22}) (Harder, 1997). D'autre part, les chaînes acyles des sphingolipides possèdent un taux moyen d'insaturation en *cis,* inférieur à celui des chaînes acyles des glycérophospholipides (respectivement 0.1-0.35 insaturations en *cis* pour les sphingolipides contre 1.1 à 1.5 pour les glycérophospholipides). Ces insaturations, apparaissant généralement entre les positions

C_9-C_{10}, produisant un coude qui augmente le niveau d'entropie de ces molécules (Barenholz, 1980).

Ces différents points mettent en exergue la propension des chaînes des sphingolipides à interagir plus fortement (interaction hydrophobe et de van der Waals) que les chaînes grasses des glycérophospholipides. Si l'on considère un mélange complexe de lipides, tels ceux qui sont présents dans les membranes plasmiques, il est raisonnable d'envisager que ces lipides vont tendre à adopter une distribution latérale leur conférant un niveau d'énergie le plus bas possible pour éviter le mésappariement hydrophobe.

Deux types différents d'études ont été utilisés: a) les méthodes thermodinamiques traditionnelles (DSC) et les méthodes de fluorescence et b) la microscopie de fluorescence des monocouches mélangées, composées de SM, DMPC, et d'une petite quantité d'un lipide fluorescent.

Les sphingolipides et les phospholipides (tels que DMPC ou DPPC) montrent une séparation de phase à l'état solide et une large région de coexistence des phases entre les deux températures de fusion des lipides (Gardam, 1989; Koynova, 1995). Ces grandes différences sont à l'origine des interactions entre têtes polaires et la formation des ponts hydrogènes. La Figure I-10 montre une image fluorescente du mélange C24:1-galactosylcéramide et DMPC.

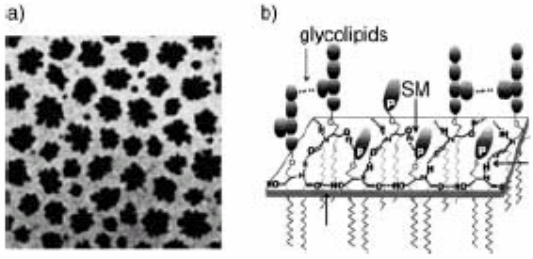


Figure I-10 a) Image de microscopie de fluorescence d'une monocouche composée de DMPC/C24:1-ceramide (30/70), 1 mol% du lipide fluorescent ; b) Une présentation schématique du réseau, formé par DMPC et C24:1-ceramide (les flèches montrent les liaisons hydrogènes ce qui mène à la formation du réseau). D'après (Gardam, 1989; Masserini, 2001)

La séparation de phase a été observée en phase liquide aussi bien qu'en phase gel. Une séparation de phase a été aussi visualisée à l'aide de la microscopie de fluorescence, par Holopainen *et al.* (2001). Les domaines enrichis en céramide C24:1 apparaissent comme des taches foncées suite à l'enrichissement en marqueur fluorescent de la phase

liquide, composée de DMPC. La présence d'un réseau, formé par des liaisons hydrogènes est probablement la raison pour la formation de ce type de domaine (Brown, 1998).

I.4.2.3 Le cholestérol: Influence sur des phospholipides

Le cholestérol augmente la rigidité de la membrane et impose une mobilité latérale plus élevée. Le mode phénoménologique de l'action est montré sur le diagramme de phase (Figure I-11) (Sankaram, 1991).

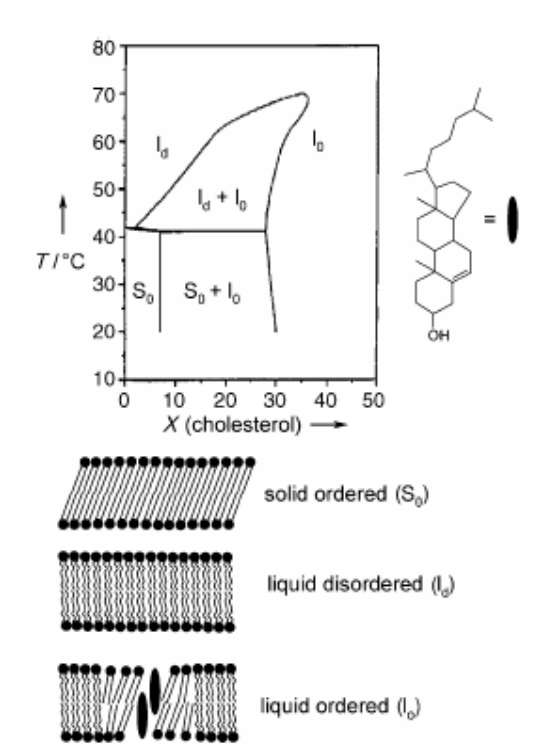


Figure I-11 Influence du cholestérol sur la structure lipidique de la bicouche. Une quantité croissante de cholestérol stabilise la phase L_d au-dessus de la température de transition de phase de DPPC. La transition de phase disparaît aux niveaux du cholestérol au-dessus de 30 mol%, apparition de la phase L_o. D'après (Sankaram, 1991)

A niveau bas de cholestérol (jusqu'à environ 30 mol% Chol), une phase nouvelle apparaît qui est en équilibre avec la phase L_d (phase liquide désordonnée). Mais la phase L_o (phase liquide ordonnée) prédomine à des niveaux plus élevés de cholestérol, ce qui a comme conséquence la disparition de la transition de phase du phospholipide (DPPC). On n'observe plus de différence entre l'état liquide et l'état cristallin de la DPPC dans un mélange contenant plus de 30 mol% cholestérol. Cela est cohérent avec la forte présence

du cholestérol dans les membranes biologiques où il est souvent présent jusqu'à 40 mol%. L'addition du cholestérol à DPPC mène également à un effet de condensation forte dans la membrane lipidique. L'aire de la molécule de DPPC diminue de 61 à 47 Å (Smaby, 1994), ce qui explique bien l'augmentation de la rigidité membranaire. L'interaction de van der Waals se produit préférentiellement entre le cholestérol et les chaînes saturées longues des espèces lipidiques. On observe également une augmentation du nombre de conformations de type *trans* dans les chaînes saturées. Cependant, la mobilité latérale augmente en raison des dimensions plus petites de la molécule du cholestérol par rapport à celles de DPPC. Donc la mobilité des composants membranaires dans la bicouche lipidique augmente en présence du cholestérol (Smaby, 1994).

I.4.2.4 Mélanges de Cholestérol - Sphingolipide

L'interaction entre les sphingolipides et le cholestérol est semblable à celle des phospholipides (Smaby, 1994). Le Tableau I-1 montre la réduction de pourcentage de l'aire de la tête polaire des monocouches composées des mélanges équimolaires de SM/Chol et de PC/Chol à une compression donnée.

Lipid	Compression [$mN\,m^{-1}$] and Area reduction [%]		
	5 $mN\,m^{-1}$	20 $mN\,m^{-1}$	30 $mN\,m^{-1}$
N-18-D1-SM	35%	28%	25%
SM (egg)	39%	28%	17%
SM (bovine)	39%	26%	16%
POPC[a]	34%	26%	23%
DPPC	41%	12%	11%
MPPC[a]	43%	29%	11%

[a] POPC = palmitoyloleoylphosphatidylcholine, MPPC = myristoylpalmitoylphosphatidylcholine.

Tableau I-1 Réduction de pourcentage de l'aire de la tête polaire des monocouches, composées des mélanges équimolaires de SM/Chol et de PC/Chol à une compression définie. D'après (Binder, 2003)

La réduction relative de la taille d'une monocouche est la plus grande quand les chaînes acyles des lipides sont en état plus étiré (aux valeurs basses de compression). Plus la monocouche lipidique est condensée, moins effectif est le cholestérol par rapport à la condensation membranaire. Ainsi, l'état de phase initial du lipide contrôle le degré de

l'interaction avec le cholestérol. Les mesures sur la désorption du cholestérol à partir des membranes composées de différentes sphingomyélines montrent une interaction plus forte lorsque la chaîne acyle N des sphingolipides est plus longue (Ramstedt, 1999).

I.4.3 Mélanges ternaires

Les membranes, composées de trois lipides ou plus, miment plus précisément les membranes biologiques que les mélanges binaires. Les biomembranes eucaryotes sont composées d'environ 50 mol% sphingolipides et phospholipides et jusqu'à 40 mol% cholestérol. Les études sur des mélanges de deux phosphatidylcholines dont les températures de transition de phase sont fortement différentes (DLPC/DPPC et DOPC/SLPC) (Silvius, 1996) mélangées avec du cholestérol, indiquent une tendance de séparation de phase. Les mélanges binaires correspondants présentent une séparation de phase aux températures entre les deux T_M des deux lipides. L'addition de faibles quantités de cholestérol favorise la séparation de phase en raison des interactions favorables avec les chaînes plus longues de DPPC, tandis que l'effet diminue à plus grandes concentrations de Chol (Silvius, 1996). Des études ont été aussi effectuées avec des bicouches supportées (c'est-à-dire, une bicouche qui couvre une surface solide) et avec des vésicules géantes en incorporant un marqueur lipidique. Ce marqueur se partitionne préférentiellement dans les domaines en phase solide (Kolrach, 1999) (Figure I-12) lorsque les vésicules sont composées de DLPC/DPPC/Chol. Il se forme des domaines de l'ordre de 10 μm ou plus grands, observés en microscopie de fluorescence confocale. Deux types différents de sondes fluorescentes ont été utilisées: 1,1′-dieicosanyl-3,3,3′,3′-tetramethylindocarbo-cyanine (DiI-C_{20}), qui est préférentiellement incorporé à la phase ordonnée solide et 2-(4,4-difluoro-5,7-dimethyl-4-bora-3a, 4a-diaza-s-indacene-3-pentanoyl)-1-hexadecanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (Bodipy-PC), qui est incorporé à la phase liquide. Les domaines solides sont visualisés en couleur rouge, tandis que les domaines liquides apparaissent verts. Pour le mélange binaire DLPC/DPPC (Figure I-12 a), une anisotropie saisissante de la phase ordonnée a été trouvée sous la forme de bandes très longues et droites, avec des longues frontières entre les phases qui se prolongent parfois sur plus de la moitié de la circonférence d'une vésicule. L'addition du cholestérol à ce mélange binaire induit une

diminution de la largeur des bandes et une augmentation de la fraction fluide (Figure I-12 b).

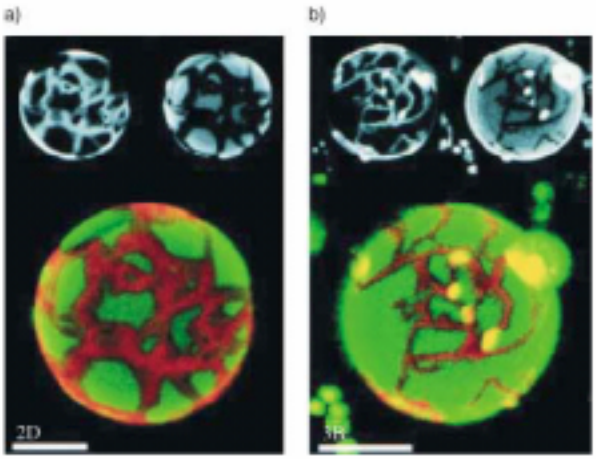


Figure I-12 Images de fluorescence des vésicules géantes avec une séparation de phase à 25°C a) DLPC/DPPC=40/60. La couleur rouge montre les domaines ordonnés solides (enrichit en DPPC), la couleur verte les domaines liquides (enrichit en DLPC) ; b) DLPC/DPPC=50/50 avec 5 mol% Chol (Barre 10 µm). D'après (Kolrach, 1999)

I.4.4 Corrélation entre la morphologie des domaines solides et la composition binaire des mélanges

Pour étudier la liaison entre la morphologie des domaines solides et la composition binaire des mélanges, Bagatolli(b) et Gratton (2000) ont étudié différents mélanges contenant du DLPC (C12:0) aux températures d'une coexistence de phase. Ils ont trouvé que la morphologie des domaines solides change d'une forme linéaire à une forme quasi circulaire pour adopter finalement une forme dendritique lorsque le mésappariement hydrophobe dans les mélanges binaires augmente (Figure I-13). Cependant, on peut se demander quel est le processus qui provoque le changement de la morphologie des domaines dans la série de mélanges contenant du DLPC. Une analyse de simulation d'ordinateur comparant les mélanges binaires de PC non idéals à des conditions de coexistence de phase a été rapportée par Jørgensen *et al.* (1993). Ces auteurs ont trouvé un phénomène intéressant d'arrangement local interfacial des lipides, appelé le mouillage interfacial. Ces auteurs ont également constaté que l'effet de mouillage est moins prononcé dans le mélange DMPC/DSPC (C14/C18) en comparaison avec DLPC/DSPC (C12/C18),

c'est-à-dire, qu'il dépend du degré de non idéalité du mélange (Jørgensen, 1993). Une conséquence de l'effet du mouillage est l'abaissement de la tension interfaciale aux frontières des domaines solides ce qui provoque un ralentissement de la dynamique interfaciale et une augmentation de la durée de vie de la structure locale (Jørgensen, 1993). Ce phénomène peut être important pour expliquer les changements de la morphologie des domaines lorsque la non idéalité du mélange augmente. Bagattoli(b) et Gratton (2000) considèrent que la composition lipidique à proximité de la frontière du domaine peut influencer les interactions lipidiques à longue distance, ce qui déterminerait la forme spécifique du domaine solide. Donc les changements de la forme des domaines sont attribués au mésappariement hydrophobe. Dans ce cas, la miscibilité du mélange lipidique binaire diminue lorsque le mésappariement hydrophobe dans le mélange binaire augmente. Ces observations sont en accord avec la prise en compte des différences compositionnelles et énergétiques entre les domaines en phase gel et en phase liquide et la baisse de l'effet de mouillage interfacial (Jørgensen, 1993; Bagatolli(b), 2000). La grande taille prévue des domaines lipidiques en phase gel dans des mélanges lipidiques avec une basse miscibilité est liée aux différences énergétiques et compositionnelles élevées entre les domaines en phase gel et liquide. Dans des mélanges lipidiques avec une miscibilité plus grande, les différences compositionnelles et énergétiques entre les domaines en phase gel et liquide sont plus basses. Voilà pourquoi cela provoquerait la formation des domaines gel avec une taille plus petite ou la formation de domaines plus ramifiés.

Un cas très particulier est la différence dans la morphologie des domaines solides à des conditions de coexistence de phase entre les mélanges DMPC/DSPC et DLPC/DPPC (1:1 mol/mol) qui varient d'une forme *quasi* circulaire à une forme linaire. Ces deux mélanges binaires présentent le même mésappariement hydrophobe, mais leurs degrés de non idéalité sont différents (Mabrey, 1976; Van Dijck, 1977). Evidemment, les compositions lipidiques aux frontières des domaines (pour ces deux échantillons) sont différentes, ce que influence leur morphologie.

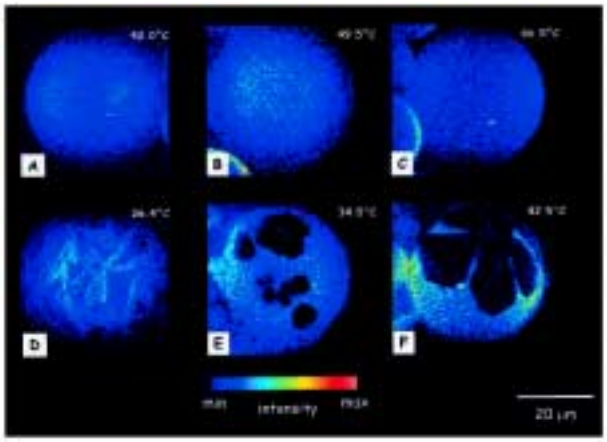


Figure I-13 Images fluorescentes (excitation de deux photons) des VGUs composées de DLPC/DPPC (A et D), DLPC/DSPC (B et E), et DLPC/DAPC (C et F) (1/1 mol/mol), marqueur lipidique N-Rh-DPPE. Les images sont capturées aux températures correspondant à la phase liquide (A-C) et à la coexistence de phase liquide/solide (D-F). D'après (Bagatolli(b), 2000)

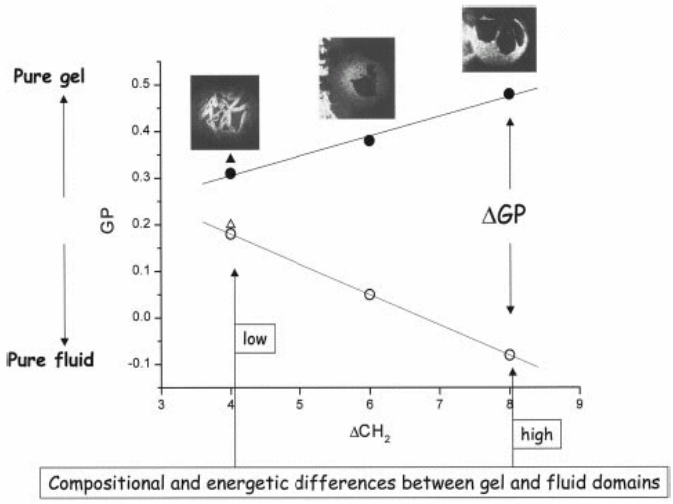


Figure I-14 GP de Laurdan en fonction de la différence CH_2 entre les chaînes hydrophobes de différentes PCs dans le mélange binaire. Les symboles ouverts et remplis dénotent des domaines fluides et solides respectivement. VGUs composées de DLPC (les cercles) et DMPC/DSPC (les triangles). D'après (Bagatolli, 2001)

Pour des VGUs contenant DLPC à des conditions de coexistence de phase, les différences entre les valeurs de GP (generalized polarization)* élevées et basses pour chaque mélange binaire augmentent en fonction du nombre de méthylènes (ΔCH_2) entre les chaînes hydrophobes de DLPC et le deuxième composant (Figure I-14) (Bagatolli(b), 2000; 2001).

*Remarque
Le spectre d'émission du Laurdan est bleu en phase gel tandis qu'en phase liquide il se déplace du bleu au vert (Parasassi, 1990). Pour mesurer les changements spectraux d'émission, la fonction GP a été définie de façon analogique à la fonction de la polarisation fluorescente $GP = \frac{I_B - I_R}{I_B + I_R}$. La fonction de GP du Laurdan à partir des images de VGUs a été calculée en utilisant deux images fluorescentes : l'une obtenue en bleu (I_B) et l'autre obtenue dans la région verte du spectre d'émission de Laurdan (I_R). Cette fonction bien caractérisée est sensible à l'état de phase d'agrégats lipidiques.

Ces auteurs ont trouvé un rapport linéaire entre la fonction GP et ΔCH_2. Ils concluent que les domaines solides de forme linéaire dans le mélange DLPC/DPPC sont composés principalement de DPPC et d'une fraction de DLPC (Bagatolli(b), 2000). En outre, lorsque la température diminue, l'épaisseur du domaine linéaire augmente grâce à l'apport de DPPC à partir de la matrice fluide composée principalement de DLPC. Le modèle proposé est que les molécules DLPC cristallisent sur les domaines solides (DPPC) et de cette manière provoquent des défauts structuraux sur ces domaines solides qui favorisent la pénétration de l'eau (Bagatolli(b), 2000; Bagatolli(c), 2000). En outre, la fraction des molécules DPPC qui reste dans la phase liquide devrait augmenter l'empilement de la phase liquide. Cela provoquera une diminution de l'effet du processus de relaxation de l'eau. La conséquence principale du dernier phénomène est que la différence entre les valeurs GP obtenues sur les domaines solides et liquides diminue (Bagatolli(b), 2000) ce qui montre une influence forte entre la phase liquide et solide (Parasassi, 1993). En tenant compte du rapport linéaire entre la fonction GP et la ΔCH_2 pour les différents mélanges contenant DLPC (Figure I-13), on pourrait conclure que 1) la fraction de DLPC qui co-cristallise avec le deuxième composant diminue dans l'ordre suivant: DPPC>DSPC>DAPC et 2) la quantité du deuxième composant dans la matrice liquide DLPC diminue dans l'ordre suivant DPPC>DSPC>DAPC. La coexistence des domaines dans le mélange DLPC/DAPC est entre des domaines purement fluides et des

domaines purement solides. Par conséquent, dans le mélange DLPC/DAPC (1:1 mol/mol) la fraction du lipide dont la température de fusion est plus basse (DLPC) est négligeable dans les domaines solides (DPPC) (Bagatolli, 2001).

I.5 Rafts

Quiconque entre dans le monde des lipides membranaires rencontrera trois expressions différentes (Figure I-15): cavéoles (Figure I-15 a), radeaux lipidiques (rafts) (Figure I-15 c) et domaines (Figure I-15 b).

I.5.1 Les cavéoles : un exemple de raft « spécialisé »

Les cavéoles sont des invaginations particulières de la membrane enrichie en cholestérol et sphingolipides et qui concentrent la cavéoline (une protéine intégrale en forme « d'épingle à cheveux » qui se lie fortement au cholestérol) (Parton, 1996; Smart, 1999). Les cavéoles ont en fait été identifiées il y a près de cinquante ans dans des cellules endothéliales sur des bases morphologiques (Palade, 1953; Yamada, 1955). Ces structures sont présentes sur nombre de cellules où elles sont impliquées dans différentes fonctions comme la potocytose, l'endocytose et les mouvements trans-cellulaires de molécules. L'endocytose par l'intermédiaire des cavéoles diffère de celle réalisée par l'intermédiaire d'autres structures comme les puits à clathrine, car elle implique des complexes moléculaires distincts. Les cavéoles présentent des caractéristiques très similaires aux rafts et de ce fait sont parfois présentées comme des rafts « spécialisés ». Il apparaît en fait que ce type de structure n'est pas présent dans les cellules dépourvues de cavéoline (tels les lymphocytes) alors que les rafts y préexistent. De ce fait, il est fort probable que soit la cavéoline en s'insérant dans un microdomaine préexistant, de type raft, induise l'invagination de celui-ci en contraignant son environnement lipidique, soit que cette protéine soit directement responsable du recrutement de lipides appropriés à la formation de la cavéole.

I.5.2 Rafts

Le terme « *raft* » (Brown, 2000) est plus historique parce que lié aux fractions membranaires isolées par extraction. La fraction lipidique, extraite par des détergents à 4°C à partir des membranes natives, est enrichie en cholestérol et en sphingolipide. Ceci a amené à la supposition que les agrégats dans les membranes cellulaires se forment principalement à base de liaisons non covalentes entre le cholestérol et les sphingolipides en présence des phospholipides. Les sphingomyélines interagissent préférentiellement avec le cholestérol par la formation des ponts hydrogènes entre le groupe OH du cholestérol et le groupe NH de la sphingosine ou par l'interaction lipophile entre les longues chaînes des sphingolipides et le cholestérol. Ainsi les rafts concernent aussi bien les membranes biologiques que les membranes artificielles mimant les membranes biologiques.

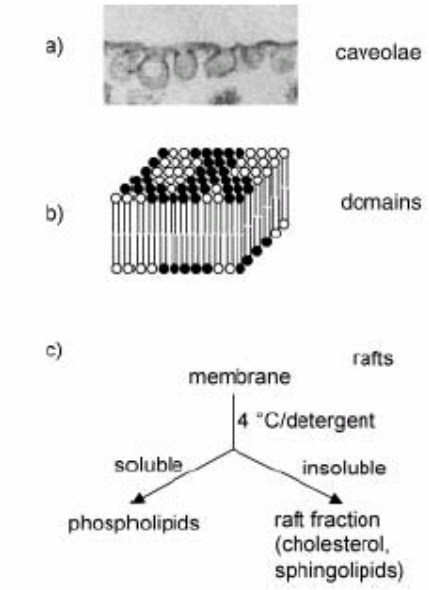


Figure I-15 a) Caveolae, b) domaines (présentation schématique), et c) protocole d'extraction pour l'isolement des fractions des rafts. D'après (Binder, 2003)

I.5.2.1 L'association du cholestérol et des lipides à chaînes saturées conditionne la formation de phases L_o insolubles aux détergents

Les molécules amphiphiles comme les détergents et les lipides se disposent en solution de façon à exposer à l'eau leurs régions polaires et à tourner les unes contre les

autres leurs régions hydrophobes. La géométrie de ces molécules impose celle de leur assemblage dispersé dans l'eau, la PC dont le volume de la tête polaire est équivalent à celui de sa région grasse, forme un agrégat à deux dimensions (bicouche plane) comme nous l'avons vu. Les détergents dont la partie hydrophobe est plus mince, forment des micelles, des agrégats sphériques, lenticulaires ou cylindriques dans lesquels les régions hydrophobes sont protégées du contact avec l'eau par la barrière des têtes polaires. Pour la plupart des détergents, les micelles ne sont stables que si elles rassemblent un grand nombre de molécules.

La *cmc* (concentration micellaire critique) est définie comme la concentration pour laquelle le détergent n'est plus soluble sous forme monomérique en solution aqueuse. En présence de membrane, le détergent aura tendance à partitionner au sein de celles-ci. Au delà de la *cmc*, la majorité du détergent partitionnera dans les membranes. La concentration de détergents augmentant, le détergent va saturer la membrane et permettre la solubilisation de celle-ci ainsi que de ces composants protéiques, au sein de micelles mixtes lipides-détergents.

La capacité du détergent à solubiliser les membranes est d'autant plus grande que sa capacité à partitionner dans celles-ci est importante. Patra *et al.* (1998) ont montré clairement que la solubilisation de bicouches lipidiques monophasiques par le Triton X-100 est dépendante de la longueur et du nombre d'insaturation en *cis* des chaînes grasses des lipides, ainsi que de la capacité des têtes polaires à créer des liaisons de type électrostatique et ionique. Plus les chaînes acyles seront longues et saturées, plus elles seront ordonnées et pourront créer des liaisons de van der Waals entre elles. Ceci explique l'insolubilité des lipides en phase gel et en phase L_o en présence de Triton X-100 (Sankaram, 1990). En cela, l'insolubilité des lipides au Triton X-100 est révélatrice de l'association étroite des lipides au sein des membranes et de l'état d'ordre de ceux-ci.

De nombreux travaux avaient mentionné, avant la mise en évidence des rafts en tant que microdomaines particuliers, l'extraction différentielle de certaines protéines et l'insolubilité caractéristique des GSLs et de la sphingomyéline d'origine cellulaire en présence de Triton X-100 à 4°C. L'équipe de D. Brown a montré que des liposomes enrichis en sphingolipides et en cholestérol étaient insolubles dans le Triton X-100 à 4°C, suggérant ainsi que les constituants lipidiques des rafts sont à l'origine du caractère insoluble ainsi que de la formation de ces microdomaines (Schroeder, 1994). Des

corrélations étroites ont en outre été établies, dans des membranes modèles, entre la résistance de ces membranes à l'extraction par le Triton X-100, la proportion de la membrane présente en phase L_o et la quantité de cholestérol et de lipides à chaînes acyles saturées (comme celles des sphingolipides), cela suggérant l'état de phase des rafts similaire à celui des phases liquides-ordonnées (Ahmed, 1997; Schroeder and Brown, 1998). En particulier Schroeder *et al.* ont mis en évidence la relation directe entre la quantité de phase L_o existant dans des membranes et la quantité de lipides insolubles retrouvée après lyse de ces membranes au Triton X-100 (Schroeder and Brown, 1998).

La capacité du Triton X-100 à discriminer des membranes possédant les caractéristiques des microdomaines ordonnés suggère donc son utilisation dans l'étude des rafts au sein des cellules de mammifères. Il convient, avant de poursuivre, de se poser deux questions. Les phases résistantes mises ici en évidence grâce à l'utilisation de ce détergent, sont-elles induites par le détergent ou pré-existent-elles et correspondent–elles à une réalité physiologique ?

I.5.2.2 Les rafts dans les membranes des cellules eucaryotes : réalité ou artefact ?

Les travaux d'Ahmed *et al.* (1997) et Schroeder *et al.* (1998) ont permis de montrer sur membrane modèle que c'est bien la pré-existence de l'état en phase L_o des membranes qui conditionne la résistance de celles-ci au Triton X-100, état de phase provoqué par le mélange d'un analogue du PC, de SM, et dépendant de la présence de cholestérol dans des rapports molaires physiologiques. Différents travaux ont, par ailleurs, confirmé que les propriétés physiques et dynamiques des lipides présents au niveau de fragments insolubles au Triton X-100, isolés de cellules de mammifères, correspondent effectivement à celles des phases L_o (Ge, 1999; Ostermeyer, 1999). Enfin, l'analyse par spectrométrie de masse de DRM isolés à partir de cellules RBL-2H3 a montré le fort enrichissement des membranes en lipides contenant des chaînes grasses saturées et mono-insaturées (Fridriksson, 1999). L'obtention de DRM nécessite cependant la solubilisation des membranes à 4°C. La solubilisation des membranes cellulaires à 37°C (par Triton X-100) ne permet l'obtention que d'une faible quantité de matériel membranaire. L'abaissement de la température permettrait l'isolement des rafts sur membrane cellulaires en stabilisant les interactions lipides-lipides. Ceci aurait pu signifier que les rafts n'existent qu'à 4°C, cette

hypothèse étant cependant exclue du fait des expériences réalisées sur membrane modèle (Ahmed, 1997; Schroeder and Brown, 1998). Une autre hypothèse est de considérer que les rafts existants au sein des membranes cellulaires ne sont pas assez stables pour résister à la lyse à 37°C. Ceci pourrait résulter d'une nature dynamique de ceux-ci et/ou d'une très faible taille de ces microdomaines lipidiques dans les membranes cellulaires. Quoi qu'il en soit, ces considérations posaient le problème de la caractérisation de ces domaines membranaires sur cellules vivantes à 37°C par d'autres approches que la biochimie.

I.5.2.3 Quelle est la composition des rafts ? Méthode différente, réponse différente

Différents détergents et concentrations on été utilisés pour préparer des DRM, tels que Lubrol WX, Lubrol PX, Brij 58, Brij 96, Brij 98, Nonidet P40, CHAPS, octylglucoside (Ilangumaran, 1999; Madore, 1999; Roper, 2000; Drevot, 2002; Slimane, 2003). L'utilisation de ces différents détergents dans la préparation des rafts produit des domaines membranaires dont les compositions lipidiques sont différentes de ceux, extraits par Triton X-100 (Schuck, 2003). Par exemple, Schuck *et al.* (2003) ont présenté la preuve que les rafts, préparés par Triton X-100 ou par CHAPS sont fortement enrichis en sphingolipides et en cholestérol en comparaison avec les membranes cellulaires totales. Cependant, l'extraction des rafts par Tween 20, Brij 58 ou par Lubrol WX produit des membranes de faible densité qui montrent relativement peu d'enrichissement des deux composants traditionnels formant les rafts (les sphingolipides et le cholestérol). Les rafts, préparés par la solubilisation des cellules avec Brij 96 ou Brij 98 ont été modérément enrichis en cholestérol et en sphingomyéline. Cependant, ces rafts n'étaient pas enrichis en autres lipides, caractéristiques pour les rafts préparés par Triton X-100 ou par CHAPS. Schuck *et al.* (2003) ont décrit ces différences comme étant dues à « la sélectivité de DRM » envers les différents détergents. Triton X-100 et CHAPS sont les détergents les plus sélectifs tandis que Tween 20 et Brij 58 sont les moins sélectifs. Cela suggère qu'il y aurait de l'hétérogénéité parmi les rafts, ce qui provoque ces différences.

I.5.2.4 Méthodes sans utilisation de détergents

Des méthodes sans utilisation de détergents ont été également développées pour l'isolement des rafts lipidiques (Smart, 1995; Song, 1996; Stan, 1997). Les préparations de

Song *et al.* (1996) et Smart *et al.* (1995) comportent la sonication des membranes pour le dégagement des rafts lipidiques en tant que petits morceaux membranaires et enfin une séparation de la fraction membranaire légère par centrifugation en gradient de densité. La spectrométrie de masse a été utilisée par Smart *et al.* (1995) pour analyser les lipides dans une préparation de raft. Comme les membranes résistantes au détergent, ces rafts sont enrichis en cholestérol et en sphingomyéline (Pike, 2002). Cependant, à la différence des rafts préparés par l'extraction de Triton X-100, ces rafts ne sont pas dépourvus de glycérophospholipides. De plus, ils sont enrichis en phosphatidylsérine, ce qui suggère que les rafts peuvent servir de réservoir à ce phospholipide. Donc, ces préparations semblent retenir une plus grande fraction des lipides membranaires, partitionnés dans la monocouche interne (Pike, 2002), que les rafts extraits par les détergents. Voilà pourquoi il a été supposé que dans ces domaines le couplage entre les deux monocouches est bien préservé. Pour ces raisons, les rafts préparés par des méthodes non détergentes semblent reproduire plus précisément la composition *in vivo* de ces microdomaines. Pourtant ces rafts sont isolés seulement sur la base de leur faible densité. Par conséquent, il est possible que les lipides non rafts et les protéines non rafts restent associés à ces rafts pendant la purification et qu'ils fassent partie de la préparation finale.

Le fait que la composition des rafts dépende fortement de la méthode utilisée suggère que le raft serait une « cible » mobile. Il semble que le raft n'a pas une structure bien définie avec une composition lipidique uniforme. A certaines conditions, le raft semble être un domaine bien ordonné, enrichi en cholestérol et en glycosphingolipides. A d'autres conditions, il semble être une collection de divers lipides montrant un enrichissement variable en cholestérol et en sphingolipides. Le fait qu'il y ait une diversité significative dans la composition des rafts lipidiques en fonction des différentes préparations suggère une diversité parmi les rafts eux-mêmes.

I.5.2.5 Modèles de composition de raft basés sur des résultats de différents protocoles d'isolement de raft

En se basant sur les analyses des rafts extraits par des détergents et par des méthodes non détergentes, on peut proposer trois modèles pour la structure des rafts qui sont conformes aux résultats expérimentaux (Pike, 2004). Ceux-ci sont montrés sur la

Figure I-16. Dans le modèle I, le raft lipidique est formé d'un noyau central bien ordonné, composé principalement de cholestérol et de sphingolipides. Ce noyau est entouré par une zone où l'ordre lipidique diminue progressivement. Les détergents comme Triton X-100 et CHAPS solubiliseraient toute la membrane sauf le noyau le plus fortement ordonné. De cette manière la fraction membranaire produite serait extrêmement enrichie en cholestérol et en sphingolipides. En revanche, les détergents comme Tween 20 et Lubrol WX solubiliseraient seulement les parties membranaires extrêmement désordonnées. La fraction extraite (les rafts) serait un peu différente de la membrane plasmique. Entre ces deux extrémités, se placent les détergents comme Brij 96 ou Brij 98 qui solubiliseraient la zone extérieure des lipides, produisant une fraction membranaire qui est enrichie en cholestérol, en sphingolipides mais contenant aussi une quantité significative de glycérophospholipides. Les préparations non détergentes des rafts lipidiques seraient semblables aux propriétés des rafts, extraits par Brij 96 et Brij 98.

Dans le modèle II, le raft est homogène en composition, mais les constituants du raft ont différentes affinités pour les rafts lipidiques et les détergents solubiliseraient ces composants sélectivement. Triton X-100 et CHAPS sont les plus efficaces dans la solubilisation membranaire et par conséquent, ils solubiliseraient sélectivement les glycérophospholipides (et probablement plusieurs protéines) en produisant un raft qui est fortement enrichi en cholestérol et en sphingolipides. Les détergents Brij sont moins efficaces par rapport aux glycérophospholipides que Triton X-100 et CHAPS et le raft est modérément appauvri en ces lipides et modérément enrichi en cholestérol et en sphingolipides. Lubrol WX et Tween 20 extraient très peu de lipides et produisent un raft qui n'est pas très différent de la membrane plasmique.

Dans le modèle III, on part de la supposition que dans les cellules existent des rafts dont la composition lipidique est différente. Les rafts « traditionnels », comme on l'a déjà mentionné, contiennent principalement le cholestérol et les sphingolipides et ils sont fortement structurés. Les rafts « atypiques » contiennent des niveaux plus bas de cholestérol et de glycosphingolipides et des niveaux plus élevés des glycérophospholipides, particulièrement ceux avec des chaînes acyles longues et saturées. Les différences en composition lipidique provoquent une sensibilité différentielle à l'extraction par détergents. Les domaines contenant principalement le cholestérol et les sphingolipides sont résistants à l'extraction par Triton X-100, tandis que d'autres domaines

qui contiennent des concentrations inférieures du cholestérol ou des sphingolipides sont solubilisés par Triton X-100 et ainsi ils sont perdus pour ces préparations des rafts. Des méthodes non détergentes ou l'utilisation des détergents moins sélectifs mènerait à une désintégration de plusieurs rafts « atypiques » aurait comme conséquence l'isolement de plusieurs sous-types des rafts.

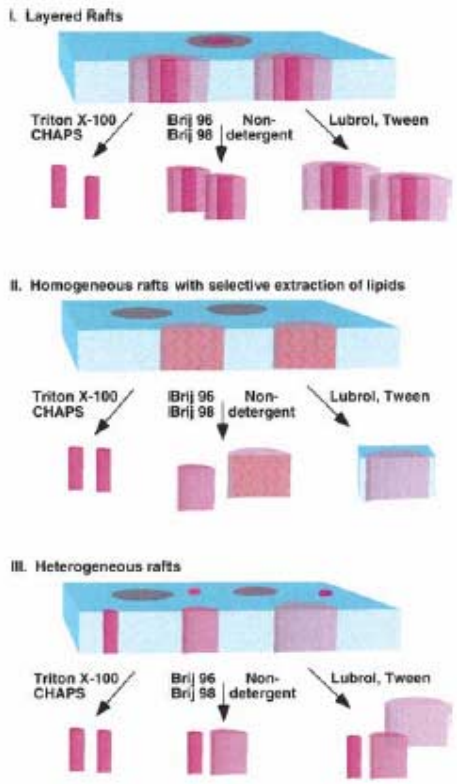


Figure I-16 Modèles d'une structure de raft basés sur des résultats de différents protocoles d'isolement de raft. D'après (Pike, 2004)

Les modèles I et II prévoient que tous les rafts, isolés par la même méthode, auraient une composition semblable. L'hétérogénéité est présente dans le système en raison des procédures d'isolement. En revanche, le modèle III prévoit que les rafts, isolés par la même méthode, seraient hétérogènes en composition. Le modèle III est considéré comme le modèle le plus probable des rafts au niveau cellulaire.

I.5.3 Domaines lipidiques

Le terme de domaine (Edidin, 2001) est employé pour décrire la formation d'assemblement lipidique dans des membranes d'une couche ou d'une bicouche, composées d'un lipide (à l'équilibre solide/liquide) ou de mélange des plusieurs lipides (séparation de phase des lipides). La définition du domaine est beaucoup moins spécifique que celle de la cavéole et elle est employée pour n'importe quel type d'agrégat lipidique. La taille des domaines peut varier de plusieurs nanomètres à quelques dizaines de micromètres. Les domaines de type raft sont connus dans la littérature comme des «domaines en phase L_o » ou «domaines L_o ».

Propriétés et description des domaines en phase L_o

I.5.3.1 Formation des domaines en phase L_o dans VGUs

L'explication de l'apparition des domaines dans la membrane lipidique commence par la formation de la phase liquide ordonnée (L_o) et de la phase liquide désordonnée (L_d) en raison de l'interaction entre le cholestérol et les phospholipides. L'addition des sphingolipides provoque l'enrichissement en sphingomyéline des domaines en phase L_o contenant le cholestérol jusqu'à 35 mol%, un effet qui favorise la formation de ces domaines. A des concentrations très élevées de cholestérol (au-dessus de 50 mol%), il n'existe que la phase liquide ordonnée qui exclut la formation des domaines.

Plusieurs auteurs ont étudié ce processus dans des membranes composées du mélange phospholipides/sphingolipides/cholestérol (Kolrach, 1999; Dietrich, 2001; Holopainen, 2001). Dietrich *et al.* (2001) et Kolrach *et al.* (1999) ont étudié les VGUs par microscopie laser confocale. Un marqueur lipidique spécifique (Laurdan) est sélectivement incorporé à la bicouche lipidique composée de DOPC/BBSM/Chol (1/1/1) et 1 mol% de ganglioside (Figure I-17). L'émission de ce lipide dépend de l'état d'hydratation de son environnement, avec un décalage rouge de 50 nm observé pour la phase L_o par rapport à la phase L_d. Voilà pourquoi, il est possible de distinguer les deux phases en utilisant les processus d'absorption de deux photons et des filtres appropriés.

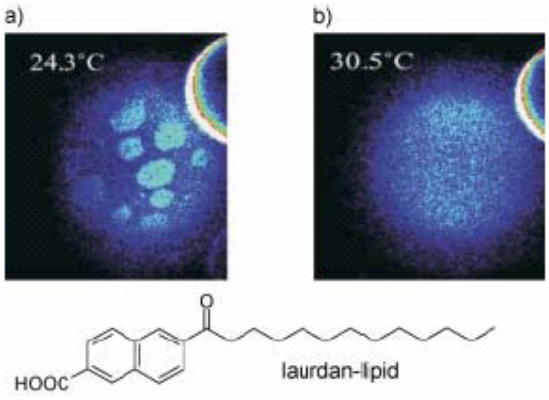


Figure I-17 Formation des domaines dans des VGUs composées de DOPC/BBSM/Chol (1/1/1) ; a) formation des VGUs à 24.3°C ; b) destruction des domaines en augmentant la température à 30.5°C. D'après (Dietrich, 2001)

Des domaines avec une taille d'environ 10 µm ont été observés sur la surface vésiculaire ce qui est une indice de la séparation de phase et de la formation des domaines en phase L_o. Ces domaines disparaissent quand la température augmente, au-dessus de la température de transition de phase. Ce fait prouve leur existence en tant que structures dues à la séparation de phase. La capture de deux images en mode de temps résolu montre que ces domaines se déplacent les uns par rapport aux autres et donc qu'ils sont mobiles dans la phase la plus liquide. Les domaines dans les deux feuillets de la bicouche coïncident toujours parfaitement. Ce fait suggère que les domaines dans les deux feuillets des membranes cellulaires peuvent être pareillement couplés, bien que le mécanisme ne soit pas connu. Les domaines identifiés par Dietrich *et al.* montrent des propriétés additionnelles attribuées aux rafts. D'abord, des expériences avec monocouche ont prouvé que ces domaines sont résistants au Triton X-100, tandis que le reste de la surface est complètement soluble. En outre, la formation des domaines dépend de la concentration du cholestérol. L'effet du cholestérol a été démontré en formant des VGUs composées de mélange lipidique extrait de BBM (brush border membranes). Dans ces membranes, des domaines ont été observés quand la température est au dessous de 45°C. Cependant, quand le mélange lipidique extrait de BBM a été épuisé en cholestérol avant la formation de VGUs, la formation des domaines s'observe à 24°C. Les domaines des VGUs contenant le cholestérol prennent une forme ronde tandis que les domaines des VGUs, épuisés en cholestérol prennent une forme irrégulière, caractéristique des domaines en phase gel. Ces

résultats sont en accord avec les résultats décrits ci-dessus et cela démontre que le cholestérol favorise l'insolubilité des domaines par des différents détergents et la séparation de phase (Ahmed, 1997; Schroeder and Brown, 1998).

L'étude de Dietrich *et al.* (2001) a fourni un nouvel apport important aux modèles de raft et prouve d'une façon convaincante que les domaines en phase L_o se forment dans les mélanges de PC/SM/Chol, au moins dans les membranes modèles.

I.5.3.2 Taille des domaines en phase L_o et rafts

Une des caractéristiques largement discutées est la taille absolue des rafts (Anderson, 2002). Les valeurs varient entre **10 et 100 nm** lorsqu'elles sont mesurées par des méthodes comme l'AFM et la SPT (single-particle tracking) et dans la gamme de plusieurs **micromètres** avec d'autres méthodes comme la microscopie optique, WAXRD (wide-angle X-ray diffraction) etc. Le nombre des molécules associées varie entre plusieurs centaines à plusieurs centaines de mille. On peut mentionner à ce sujet trois points:

1) Les rafts (domaines) sont des structures dynamiques ce qui signifie que les composants sont en équilibre dynamique entre les formes associées et libres. Il a été démontré par la microscopie de fluorescence et la SPT que le bord du raft avec son environnement se déplace à l'échelle temporelle de la seconde. Voila pourquoi la détermination finale de la taille est rendue difficile à température ambiante.

2) La méthode de détection détermine la taille des structures qui peuvent être mesurées. Ainsi, par exemple, des rafts (domaines) d'une taille au dessous de 1 micromètre ne peuvent pas être détectés par la microscopie de fluorescence tandis que les méthodes comme AFM peuvent détecter des structures de l'ordre de quelques nanomètres.

3) Puisque le phénomène de la séparation de phase est la base de la formation des rafts (domaines), le mode de leur préparation est certainement important, par exemple l'état physique de la structure mono- ou bi-couche. La plupart des expériences ont été faites avec des monocouches ou bicouches et il est probable que ces résultats sont différents de ceux des membranes sans support telles les VGUs. De plus, la croissance des phases dépend du temps (Giocondi, 2001) ce qui nous amène à penser que les domaines ne sont pas toujours des structures en équilibre.

Cependant, la question principale qui demeure est : comment les résultats obtenus sur des systèmes modèles peuvent-ils être appliqués aux rafts dans les cellules? L'existence des rafts enrichis en cholestérol et en sphingolipides dans les membranes cellulaires n'a pas été démontrée d'une façon concluante et des marqueurs putatifs pour des rafts, tels que différentes protéines GPI-ancrées, sont souvent distribués d'une manière homogène (uniforme) dans la membrane plasmique (Kenworthy, 2000). Il n'a pas encore été observé l'existence des domaines de l'ordre de micromètres, enrichis en protéines GPI-ancrées ou gangliosides dans des membranes cellulaires comme Dietrich *et al*. (2001) en ont détecté dans des membranes modèles. L'évaluation de la taille des rafts est de l'ordre de 10-100 nanomètres ou même du microns comme nous l'avons déjà mentionné ci-dessus. Les rafts dans les cellules sont plus complexes que ceux des membranes modèles, même si celles-ci sont composées de mélange lipidique extrait de BBM (brush border membrane).

I.5.4 Impacts biologiques de séparation de phase

I.5.4.1 Protéines au sein des rafts

Les preuves que les rafts peuvent exister dans les membranes cellulaires sont issues des études sur des fibroblastes humain et de hamster, dans lesquels les fractions membranaires, riches en glycosphingolipides, mais résistantes au Triton X-100 à 4°C, ont été détectées (Carter, 1981). Plus tard, un nombre croissant d'expériences s'est concentré sur l'importance des rafts et l'activité biologique des membranes cellulaires. D'ailleurs, il a été trouvé que quelques protéines s'associent avec ces domaines, une association susceptible d'influencer beaucoup d'événements biologiques comme la transduction des signaux, le tri de protéines et de lipides, l'adhésion cellulaire, la motilité, et diverses maladies (Simons, 2000).

L'un des avantages immédiats de l'organisation latérale des membranes biologiques en microdomaines réside dans la capacité de ces membranes à pouvoir ségréger différentes protéines entre elles, ou au contraire à permettre leur coalescence et donc leur concentration dans certaines zones de la membrane plasmique (Simons, 2000). Il est bien établi que dans le cas des mécanismes d'activation impliquant la signalisation par des tyrosines kinases, un échafaudage de protéines adaptatrices et nombre d'enzymes sont

recrutés sur la membrane plasmique (Ilangumaran, 2000). Les rafts, en concentrant les protéines impliquées dans les voies de signalisation peuvent jouer le rôle de plate-forme de signalisation, concentrant en un même endroit différents partenaires protéiques. Les protéines qui interagissent avec les membranes cellulaires appartiennent principalement aux trois types suivants: protéine intégrale possédant un ou plusieurs domaines transmembranaires, protéine cytosolique interagissant avec la membrane plasmique et protéine accrochée à la face extracellulaire de la membrane plasmique grâce à une ancre Glycosylphosphatidylinositol (GPI). Les protéines appartenant aux dernières catégories interagissent avec la membrane plasmique au moyen d'une modification lipidique post-traductionnelle.

A ce jour, quatre types de modifications post-traductionnelles lipidiques ont été mises en évidence:

1) Les protéines "à ancre GPI" sont des protéines liées de façon covalente à un groupement lipidique de type glycosylphosphatidylinositol (GPI) et exprimées par ce biais sur la face extracellulaire des cellules (Englund, 1993). Cette modification intervient dans la lumière du réticulum suite à la synthèse de la protéine.

2) La prénylation consiste à l'addition de groupes geranylgeranyls ou de groupes farnésyls sur des cystéines par liaison thioéther. Des niveaux relativement bas de ces protéines ont été trouvés dans les rafts. Cela pourrait être expliqué par la plus grande partie stérique des groupes de prenyl. En effet, ces groupes sont fortement hydrophobes mais leur structure volumineuse les empêche de partitionner efficacement au sein des domaines ordonnés.

3) La myristoylation est l'addition d'un groupe C14 :0, intervenant en N-terminal des protéines, sur des résidus glycines grâce à une liaison amide (un exemple: la Src kinases).

4) La palmitoylation, enfin, représente l'attachement d'un groupement palmitate (C16 :0) grâce à une liaison thioester sur un résidu cystéine.

I.5.4.2 La séparation de phase comme modulateur de l'activité enzymatique

Le rôle de certaines enzymes en tant que *molécules signal* participant dans des processus de bourgeonnement et de vésiculation, y compris ceux dans des membranes

golgiennes, a été déjà établi. Par exemple, Simon *et al.* (1996) ont montré l'implication de la protéine kinase C dans la vésiculation membranaire golgienne comme activateur de la phospholipase D (PLD). Les auteurs ont supposé que l'acide phosphatidique, le produit de l'activité de PLD, déclenche le bourgeonnement et la vésiculation à partir du complexe de Golgi. D'un côté, de Figueredo *et al.* (2000) ont démontré la participation de PLA_2 dans le trafic rétrograde médié par des tubules du complexe de Golgi au réticulum endoplasmique. Ce transport-rétro assure le transport du cholestérol mais pas celui des sphingolipides.

Il est bien établi que l'activité de la PLA_2 augmente de façon significative lorsque l'enzyme attaque des bicouches lipidiques qui contiennent des défauts membranaires. Un exemple de tels défauts est la coexistence de L_d et H_{II} ou de L_d et L_o (Koumanov, 2002). La sphingomyéline (SM) est un inhibiteur de la PLA_2. L'enzyme se lie à la SM mais il ne peut pas l'hydrolyser. Cet effet inhibiteur est supprimé en ajoutant au mélange lipidique des quantités équimolaires de cholestérol (SM/Chol, 1/1) (Koumanov, 1998). En raison de l'affinité élevée du Chol pour la SM (Bittman, 1994), le Chol déplace la PLA_2 de son association avec la SM. La séparation de phase latérale dans des bicouches lipidiques correspondant à la formation des rafts a pour conséquence l'apparition de défauts en empilement lipidique et des fluctuations de densité moléculaire (Mouritsen, 1991; Jørgensen, 2002). Par conséquent, on pourrait prévoir que la cinétique de l'adsorption de PLA_2 et son activité enzymatique seraient différentes dans les régions des rafts et dans la matrice liquide, aussi bien qu'à proximité de la frontière entre les deux phases (L_d/L_o) en raison de leur composition différente et de leur empilement moléculaires différent. Un des objectifs de cette thèse est justement l'étude des réactions enzymatiques sur un système modèle mimant une séparation de phase de type L_d/L_o. Voilà pourquoi nous présentons ici un peu plus de détails sur cet enzyme.

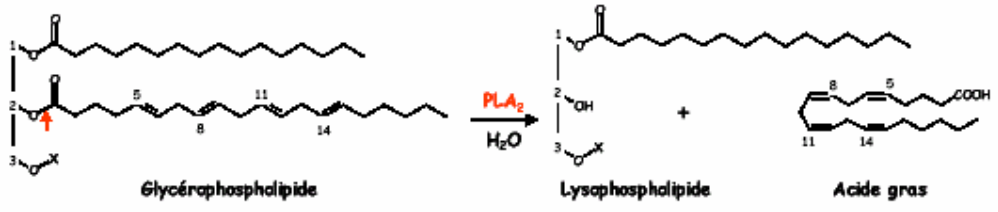


Figure I-18 Hydrolyse des glycérophospholipides par les PLA_2

Les phospholipases A_2 catalysent l'hydrolyse de la liaison ester en position *sn*-2 des glycérophospholipides libérant un acide gras et un lysophospholipide (Figure I-18). Les substrats naturels des PLA_2 sont les glycérophospholipides possédant en position *sn*-2 une chaîne comprenant au moins 2 carbones. Les acides gras insaturés (p.e. l'acide arachidonique, l'acide linoléique et l'acide oléique) sont les acides gras présents majoritairement en position *sn*-2 des glycérophospholipides. Ce sont donc les acides gras libérés en plus grande quantité par les PLA_2. L'acide arachidonique sert alors de second messager et de précurseur des icosanoïdes. Le lysophospholipide est le substrat pour le remodelage des lipides membranaires. Il est très rapidement réacylé par une acyltransférase pour reformer un glycérophospholipide, permettant ainsi de maintenir une concentration faible d'acides gras et de lysophospholipides libres dans les cellules. Le maintien de cette faible concentration de lysophospholipides, en particulier l'acide lysophosphatidique est nécessaire car les lysophospholipides jouent un rôle important dans la signalisation cellulaire et leur présence modifie de façon importante les propriétés des membranes (Moolenaar, 1999; Graler, 2002).

Les PLA_2 forment une famille hétérogène quant à leur structure, leur rôle biologique, leur localisation et leur régulation. Leur classification est complexe. On différencie trois grandes classes : les phospholipases A_2 sécrétées ($sPLA_2$), de petit poids moléculaire (13 – 18 kDa), calcium dépendantes, les PLA_2 intracellulaires, calcium indépendantes ($iPLA_2$) et des PLA_2 cytosoliques de 85 kDa ($cPLA_2$).

L'activité enzymatique des $sPLA_2$ est strictement dépendante du calcium, à des concentrations de l'ordre millimolaire, correspondant aux concentrations de calcium dans le milieu extracellulaire. Elles sont présentes dans une grande variété de venins de serpents, d'insectes, dans les glandes exocrines des mammifères et sont sécrétées par différents types cellulaires. Les $sPLA_2$ sont constituées d'environ 125 acides aminés dont 10 à 16 cystéines impliquées dans des ponts disulfures qui confèrent à ces enzymes une grande stabilité. Le mécanisme catalytique : un résidu histidine associé à un résidu acide aspartique polarisent une molécule d'eau qui attaque la liaison ester du substrat, elle même polarisée par le calcium. Ce mécanisme catalytique est donc strictement dépendant du calcium qui participe à la liaison du substrat au site catalytique et à l'étape d'hydrolyse (Dennis, 1994; Murakami, 1995; Dennis, 1997).

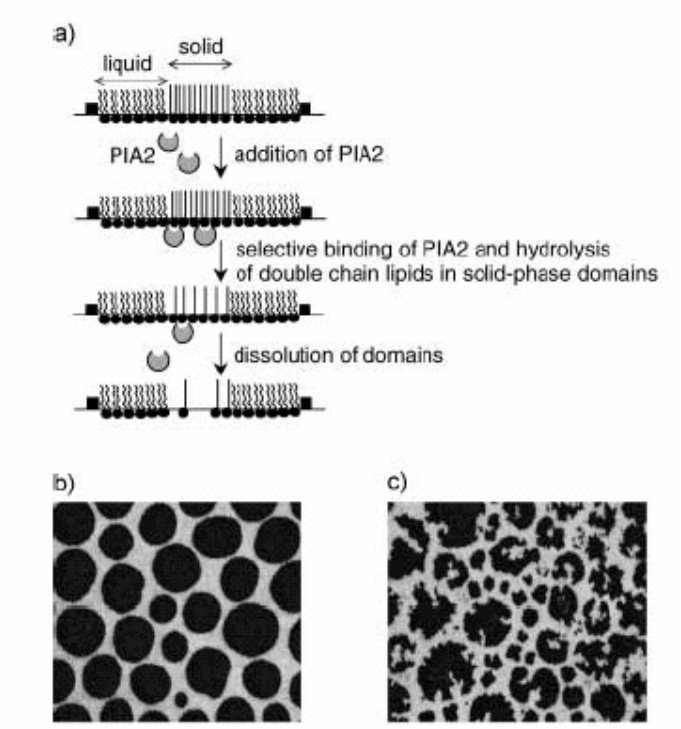


Figure I-19 Action sélective de la phospholipase PLA_2 sur des domaines ordonnés solides des monocouches composées de DPPC. a) Présentation schématique de l'action enzymatique par l'hydrolyse sélective des lipides dans les domaines ordonnés solides. b) Domaines ronds avant l'addition de la PLA_2. c) Destruction des domaines par l'hydrolyse sélective et enfin leur dissolution. D'après (Grainger, 1990)

L'action de ces enzymes peut être aussi influencée sensiblement par la séparation de phase et la formation de domaines dans les membranes. Grainger *et al.* (1990) ont prouvé que l'action de la phospholipase A_2 dépend fortement de l'état de phase de la membrane. Des monocouches composées de DPPC ont été préparées exactement au point de coexistence des états solide et liquide. A l'aide d'un marqueur fluorescent spécifique, les domaines ordonnés solides ont été visualisés en tant que domaines ronds foncés (Figure I-19). Quand la PLA_2 a été ajoutée, les domaines commencent clairement à se déformer. D'après les auteurs, la perte de la forme ronde des domaines est causée par la dégradation préférentielle des molécules DPPC à la frontière de la phase solide/liquide.

I.5.4.3 Introduction de la fonction des rafts

Plusieurs approches ont été adoptées pour étudier la fonction des rafts. Une d'elles est de montrer qu'ils sont enrichis en protéines-cibles. Cela suppose un rôle régulateur des

rafts par rapport à la fonction de ces protéines, mais ne le prouve pas. Une preuve plus évidente est de montrer comment plusieurs protéines se redistribuent et co-localisent pour qu'elles puissent déclencher leur interaction, c'est à dire effectuer leur fonction. Une autre approche est de montrer que la perturbation de l'association d'une protéine avec des rafts perturbe sa fonction. Un exemple est la désintégration de rafts par une déplétion du cholestérol (méthyl-β-cyclodextrine) ou, plus rarement, par une déplétion des sphingolipides. Bien que cette méthode soit la plus répandue, la déplétion du cholestérol peut perturber non seulement les rafts, mais aussi d'autres fonctions de la cellule qui ne sont pas directement liées aux fonctions des rafts.

Un des objectifs de cette thèse est la visualisation directe de la désintégration des domaines en phase L_o par différents agents comme la méthyl-β-cyclodextrine et la sphingomyélinase. Nous allons chercher une relation entre la manière dont sont désintégrés les domaines et le mécanisme moléculaire qui est à l'origine de cette transformation morphologique. La motivation plus précise de cette étude est présentée dans le chapitre III.1. Ici, nous décrivons en détails la structure chimique et les propriétés physico-chimiques de ces molécules.

I.5.4.3.1 Méthyl-β-cyclodextrine

La méthyl-β-cyclodextrine peut s'associer au cholestérol en formant un complexe hydrosoluble. En utilisant des concentrations élevées de méthyl-β-cyclodextrine, on peut extraire le cholestérol des membranes cellulaires (Ohtani, 1989), (Kilsdonk, 1995) et (Haynes, 2000). Les cyclodextrines sont des oligosaccharides cycliques composées d'unités de glucopyranoses (Figure I-20). Les plus connues sont les cyclodextrines α, β et γ qui ont respectivement 6, 7, et 8 unités de glucopyranoses. La forme de la molécule est un cône tronqué (Figure I-21). La méthylation des groupes hydroxyliques externes du glucose augmente la vitesse de désorption du cholestérol des membranes.

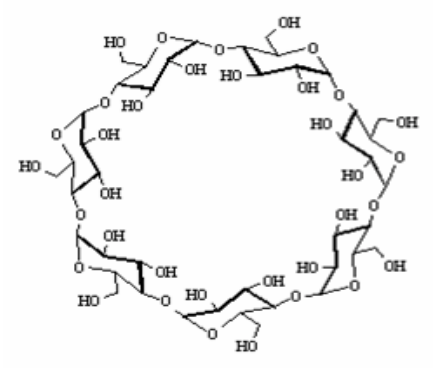


Figure I-20 La structure chimique de β-cyclodextrine

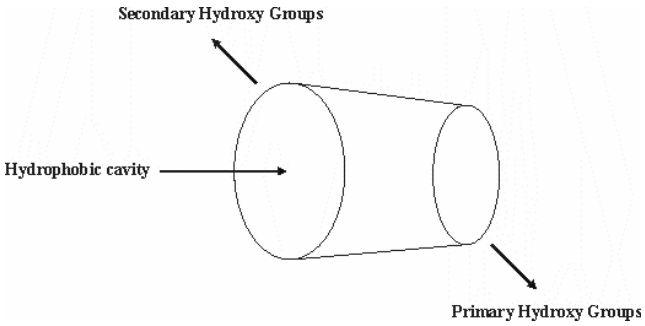


Figure I-21 Le plan de la molécule de β-cyclodextrine

Propriétés principales

- les cyclodextrines sont hydrosolubles puisque les groupes hydroxyliques se trouvent sur la surface externe de l'anneau
- la cavité interne est hydrophobe
- les cyclodextrines forment des complexes solides cristallins avec des « guest » molécules

La formation de complexe β-cyclodextrine-« guest » molécule (comme accepteur du cholestérol)

- la « guest » molécule doit posséder une taille appropriée à la cavité hydrophobe et une forme moléculaire appropriée
- substitution des molécules d'eau par des « guest » molécules moins polaires
- interaction de « guest » molécules relativement non polaires avec la cavité hydrophobe

- la stabilité du complexe est proportionnelle à l'hydrophobicité des composants

La force motrice de la formation du complexe

- interaction apolaire/apolaire (« guest » molécule/cavité hydrophobe) est privilégiée par rapport à l'interaction polaire/apolaire (eau/cavité hydrophobe)
- interactions de van der Waals et formation des liaisons hydrogènes
- énergie libre du système diminuée

I.5.4.3.2 Sphingomyélinase

L'enzyme utilisé dans nos expériences appartient aux sphingomyélinases exogènes. La shingomyélinase exogène isolée de *Bacillus cereus* ou de *Staphylococcus aureus* permet, via l'hydrolyse de la SM, présente dans le feuillet externe de la membrane plasmique cellulaire, de générer de grandes quantités de céramides (Figure I-22) et peut être ainsi un moyen de reproduire les effets des céramides sur les cellules.

Au moins sept classes de SMases ont été identifiées dans les cellules, basées principalement sur différents profils de pH, présence des cations, et localisation cellulaire. Le céramide est un activateur biologique, capable d'induire par exemple deux fonctions cellulaires opposées, la prolifération et la mort cellulaire programmée (un terme connu dans la littérature sous le nom d'« apoptose ») (Kolesnick, 1995).

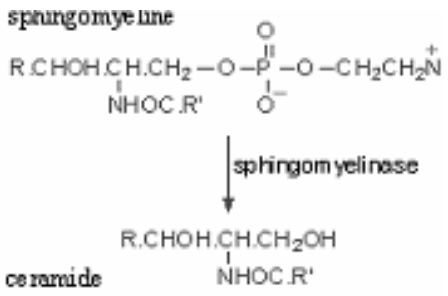


Figure I-22 Hydrolyse des shingomyélines par les SMases

Le traitement des cellules avec la sphingomyélinase bactérienne est une méthode aisée pour la déplétion des membranes cellulaires en SM. Cependant, cette méthode a un inconvénient inévitable. Ici, il s'agit d'une dégradation de la SM par la SMase qui a comme conséquence l'accumulation de céramide. Le céramide sert en tant que modulateur des diverses fonctions cellulaires, impliquant le métabolisme et la dynamique du

cholestérol (Harmala, 1993; Ridgway, 1995). Ainsi, en utilisant cette méthode, il faut tenir compte du fait que le traitement avec la SMase mène à l'accumulation de céramide, mais pas à une déplétion de SM au sens de la déplétion de Chol. Cet effet ne peut pas être éliminé si on ajoute extérieurement des céramides car l'incorporation des céramides naturels à longue chaîne au sein des membranes plasmiques cellulaires est difficile. Les céramides artificiels à chaîne courte s'incorporent facilement aux membranes, mais leurs propriétés physico-chimiques sont différentes. Donc, les céramides ajoutés extérieurement ne peuvent pas mimer l'effet de l'action de la sphingomyélinase. Ce problème au niveau cellulaire est résolu en utilisant des mutants des cellules, défectueux dans la production de la SM et sans l'accumulation du céramide (Fukasawa and Hanada, 2000). Ces auteurs trouvent que la réduction de la SM cellulaire à 15%, sans l'accumulation du céramide ne cause pas de changement des niveaux de cholestérol dans la membrane plasmique. Cependant, la SM joue un rôle dans la rétention du cholestérol membranaire plasmique contre son efflux provoqué par des accepteurs extracellulaires.

I.6 Propriétés physicochimiques des membranes lipidiques modèles

I.6.1 Approche thermodynamique

Deux questions se posent maintenant si l'on veut comprendre le phénomène d'auto-association des lipides en phase aqueuse :

- Pourquoi y a–t–il agrégation à une concentration déterminée en lipide, la *cmc*… ?
- Pourquoi les objets formés ont-ils une géométrie variable en fonction de la structure chimique du lipide, de la teneur en eau, de la température… ?

Auto–association des lipides

On peut représenter le phénomène d'auto–association sous la forme d'un équilibre (Tanford, 1973; Israelachvili, 1985) :

Eq. 1 $$nL \leftrightarrow L_n$$

Pour une micelle de nombre d'agrégation n (n lipides par micelle), on définit μ_{mic} comme son potentiel chimique, μ_n étant le potentiel par lipide. x_{mic} est la fraction des micelles à n lipides et x_n la fraction de lipides contenus dans celle–ci, $x_{mic} = x_n / n$. A l'équilibre, on doit avoir égalité des potentiels chimiques du lipide, quelle que soit la taille de l'édifice auquel il appartient :

Eq. 2 $$\mu_1 = \mu_n = \frac{\mu_{mic}}{n}$$

où l'indice 1 représente le monomère en solution. Dans le cas d'un mélange idéal (grande dilution), on a :

Eq. 3 $$\mu_1 = \mu_0^1 + RT \ln x_1$$

et

Eq. 4 $$\mu_{mic} = \mu_{mic}^0 + RT \ln x_{mic} = n.\mu_n^0 + RT \ln \frac{x_n}{n}$$

L'égalité des potentiels chimiques s'écrit donc :

Eq. 5 $$\mu_1^0 + RT\ln x_1 = \mu_n^0 + \frac{RT}{n}\ln\frac{x_n}{n}$$

L'enthalpie libre de micéllisation est, par définition :

Eq. 6 $$\Delta G_{mic}^0 = \mu_n^0 - \mu_1^0 = RT\ln x_1 - \frac{RT}{n}\ln\frac{x_n}{n}$$

Dans ces conditions, la concentration en lipide sous forme d'agrégats de taille *n* peut s'écrire :

Eq. 7 $$x_n = n.\left[x_1 \exp\left(-\frac{\Delta G_{mic}^0}{RT}\right)\right]^n$$

Or, comme le nombre d'agrégation *n* est en général grand, de l'ordre de 50 ou 100, x_n ne peut être notablement différent de zéro que si le terme entre crochets est très voisin de 1. Cette condition n'est pas vérifiée si la fraction x_1 est inférieure à une fraction critique, x_{cmc}, pour laquelle les premiers phénomènes d'agrégation sont possibles :

Eq. 8 $$x_{cmc} = \exp\frac{\Delta G_{mic}^0}{RT} \Leftrightarrow \Delta G_{mic}^0 = RT\ln x_{cmc}$$

$$\forall n > 1, x_n \cong 0 \text{ si } x_1 < x_{cmc}$$

On peut remarquer que pour *n* donné, ΔG_{mic}^0 ne dépend que des potentiels chimiques standards, fonction de la température. Ainsi, x_1 est constante, quelle que soit la concentration totale en lipide supérieure à la *cmc*.

Les conditions nécessaires pour qu'il y ait agrégation sont donc :

Eq. 9 $$\Delta G_{mic}^0 < 0 \Leftrightarrow \mu_n^0 < \mu_1^0$$

La relation de Gibbs–Helmholtz permet de déterminer l'enthalpie de micellisation, ΔH_{mic}^0, si la loi de dépendance de x_{cmc} selon la température est connue,

Eq. 10 $$\frac{d\ln x_{cmc}}{dT} = -\frac{\Delta H_{mic}^0}{RT^2}$$

Les enthalpies de micellisation obtenues par cette méthode sont fréquemment faibles, de l'ordre de quelques kJ/mol. Mais on peut aussi déduire l'entropie de micellisation, $\Delta S^0_{mic} = \left(\Delta H^0_{mic} - \Delta G^0_{mic}\right)/T$, qui est en général grande et positive. *C'est donc l'entropie qui gouverne le processus d'auto–association*. Cet effet est connu sous le nom *d'effet hydrophobe*, et il s'explique si l'on prend en compte l'entropie de l'eau. En effet, l'eau s'organise autour des régions apolaires des molécules en un réseau très structuré, de faible entropie. L'auto-association évite cette organisation de l'eau en remplaçant les contacts lipide–eau par des interactions lipide - lipide. Il en résulte une augmentation de l'entropie totale du système, la perte d'entropie liée au rassemblement des molécules lipidiques étant très inférieure au gain d'entropie du solvant. La micellisation se produit principalement afin d'éviter la diminution d'entropie liée à l'organisation de l'eau.

I.6.2 Approche géométrique

On considère les deux types d'interactions mises en jeu à l'interface lipide/eau :

- interactions attractives, qui s'exercent par l'intermédiaire de la tension interfaciale γ ($E_\gamma = \gamma.a$, a étant l'aire occupée par molécule)
- interactions répulsives au niveau des têtes polaires (électrostatiques, stériques), E_{tp}, et au niveau des chaînes (stériques), E_{cb}

Dans son modèle, Israelachvili (1985) a simplement considéré que les répulsions au niveau des têtes sont de la forme $E_{tp}=C/a$, où C est une constante. Par ailleurs, pour un système fluide, Israelachvili considère que la contribution répulsive des chaînes, E_{cb} reste constante tant que la longueur des chaînes est inférieure à une certaine longueur critique, *lc*. Ceci traduit le fait que, comme dans le cas d'un liquide, les chaînes fluides vont librement occuper tout le volume disponible. L'énergie d'une molécule à cette interface peut donc s'écrire en fonction de l'aire occupée à l'interface, a :

Eq. 11 $$\mu^0 = \gamma a + \frac{C}{a} + E_{cb}$$

L'équilibre est atteint pour un minimum d'énergie, qui correspond à une aire optimale par molécule $a_0 = \sqrt{\frac{C}{\gamma}}$ et une énergie :

Eq. 12 $$\mu^0 \cong 2\gamma a_0 + \frac{\gamma}{a_0}(a - a_0)^2 + E_{cb}$$

On voit ici que le deuxième terme représente une variation parabolique autour du minimum. Cette forme d'énergie, analogue à une loi de Hooke, assure la stabilité au système ($\partial^2\mu^0 / \partial a^2 = 2\gamma / a_0 \geq 0$). Dans un objet de volume V contenant n molécules, le volume moléculaire v est égale à $v=V/n=a_0.l$ si $l<l_c$. Dans le cas $l=l_c$, la surface moléculaire a devient alors plus grande que la surface optimale a_0 (μ augmente) de façon a maintenir la contrainte $v = a.l_c = const$.

D'après le modèle précèdent, tous les objets dont le nombre d'agrégation est n seront stables si la surface a, réservée pour chaque lipide, est égale à a_0. Toutes les tailles et toutes les formes sont donc permises à condition de respecter la contrainte $a=a_0$. Or, le phénomène d'auto – association implique aussi que les chaînes aliphatiques remplissent le mieux possible la zone hydrophobe, afin de minimiser la surface de contact avec l'eau. Pour une aire donnée a_0, il n'y a que quelques structures (micelles, tubes, bicouches, micelles inverses) qui autorisent un tel arrangement. Ces objets ont une taille déterminée, fonction des contraintes d'empilement propres à chaque lipide. Une structure donnée ne sera en effet possible que si elle conduit à une longueur de chaînes inférieure à la longueur critique l_c. En rappelant que n est le nombre d'agrégation et a_0 est l'aire moléculaire, on définit v comme volume de la partie hydrophobe de la molécule. Si on observe des micelles sphériques de rayon R, on déduit les relations :

Eq. 13 $$n = \frac{4\pi R^3}{3v} = \frac{4\pi R^2}{a_0} \Rightarrow R = \frac{3v}{a_0} \leq l_c$$

L'inégalité constitue la contrainte d'empilement dans les objets micellaires, condition que l'on peut aussi écrire :

Eq. 14 $$\frac{v}{a_0 l_c} \leq \frac{1}{3}$$

Si maintenant on considère une phase de type H_I, les lipides sont arrangés dans un cylindre de longueur L et de rayon R :

Eq. 15 $$n = \frac{\pi R^2 L}{v} = \frac{2\pi RL}{a_0} \Rightarrow R = \frac{2v}{a_0} \leq l_c$$

et la condition d'existence devient, dans ce cas :

Eq. 16 $$\frac{v}{a_0 l_c} \leq \frac{1}{2}$$

Avec des bicouches planes, de surface A et d'épaisseur $2R$, on obtient :

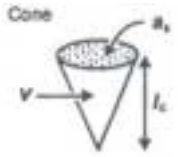
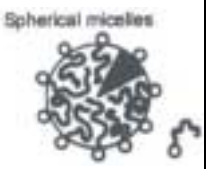
Eq. 17 $$n = \frac{2RA}{v} = \frac{2A}{a_0} \Rightarrow R = \frac{v}{a_0} \leq l_c$$

c'est–à–dire :

Eq. 18 $$\frac{v}{a_0 l_c} \leq 1$$

Enfin, pour des micelles inverses, on aboutirait à :

Eq. 19 $$\frac{v}{a_0 l_c} > 1$$

Lipides	$v/(a_0 l_c)$	**Forme**	**Structures**
Lipides mono - caténaires à large tête polaire, surfactants SDS à faible force ionique	$< \frac{1}{3}$		

Lipides mono - caténaires à petite tête polaire SDS et CTAB à grande force ionique Lipides non ioniques	$\frac{1}{3}-\frac{1}{2}$	Truncated cone	Cylindrical micelles
Lipides bicaténaires à large tête polaire, chaînes fluides PC, PS, PA et etc.	$\frac{1}{2}-1$	Truncated cone	Flexible bilayers, vesicles
Lipides bicaténaires à petite tête polaire, lipides anioniques a grande force ionique, chaînes gelées PE, PS + Ca^{2+}	~1	Cylinder	Planar bilayers
Lipides bicaténaires à petite tête polaire, lipides non ioniques, chaînes poly – cis – insaturées, température élevée PE insaturées PA+Ca^{2+} et etc.	>1	Inverted truncated cone or wedge	Inverted micelles

Tableau I-2 Influence de la géométrie moléculaire sur la stabilité des phases lipidiques. D'après (Israelachvili, 1985)

Ainsi, on voit qu'à chaque structure correspond une relation déterminée entre la surface occupée par tête polaire et le volume des chaînes aliphatiques. Lorsque plusieurs solutions sont possibles, le terme entropique favorise toujours la plus grande dispersion, c'est–à–dire les nombres d'agrégations les plus petites. Une illustration de cet effet de la géométrie moléculaire sur la structure des phases observées est donnée dans le Tableau I-2

D'après Tanford (1973), le volume v et la longueur critique d'étirement des chaînes, l_c peuvent s'écrire :

Eq. 20 $$v \cong \left(27.4 + 26.9.n_{CH_2}\right)\dot{A}^3$$

Eq. 21 $$l_c \leq l_{\max} = (1.5 + 1.265.n_{CH_2})\dot{A}$$

où n_{CH_2} est le nombre de CH_2 et l_{max} la longueur des chaînes en configuration *all-trans.* Ainsi, pour un tensio – actif monocaténaire caractérisé par $v / l_c \cong 20\dot{A}^2$ (n_{CH_2} élevé), on obtient des micelles sphériques pour $a_0 \geq 60\dot{A}^2$, puis des phases hexagonales pour $a_0 \geq 40\dot{A}^2$, des bicouches pour $a_0 > 20\dot{A}^2$, et des phases inverses de type II, pour $a_0 \leq 20\dot{A}^2$.

I.6.3 Approche mécanique

Dans ce cas, on ne s'intéresse plus à la structure moléculaire des lipides mais on considère simplement la membrane comme une surface bidimensionnelle. Dans cette description, tous les détails moléculaires ont été gommés au profit des propriétés macroscopiques. Au premier niveau de description, la membrane est assimilable à un simple film. On peut ignorer la présence de deux monocouches distinctes. Mécaniquement, ce film peut être courbé, comprimé ou étiré, et cisaillé. Si on s'intéresse à une surface unitaire de membrane, trois types de déformation peuvent se produire, auxquels on associe trois énergies élastiques (les définitions sont prises de (Delattre, 1993) (Figure I-23):

- Une énergie de cisaillement (shear)

Elle est mise en jeu lorsqu'il se produit simultanément une compression dans une direction et une dilatation dans l'autre, à surface et courbure constantes. Dans le cas d'une

membrane fluide, qui est le seul considéré ici, une telle déformation ne coûte pas d'énergie puisque les molécules sont libres de glisser les unes par rapport aux autres.

- Une énergie d'expansion (streching)

Si S_o est l'aire en l'absence de contrainte, l'énergie par unité de surface qu'il faut fournir à la membrane pour l'augmenter de ΔS s'écrit:

Eq. 22 $$E_{\exp} = \frac{K_S}{2}\left(\frac{\Delta S}{S_0}\right)^2$$

K_s représente le module d'expansion, dont la valeur est de l'ordre de 100 mN/m.

- Une énergie de courbure (bending)

D'après Helfrich, cette énergie de courbure par unité de surface s'écrit

Eq. 23 $$E_{courb} = \frac{k_c}{2}\left(c_1 + c_2 - c_0\right)^2 + \overline{k_c}.c_1 c_2$$

où c_o est la courbure spontanée de la membrane. Le premier terme dans cette expression représente l'énergie de courbure *cylindrique*, le deuxième l'énergie de courbure *gaussienne*. Ce dernier est nécessaire pour rendre compte des déformations en « selle-de-cheval », dont un exemple est le cas $c_1 = -c_2$ et c_o=0, pour lequel la courbure cylindrique est nulle. Il n'existe pas à l'heure actuelle de détermination expérimentale de $\overline{k_c}$ mais on sait, par contre, que le module de courbure cylindrique k_c est excessivement faible, de l'ordre de 10^{-19}J. L'agitation thermique (kT =4.10^{-21}J à 25°C) peut donc engendrer des fluctuations spontanées de la courbure et dans le cas de très grands liposomes, les amplitudes de ces déformations sont visibles au microscope optique.

I.6.3.1 Les ondulations membranaires provoquées par l'agitation thermique

Une des méthodes consiste à observer les fluctuations de forme d'une vésicule flasque sous l'action de la seule agitation thermique (Meleard, 1997). L'analyse statistique du signal permet de remonter à la valeur de k_c qui est de l'ordre d'une dizaine de kT pour les phosphatidylcholines. Sous tension nulle, l'amplitude des fluctuations parcourant la membrane est limitée uniquement par l'énergie de courbure :

Eq. 24 $$\left\langle u^2 \right\rangle^{\frac{1}{2}} \approx \left(kT / k_c\right)^{\frac{1}{2}} R$$

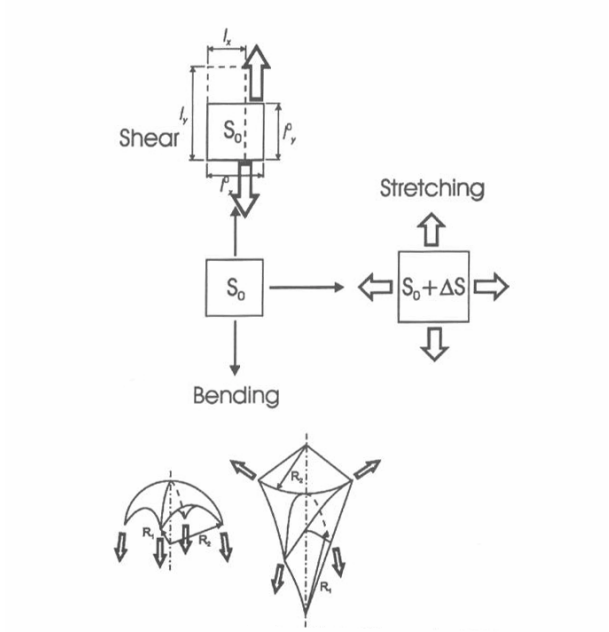


Figure I-23 Représentation des déformations élastiques d'une surface, S_o, initialement plane : shear – cisaillement à surface et courbure constantes ; stretching – expansion ; bending – modification de la courbure avec $c_1.c_2>0$ (à gauche) et modification de la courbure à surface constante avec $c_1.c_2<0$ (à droite). D'après (Meleard, 1990)

Avec un module élastique k_c =10 - 50kT, on trouve effectivement des ondulations supérieures au micromètre. Or, de même que du papier froissé peut contenir une grande surface dans un petit volume, la membrane plissée des vésicules fluctuantes possède un réservoir conséquent d'aire « cachée ». Dans la littérature on parle plutôt « d'excès de surface », défini comme l'aire ΔA récupérable en dépliant les fluctuations. L'excès de surface est la différence entre l'aire de la surface ondulée et l'aire projetée sur le plan ΔA= A – A_p. A l'état complètement détendu (σ=0), cette fraction ΔA^0 représente de 5 à 10 % de la surface moyenne projetée A_p^0. L'augmentation de la surface projetée A_p, par une action extérieure, se fait au détriment des fluctuations. D'origine entropique, cette élasticité est décrite par une relation logarithmique en fonction de la tension σ de la membrane

Eq. 25
$$\frac{\Delta A-\Delta A^0}{A_p^0}=-\frac{kT}{8\pi k_c}\ln\left(1+\frac{A_p^0}{\pi^2 k_c}\sigma\right)$$

I.6.3.2 La technique de micropipette

Les ondulations spontanées de la membrane en phase fluide se traduisent par une tension de caractère entropique qui peut être mesurée par aspiration de la vésicule dans un capillaire. Cette technique, dite de « micropipette » (Figure I-24), permet d'étirer la membrane. L'aspiration fait pénétrer une extension tubulaire de la membrane à l'intérieur de la pipette. Des changements de la longueur cylindrique L, on mesure très précisément les variations de surface de la vésicule.

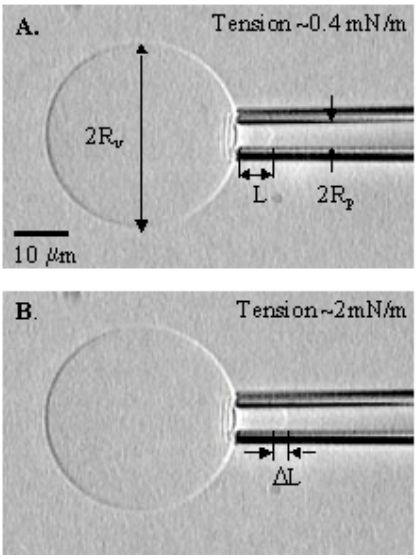


Figure I-24 Technique « micropipette » pour la mesure du module de courbure k_c

La tension σ imposée à la membrane est déduite simplement à partir de la loi de Laplace. L'augmentation de la surface projetée A_p par la tension latérale σ présente deux régimes :

La partie entropique de la réponse permet de remonter à la valeur de k_c. Dans ce régime l'aspiration est très faible et la membrane n'est pratiquement pas dilatée : elle a un contour lisse. La véritable dilatation intervient pour des tensions de l'ordre de 0.1 dyne/cm et au–delà, l'élasticité classique de Hook lorsque σ n'est plus négligeable devant le module K_S. On mesure de cette façon la constante K_S.

Eq. 26 $$\frac{A_p - A_p^0}{A_p^0} = \frac{kT}{8\pi k_c}\ln\left(1 + \frac{A_p^0}{24\pi k_c}\sigma\right) + \frac{\sigma}{K_S}$$

I.6.3.3 Modules élastiques k_c et K_S

Le module de courbure k_c et le module d'expansion K_S mesurés par l'une de deux techniques décrites précédemment vont être présentées du fait de leur importance dans la discussion de nos résultats.

1. **Module de courbure k_c**

LIPID	T [° C]	k_c [10^{-19}J]	Reference
EYPC	room	1.50±0.50	(Schneider, 1984a)
		1.28±0.25	(Bivas, 1987)
		0.88±0.20	(Faucon, 1989)
		1.00±0.15	(Faucon, 1989)
		0.80±0.25	(Mutz, 1990)
		0.66±0.06	(Angelova, 1992)
		0.43±0.11	(Mitov, 1992)
DMPC	30	1.15±0.15	(Duwe, 1989; 1990)
DMPC+20%Chol		2.1±0.25	
DMPC+30%Chol		4.0±0.25	

Tableau I-3 Module de courbure

2. **Module d'expansion K_S**

LIPID	T [°C]	K_S [mN /m]	Reference
EYPC	25	140±16	(Kwork, 1981)
SOPC	15	193±20	(Needham, 1990)
SOPC+38%Chol	15	333±9	

Tableau I-4 Module d'expansion

I.6.4 Bourgeonnement et Fission des domaines : approche théorique

En général, la bicouche est composée de différents types de molécules. Dans un tel système à plusieurs composants, la distribution peut être non homogène, ce qui influence les propriétés élastiques et par conséquent la forme de la membrane. Plusieurs phénomènes coopératifs, qui sont conduits par ce couplage entre la composition et la forme, ont été distingués. L'effet général est le bourgeonnement des domaines intramembranaires.

Les petites vésicules composées de deux lipides différents montrent souvent une asymétrie forte dans la composition des deux monocouches. Cette asymétrie compositionnelle réduit le mésappariement ou la « frustration » entre les courbures spontanées des deux monocouches. De même, les molécules dont la forme est conique tendent à diffuser vers des régions membranaires avec une courbure appropriée. Ainsi, la courbure peut induire la ségrégation de phase. Le diagramme de phase d'une bicouche à plusieurs composants montre en principe un régime d'une phase uniforme et un régime de coexistence de phase en fonction de la température et la composition membranaire. Quand une telle bicouche est préparée dans les conditions de coexistence de phase, elle présente la séparation de phase, qui correspond à la formation de domaines. Les bords de ces domaines se caractérisent par une tension de bord ou de ligne. Puisque la longueur de la frontière du domaine diminue lorsque le domaine bourgeonne, la compétition entre cette tension de ligne et l'énergie de courbure mène au bourgeonnement de ces domaines, connu dans la littérature sous le nom « domain-induced budding » (Lipowsky, 1992; Julicher, 1993; Lipowsky, 1993). Les deux phases liquides qui coexistent dans le mélange lipidique seront dénotées par α et β (Figure I-25).

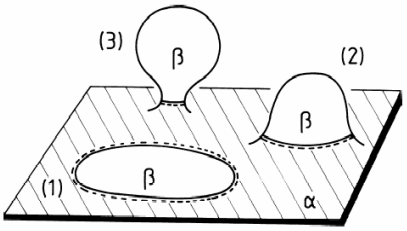


Figure I-25 Bourgeonnement d'un domaine membranaire inclus dans la matrice membranaire liquide. Le bord du domaine est indiqué par la ligne hachurée. La longueur de ce bord diminue pendant le processus de bourgeonnement de (1) à (3). D'après (Lipowsky, 1992).

I.6.4.1 L'énergie de bord et la tension de ligne

Le bord du domaine intramembranaire a une énergie qui est proportionnelle à la longueur du bord. Par conséquent, le domaine a une tendance à prendre une forme circulaire (immiscibilité liquide/liquide) afin de réduire au minimum son énergie de bord. La tension de ligne (σ) est égale à l'énergie de bord par unité de longueur. D'abord, considérons que le domaine dans la bicouche est situé à travers les deux monocouches. Dans ce cas-là, le bord du domaine représente une coupe à travers la bicouche entière. La section transversale d'une telle coupe se compose de trois régions distinctes: deux régions hydrophiles formées par des têtes polaires (épaisseur combinée de l'ordre de 1 nm) et une région hydrophobe intermédiaire formée par des queues lipidiques (épaisseur de l'ordre de 4 nm). Ces deux régions peuvent avoir des énergies libres interfaciales distinctes par unité de surface. Les phases liquides à trois dimensions ont une valeur typique pour l'énergie libre interfaciale de l'ordre de 10^{-2} J/m^2. Si on suppose que cette valeur est également applicable à la région des têtes polaires et que cette région donne justement la contribution principale à la tension de ligne, on obtient alors la valeur de 10^{-11} J/m (Lipowsky, 1992). Pour un domaine qui se prolonge seulement à travers une monocouche, la tension de ligne est réduite par un facteur 1/2.

I.6.4.2 L'énergie de bord contre l'énergie de courbure

Un domaine plat formera un disque circulaire afin d'atteindre un état dont la longueur de bord est minimale. Pour un domaine circulaire de rayon L, l'énergie de bord, F_e, est donnée par $F_e = 2\pi L\sigma$.

Cependant, en ce qui concerne l'énergie de bord, un disque circulaire plat ne représente pas l'état de la plus basse énergie, puisque la longueur du bord peut être encore réduite si le domaine forme un bourgeon: le bord du domaine forme le cou du bourgeon et ce cou se rétrécit progressivement pendant le processus du bourgeonnement (Figure I-25). Le bourgeonnement comporte une augmentation de la courbure, c'est-à-dire que l'énergie de courbure du domaine augmente. Par conséquent, le processus de bourgeonnement des membranes liquides est géré par la compétition entre la courbure de rigidité $\boldsymbol{k_c}$ du domaine et la tension de ligne $\boldsymbol{\sigma}$ du bord du domaine. Cette compétition mène à la longueur

caractéristique d'invagination, $\xi = k_c/\sigma$ (Lipowsky, 1992). En utilisant des valeurs caractéristiques pour $k_c \cong 10^{-19}$J et $\sigma \cong 10^{-11}$J/m, on obtient $\xi \cong 10$ nm pour des domaines enserrant les deux monocouches. Pour des mélanges phospholipide-cholestérol, cette échelle de longueur est beaucoup plus grande. D'une part, il a été expérimentalement estimé que la courbure de rigidité k_c pour ces mélanges est quatre fois plus grande, $k_c \cong 4.10^{-19}$J (Duwe, 1990). D'autre part la tension de ligne pour le mélange (DMPC/Chol) a une valeur relativement petite, 10^{-12}J/m (Benvegnu, 1992). La valeur de la longueur d'invagination est alors de l'ordre de 400nm.

I.7 Objectifs de la thèse

Ces dernières années l'intérêt des scientifiques pour les microdomaines membranaires de type « rafts » a augmenté énormément, surtout du fait de l'établissement de leur rôle dans la signalisation cellulaire. Des rafts sous forme de DRM ont été isolés à partir de types cellulaires différents à l'aide de méthodes utilisant ou non de détergents non-ioniques. Malgré les succès considérables dans ce domaine, il reste encore beaucoup d'inconnues concernant les mécanismes intimes impliqués dans la translocation des rafts entre les Golgi (lieu de leur synthèse) et les membranes plasmiques, ainsi que dans la manière exacte dont agissent les détergents.

En ce qui concerne leur translocation vers les membranes plasmiques, la participation de la phospholipase D et de la protéine kinase C a été présumée parmi d'autres facteurs. Dès le début de nos études, nous avons émis l'hypothèse que l'implication dans ce processus de la phospholipase A_2 n'est pas à exclure. Cette hypothèse a été émise sur la base du fait connu que cet enzyme agit préférentiellement dans les régions membranaires présentant des défauts de structure. Les abords des rafts (l'interphase L_o/L_d) présentent donc un intérêt spécial. Ceci nous a poussé à formuler notre **premier objectif**:

Etudier le mécanisme d'action de la phospholipase A_2 sur des vésicules géantes unilamellaires contenant des domaines en phase L_o et le comportement des domaines par rapport à l'action enzymatique.

Cet objectif imposait au préalable l'étude des conditions de formation des domaines L_o dans des VGU composées de mélanges lipidiques différents, de la stabilité des domaines à des températures variant de 4°C à 37°C, ainsi que l'étude de la morphologie de VGU et de domaines L_o après extraction partielle du cholestérol par méthyl-β-cyclodextrine ou après hydrolyse partielle de la sphingomyéline par sphingomyélinase bactérienne.

Après avoir atteint notre premier objectif, nous avons compris que la LysoPC, produit de l'action de la PLA_2 sur les VGU, joue un rôle important dans les processus de

bourgeonnement et de fission des domaines en phase L_o que nous avons observé. Ceci nous a imposé le **deuxième objectif**:

Etudier le comportement des VGU et des domaines L_o au cours d'injections externes de LysoPC et d'autres molécules actives au bord (edge-active molecules) telles que les détergents Triton X-100 et Brij 98.

Ces molécules actives présentent pour nous un double intérêt: i) vu leur forme conique, les comparer à LysoPC et ii) vu leur utilisation pour l'extraction des DRM des membranes cellulaires, comprendre le mécanisme de leur action.

II Matériels et méthodes

II.1 Matériels utilisés

Les études expérimentales ont été effectuées sur des membranes lipidiques modèles composées de différentes molécules. Selon les objectifs spécifiques, nous avons étudié des bicouches lipidiques composées des molécules lipidiques suivantes :

Lipides

1) Egg yolk phosphatidylcholine (phosphatidylcholine du jaune d'œuf) (**EYPC**), SIGMA; contenu en acides gras saturés (34% 16 :0, 11% 18 :0) liés en position 1 et insaturés ou polyinsaturés (2% 16 :1, 32% 18 :1, 18% 18 :2, 3% 20 :4) en position 2 du glycérol, S/I = 0.83; poids moléculaire 760.08 g/mol.
2) Egg yolk sphingomyelin (sphingomyéline du jaune d'œuf) (**EYSM**), SIGMA ; contenu en acides gras à chaîne saturée (84% C16 :0, 6% 18 :0, 2% 20 :3, 4% 22 :0 et 4% 24 :0) liés par une liaison amide à une base grasse en C18 - la sphingosine ; poids moléculaire 703.03 g/mol
3) Cholesterol (**Chol**), SIGMA; poids moléculaire 386.66 g/mol
4) Acyl 12:0 NBD PC (N-[12-[(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl) amino] dodecanoyl]-D-*erythro*Sphingosine) - marqueur lipidique (**PC***), Avanti Polar Lipids, le contenu en acides gras (62% C16 :0, 29% C18 :0, 5.5% C18 :1 et d'autres) ; poids moléculaire 856.05 g/mol ; excitation 460nm et émission 534nm ; (Figure II-1)
5) 1,2 – dipalmitoyl – *sn* - glycero – 3 phosphatidylcholine (C16 :0) (**DPPC**), SIGMA, poids moléculaire 734.05 g/mol
6) 2,3- dipalmitoyl - *sn* - glycero- 1 - phosphatidylcholine (**D – DPPC**), SIGMA, poids moléculaire 734 g/mol
7) Egg yolk céramide (céramide du jaune d'œuf) (**EYCER**), SIGMA; poids moléculaire 537.91 g/mol

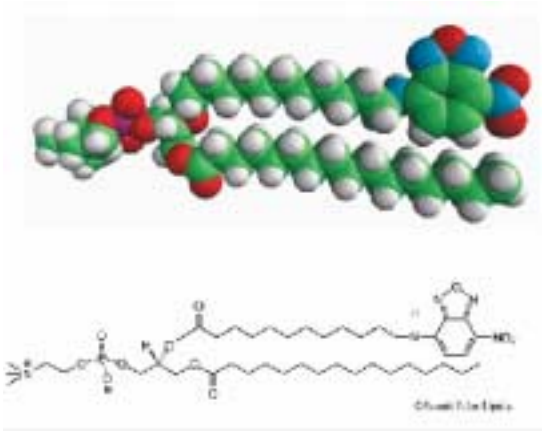


Figure II-1 Structure chimique de la C_{12} PC – NBD

Tampon

Les vésicules géantes sont formées dans un tampon **Hepes 0.5 mM**, pH 7.4 (ajusté à l'aide de *NaOH*, 0.1M), conductivité σ=59 µS/cm.

Hepes, SIGMA, poids moléculaire 238.3 g/mol

Macromolécules actives

Sous le nom de « Macromolécules actives » sont réunies ces macromolécules dont l'interaction avec les membranes des VGU est un des objectifs de cette étude. Ces molécules sont dissoutes dans le tampon Hepes 0.5mM et ensuite cette solution est injectée à proximité de la vésicule.

1) Egg yolk lysophosphatidylcholine (lysophosphatidylcholine de jaune d'œuf) (LysoPC), Avanti Polar Lipids, contenu en acides gras (67% 16:0, 23% 18:0, 2% 16:1, 6% 18:1, 1% 18:2, 1% d'autres, S/I = 10 ; poids moléculaire 495.64 g/mol ; *cmc≈7µM* (C16 :0)

2) Triton X-100, SIGMA; poids moléculaire 625 g/mol ; *cmc≈240 µM*,

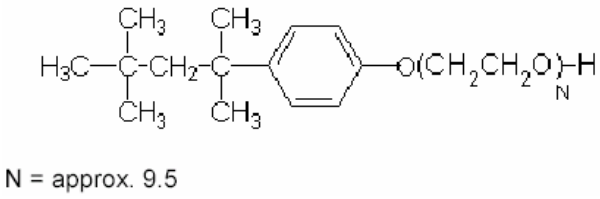


Figure II-2 Structure chimique de Triton X-100

3) Brij 98, SIGMA, poids moléculaire 1545.2 g/mol ; *cmc≈25μM*

$$CH_3(CH_2)_6CH_2CH{=}CHCH_2(CH_2)_6CH_2(OCH_2CH_2)_{20}OH$$

Figure II-3 Structure chimique de Brij 98

4) Méthyl-β-cyclodextrine, SIGMA, poids moléculaire 1331.39 g/mol

5) Phospholipase A_2 (PLA_2) sécrétée de venin d'abeille (*Apis mellifera*), SIGMA, poids moléculaire *14 kDa, 1360 Unites/mg protéine* (une unité catalyse l'hydrolyse de 1 μmole de la phosphatidylcholine en 1min, à pH 8.9, à 25°C).

6) Sphingomyélinase de *Staphylococcus aureus*, SIGMA, poids moléculaire *37 kDa,* 297 *Units/mg protéine* (où une unité catalyse l'hydrolyse de 1 μmole de la sphingomyéline en 1min, à pH 7.4, à 37°C).

II.2 Formation et visualisation des vésicules géantes unilamellaires (VGU)

II.2.1 Electroformation

Les VGUs ont été préparées selon la méthode d'électroformation (Angelova, 1986, 2000) (Figure II-4 A). En bref, le protocole spécifique d'électroformation est le suivant: on prépare des solutions diluées à 0.3 – 0.5 mg/ml (le rapport entre les solvants est éther éthylique/méthanol/chloroforme 72/10/18 v/v) à partir des solutions stocks de lipides EYPC 3 mg/ml, EYSM 2 mg/ml, EYCER 2 mg/ml, DPPC 3.2 mg/ml, D – DPPC 2mg/ml, PC* 1mg/ml diluées à méthanol/chloroforme (1/9) et Chol 4mg/ml (chloroforme). Une gouttelette de solution lipidique ≈1 μl est déposée directement sur chacune des deux électrodes (en évitant le glissement de l'aiguille de la microseringue *Hamilton* sur les électrodes). Les électrodes sont faites de deux fils de platine (diamètre 0,8 millimètres, parallèles l'un par rapport à l'autre (distance entre eux 3 millimètres) (Figure II-4 A). Avec ces solvants très volatils, la solution se rompt en gouttelettes. Les solvants s'évaporent très vite et laissent des auréoles grises sur les deux électrodes. La chambre de préparation des vésicules est ensuite mise sous vide partiel, à température

ambiante, environ 30-45 min, pour enlever toute trace de solvant, et surtout pour que le lipide s'assemble en une phase lamellaire, parfaitement déshydratée. Une tension alternative 100 mVpp (pic à pic), 10 Hz est appliquée aux électrodes à la température ambiante (≈21°C). Un thermocouple placé à une distance d'environ 0.3 – 0.5 mm à partir d'une des électrodes est utilisé pour mesurer la température. On remplit la chambre de préparation avec la solution de gonflement : 1.2 ml de tampon HEPES 0.5 mM. On ajoute le tampon suffisamment lentement (en évitant l'agitation) pour ne pas décoller le film lipidique des électrodes. On monte progressivement la température et la tension appliquée par pallier de 1°C et 20 mVpp toutes les 5 min, jusqu'à 30°C et 400 mVpp, puis on laisse les vésicules gonfler à 400 - 500 mVpp, 10 Hz, pendant 1h30. La durée nécessaire à l'électroformation est d'environ 2 – 3 h en solution peu visqueuse (proche de celle de l'eau) et environ 6 h dans une solution 30 fois plus visqueuse. Après la coupure du champ électrique à la fin de l'électroformation, on dispose au moins de 10 VGUs dont le diamètre est compris entre 60 et 90 μm.

Plusieurs méthodes de préparation des VGU à partir de phospholipides synthétiques (des phosphatidylcholines) ont été évaluées par Bagatolli(a) *et al.* (2000). Ces auteurs ont comparé à l'aide du microscope de fluorescence à deux photons les caractéristiques physiques en termes de lamellarité et morphologie de l'échantillon lipidique entier pour chaque préparation. L'évaluation de l'échantillon lipidique entier consiste à déterminer la taille moyenne des vésicules, la forme et l'épaisseur de l'enveloppe vésiculaire (lamellarité) dépendant de la méthode de préparation des vésicules. Ils mettent en évidence que la formation des vésicules géantes par la méthode d'électroformation offre plusieurs avantages par rapport aux autres méthodes examinées: le gonflement spontané « gentle hydration method » et l'évaporation du solvant « solvent evaporation method ». En utilisant la méthode d'électroformation, on dispose d'un rendement élevé de formation de vésicules **unilamellaires** (~95%) avec une distribution étroite en taille (diamètre moyen > 40 μm).

Les VGUs formées par la méthode d'électroformation sont toujours symétriques : d'une part les deux feuillets des bicouches ont *à priori* la même composition lipidique, d'autre part les deux compartiments aqueux interne et externe contiennent la même solution. Les membranes ont donc une courbure spontanée rigoureusement nulle. Une

façon de briser la symétrie des vésicules est de modifier le feuillet externe de la membrane. C'est par exemple la microinjection des macromolécules actives à proximité de la vésicule cible (Figure II-4 B).

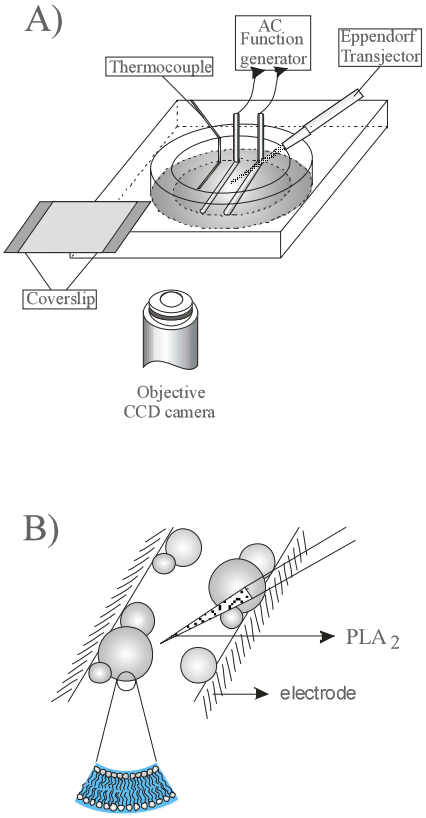


Figure II-4 La présentation schématique (A) de la chambre thermostatée pour l'électroformation et la micromanipulation des VGUs et (B) la microinjection des macromolécules actives à proximité d'une vésicule.

II.2.2 Visualisation des VGUs par la microscopie optique

Les vésicules géantes sont des objets ténus, à la fois macroscopiques par leur diamètre, quelques dizaines de micromètres et microscopiques du point de vue de l'épaisseur de la membrane (3 – 5 nm). Elles offrent l'avantage de pouvoir être étudiées sur un simple microscope optique, à condition d'utiliser des contrastes adaptés. Les vésicules devraient être complètement transparentes quand on les observe simplement au microscope

en transmission. En effet, les lipides absorbent très peu la lumière visible, et de toutes façons le trajet optique est beaucoup trop faible (épaisseur moléculaire). Pourtant, à l'aide d'un objectif d'ouverture numérique suffisante (NA au moins égale à 0.40), on peut quand même les deviner. Pour cette raison, seules les méthodes comme le contraste de phase, le contraste d'interférence ou la fluorescence sont applicables.

II.2.2.1 Contraste de phase

Les objets à examiner ne présentent entre eux ou avec leur environnement que de très petites différences d'indice de réfraction et seule une très petite différence de phase de la lumière qui les traverse permet de les différencier, ils sont appelés pour cela objets de phase. Leur principale caractéristique est qu'en éclairage sur fond clair, on ne peut pas ou difficilement les discerner à moins qu'ils ne présentent une épaisseur notable (objets d'amplitude). D'après la théorie d'Abbe, l'image issue d'un objet microscopique transparent est formée par la juxtaposition de deux images différentes. La première, directe, issue des parties uniformes de l'objet et la seconde, produite par la diffraction dûe aux irrégularités de l'objet. Fritz Zernike a donc eu l'idée de produire artificiellement un décalage de phase entre ces deux images en apportant grâce à une lame de phase, une avance (ou un retard: dans ce cas on a un contraste de phase négatif) de la phase de la première image qui se transforme en image d'amplitude. Pour arriver à un tel résultat, le microscope doit être équipé d'un diaphragme annulaire sous le condenseur dont l'image se superpose exactement à la lame de phase annulaire située dans la partie arrière de l'objectif. Il doit y avoir autant de diaphragmes que d'objectifs et ils sont contenus dans une tourelle en sous-platine permettant leur centrage rigoureux grâce à un petit microscope auxiliaire monté à la place de l'oculaire. Le dispositif d'Amici-Bertrand permet le même réglage si le microscope en est équipé (observation conoscopique). Grâce à cette méthode d'observation, et si on choisit un objectif dont la distance de travail est suffisamment grande pour traverser une lame de verre de l'ordre de 1.5 mm (objectif de Zeiss, LD ACHROPLAN 40x/0.60 Korr Ph2), nous pouvons observer le gonflement du film lipidique et suivre l'apparition des vésicules pendant l'électroformation.

II.2.2.2 Microscopie de fluorescence

La fluorescence est une méthode extrêmement sensible comme moyen de visualisation d'objets contenant même de très petites quantités de sondes fluorescentes. Pour imager des vésicules de phospholipides, Schneider *et al.* (1984; 1984a) ont appliqué pour la première fois la microscopie de fluorescence. L'inconvénient de cette technique est qu'une molécule additive, la sonde fluorescente, doit être incorporée dans la membrane afin de la visualiser. Cette méthode est sensible à la présence des autres objets fluorescents près du plan focal. Pour imager des membranes, naturelles ou artificielles, on utilisera des marqueurs lipophiles. Des expériences sont aussi possibles avec des molécules fluorescentes solubles dans l'eau, encapsulées dans la vésicule ou au contraire exclues.

Des phospholipides marqués sur l'une des chaînes grasses par un fluorophore se mélangent facilement avec un phospholipide diluant, classiquement une sorte de PC. Comme ces molécules sont de véritables phospholipides, elles peuvent être incorporées à une concentration comprise entre 1 et 10 mol% de la quantité totale de lipide, sans déstabilisation de la structure en bicouche.

Récemment, divers analogues lipidiques fluorescents ont été utilisés pour visualiser la coexistence des phases lipidiques (Kolrach, 1999; Dietrich, 2001; Veatch, 2003). Cette visualisation est dûe aux différents coefficients de partition des marqueurs lipidiques au niveau des phases ordonnées et désordonnées. En effet, le marqueur est sensible au degré d'empilement des chaînes d'acyle dans les bicouches. Notre marqueur lipidique se partitionne préférentiellement dans la phase liquide désordonnée (L_d), donc il s'exclut majoritairement des domaines en phase L_o. Grâce à cette propriété intrinsèque de ce marqueur, nous observons des domaines foncés (phase L_o) sur une vésicule brillante (phase L_d).

On détaille ici les éléments classiques d'un module de fluorescence (Figure II-5). Le trajet optique depuis la lampe HBO emprunte la voie d'illumination épiscopique. Le filtre d'excitation ne laisse passer vers l'échantillon qu'une onde sélectionnée. Le filtre de barrière absorbe les rayons d'excitation ce qui permet à une onde sélectionnée d'émission de passer vers le détecteur. Le miroir dichroïque réfléchit l'onde d'excitation et laisse passer uniquement l'onde d'émission.

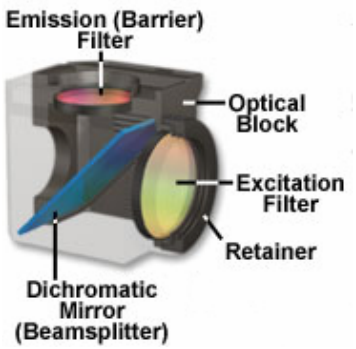


Figure II-5 Jeu de filtres de fluorescence

II.2.2.3 Vidéomicroscopie

Le microscope de Zeiss Axiovert 135, est équipé d'un micromanipulateur Narishige MMN-1 plus MMO-22. La détection des images de fluorescence nécessite parfois une camera très sensible, intensifiée ou refroidie. Dans les cellules vivantes, le flux lumineux doit être minimal pour ne pas initier de réactions photochimiques destructives. Par contre, avec les vésicules on peut se permettre un éclairage intense. Une caméra CCD Hamamatsu B/W (C5985-10) est reliée à un système d'enregistrement et de traitement d'image. Les transformations morphologiques des VGUs hétérogènes ont été observées en contraste de phase et en fluorescence (filtre Zeiss, numéro 16, Ex/Em = 485/>520 nm).

II.3 Microinjection des macromolécules actives

La microinjection a été effectuée avec un Eppendorf Transjector 5246. Les microcapillaires, pour l'accomplissement de la microinjection locale à proximité de VGU, ont un diamètre intérieur de 0.5 - 1 µm. Les volumes injectés ont été de l'ordre de plusieurs *pl* (1 *pl* = $1x10^{-12}$ *l*).

Les paramètres d'injections (pression (*p*), durée d'injection (Δt) et distance vésicule -pointe de la micropipette (*l*)) dépendent du diamètre intérieur de la micropipette et de la viscosité de la solution. Leurs valeurs sont choisies de telle manière que pendant l'injection le flux hydrodynamique ne déforme pas la vésicule, ce qui nous a permis d'éviter les artefacts pendant la collection de nos résultats expérimentaux. Nous avons fait le contrôle

suivant: on a injecté du tampon en faisant varier les paramètres d'injection (p, Δt, l). Aucun événement de bourgeonnement des domaines foncés (phase L_o) n'a été observé. Le seul artefact visible est l'apparition de domaines brillants dans les domaines foncés, c'est à dire que l'on observe un mélange des deux phases causé par le flux hydrodynamique de grande vitesse (aux conditions de fortes pressions $p \approx 800 - 1000$ *hpa* et de petites distances $l \approx 5–15$ μm), ce qui mène à une déformation vésiculaire significative.

On prépare une solution de macromolécules actives qui sont en principe solubles, dans l'eau, ou dans le tampon qui est utilisé pour la formation des vésicules.

Nous avons injecté les solutions suivantes de macromolécules actives, diluées toujours au tampon Hepes (0.5 mM):

- Solution de LysoPC 92 mM
- Solution de Brij 98 à 15% (97 mM)
- Solution de Triton X-100 à 15% (256 mM)
- Solution de Méthyl-β-cyclodextrine 0.75 M
- Solution de $sPLA_2$ 1U/µl, activité spécifique 1360 Unites/mg protéine, 10 mM $CaCl_2$
- Solution de SMase 100U/ml, activité spécifique 297 Unites/mg protéine, 10 mM $CaCl_2$, 1.8 mM $MgCl_2$

Une question importante dans ce type d'expérience est celle du choix de la concentration de la substance active dans la micropipette. Pour les détergents, par exemple, nous avons déterminé une concentration de la solution à 15%. Ce sont des valeurs bien élevées par rapport aux concentrations utilisées pour l'extraction des rafts au niveau cellulaire, de l'ordre de 1 – 2%.

Des solutions de détergent à 2, 5 et 10% ont ete injectées sur un grand nombre de vésicules à une distance l d'environ 15 - 20 µm de la vésicule. Le diamètre de la micropipette est de 1 µm et p=200 hpa, Δt=2 s.

Nous avons observé une résistance membranaire (des deux phases, L_d et L_o) à la solubilisation par des détergents. Cependant nous avons remarqué que les domaines foncés montrent une tendance de plus en plus marquée à bourgeonner. Après l'arrêt de l'injection les domaines reviennent à leur place, mais pas toujours complètement. Evidemment, le

milieu autour de la vésicule n'est pas assez saturé en molécules de détergent à cause de leur diffusion rapide. Elles se diluent dans le volume entier (2 ml).

Pour saturer le milieu, nous disposons de deux approches: 1) on garde la même concentration de détergent, mais en revanche, il faut changer les paramètres d'injection, donc il faut augmenter p et Δt pour qu'on puisse fournir assez de détergent. Cependant dans ce cas, les pressions élevées mènent à un flux de grande vitesse qui déforme la vésicule et peut induire les artefacts décrits précédemment; 2) on augmente la concentration de détergent et ensuite on choisit des paramètres d'injection (p, Δt, l) qui ne provoquent pas des déformations vésiculaires. En suivant cette approche systématique, nous avons abouti à une concentration de la solution de détergent à 15% et aux paramètres d'injection $p \approx 200$ hpa, $\Delta t \approx 2$ s, $l \approx 50$ μm, qui fournissent assez de quantité de détergent sans causer de déformations vésiculaires.

Dans ce type d'expérience nous ne pouvons pas déterminer la quantité absolue des macromolécules actives atteignant la surface membranaire de la vésicule cible aussi bien que le *ratio* macromolécule active/lipide, à cause de la diffusion libre de la substance active. Une estimation approximative montre que si on admet que 1 *pl* de la solution injectée se dilue à 15 – 125 *pl* (le volume est défini comme un cube de côtés de 25 à 50 μm), la concentration réévaluée pour les détergents par exemple est de l'ordre de 0.1–1% autour de la vésicule pendant le temps de l'expérience. Ces valeurs correspondent à celles utilisées pour l'extraction des rafts au niveau cellulaire. Les observations présentées dans la sections «Résultats» sont basées sur au moins cinq expériences du même type. La variation de la quantité (portion) des macromolécules actives (par exemple l'enzyme-la $sPLA_2$) est une question compliquée. En augmentant la durée d'injection, mais en gardant la pression, nous pouvons effectuer une microinjection sans déformation vésiculaire mais en même temps, le *ratio* macromolécule active/lipide est augmenté. Un critère de choix d'une portion pourrait être au moins 60% de reproductibilité des transformations morphologiques.

L'avantage essentiel de cette étude est de donner des réponses au niveau qualitatif par une visualisation directe des changements morphologiques d'une seule vésicule, la vésicule cible, en laissant les vésicules voisines intactes. Les réponses attendues sont de type: Y a-t-il ou n'y a-t-il pas une interaction spécifique entre une macromolécule active et

une membrane composée des lipides impliqués directement dans les phénomènes biologiques? La réponse au niveau moléculaire se traduirait-elle par une réorganisation superficielle à longue portée (comme par exemple un changement de la morphologie des phases) et/ou par une transformation morphologique de la vésicule?

III Résultats et discussions

III.1 Formation et stabilité des domaines en phase L_o

III.1.1 La morphologie de phase, dynamique des domaines

Les VGUs ont été formées à partir du mélange lipidique EYPC/PC*/SM/Chol (55/5/20/20) à 34°C (Figure III-1).

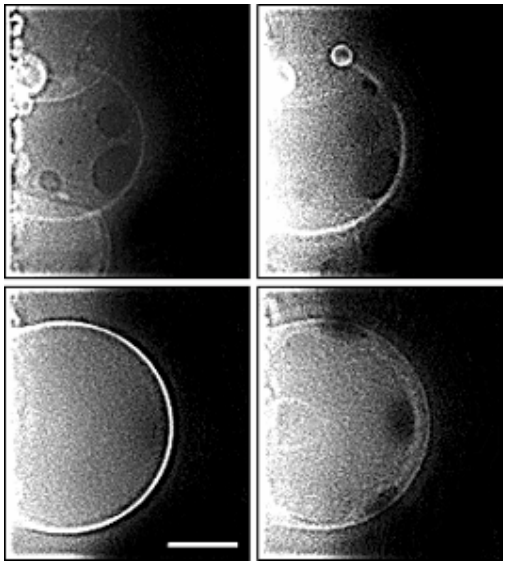


Figure III-1 Visualisation des domaines en phase L_o en fluorescence (série d'images en z). VGUs composées de EYPC/PC*/SM/Chol (55/5/20/20) à 34°C (barre 20 µm)

Cette composition lipidique et cette température correspondent à des conditions de formation de domaines en phase L_o. La coexistence des deux phases est visualisée par microscopie de fluorescence. En effet, le lipide marqué en chaîne C_{12}-NBD-PC (PC*) est exclu de la phase L_o et il se partitionne principalement dans la phase L_d (Mesquita, 2000). L'apparition d'un domaine circulaire foncé dans la membrane brillante suggère donc la présence d'une phase liquide ordonnée L_o, coexistant latéralement avec la phase liquide désordonnée L_d. Ces données expérimentales auraient fourni une information plus

pertinente biologiquement sur les propriétés des rafts dans les membranes cellulaires si les vésicules avaient été formées et injectées à 37°C. Dans les limites de la résolution de la microscopie optique, des domaines identiques ont été vus à 37°C au niveau des régions polaires des VGUs par fluorescence en z-scan (Figure III-2). Le fait que les petits domaines soient peu visibles à l'équateur s'explique par le fort signal de fluorescence dans cette zone. Les pôles et l'équateur sont définis par rapport à l'axe optique.

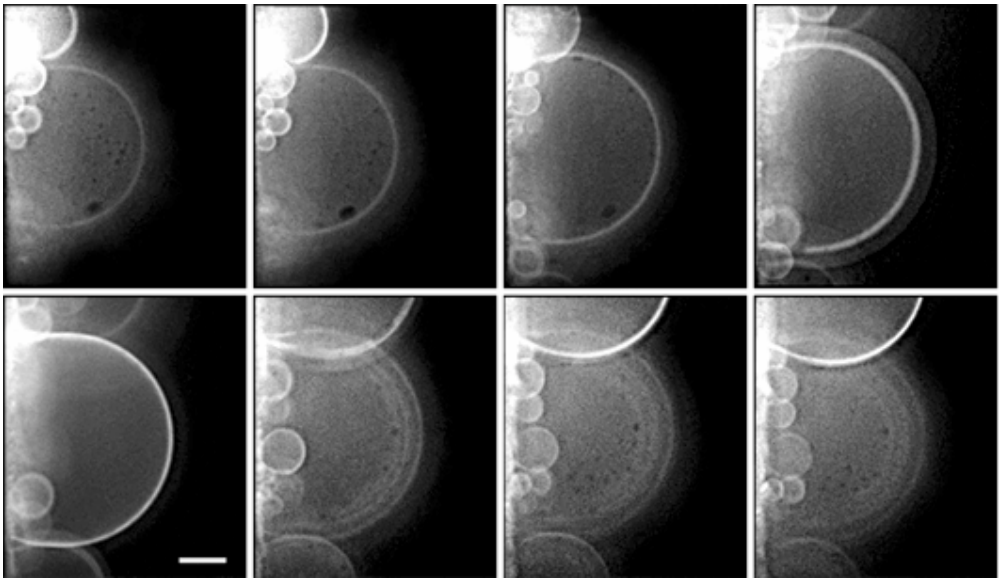


Figure III-2 Visualisation des domaines en phase L_o en fluorescence (z-scan), VGUs composées de EYPC/PC*/SM/Chol (55/5/20/20) à 37°C (barre 20 µm)

La taille de ces domaines à 37°C, de l'ordre de quelques micromètres de diamètre ne fait pas de ceux-ci les meilleurs objets pour l'étude des transformations morphologiques de vésicules hétérogènes par microscopie optique. Les objets ≤ 1µm ne peuvent pas être détectés par microscopie optique donc nous ne serons pas capables de décrire précisément les transformations concernant des vésicules (ou objets) à cette échelle de dimensions. Afin d'améliorer la visualisation des phénomènes, nous avons effectué nos études à des températures plus basses, 30 – 34°C en fonction du mélange lipidique. Dans cette gamme de température, la taille des domaines est plusieurs fois supérieure à la résolution optique, ce qui nous permet de suivre systématiquement les transformations morphologiques des VGUs. Les vésicules se forment dans une chambre de préparation fermée, recouverte par une plaque de verre afin d'éviter l'évaporation du tampon. Après la formation des

vésicules, la coupure du champ électrique et l'ouverture de la chambre de préparation, nous avons observé, par microscopie de fluorescence, un certain nombre de domaines (Figure III-3 a) à 34°C. L'ouverture de la chambre de préparation provoque un changement de température de [1±0.1]^{o}C. Si les vésicules sont laissées suffisamment longtemps à cette température, les domaines vont fusionner et former un ou deux grands domaines dans la vésicule (Figure III-3 b) qui atteint un équilibre.

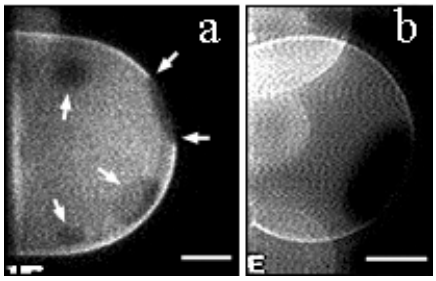


Figure III-3 Visualisation des domaines en phase L_o, VGUs composées de EYPC/PC*/SM/Chol (55/5/20/20) à 34°C. a) immédiatement après la coupure du champ électrique et l'ouverture de la chambre de préparation ; b) au bout de 15 min (les barres mesurent 20 µm)

Le nombre, les dimensions et la dynamique des domaines foncés (représentant la phase L_o) dépendent rigoureusement **de la température, des composants lipidiques et de leur rapport molaire.**

Dietrich *et al.* (2001) ont présenté plusieurs résultats significatifs montrant la coexistence de deux phases liquides. Ils ont souligné que la forme parfaitement circulaire des domaines indique qu'ils se trouvent dans un état de phase liquide. Lorsque des domaines liquides sont inclus dans un environnement liquide, ces derniers prennent une forme circulaire parce que les deux phases sont isotropes et parce que l'énergie de ligne (tension), qui est associée au bord des deux phases non mélangées, est minimisée en optimisant le rapport de surface au périmètre. Ces auteurs ont utilisé le marqueur Laurdan différent du notre (C_{12}-NBD-PC) mais nos résultats sont en accord avec les leurs (Dietrich *et al.*, 2001) (Figure III-1, Figure III-2). De plus, en comparant les deux images prises à 2 s d'intervalle (c'est le temps moyens d'exposition en fluorescence), on observe qu'un domaine foncé (en phase L_o) diffuse dans le milieu brillant (en phase L_d) au cours du

temps. Quand il y a plus d'un domaine ils se déplacent relativement l'un par rapport à l'autre.

En variant la composition des VGUs nous avons observé deux morphologies distinctes au niveau des phases : 1) la coexistence de deux phases liquides et 2) une phase liquide uniforme. Les mélanges ternaires que nous avons choisis sont EYPC/SM/Chol 60/20/20, 45/45/10, 40/40/20, 1/1/1. Ce choix sera argumenté dans les chapitres suivants. Quand la concentration en cholestérol était en dessous de 10 mol%, les VGUs composées de EYPC/PC*/SM/Chol (45/5/45/5) étaient toujours homogènes à 31°C au moins à l'échelle micrométrique (Figure III-4 a). Nous avons observé la coexistence des phases liquides approximativement entre 10 mol% et 33 mol% de cholestérol. A basses concentrations de cholestérol (45/45/10), la surface de la fraction des domaines foncés est petite, ceux-ci apparaissent ainsi sur un fond brillant (Figure III-4 b). En augmentant la concentration de cholestérol, nous avons observé en fluorescence : 1) pour les mélanges 60/20/20 (Figure III-4 c) et 40/40/20 (Figure III-4 d), une croissance de la fraction superficielle des domaines foncés et 2) pour le mélange 1/1/1, de faibles traces de vésicules qui étaient en phase liquide uniforme, la phase L_o (Figure III-4 e). Les vésicules étaient presque entièrement noires lorsque les temps d'exposition étaient comparables avec ceux des résultats précédents. Les images de la Figure III-4 (e, f) ont été capturées avec un temps d'exposition deux fois plus grand. En diminuant la température jusqu'à 25°C, on observe un phénomène connu dans la littérature sous le nom de percolation de la phase, le contraste s'inverse et on observe des domaines brillants sur un fond noir (Figure III-4 f). Cette inversion se produit à 33 mol % de cholestérol à 25°C. Les domaines brillants sur un fond noir diffusent moins vite que les domaines foncés sur un fond brillant car la phase dominante L_o est plus visqueuse.

Pour l'un des mélanges EYPC/SM/Chol (45/45/10), nous avons observé la coexistence de deux phases liquides dans un intervalle plus large de température compris entre 10°C et 39°C. Suite à un abaissement de la température restant néanmoins encore dans l'intervalle de coexistence des deux phases liquides, nous observons un grand nombre de petits domaines. Si nous laissons s'équilibrer assez longtemps (après la coupure du champ électrique ou après le changement de la température), les phases se séparent complètement en une région foncée et une région brillante.

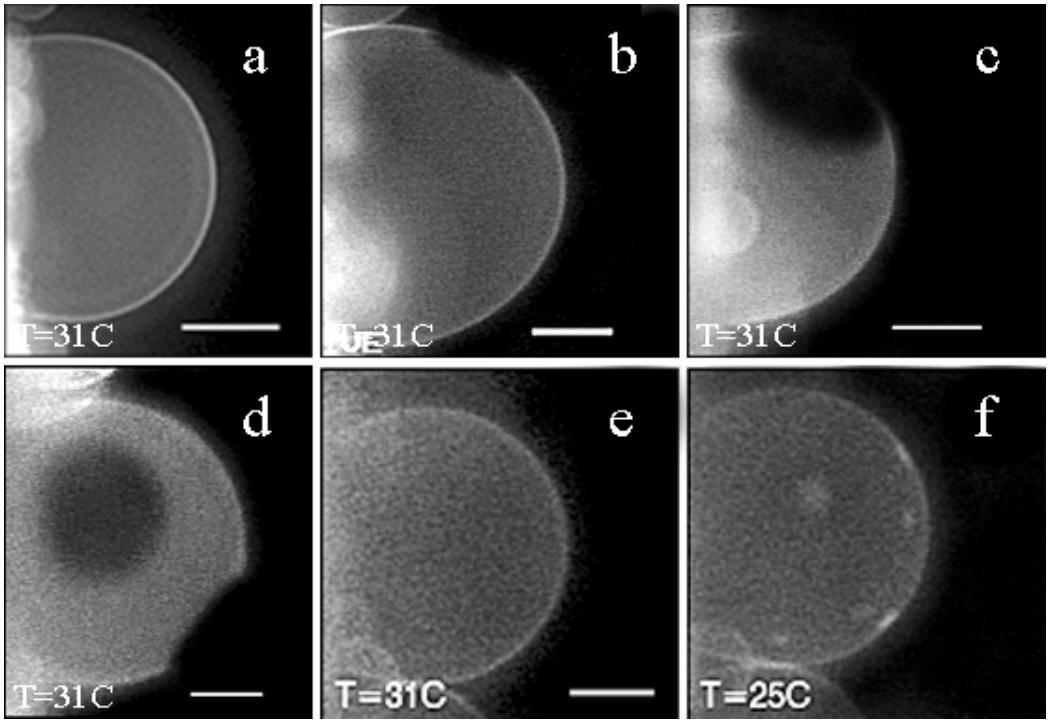


Figure III-4 Visualisation des domaines en phase L_o. a) EYPC/PC*/SM/Chol (45/5/45/5) à 31°C ; b) EYPC/PC*/SM/Chol (40/5/45/10) à 31°C ; c) EYPC/PC*/SM/Chol (55/5/20/20) à 31°C ; d) EYPC/PC*/SM/Chol (35/5/40/20) à 31°C ; e) EYPC/SM/Chol (1/1/1) à 31°C ; f) EYPC/SM/Chol (1/1/1) à 25°C (les barres mesurent 20 µm)

Les domaines grandissent par collision et fusion avec d'autres domaines. Les domaines fusionnés reviennent rapidement à une forme circulaire. Régulièrement, on observe à basses températures (10°C) un petit nombre de grands domaines (Figure III-5 a) et à des températures plus élevées, un plus grand nombre de domaines plus petits par exemple à 20°C (Figure III-5 b) et à 31°C un ou deux domaines de l'ordre de 10-15 µm (Figure III-4 b).

Jusqu'à 39°C, il est encore possible de détecter en fluorescence de domaines foncés discrets (données non montrées).

Certaines vésicules dans nos échantillons étaient flasques (non tendues). Des ondulations thermiques étaient alors visibles en contraste de phase. En observant les ondulations thermiques de la membrane hétérogène, on peut en déduire que la membrane au niveau des domaines est plus rigide car les ondulations sont plus faibles. La vésicule flasque, maintenue en dessous de la température de miscibilité complète, est légèrement

déformée par les domaines (ce que nous appelons le bourgeonnement des domaines) (Figure III-6).

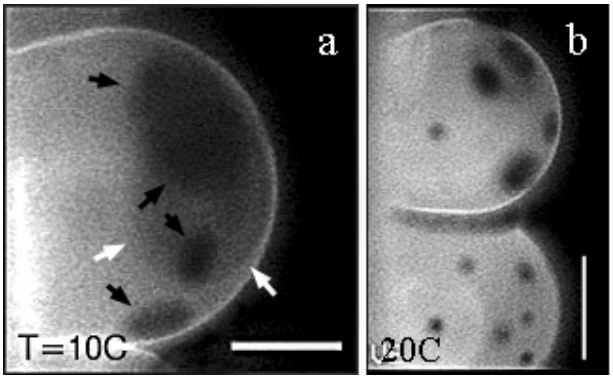


Figure III-5 Visualisation des domaines en phase l_o. a) EYPC/PC*/SM/Chol (40/5/45/10) à 10°C ; b) EYPC/PC*/SM/Chol (40/5/45/10) à 20°C (les barres mesurent 20 µm)

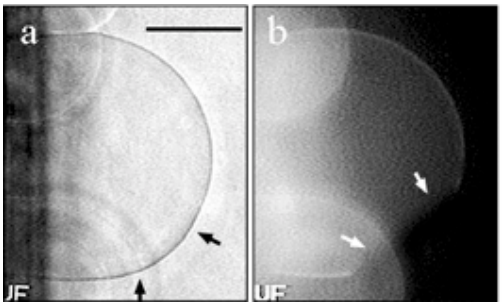


Figure III-6 Vésicule non tendue, le bourgeonnement du domaine (indiqué avec des flèches), EYPC/PC*/SM/Chol (40/5/45/10) à 31°C ; a) en contraste de phase ; b) en fluorescence (barre 20 µm)

Veatch *et al.* (2003) ont observé le bourgeonnement des domaines brillants et foncés. Pour certains domaines, la frontière linéaire entre les phases diminue avec le temps jusqu'à ce que chaque domaine soit une sphère. Ceci est conforme à la théorie selon laquelle la frontière des phases doit diminuer pour minimiser la contribution de la tension de ligne et donc l'énergie libre (Lipowsky, 2003). Ce phénomène montre encore une fois que la valeur de la tension de ligne dans ce système n'est pas négligeable.

III.1.2 La stabilité des domaines en phase L_o

III.1.2.1 Motivation de l'étude

Une approche utile dans l'étude des fonctions des rafts est la manipulation de ces composants au moyen de la séquestration de cholestérol (antibiotiques : filipine, nystatine, amphotéricine, agents formant des pores : saponine, digitonine, streptolysine), l'extraction de cholestérol (méthyl-β-cyclodextrine), l'inhibition de la biosynthèse de cholestérol (lovastatin), la perturbation de la stabilité des rafts par des agents exogènes tels que la sphingomyélinase, la cholestérol oxydase, gangliosides exogènes et autres. Ce traitement mène à la dissociation des protéines des rafts qui peut être détectée par des méthodes conventionnelles employées pour l'analyse de l'association aux rafts. Ce type de méthodologie a considérablement contribué à notre compréhension de fonction de raft *in vivo*.

Pour la formation des domaines en phase L_o, le maintien de clusters incluant des protéines ancrées GPI et des cavéoles, la formation de fractions résistantes aux détergents dans les cellules, la présence de cholestérol est exigée. Cependant les besoins cellulaires en cholestérol dépassent de loin le cholestérol requis pour la formation de ces domaines. Le cholestérol, comme d'autres lipides, joue un rôle important dans la régulation de l'activité fonctionnelle des protéines membranaires, intervient dans le turnover des autres lipides ; y compris la SM (Lange, 1996; Fielding, 2000; Ohvo-Rekila, 2002).

III.1.2.1.1 La déplétion de cholestérol au niveau cellulaire

Une des voies d'investigation du rôle du cholestérol dans la fonction des rafts passe par sa déplétion par la méthyl-β-cyclodextrine ou la cholestérol oxydase. Des études ont montré, par exemple, que la déplétion intense de cholestérol perturbe les clusters des SNAREs (les SNAREs sont des protéines membranaires qui sont impliquées dans le rapprochement et la fusion de deux membranes de cellules d'origine neuronale qui secrètent des neurotransmetteurs) impliqués aussi dans l'exocytose (Lang, 2001), bloque la formation des vésicules d'endocytose à partir des puits à clathrine (Rodal, 1999; Subtil, 1999), et peut-être le plus important, conduit à la délocalisation du phosphatidylinositol (4,5) - bisphosphate (PIP(4,5)P2) de la membrane plasmique (un phospholipide très

important, impliqué dans la signalisation et la transduction des messages cellulaires) (Pike, 1998). PIP(4,5)P2 est un régulateur important du cytosquelette d'actine (Raucher, 2000) et il est intimement impliqué dans les mécanismes d'endocytose (Botelho, 2000). Par conséquent, la déplétion de cholestérol mène à la dispersion du PIP(4,5)P2 des sites d'interaction fonctionnelle avec des protéines cellulaires et ainsi peut énormément perturber les fonctions cellulaires. Il a récemment été montré que la déplétion de cholestérol ainsi que la séquestration de PIP(4,5)P2 change l'organisation d'actine et inhibe la diffusion latérale des protéines membranaires (Kwik, 2002). Il semble que la corrélation entre la réduction du cholestérol cellulaire, la perte des fractions membranaires résistantes aux détergents (DRM) et la perte de fonctions cellulaires particulières, par exemple le bourgeonnement des virus ou la signalisation médiée par des récepteurs, ne peut pas être rigoureusement attribuée aux rafts lipidiques impliqués directement dans la fonction cellulaire ciblée.

L'organisation du cholestérol dans la membrane plasmique a des effets directs sur l'efflux de cholestérol à partir de la cellule. Quand des cellules sont exposées à un accepteur de cholestérol tel que la cyclodextrine, deux pools cinétiques distincts de cholestérol peuvent être trouvés (Yancey, 1996). Récemment, Haynes *et al.* (2000) ont posé la base de la discussion sur la localisation cellulaire de ces deux pools de cholestérol. Dans cette étude, il a été montré que le pool rapide et la majorité du pool lent du cholestérol sont localisés dans la membrane plasmique. Cependant aucune réponse n'a encore été apportée à la question : pourquoi existe t-il un pool lent ? La cyclodextrine extrait le cholestérol des zones fluides du feuillet externe de la membrane plasmique (pool rapide). Le pool lent serait attribue à la vitesse limite du mouvement du cholestérol à partir des zones caractérisées par une plus grande cohésion comme les rafts, ou à partir du feuillet interne de la membrane plasmique. Une partie du pool lent peut également provenir d'autres compartiments cellulaires.

Ces différents faits montrent que le mécanisme exact de l'extraction du cholestérol n'est pas encore élucidé. Voilà pourquoi nous avons eu pour objectif de réaliser l'extraction du cholestérol à partir des membranes présentant la coexistence des deux phases liquides: L_d, phase dominante dans laquelle la phase L_o est visualisée par des domaines foncés. Dans cette étude, en utilisant un système simple, nous avons cherché des réponses aux questions suivantes: Quel est le mécanisme de destruction des domaines en

phase L_o suite à l'extraction du cholestérol par la méthyl-β-cyclodextrine ? Peut-on faire une corrélation entre le mode de destruction des domaines et le mécanisme par lequel est extrait le cholestérol ?

III.1.2.1.2 Sphingomyélinases et rafts au niveau cellulaire

Plusieurs résultats significatifs suggèrent que les rafts seraient des sites spécifiques pour la formation de céramides en réponse à divers agonistes et aux signaux du stress (Zundel, 2000; Cremesti, 2001). Le rôle des différentes sphingomyélinases dans la formation de céramides dans les rafts est un sujet de recherche en cours. L'activation de la ASMase (sphingomyélinase acide) par la NSMase (sphingomyélinase neutre) se produit différemment en réponse à des stimuli différents (Kolesnick, 1999). ASMase et NSMase ont toutes les deux été détectées dans les rafts (Zundel, 2000; Veldman, 2001). Cremesti *et al.* (2001) ont prouvé que la ASMase a la capacité de se déplacer rapidement d'un compartiment intracellulaire vers la membrane plasmique sous la stimulation de Fas. Levade et son groupe ont prouvé qu'un pool substantiel de la NSMase, environ 22% du total, réside dans les cavéoles des fibroblastes de la peau humaine. La NSMase a été également détectée dans les rafts des fibroblastes des patients atteints de la maladie de Niemann-Pick dans lesquels manque la ASMase (Veldman, 2001). La formation du céramide dans les rafts en réponse aux agonistes choisis renforce l'idée que ces microdomaines peuvent jouer un rôle crucial dans la signalisation transmembranaire. Le scénario suivant a été proposé (Cremesti, 2002): la ASMase se déplace du pool intracellulaire au feuillet externe de la membrane plasmique et hydrolyse la SM en Cer dans les rafts. Le céramide représente la force motrice pour la coalescence des rafts sous-microscopiques dans des « *patches* », et puis dans de plus grandes plateformes (macrodomaines). Ces changements locaux dans les microdomaines membranaires gèrent alors les processus de la transduction du signal en permettant l'oligomérisation des protéines spécifiques cellulaires, telles que les ligands liés aux récepteurs. Comme l'oligomérisation des protéines est une condition presque universelle pour la transmission du signal, il a été proposé que la réorganisation des microdomaines dans des macrodomaines constitue un nouveau paradigme pour la transmission des signaux à travers la membrane plasmique.

III.1.2.2 La déplétion de cholestérol par la méthyl β-cyclodextrine

III.1.2.2.1Résultats

On a montré précédemment que le changement de la température et de la composition lipidique mène à un changement de la morphologie de phase : soit à l'immiscibilité des phases liquide, soit à la miscibilité de deux liquides. Le même résultat peut être réalisé en changeant la composition lipidique des vésicules à température constante.

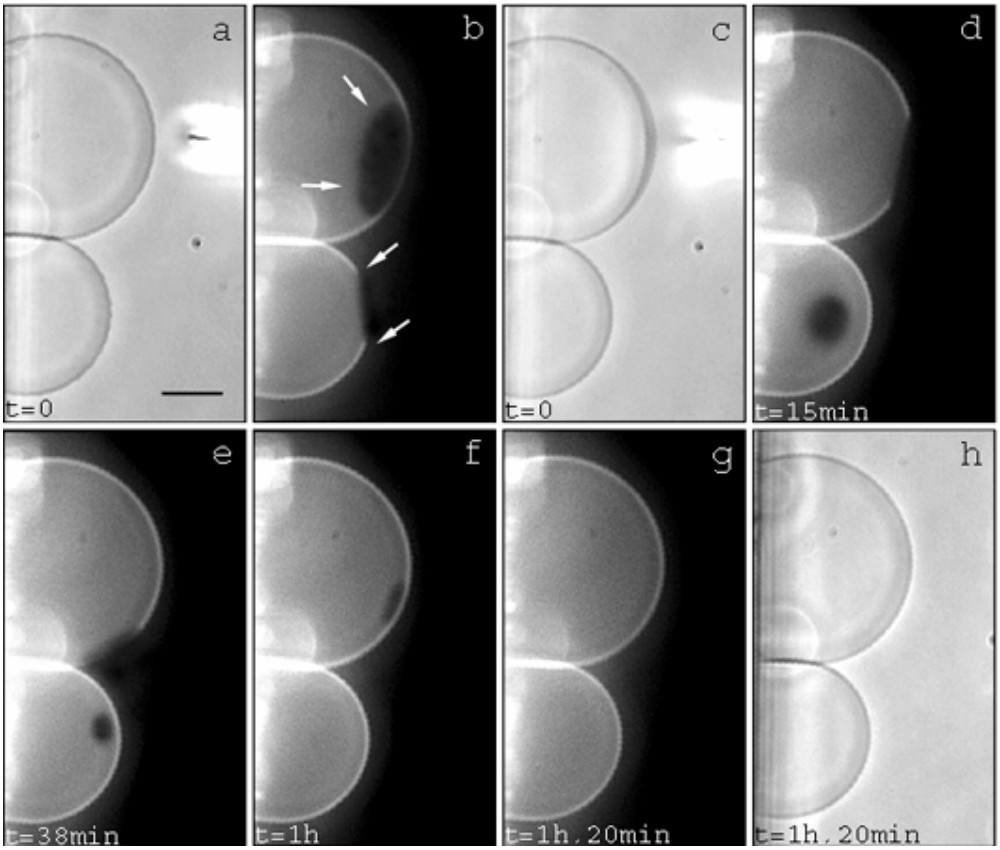


Figure III-7 Déplétion du cholestérol par la méthyl-β-cyclodextrine à partir des vésicules composées de EYPC/PC*/SM/Chol (55/5/20/20) à 34°C (barre 20 μm)

La Figure III-7 (a et b) montre deux vésicules, composées de EYPC/PC*/SM/Chol (55/5/20/20) à 34°C qui se trouvent dans un état où les deux phases liquides ne sont pas miscibles. Quand la méthyl-β-cyclodextrine (0.75 M) est injectée périodiquement (Figure III-7, c et d), la quantité de cholestérol dans la membrane diminue au fur et à

mesure. Toute en conservant leur forme circulaire, les domaines diminuent de taille (Figure III-7, e et f) et finissent par disparaître complètement au bout de 1h 20 min à 2h (Figure III-7, f plus petite vésicule, g et h). La déplétion du cholestérol de la membrane mène à l'apparition d'une phase liquide uniforme. Dans ce cas, on peut supposer que le pourcentage du cholestérol dans la membrane est en dessous de 10 % dans l'intervalle des valeurs où on n'observe pas de domaines. Veatch *et al.* (2003) ont réalisé exactement le contraire : la transition d'une phase uniforme L_o jusqu'à l'apparition de domaines a la suite de la déplétion du cholestérol par la β-cyclodextrine.

III.1.2.2.2Discussion

La vitesse de désorption du cholestérol est grandement affectée par les interactions attractives de van der Waals entre le cholestérol et les chaînes acyles des phospholipides. La désorption spontanée du cholestérol des membranes modèles est un processus assez lent avec des temps de demi-vie mesurés de l'ordre de l'heure (Phillips, 1987), (Bittman, 1992). La vitesse de désorption relativement lente est liée à l'énergie d'activation assez élevée requise pour la désorption du cholestérol vers les membranes d'accepteurs (20 kcal/mol). Le cholestérol doit en effet passer par la phase aqueuse d'une membrane de donneur à un accepteur (Phillips, 1987). La vitesse de désorption du cholestérol peut être sensiblement augmentée en employant comme accepteurs les β-cyclodextrines qui peuvent extraire le cholestérol à partir des membranes. En effet, elles diminuent l'énergie d'activation nécessaire pour la désorption jusqu'à 7-9 kcal/mol (Yancey, 1996). Ohvo et Slotte (1996), Slotte et Illman (1996) ont utilisé la β-cyclodextrine pour effectuer la désorption du cholestérol et d'acides gras des monocouches. Ils trouvent une corrélation entre la vitesse de désorption et les interactions intermoléculaires dans la monocouche. La vitesse de désorption du cholestérol mesurée à partir des monocouches contenant différents phospholipides prouve clairement que le cholestérol interagit d'une manière différente avec les SMs et les PCs contenant des chaînes mixtes. La désorption du cholestérol des monocouches de SM est toujours plus lente que celle des monocouches de PC (Ramstedt, 1999). La vitesse de désorption du cholestérol (pmol/cm^2.min) croît lorsque la longueur des chaînes de PC croît (elle croît environ sept fois entre 1(16:0)-2(14:0)-PC et 1(16:0)-2(24:0)-PC), tandis que la vitesse est constamment basse pour toutes les longueurs des chaînes acyles N-liées aux SM. Les résultats de désorption à partir des monocouches de PC

peuvent être interprétés en suggérant que la phase de cholestérol a été ségrégée à un certain degré dans l'environnement par les chaînes plus longues de PC (attribué au mésappariement hydrophobe). Ce mésappariement entre les surfaces hydrophobes d'interaction des lipides favorise la séparation de phase dans des membranes modèles (Silvius, 1996). Grâce à ces résultats, on peut supposer que la méthyl-β-cyclodextrine extrait préférentiellement le cholestérol à partir de la phase liquide désordonnée plutôt que de domaines enrichis en sphingolipides-cholestérol.

D'autres idées renforcent cette hypothèse. Nous allons en effet décrire un modèle développé par Martine Ben Amar en collaboration avec notre laboratoire élaboré à partir de la théorie d'instabilité de Saffman-Taylor. Les rafts dans les membranes biologiques ainsi que les domaines en phase L_o dans les membranes modèles peuvent être modélisés en tant que gouttes visqueuses qui bougent librement le long de la membrane, présentée comme le fluide moins visqueux. À l'équilibre, il existe une frontière circulaire bien définie caractérisée par une tension de ligne entre les deux phases. Le fait que la vésicule entière reste plutôt sphérique indique que cette tension de ligne est petite par rapport à la tension membranaire, associée à la différence de pression p_{in}, p_{ext} de la vésicule. Ce modèle prédit que si l'extraction de cholestérol se produit à partir des domaines, la perte de masse et le déplacement de l'équilibre chimique induisent un flux tangentiel dirigé de la phase moins visqueuse (L_d) vers la phase plus visqueuse (L_o). Ce flux provoque une déstabilisation du contour du domaine et l'apparition d'ondulations connues dans la littérature sous le terme de « instabilité de digitation visqueuse » («viscous fingering instability »). Une autre possibilité dans ce modèle est l'extraction de masse à partir de la phase L_d. L'équilibre chimique dans le système est perturbé et dans ce cas, le flux est dirigé en sens contraire, c'est-à-dire du fluide le plus visqueux vers le moins visqueux. La modélisation montre un rétrécissement du contour du domaine lequel garde sa forme parfaitement circulaire. Les données expérimentales sur la déplétion de cholestérol par la méthyl-β-cyclodextrine, au moins à l'échelle micrométrique et à l'échelle temporelle des secondes (les temps d'exposition en fluorescence durent environ 2 - 4 s), sont en accord avec la modélisation d'extraction de masse à partir du fluide le moins visqueux. En rendant compte de la désorption faible de cholestérol à partir des monocouches de SMs (Ramstedt, 1999), le rétrécissement progressif des domaines en phase L_o en gardant leur contour toujours

circulaire et la modélisation dans le cas d'extraction de masse du fluide le moins visqueux (Ben Amar) confortent l'hypothèse d'une extraction de cholestérol préférentielle à partir de la phase liquide désordonnée. Cependant, ce type de modélisation « Instabilité de Saffman-Taylor » sera parfaitement validé si on met en évidence que l'extraction de masse à partir des domaines en phase L_o engendre l'apparition de « viscous fingering instability » (les études sont en cours).

III.1.2.3 L'hydrolyse de la sphingomyéline par la sphingomyélinase

III.1.2.3.1Résultats

Pour étudier les conséquences de la conversion enzymatique de la sphingomyéline en céramide dans une membrane hétérogène qui présente l'immiscibilité liquide des phases L_o/L_d à l'échelle micrométrique, nous avons traité par la sphingomyélinase des vésicules de EYPC/PC*/SM/Chol (55/5/20/20) à 34°C (Figure III-8). L'injection de cette enzyme à proximité de la surface externe des membranes (Figure III-8 c) dure environ 5 s et nous permet de saturer l'espace autour de la vésicule avec la sphingomyélinase. 3 à 8 min après l'application de l'enzyme, les domaines en phase L_o perdent leur forme circulaire originale et se transforment en tâches foncées de forme irrégulière (Figure III-8, e - g). Au bout de 12-20 min, on ne peut plus par fluorescence différencier de domaines avec notre résolution.

La formation de céramide à partir de la SM par la SMase provoque une déstabilisation et une destruction des domaines en phase L_o. Le mélange lipidique EYPC/PC*/EYCER/Chol (75/5/10/10) à 34°C indique que le céramide et le cholestérol n'interagissent pas de même manière que la sphingomyéline et le cholestérol et que le céramide inhibe la formation de domaines en phase L_o. Les lipides sont complètement miscibles à l'échelle micrométrique et la membrane est en phase uniforme (Figure III-9, a et b).

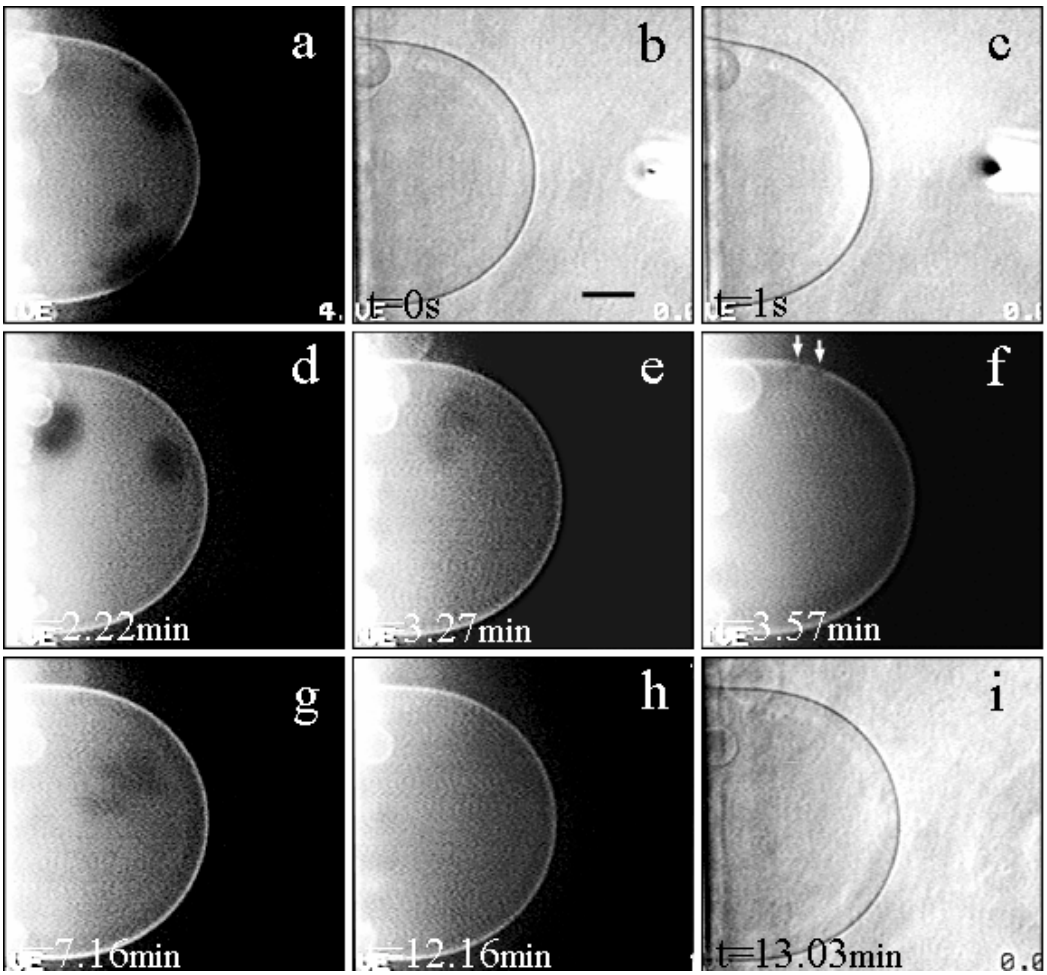


Figure III-8 Hydrolyse de la sphingomyéline par la sphingomyélinase à partir des vésicules composées de EYPC/PC*/SM/Chol (55/5/20/20) à 34°C (barre 20 µm)

Le contenu en céramides dans les membranes des cellules lorsqu'elles se trouvent en état d'apoptose représente environ 10% des lipides, ce qui justifie le pourcentage du Cer dans le mélange ci-dessus. L'abaissement de la température mène à l'apparition de domaines linéaires en forme de « bâtons » (Figure III-9, c - f). Cette forme suggère néanmoins qu'ils se trouvent à l'état de phase gel (Samsonov, 2001) faiblement visibles à 20°C mais par contre bien visibles à 16°C. Les domaines circulaires en phase L_o n'ont pas été observés même à 10°C.

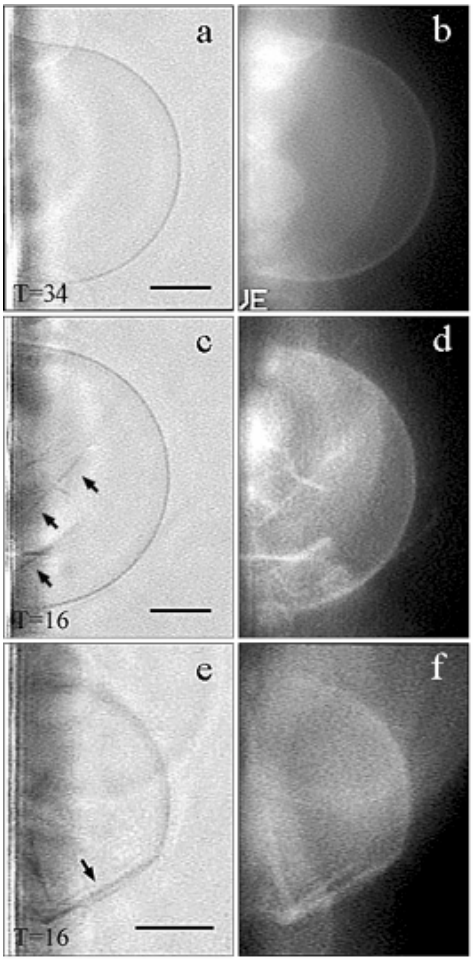


Figure III-9 EYPC/PC*/EYCER/Chol (75/5/10/10) (barre 20 µm)

III.1.2.3.2Discussion

Juste après la conversion de sphingomyéline en céramide, l'organisation de la membrane ne correspond plus à l'équilibre thermodynamique. Elle atteint un nouvel état d'équilibre : la vitesse de ce processus de réorganisation est contrôlée par la diffusion latérale des lipides. Dans notre expérience ci-dessus, la formation de céramide a probablement lieu seulement dans le feuillet externe de la vésicule. La formation de céramide dans les deux feuillets des bicouches exigerait soit la perméabilité de la bicouche pour la SMase, soit la diffusion rapide transversale du céramide. Le premier mécanisme n'est pas envisageable pour une enzyme avec une masse moléculaire de 37kDa. Le deuxième mécanisme exigerait que la vitesse du flip-flop du céramide soit très rapide. Cependant, ceci serait en contradiction avec les données de Bai et Pagano (1997) qui ont

établi pour le mouvement spontané transversal du céramide marqué prend 22 min. Les études fluorimétriques montrent que la formation enzymatique asymétrique du céramide dans des bicouches phospholipidiques mène à leur réorganisation sous la forme d'une séparation latérale de phase (Holopainen, 1998). Le mésappariement hydrophobe (Holopainen, 1997) pourrait être exclu des causes de ségrégation latérale du céramide, mais plutôt résulter des propriétés de sa tête polaire. En faisant une comparaison avec les glycérophospholipides qui sont uniquement des accepteurs de liaisons hydrogène, les sphingolipides tels que la sphingomyéline et le céramide peuvent être aussi bien accepteurs et donneurs en raison de leurs groupes hydroxyle et amine. Cependant les céramides et les sphingomyélines ont des affinités différentes pour d'autres lipides de la membrane, comme le cholestérol. La SM interagit très étroitement avec le cholestérol par la liaison hydrogène entre le groupe hydroxyle C-3 du cholestérol et le groupe amine de la partie sphingosine de la sphingomyéline. Ceci sert de base à la formation du radeau lipidique (raft). D'autre part, les céramides ont une affinité très faible pour le cholestérol et tendent à se ségréger dans des domaines enrichis exclusivement en céramide (Kolesnick, 2000). En outre, comme molécule hydrophobe, le céramide favorise fortement la partition dans les bicouches. Il a été suggéré que cela mène à des changements de l'état physique de la membrane qui peut servir comme médiateur ou modulateur des différentes fonctions cellulaires. Les céramides se mélangent faiblement avec les phospholipides des bicouches, ils se séparent dans les microdomaines enrichis en céramide se caractérisant par des températures élevées de fusion et facilitent la transition de la phase lamellaire à la phase hexagonale (Veiga, 1999). La miscibilité du céramide est très spécifique, car directement liée aux espèces lipidiques et au rapport entre elles. La sphingomyéline du jaune d'œuf (EYSM) est composée d'une tête polaire de phosphorylcholine, et d'acides gras à chaîne saturée (84% C16 :0, 6%18 :0, 2% 20 :3, 4% 22 :0 et 4% 24 :0) liés par une liaison amide à une base grasse en C18 - la sphingosine. La phosphatidylcholine du jaune d'œuf (EYPC) est constituée d'acides gras saturés (34 % 16 :0, 11 % 18 :0) liés en position 1 et insaturés ou polyinsaturés (2 % 16 :1, 32 % 18 :1, 18% 18 :2, 3 % 20 :4) en position 2 du glycérol. En position 3 du glycérol, un pont phosphodiester est lié à la choline (PC). Le lipide synthétique le plus proche de la PC du jaune d'œuf qui pourrait bien simuler ses propriétés intrinsèques est la palmitoyl, oleoyl-PC (POPC). Le céramide formé à partir d'EYSM hydrolysée par la shingomyelinase-(EYCER) peut être comparé avec N-palmitoyl-sphingosine (C16 :0).

Notons qu'en biophysique, les lipides les plus utilisés pour l'étude systématique de leurs interactions, sont les lipides synthétiques et plus rarement des lipides de source naturelle.

Les microdomaines enrichis en céramide ont été observés en utilisant le C16:0-Cer dans des bicouches de POPC ou après le traitement des bicouches composées de POPC/C16:0-SM par la sphingomyélinase (Holopainen, 1998). Cependant, des domaines de ce type n'ont pas été détectés avec le céramide de cerveau de bœuf (BBCER) (Massey, 2001). Les auteurs expliquent ce résultat par une longueur semblable des chaînes acyles. C16:0-SM et C16:0-Cer sont des molécules symétriques où la chaîne acyle N-liée a une longueur presque égale à la chaîne de sphingosine. Cependant, la température de fusion des chaînes acyles d'une phase ordonnée à une phase désordonnée de C16:0- Cer est beaucoup plus élevée (T_M = 90°C) (Shah, 1995) que celle de C16:0-SM (T_M = 41°C) (Bar, 1997; Ramstedt, 1999). La grande capacité du C16:0-Cer à former une phase gel devrait faciliter la séparation de phase latérale du Cer.

Dans notre système, la SMase attaque les deux phases : L_d et L_o. Dans la phase brillante (L_d), nous n'avons pas observé comme Holopainen *et al.* (2000) de domaines plus intensément brillants à l'échelle micrométrique. Selon nous, il y a plusieurs raisons à cette différence : 1) Le rapport SM/Chol dans notre mélange lipidique est équimolaire. Gandhavadi *et al.* (2002) ont montré que des bicouches de DRMs (isolées à partir du mélange DOPC/SM/Chol 1/1/1) ont des structures tout à fait semblables aux bicouches de SM/Chol 2/1. De ce fait, on peut supposer que la majorité de la SM est partitionnée dans la phase L_o et la fraction de la SM convertie en céramide dans la phase L_d n'est pas suffisante pour la ségrégation en domaines ; 2) EYPC et EYCER sont des molécules beaucoup plus hétérogènes et plus asymétriques. Elles sont distribuées de telle manière que la densité membranaire change progressivement sans seuil (il est possible qu'existe un gradient d'ordre) à la différence d'un système modèle composé de lipides synthétiques comme POPC et C16:0-Cer où la ségrégation pourrait être gérée par le mésappariement hydrophobe; 3) si on admet l'existence des domaines enrichis en céramide dans la phase L_d, alors leur taille serait à l'échelle nanométrique et donc en dessous de notre résolution. Nous avons remarqué précédemment que la majorité de la SM est partitionnée dans la phase L_o et que cette phase est attaquée par la SMase. La formation enzymatique du céramide par la SMase induit une déformation du bord circulaire et le domaine s'éclaircit à partir du bord vers l'intérieur. Ceci prouve que la formation du céramide dans le domaine

en phase L_o a permis à la C_{12}-NBD-PC d'y pénétrer. Au bout de 12-20 min de traitement, soit les domaines disparaissent, soit ils laissent seulement de faibles traces de leur existence antérieure. Les domaines en phase L_o ne sont pas maintenus quand la SM est convertie en céramide, ce qui prouve qu'ils peuvent être dynamiquement contrôlés. C'est aussi en accord avec nos résultats décrits dans la première partie de ce chapitre : la formation de vésicules composées du mélange lipidique EYPC/PC*/EYCER/Chol (75/5/10/10) à 34°C ne provoque pas de séparation de phase et de formation de domaines circulaires en phase liquide ordonnée. Dans ce cas-là, la membrane demeure sous la forme d'une phase homogène. L'abaissement progressif de la température favorise la formation de domaines linéaires en phase gel mais pas de domaines circulaires en phase L_o de type raft. Cela montre l'inefficacité du céramide (EYCER) à former et à maintenir des domaines en phase liquide ordonnée, en rappelant toujours que nos conclusions sont faites sur la base d'observations à l'échelle micrométrique. Nos résultats montrent que malgré la grande ressemblance de la partie hydrophobe de la SM et du céramide au niveau structural, l'interaction entre eux et le cholestérol est rigoureusement spécifique. London M. et London E. (2004) constatent que les céramides saturés synthétiques et naturels remplacent les stérols des rafts. Comme les rafts enrichis en cholestérol, les « rafts » enrichis en céramide restent aussi dans un état bien ordonné. Ils émettent l'hypothèse que les céramides et le cholestérol sont en compétition pour leur association aux rafts.

La question clef dans ce contexte est : Quelle est l'origine du remplacement du cholestérol par les céramides dans les rafts? Le cholestérol et le céramide ont des structures permettant l'arrangement serré avec des phospholipides et/ou les sphingolipides. L'arrangement serré impliquant le cholestérol peut être également énergétiquement favorisé par le fait que la petite tête polaire (OH) du cholestérol est insuffisante pour protéger les quatre cycles rigides de la molécule vis-à-vis de l'eau. L'arrangement serré avec d'autres lipides permet aux cycles du cholestérol de se « cacher » sous un « parapluie » (le modèle est connu sous le nom « umbrella model ») formé par des lipides ayant des têtes polaires d'encombrement stérique important (Huang, 1999). Puisque les céramides ont également une petite tête polaire, ces auteurs proposent un phénomène d'interaction semblable. La capacité limitée des lipides polaires à protéger simultanément de l'eau les groupes carbonés du céramide et du cholestérol, a comme conséquence une compétition entre le céramide et le cholestérol pour leur inclusion dans les domaines

ordonnés. D'autre part, la liaison hydrogène semble jouer un rôle moins important pour le remplacement. Les diglycérides forment des liaisons hydrogènes selon un mode différent des céramides mais un diglycéride saturé remplace le cholestérol plus efficacement qu'un céramide avec une structure de chaîne carbonée semblable. Ceci confirme que l'hydrophobicité de la tête lipidique a un rôle primordial dans le remplacement. Une autre explication alternative du remplacement est que le céramide forme des domaines ordonnés appauvris en cholestérol qui sont séparés des domaines ordonnés constitués par la DPPC (ou SM) (London, 2004). Quand le céramide est substitué à la DPPC, il y aurait une quantité inférieure de domaines ordonnés enrichis en DPPC auxquels le cholestérol pourrait s'incorporer. Les observations réalisées sur une concentration croissante de céramide montrent que le céramide n'induit qu'une augmentation progressive de la température de fusion des rafts et que la fusion reste un processus continu ce qui contredit l'existence des domaines ordonnés de différents types. Une phase séparée enrichie en céramide provoquerait un événement de fusion à une température différente. En outre, l'inclusion du céramide augmente la fraction de DPPC liée aux domaines ordonnés tout en remplaçant le cholestérol. On ne s'attendrait pas à ceci si le céramide et la DPPC formaient des domaines séparés, mais ce serait prévisible si le céramide et la DPPC interagissaient et formaient des domaines ordonnés d'un type simple. Ces résultats prouvent par une visualisation directe que le céramide et le cholestérol ne sont pas capables de former ou de maintenir des domaines en phase liquide ordonnée. Nos résultats et nos conclusions sont en accord avec l'hypothèse émise par London M. et London E. selon laquelle la présence du céramide dans un système modélisant la coexistence de domaines en phase L_o dans un milieu en phase L_d provoque la formation de domaines d'un seul type. Cependant nous sommes en désaccord avec l'opinion affirmant que ces domaines sont en phase L_o car nous disposons d'une preuve visuelle de la perturbation du bord des domaines, puis de la perturbation de leur forme circulaire et enfin de la désintégration de ces domaines. Cela nous amène à penser que le remplacement du cholestérol par le céramide mène à la formation de domaines qui n'ont pas une forme circulaire. Fanani *et al.* (2002) ont montré deux topographies différentes de surface des domaines dans des monocouches lipidiques : les domaines ont une forme circulaire quand les monocouches sont composées du mélange SM/Cer et ils ont une forme digitée quand les domaines sont formés par l'activité de la SMase à partir d'une monocouche de SM. Les auteurs supposent que dans le premier type

de domaines la fraction de la SM serait significativement dominante et que dans le deuxième type de domaines, ce serait la fraction du Cer qui dominerait.

En utilisant la méthyl-β-cyclodextrine et la sphingomyélinase bactérienne, la stabilité des domaines en phase L_o a été perturbée et la morphologie de désintégration de ces domaines en fonction de l'agent est complètement différente. Dans le premier cas, les domaines gardent leur bord toujours circulaire, suggérant ainsi que la diminution progressive de surface ne mène pas à un changement de l'état de phase du système. Dans le deuxième cas, pendant la désintégration des domaines, le bord prend une forme irrégulière. La résolution optique ne nous permet pas de définir si la périphérie des domaines a une structure particulière. Le fait que le bord ne soit pas circulaire sur plusieurs minutes et que l'on observe l'apparition d'une anisotropie dans la phase ordonnée, cela tend à prouver qu'il se produit un changement d'état de phase du système. Sans donner une explication moléculaire détaillée, il est clair que cette topologie implique une anisotropie dans l'arrangement moléculaire de la phase dans les domaines et donc à leur frontière. Elle se manifeste par l'embranchement fin (probablement de type « star » (Fanani, 2002)) des domaines foncés avant leur solubilisation complète dans la phase L_d à la suite de l'activité enzymatique.

La perturbation de la stabilité des domaines en phase L_o par des agents différents mène à des réponses rigoureusement spécifiques au niveau du système modèle constitué uniquement par des lipides.

III.2 La $sPLA_2$ induit le bourgeonnement et la fission des domaines en phase L_o à partir des vésicules géants unilamellaires

III.2.1 Résultats

III.2.1.1 $sPLA_2$ et VGUs hétérogènes

Les résultats des Figure III-10 et Figure III-11 montrent, après une microinjection locale de la $sPLA_2$, le bourgeonnement, la fission et enfin l'expulsion d'une vésicule en phase L_o. Les VGUs sont formées de PC/PC*/SM/Chol (40:5:45:10) à 30°C.

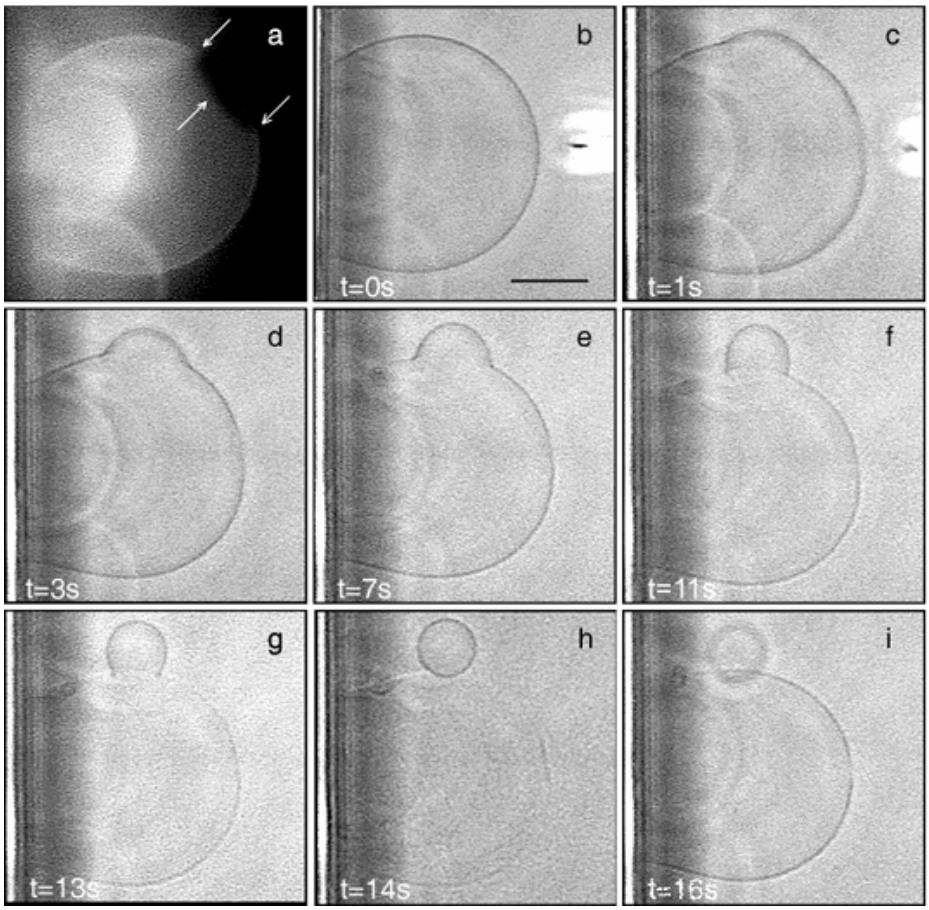


Figure III-10 Bourgeonnement et fission d'un domaine en phase L_o induits par la $sPLA_2$ à partir d'une vésicule composée de PC/PC*/SM/Chol (40:5:45:10) à 30°C (barre 20 µm)

Ce mélange lipidique, à cette température, correspond aux conditions de coexistence des deux phases liquides L_o et L_d. Il se forme un ou deux domaines foncés (phase L_o) dont la taille est approximativement de 20 µm (Figure III-10 et Figure III-11, a). Une seconde après l'injection de la $sPLA_2$ à proximité de la VGU (à une distance d'environ 10 µm) (Figure III-10, b), on observe le bourgeonnement au niveau du domaine foncé (Figure III-10, c). Souvent les domaines commencent à bourgeonner à un endroit légèrement décalé par rapport à la position du domaine foncé observé en fluorescence. Ce décalage est attribuable au mouvement relatif des domaines les uns par rapport aux autres dont l'origine est l'immiscibilité des phases liquide/liquide.

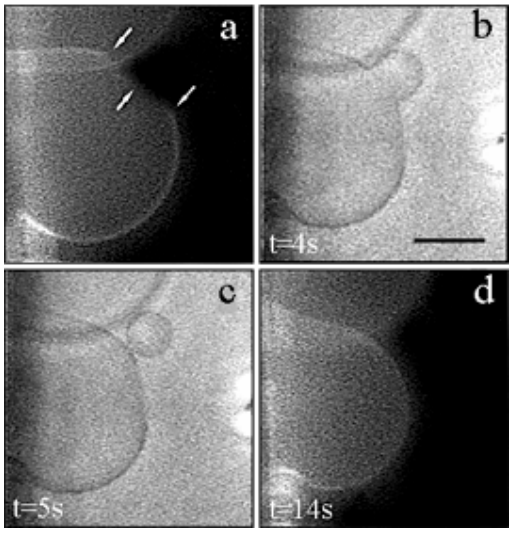


Figure III-11 Bourgeonnement et fission d'un domaine en phase L_o induits par la $sPLA_2$ à partir d'une vésicule composée de PC/PC*/SM/Chol (40:5:45:10) à 30°C (barre 20 µm)

Le bourgeon se développe progressivement en se transformant en vésicule sphérique, (Figure III-10, d - g et Figure III-11, b), ensuite il se ferme et finalement, il se détache de la vésicule mère (Figure III-10, h et Figure III-11, c). Le processus prend environ 15 s dans les conditions décrites pour la Figure III-10 et 5 s pour la Figure III-11. La vésicule néoformée ne brille pas en fluorescence et aucun domaine foncé n'est alors visible sur la vésicule mère (Figure III-11, d). Ces observations suggèrent que la vésicule expulsée est entièrement composée du domaine en phase L_o. Ceci est bien évident sur les images au moment du bourgeonnement avancé (Figure III-15). La vésicule mère a toujours

une forme quasi - sphérique mais son diamètre est plus petit (Figure III-10, i et Figure III-11, c).

III.2.1.2 Bourgeonnement et Fission en fonction de la température

L'expulsion des vésicules en phase L_o se produit également à 20° C, (Figure III-12) mais la taille de ces vésicules ainsi que la cinétique de leur expulsion est différente.

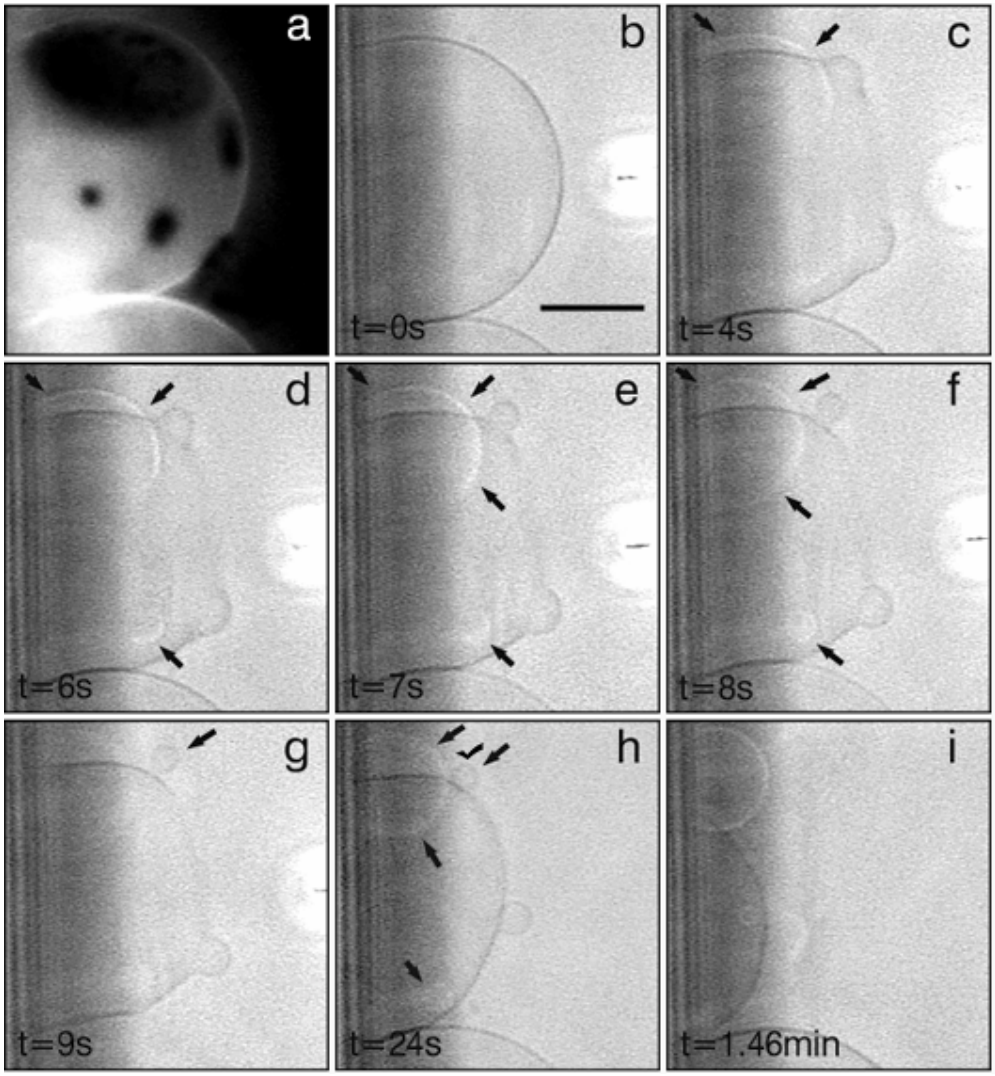


Figure III-12 Plusieurs événements du bourgeonnement et de la fission des domaines en phase L_o induits par la $sPLA_2$ à partir d'une vésicule composée de PC/PC*/SM/Chol (40:5:45:10) à 20°C (barre 20 µm)

À 20°C, on observe plusieurs domaines foncés (un ou deux plus grands et plusieurs plus petits) (Figure III-12, a) qui nous ont permis d'observer simultanément plusieurs événements du phénomène « bourgeonnement et fission » des domaines en phase L_o (Figure III-12, c - i, les étapes du bourgeonnement sont montrées par les flèches noires). Quatre événements du bourgeonnement sont visibles: deux se développent au niveau des régions de l'équateur (ils sont donc dans le champ de focalisation, les contours noirs) et les deux autres – dans les régions du tropique (les contours blancs, indiqués par les flèches noires, Figure III-12, c - f).

Remarque : Si le bourgeonnement se développe au niveau des pôles de la vésicule, il n'est pas visible sur les images. Les pôles et l'équateur sont définis par rapport à l'axe optique.

Les vésicules en phase L_o restent souvent autour de la vésicule mère bien qu'elles semblent être détachées (Figure III-12, g et h, vésicule indiquée par le signe ˇ) ce qui suggère qu'elles restent attachées à elle par des fils membranaires formant ainsi un cou infinitésimal (un terme connu dans la littérature sous le nom « infinitesimal neck »).

Ce phénomène est bien montré sur la Figure III-13. La vésicule en phase L_o (la plus grande) est presque fermée mais reste encore liée à la membrane par un fil très fin. Le bout du fil du coté du bourgeon est invisible au microscope (Figure III-13, f - i). Ce fil tire la membrane en phase L_d qui est très flasque en raison de l'activité enzymatique et il forme avec elle un bout plus large, visible au microscope (Figure III-13, f). La vésicule mère ne reste pas intacte, sa taille diminue pour deux raison : d'une part à cause de l'exclusion des domaines occupant une surface significative de la vésicule à cette température, et d'autre part en raison de l'hydrolyse de la phase L_d par l'enzyme (Figure III-12 et Figure III-13, i).

A 14°C, les domaines foncés bourgeonnent jusqu'à l'étape de la demi–sphère (Figure III-14, g et h), le deuxième domaine se trouve aux tropiques. Souvent le bourgeon n'est pas symétrique, probablement en raison de la distribution hétérogène de l'enzyme dans la membrane due à la microinjection locale (Figure III-14, c - f). Les bourgeons à l'état de demi–sphère existent pendant environ 1 min (Figure III-14, g - h) et ensuite mettent à peu près 6 min pour revenir dans la vésicule (Figure III-14, h - k). Dans la Figure III-14 (k), le domaine est observable sous la forme d'un arc plus foncé, parce que la mise au point a été faite sur lui : l'équateur de la vésicule est légèrement hors de la mise au point

(le contour de la vésicule est un peu terne). En fluorescence (Figure III-14, l), on observe deux domaines foncés comme au début de l'expérience et l'un d'eux a presque la position initialement vue en contraste de phase (Figure III-14, j et k).

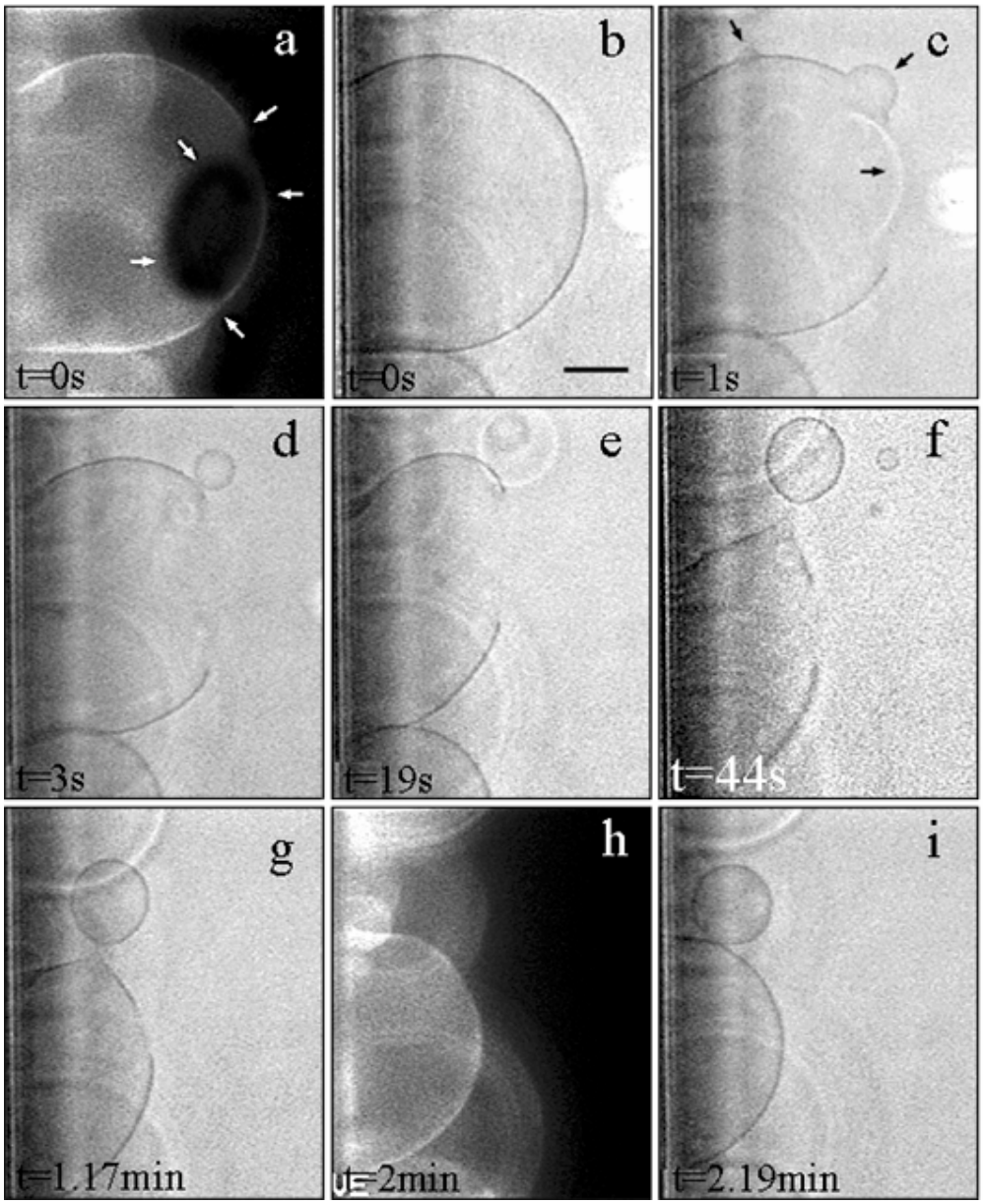


Figure III-13 Formation d'un cou infinitésimal d'un bourgeon en phase L_o induit par la $sPLA_2$ à partir d'une vésicule composée de PC/PC*/SM/Chol (40:5:45:10) à 20°C (barre 20 µm)

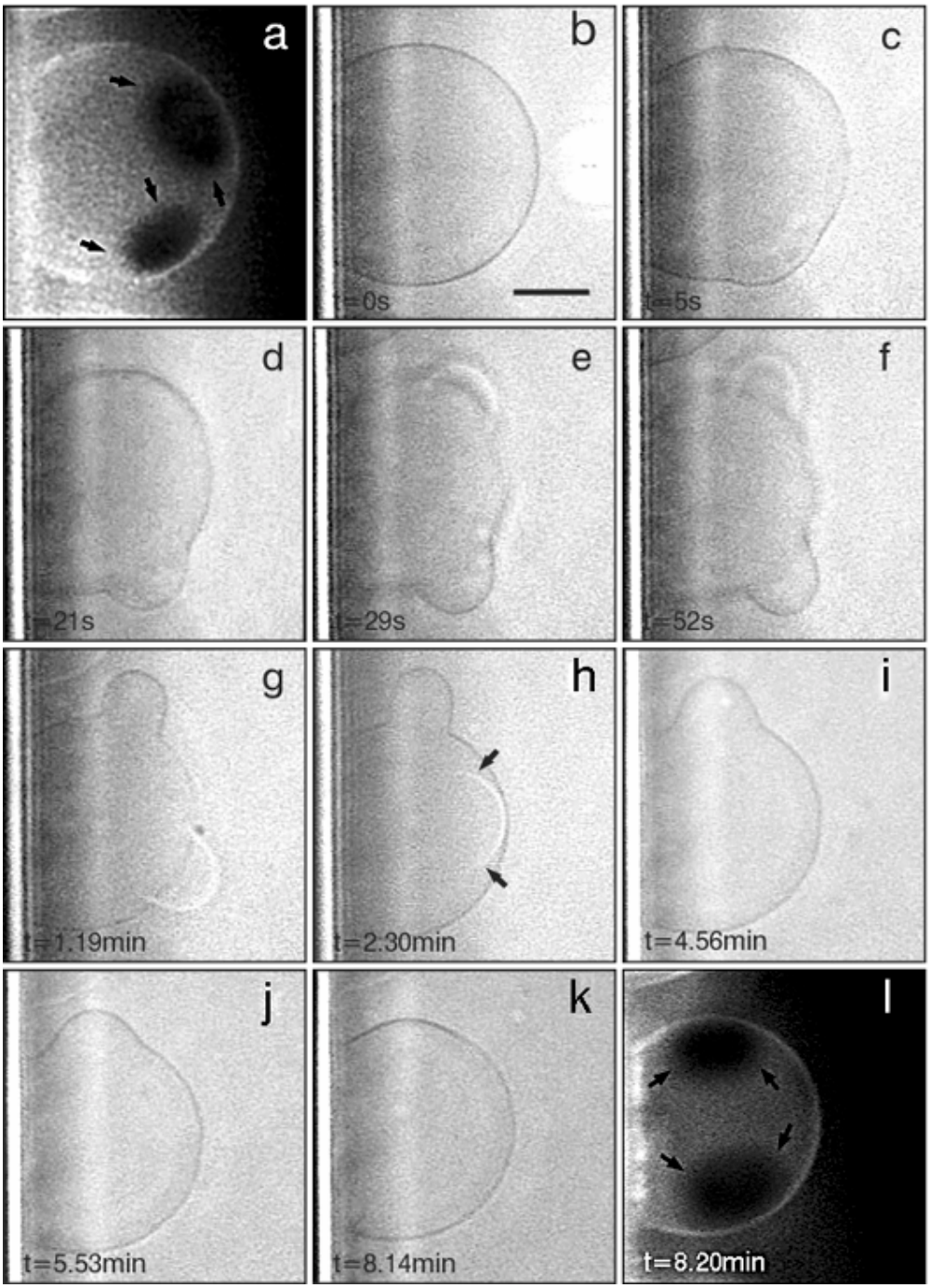


Figure III-14 Deux événements du bourgeonnement induits par la $sPLA_2$ sans fission des domaines en phase L_o à partir d'une vésicule composée de PC/PC*/SM/Chol (40:5:45:10) à 14°C (barre 20 µm)

Dans la Figure III-15, nous avons présenté une vésicule à 14°C dont le grand domaine en phase L_o bourgeonne. L'important dans le cas présent c'est que le phénomène

du bourgeonnement est capturé en contraste de phase (Figure III-15, a) mais également en fluorescence (Figure III-15, b). Le développement lent du bourgeon à 14°C a permis de prendre une image en fluorescence et en contraste de phase sans que le bourgeonnement ne change de position et de forme. Le manque de signal fluorescent au niveau du bourgeon (indiqué par les flèches blanches) est une preuve indiscutable qu'il est entièrement constitué du domaine foncé (phase L_o).

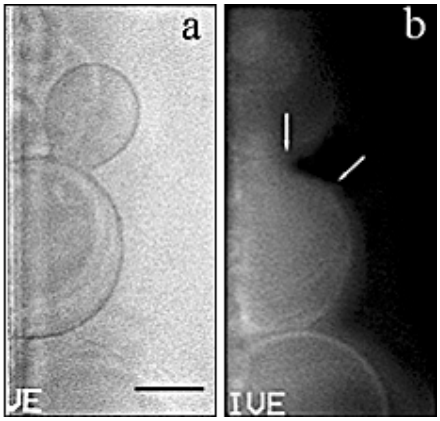


Figure III-15 a) Bourgeonnement avancé induit par la $sPLA_2$ à partir d'une vésicule composée de PC/PC*/SM/Chol (40:5:45:10) à 14°C : a) en contraste de phase, b) en fluorescence (barre 20 µm)

III.2.1.3 Influence de l'activité enzymatique

La fission de la vésicule en phase L_o dépend de l'activité enzymatique mais pas le bourgeonnement des domaines L_o. En effet, l'addition de l'enzyme inactive ou faiblement active induit toujours le bourgeonnement des domaines L_o mais le processus ne se développe pas complètement et ne se termine pas par la fission et l'expulsion finale de vésicules en phase L_o. La $sPLA_2$ est une enzyme dépendante du Ca^{2+} (10mM) et par conséquent, l'addition d'EDTA (10mM) à la solution d'enzyme est une procédure commune pour inhiber l'activité enzymatique (Figure III-16).

Une autre façon de diminuer l'activité de la $sPLA_2$ est l'abaissement de la température. Celle-ci s'accompagne d'une augmentation de la rigidité membranaire. Ces deux facteurs limitent le bourgeonnement et la fission. Dans les deux cas, le bourgeonnement apparaît après l'injection locale de la $sPLA_2$ mais ensuite, on observe un

retour de celui–ci dans la vésicule. Les domaines en phase L_o restent dans la vésicule mère. Cependant, les cinétiques du bourgeonnement et son retour dans la vésicule sont différents.

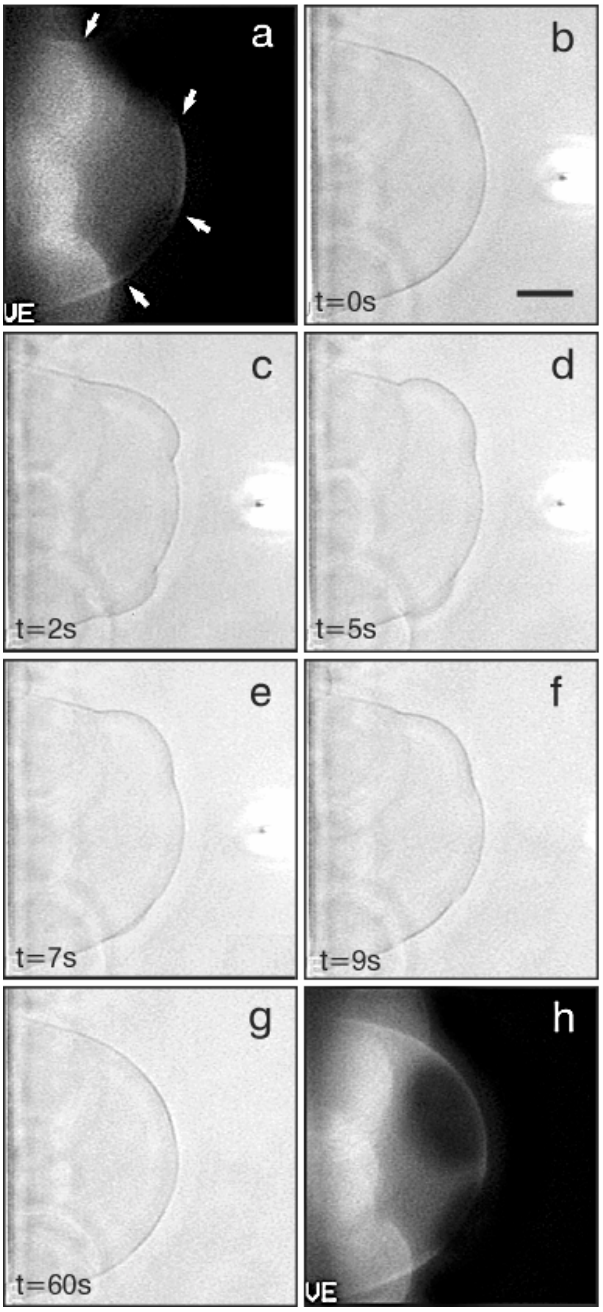


Figure III-16 Deux événements du bourgeonnement sans fission des domaines en phase L_o induits par la $sPLA_2$ inactive (inhibée par EDTA, 10mM) à partir d'une vésicule composée de PC/PC*/SM/Chol (40:5:45:10) à 30°C (barre 20 µm)

En présence d'EDTA à 30°C, le processus de développement et de retour du bourgeon dans la membrane dure approximativement autant de temps que le processus de bourgeonnement et de fission décrit ci-dessus, c'est-à-dire quelques secondes. Par contre, à 14°C, ce processus dure 5 à 10 min en fonction de la quantité d'enzyme.

Le processus de bourgeonnement continu s'achevant par une fission puis par l'expulsion d'une vésicule en phase L_o n'est visible que pour les vésicules mères ayant une composition lipidique particulière (PC/SM/Chol (45:45:10) et à une température définie (à 30°C).

III.2.1.4 $sPLA_2$ et VGUs composées de EYPC

Les transformations morphologiques des vésicules (constituées entièrement de lipides - substrat de la $sPLA_2$) induites par l'activité enzymatique sont semblables à celles déjà décrites dans la littérature : ouverture et fermeture des pores micrométriques géants dans la membrane, fluctuations du diamètre et rétrécissement progressif de la vésicule, désintégration de la vésicule sous la forme de monomères, de micelles et de petites vésicules (Wick, 1996; Sanchez, 2002). En faisant varier la quantité d'enzyme (pression et durée d'injection), nous avons reproduit tous les cas mentionnés ci-dessus pour des vésicules formées à partir uniquement de EYPC. Nous avons examiné l'interaction de la $sPLA_2$ avec des VGUs ayant un diamètre sensiblement identique. De cette façon, nous avons fixé approximativement un rapport **activité enzymatique/unité de surface** constant. L'augmentation progressive de la quantité d'enzyme réduit sensiblement le temps avant le début du rétrécissement (lag time) (Figure III-17) alors que cette transformation morphologique se convertit en fragmentation membranaire (Figure III-18). L'augmentation progressive de la quantité d'enzyme mène à l'ouverture et à la fermeture des pores micrométriques géants dans la membrane immédiatement après l'injection (Figure III-19). Nous considérons que les transformations observées dans nos expériences aussi bien que celles décrites dans la littérature sont de même nature. Leur comportement dépend des cinétiques de la réaction enzymatique de la $sPLA_2$ et de la stabilité membranaire (des propriétés visco-élastiques). D'un autre coté, les cinétiques de la réaction enzymatique dépendent de l'origine de la $sPLA_2$, de ses préférences envers le substrat et de son environnement, de l'organisation des phospholipides entre d'eux, comme l'empilement

lipidique, l'état de phase etc. Nous avons fait varier l'enzyme en quantité croissante et nous avons classé les transformations morphologiques dans l'ordre suivant:

1) *rétrécissement progressif de la vésicule (Figure III-17);*

2) *rupture et désintégration complète de la membrane (éclatement de la vésicule) (Figure III-18)*

3) *rupture locale de la membrane – ouverture et fermeture des pores macroscopiques géants dans la bicouche (Figure III-19).*

Rétrécissement progressif de la vésicule homogène

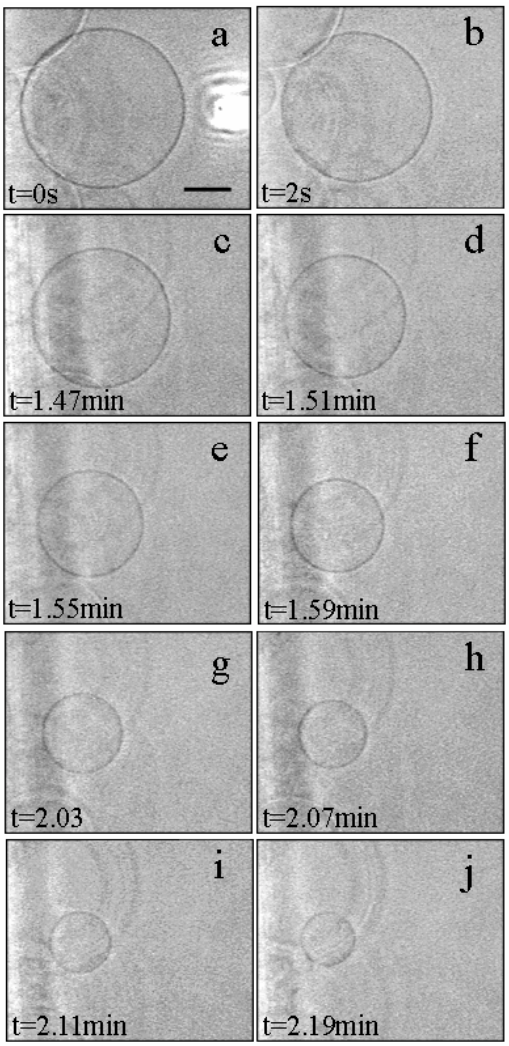


Figure III-17 Rétrécissement progressif d'une vésicule composée de EYPC à 30°C (barre 20 µm)

La Figure III-17 présente la séquence d'images obtenue avant (Figure III-17 a) et après l'injection d'enzyme (Figure III-17, b – j). La vésicule est composée de EYPC pure et la manipulation est faite à 30°C. Immédiatement après l'injection d'enzyme, la vésicule commence à se rétrécir et perd environ 16 % de sa surface en 2 s. Elle se stabilise et ne subit plus de transformations morphologiques durant 1.43 min (Figure III-17 b). Ensuite le rétrécissement recommence jusqu'à ce qu'il ne reste pratiquement rien de la vésicule (Figure III-17, c - j).

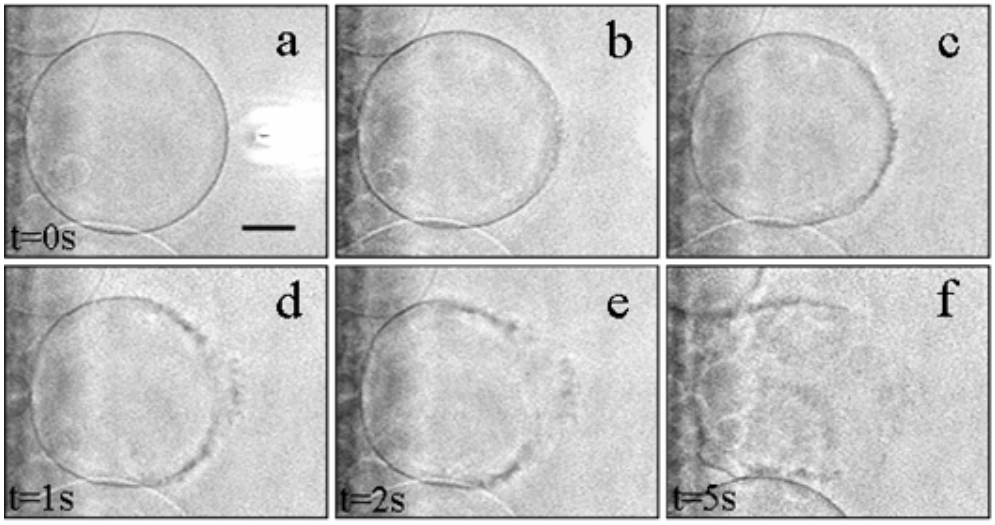


Figure III-18 Rupture et désintégration complète de la membrane d'une vésicule composée de EYPC à 30°C (barre 20 µm)

Rupture et désintégration complète de la membrane

L'activité de la $sPLA_2$ sur les VGUs formées de EYPC pure à 30°C est montrée sur la Figure III-18. Comme on le voit sur cette figure, presque immédiatement après l'injection de la $sPLA_2$ à une distance d'environ 15 µm de la VGU (Figure III-18 a), commence une hydrolyse rapide du substrat, exprimée par la perturbation de l'intégrité membranaire (Figure III-18, b - d) puis par une désintégration totale de la vésicule au bout de 5 s (Figure III-18 f). Toute la surface de la vésicule se transforme alors en micelles et en petites vésicules sous l'effet de l'hydrolyse de la plupart du substrat. Dans ce cas, l'éclatement immédiat de toute la vésicule est aussi observé. En contraste de phase, à l'endroit du contour, on observe un grand nombre de petites vésicules (dans la limite de la

résolution optique) après qu'elles aient fusionné et pris une taille de l'ordre de quelques microns. Elles ne sont pas montrées à cause de la vitesse extrêmement rapide du processus (inférieur à la seconde) et par le fait que leur taille se différencie difficilement du bruit.

Rupture locale de la membrane et refermeture

Quand la quantité d'enzyme est environ deux fois plus grande que le cas précédent, la vésicule éclate immédiatement après l'injection en formant un pore géant (Figure III-19 b). La vésicule se vide et les flèches noires sur la figure montrent le flux aqueux emportant le matériel lipidique (Figure III-19, b – ouverture du pore géant et c – fermeture du pore). On observe ensuite un deuxième éclatement (Figure III-19 d), puis la refermeture de la membrane (Figure III-19 e) et enfin sa stabilisation au bout de 4 s (Figure III-19 f).

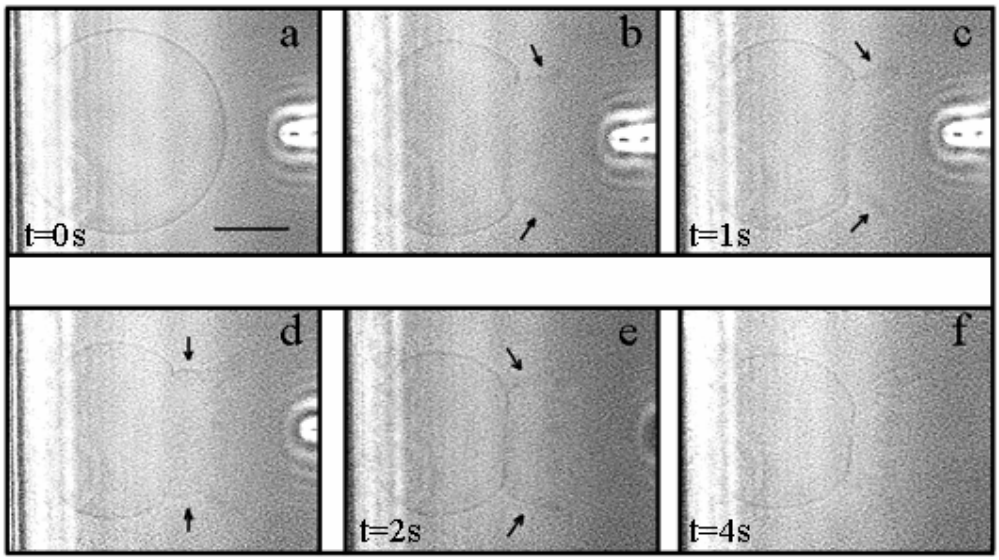


Figure III-19 Rupture locale et refermeture de la vésicule composée de EYPC à 30°C (barre 20 µm)

III.2.1.5 Effet inhibiteur de la SM

La présence de la SM augmente la résistance de la membrane à la $sPLA_2$. En formant des vésicules avec une quantité de SM augmentée de 10%, nous avons établi que pour le mélange PC/SM (50/50) à 30°C, la plupart des VGUs (environ 80%) restent intactes après l'injection de la $sPLA_2$, et les 20% restants se rétrécissent en ne perdant pas plus de 20 % de leur aire (données non presentées). La résistance observée est due à l'effet

inhibiteur de la SM sur la $sPLA_2$. Les VGUs formées de PC/PC*/SM (45:5:50) à 30°C ont une forme bien arrondie sans séparation de phases, au moins à l'échelle micrométrique, ce qui a été déterminé par l'incorporation du marqueur fluorescente C_{12}-NBD-PC (Figure III-20, a).

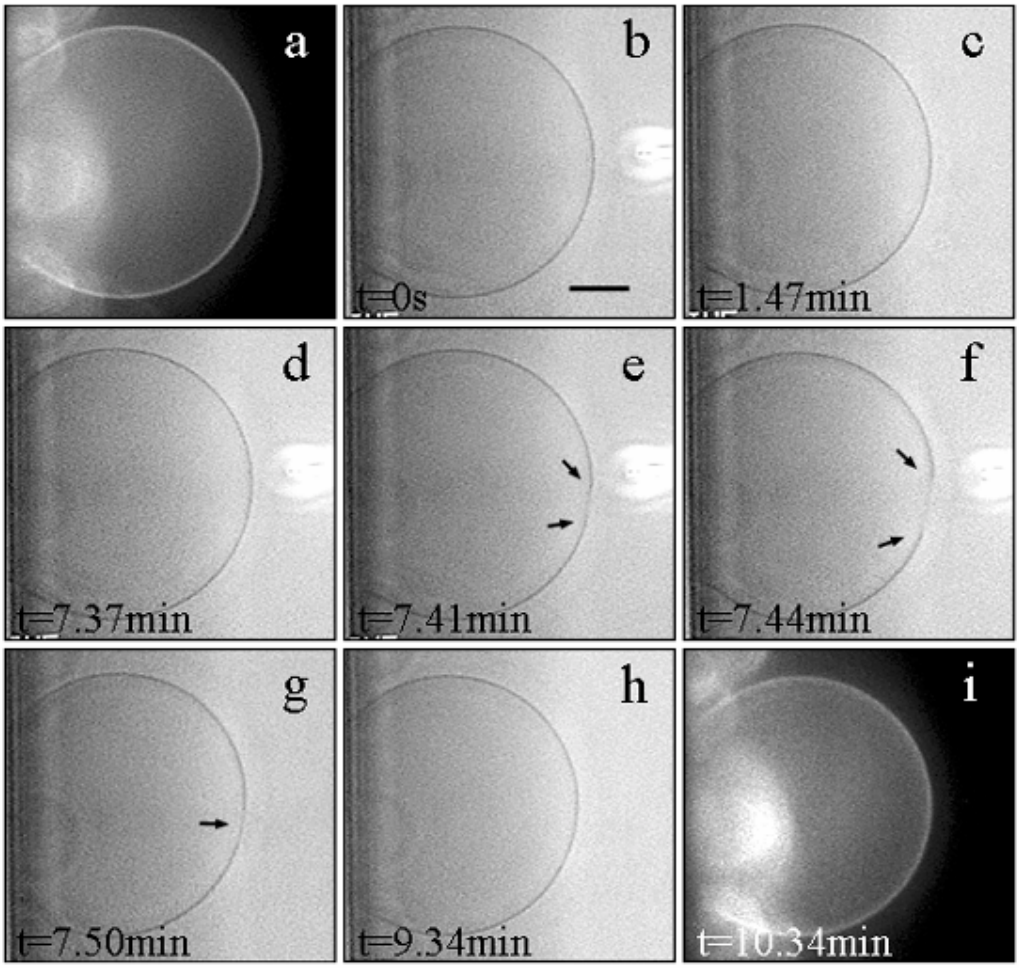


Figure III-20 Interaction de la $sPLA_2$ avec une vésicule composée de PC/PC*/SM (45:5:50) à 30°C (barre 20 µm)

Le traitement de ces vésicules avec $sPLA_2$ a induit une transformation insignifiante de la forme de la vésicule. C'est seulement après plusieurs injections de l'enzyme que nous avons observé de faibles changements du contour de la vésicule au niveau de la région de l'injection (le front de la vésicule) et un léger rétrécissement témoignant d'une faible

hydrolyse (Figure III-20, d – g). Cependant, ce processus se termine rapidement et la vésicule garde sa forme presque intacte (Figure III-20, h et i).

Dans le cas du mélange PC/SM/Chol (45:45:10), l'interaction prédominante du Chol avec la SM libère partiellement l'effet inhibiteur de cette dernière (Koumanov, 1998). La majorité de la SM est une composante de la phase L_d en raison du rapport SM/Chol (45/10) qui assure une protection considérable de la membrane envers $sPLA_2$.

Un tel équilibre permet à la fission et à l'expulsion des vésicules en phase L_o de se produire d'une façon continue, sans désintégration membranaire et ouverture de pores géants dans la bicouche. L'échange significatif du volume interne de la VGU vers l'espace aqueux externe ne se produit pas pendant la fission, ce qui mime correctement les processus de la vésiculation des membranes biologiques.

Par contre, quand le rapport SM/Chol est équimolaire dans le mélange PC/PC*/SM/Chol (55:5:20:20) à 31°C (Figure III-21), on observe, en raison d'une forte hydrolyse enzymatique de la phase L_d, une exclusion des domaines en phase L_o plutôt qu'un développement progressif du bourgeon, (Figure III-21, c - e). Sa désintégration en monomères, micelles et petites vésicules est rapide et commence immédiatement après l'injection d'enzyme. Le contour membranaire de la phase L_d se ferme en fluctuant et se stabilise après 26 s (Figure III-21, g et h). Le domaine en phase L_o se ferme en formant une vésicule quasi–sphérique sans observation d'un bourgeonnement continu mais en achevant ce processus par une fission (Figure III-21 f). En fluorescence, à la même position observée en contraste de phase, on voit qu'il n'y a pas de traces de signal fluorescent donc cette vésicule est en phase L_o (Figure III-21, h et i).

Quand le rapport PC/SM/Chol est équimolaire (1/1/1) à 31°C, nous avons observé une phase liquide uniforme L_o (Figure III-22). Les vésicules restent intactes (données non presentées) si on garde la quantité d'enzyme égale aux expériences ci–dessus. Bien entendu, on peut trouver une quantité d'enzyme laquelle qui provoquera soit un léger rétrécissement, soit une ouverture locale de la membrane à la région d'injection. L'abaissement de la température (à 25°C) entraîne l'apparition de domaines brillants circulaires sur un fond noir (Figure III-22 b). Ce phénomène est connu dans la littérature comme une percolation de la phase. Les domaines brillants représentent la phase L_d. Après l'injection de la $sPLA_2$ à 25°C, ils disparaissent et la vésicule revient en phase uniforme en gardant son aire presque intacte (Figure III-22, c et d).

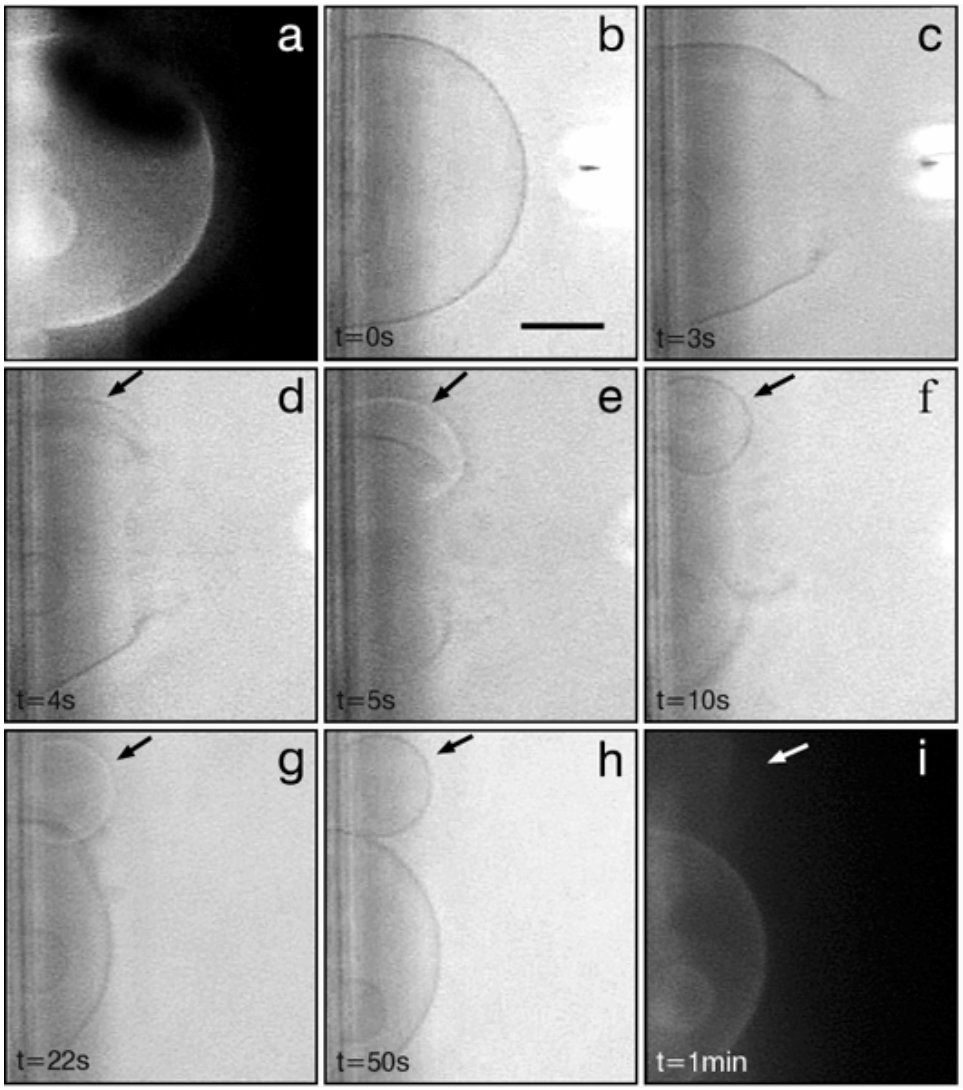


Figure III-21 Interaction de la $sPLA_2$ avec une vésicule composée de PC/PC*/SM/Chol (55:5:20:20) à 31°C, exclusion d'un domaine en phase L_o et désintégration de la phase L_d (barre 20 µm)

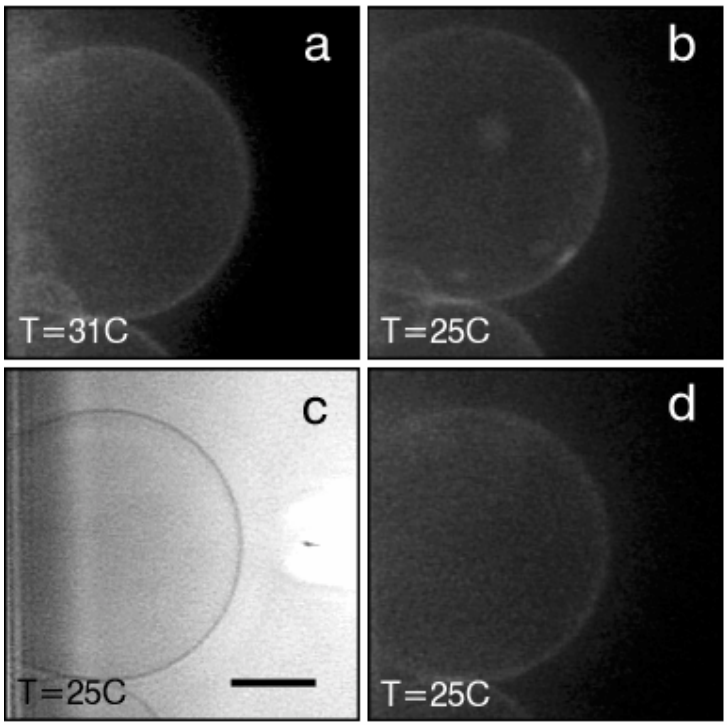


Figure III-22 Interaction de la $sPLA_2$ avec une vésicule composée de PC/SM/Chol (1/1/1) (barre 20 µm)

III.2.1.6 Effet de la DPPC

L'implication de la SM dans la formation des rafts a accru l'intérêt envers ce lipide membranaire. Les données accumulées montrent que le Chol interagit préférentiellement avec la SM ce qui confère des propriétés physico-chimiques spécifiques à la membrane. L'empilement moléculaire créé par le Chol et la SM est la force motrice pour la formation des rafts. Il est connu en général que cet empilement diffère de celui engendré entre le cholestérol et des phosphatidylcholines saturées bien que les mélanges ternaires de PC (insaturées)/DPPC/Chol forment aussi des domaines circulaires ayant les mêmes propriétés essentielles que les domaines enrichis en Chol et SM. Voilà pourquoi dans beaucoup d'études, les PC saturées sont encore considérées comme un modèle pour la SM. Par conséquent, la DPPC est l'espèce lipidique qui d'un coté pourrait mimer la SM dans le mélange ternaire en formant des domaines foncés circulaires et qui, de l'autre côté constitue un substrat de la $sPLA_2$ à la différence de la SM.

Les vésicules ont été formées de EYPC/PC*/DPPC/Chol (40:5:45:10) à 30°C (Figure III-23). On observe un ou deux domaines foncés et leur taille moyenne est plus grande que celle des domaines enrichis en EYSM. Après l'injection d'enzyme (on a utilisé les mêmes paramètres d'injection que dans la Figure III-10), nous avons observé l'apparition des fluctuations d'une amplitude plus grande qu'avant l'injection dans la région de la phase L_d (Figure III-23 c – f). Ceci s'accompagne d'un rétrécissement lent de la vésicule à la dépense de la phase L_d. (Figure III-23, f – i, k - à gauche de la flèche blanche). La phase L_o reste intacte bien qu'on s'aperçoive que le contour membranaire dans la région du domaine disparaisse. Cela nous amène à penser qu'il se forme un pore géant (Figure III-23, c – e). Puisque la vésicule ne perd pas rapidement son volume et qu'il n'y a pas de traces d'efflux d'eau, cette perte doit être due à un autre effet. Après l'injection, le front de la membrane entre en contact direct avec la concentration la plus grande en enzyme.

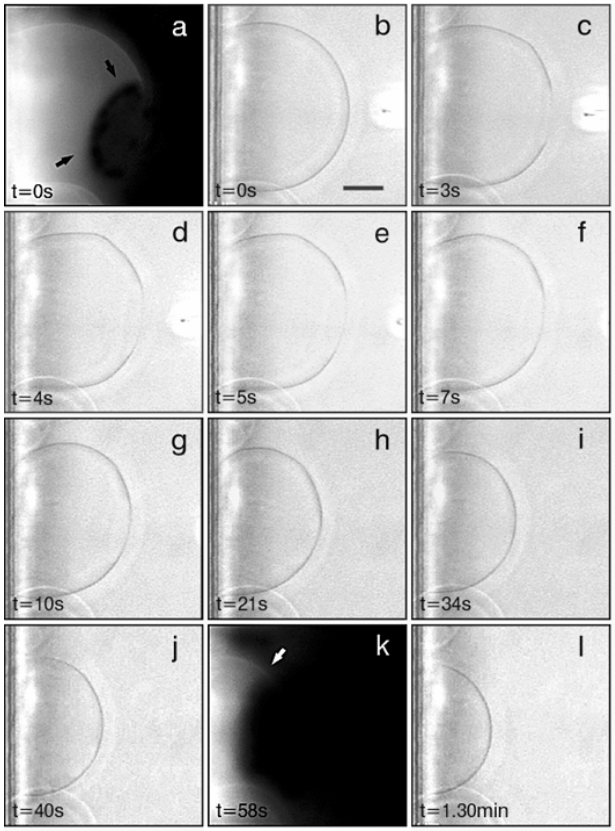


Figure III-23 Interaction de la $sPLA_2$ avec une vésicule composée de EYPC/PC*/DPPC/Chol (40/5/45/10) à 30°C (barre 20 μm)

Le contour de la membrane dans cette région commence à fluctuer intensivement, compte tenu du fait que la DPPC est un substrat de la $sPLA_2$ et que la phase L_o est hydrolysée par l'enzyme. C'est précisément ces fluctuations du contour membranaire qui mènent à une perte partielle du contraste. Dans ce cas, nous n'avons pas observé le bourgeonnement et la fission des domaines foncés. Par conséquent, le phénomène du bourgeonnement est rigoureusement spécifique pour les domaines enrichis en Chol et SM. Cependant, nous avons été intéressés par la possibilité de substituer à la SM une autre molécule ayant la capacité de former des domaines en phase L_o avec le Chol mais n'étant pas un substrat de la $sPLA_2$. Cette molécule est la D-DPPC (Koumanov, 1997). En formant des vésicules de EYPC/PC*/D-DPPC /Chol (40:5:45:10) à 32.4°C, les membranes ont toujours été en phase liquide uniforme (Figure III-24, a et b).

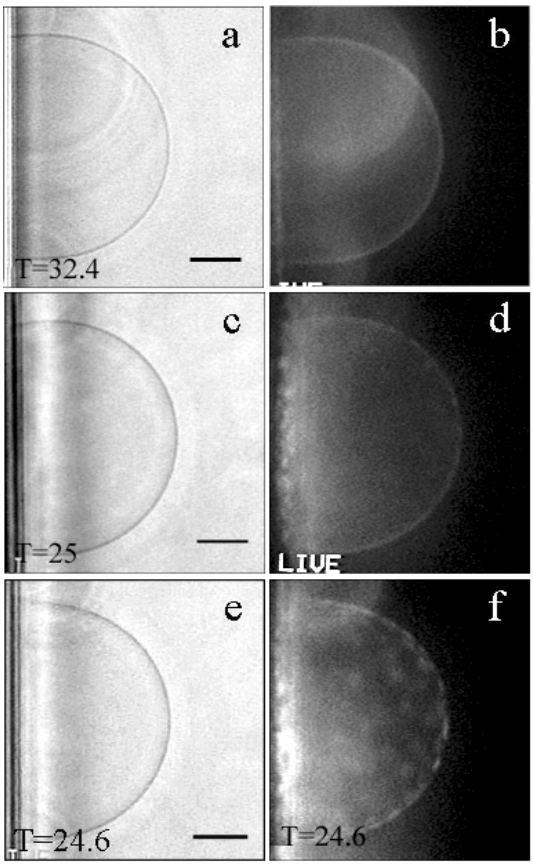


Figure III-24 Visualisation d'une vésicule de morphologie de phase différente composée de EYPC/PC*/D-DPPC /Chol (40/5/45/10) en fonction de la température (barres mesurent 20 μm)

L'abaissement de la température a provoqué l'apparition d'une hétérogénéité à 25°C (Figure III-24, c et d). Celle-ci est visible par l'existence de taches plus brillantes le long du contour et de domaines plus grands bien visibles à 24.6°C (Figure III-24, e et f). Ici, on observe le cas d'une percolation des phases. Une telle morphologie de la phase ne correspond pas néanmoins à celle qui nous intéresse. Voilà pourquoi cette expérience ne représente pas un contrôle correct. L'injection de l'enzyme sur les vésicules a été réalisée à 30°C mais celles–ci sont restées intactes même après plusieurs injections de $sPLA_2$.

III.2.1.7 Effet du Céramide

Dans des articles précédents de notre groupe de recherche (Koumanov, 1997; 1998; 2002), nous avons montré l'influence de la composition et des propriétés du substrat sur l'activité $sPLA_2$. Dans les expériences avec $sPLA_2$ recombinante humaine de type II, nous avons prouvé que la substitution d'une partie de la SM en utilisant des liposomes préparés à partir de PE/PS/SM (40:10:50) par Cer (de 2 à 20 mol%) a non seulement supprimé l'effet inhibiteur de la SM, mais induit également la réactivation notable de l'enzyme.

Nous nous proposons montrer comment la réactivation de la $sPLA_2$ de venin d'abeille modulerait la réponse au niveau transformations morphologiques.

Les vésicules faites à partir des mélanges PC/PC*/SM/Cer (45/5/48/2) et PC/PC*/SM/Cer/Chol (40/5/43/2/10) ont été formées à 45°C. Il s'agit d'une température qui est plus élevée de plusieurs degrés que la T_M la plus élevée des lipides inclus dans ces mélanges. Ceci nous garantit que le Cer sera à l'état liquide pendant la formation des vésicules puisque sa T_M est à 41°C.

La température est ensuite abaissée à 37°C. Toutes les injections ont été faites à cette température physiologique. Par soucis de cohérence avec nos précédents résultats, il aurait été préférable d'avoir une température identique dans toutes nos expériences. Mais, l'étude par diffraction des rayons X nous montre qu'entre 15°C et 30°C, il apparaît des traces de phase gel (L_β) dans les deux phases liquides L_d et L_o pour les mélanges PC/PC*/SM/Cer/Chol (40/5/43/2/10) et PC/PC*/SM/Cer (45/5/48/2) L_β + L_d. Pour éviter la présence de cette phase gel, nous avons choisi d'effectuer nos études à 37°C.

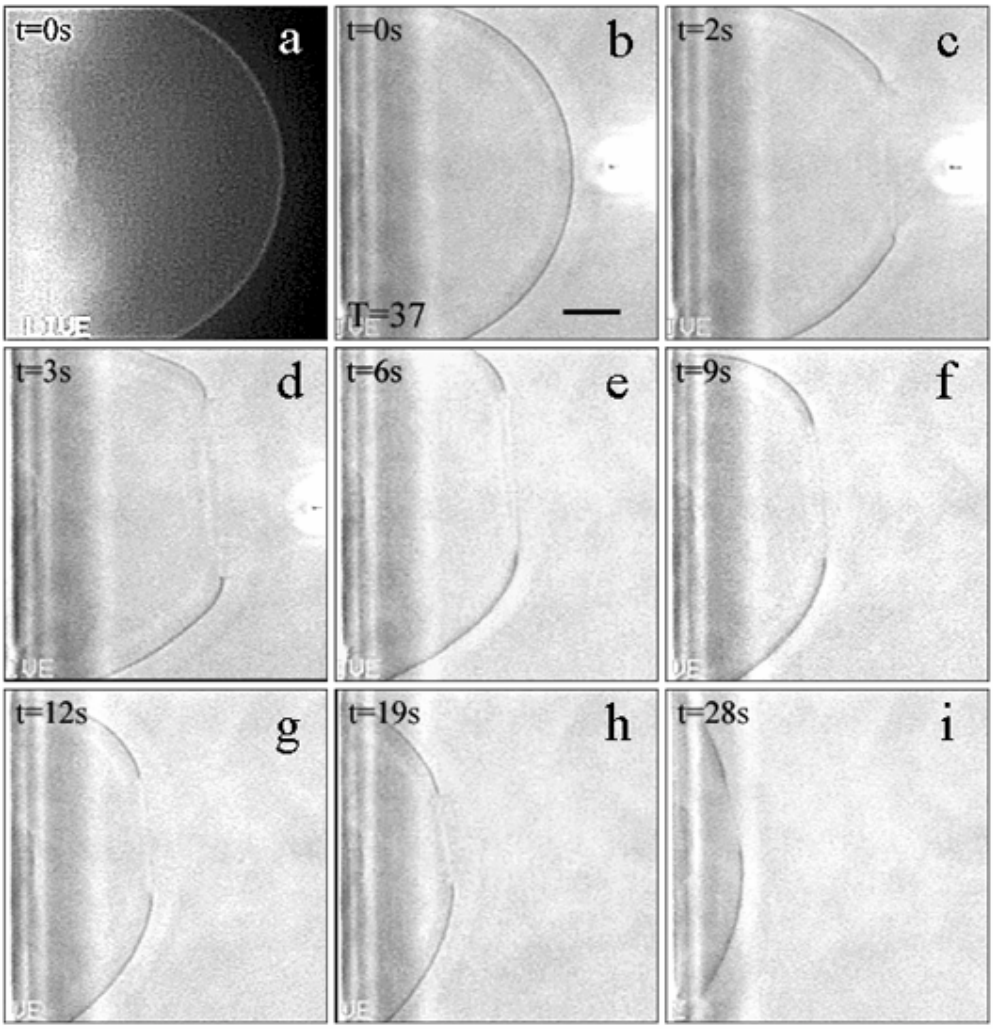


Figure III-25 Interaction de la $sPLA_2$ avec une vésicule composée de PC/PC*/SM/Cer (45/5/48/2) à 37°C (barre 20 µm)

La substitution de 2 % de SM par du Cer dans le mélange lipidique PC/SM/Cer (50:43:2) suffit à rétablir l'activité enzymatique habituelle de la $sPLA_2$ (Figure III-25). Les transformations morphologiques ressemblent à celles qui nous avons observées aux Figure III-18 et Figure III-19 bien que le rapport PC/SM soit presque équimolaire, ce qui correspond mieux au cas décrit à la Figure III-20. Deux secondes après l'injection, la vésicule s'ouvre en formant un pore géant dont le diamètre est de 60 µm (Figure III-25, b – d). La vésicule perd alors son volume à cause de l'écoulement de l'eau à travers le pore

et elle perd son aire à cause de l'hydrolyse du substrat qui entraîne la désintégration de la bicouche (Figure III-25, e – i). La substitution de 5 % de Cer dans le mélange PC/SM/Cer (50:40:5) produit un éclatement immédiat de la vésicule après l'injection d'enzyme (données non montrées).

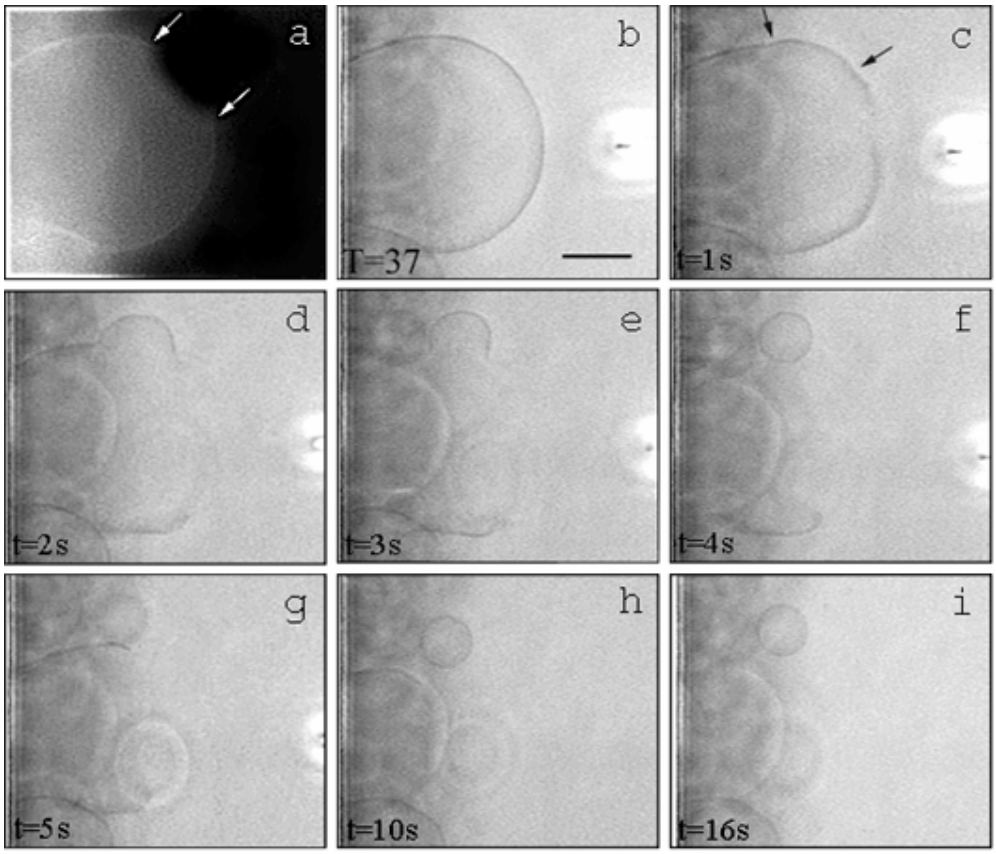


Figure III-26 Interaction de la $sPLA_2$ avec une vésicule composée de PC/PC*/SM/Cer/Chol (40/5/43/2/10) à 37°C (barre 20 µm)

En raison de l'hydrolyse enzymatique, si on substitue 2 % de SM par du Cer dans le mélange PC/PC*/SM/Cer/Chol (40/5/43/2/10), cela mène à la désintégration complète de la phase L_d (Figure III-26) contrairement au cas décrit à la Figure III-10 où cette phase restait intacte. Une seconde après la microinjection de la $sPLA_2$, le processus du bourgeonnement se déclenche (Figure III-26 c), se développe (Figure III-26, d et e) et au bout de 4 s, il se produit la fission du domaine en phase L_o (Figure III-26 f). Cette séquence permet de visualiser le rôle du Cer comme un activateur puissant de l'activité de la $sPLA_2$,

ce qui se manifeste par la perte rapide du matériel vésiculaire de la phase L_d en le transformant en monomères, micelles et petites vésicules. Cette phase est complètement désintégrée au bout de16 s (Figure III-26, f – i). Il ne reste de la vésicule mère que la petite vésicule en phase L_o.

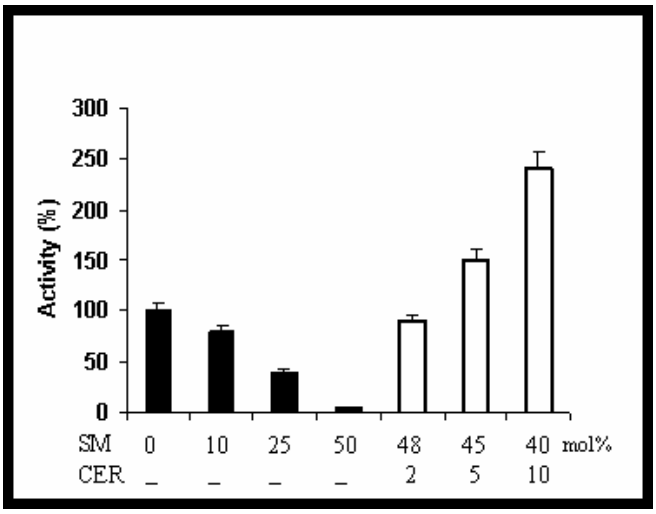


Figure III-27 Activité de la $sPLA_2$ sur SUV composées de PC et différentes concentrations de la SM et du Cer

Des études semblables ont été effectuées avec des SUV ayant la même composition en phospholipide. Ces liposomes ont été incubés en présence de la $sPLA_2$ de venin d'abeille et l'activité enzymatique a été mesurée par la détermination des acides gras libérés. L'activité de la $sPLA_2$ hydrolysant des SUV composées de EYPC est considérée comme totale (100%) (Figure III-27). En augmentant le pourcentage de SM incorporée à ces liposomes, l'activité a été graduellement diminuée. À un rapport EYPC/EYSM (1:1), l'activité enzymatique est presque totalement inhibée (inhibition de 92%). Le remplacement de la SM par 2, 5 et 10 mol% de Cer induit la réactivation de l'enzyme de 10 à 200%. 2 mol% Cer sont suffisants pour provoquer une réactivation complète de la $sPLA_2$ ce qui correspond au cas où les SUV sont composées de EYPC pure.

III.2.2 Discussion

III.2.2.1 Interaction de la $sPLA_2$ avec des VGUs homogènes, transformations morphologiques

III.2.2.1.1 VGUs composées d'une seule espèce lipidique

Une approche moléculaire

La réponse des VGUs au traitement avec la $sPLA_2$ pourrait être résumée en trois transformations morphologiques : 1) rétrécissement progressif de la vésicule; 2) rupture et désintégration complète de la membrane (éclatement de la vésicule) ; 3) rupture locale de la membrane – ouverture et fermeture des pores géants dans la bicouche. La perte graduelle de la taille vésiculaire et la désintégration vésiculaire sont un résultat imprévu. Historiquement, les expériences ont montré que les membranes (SUVs, LUVs ou érythrocytes) restent intactes et inchangées lorsque la PLA_2 hydrolyse leur feuillet externe (Jain, 1980, 1991). En fait, les études sur la cinétique d'hydrolyse des vésicules par $sPLA_2$ reposent souvent sur la supposition que les vésicules restent intactes (Jain, 1991). Les résultats sur des transformations morphologiques significatives des VGUs (Wick, 1996; Sanchez, 2002; Staneva, 2004) posent certaines questions par rapport aux assertions de longue date.

A quel point nos observations ont-elles une portée générale? Peuvent-elle être extrapolées aux expériences faites sur LUVs?

La réduction des dimensions des VGUs indique une perte de masse lipidique et un changement dramatique du volume vésiculaire. Les VGUs en l'absence de la $sPLA_2$ sont stables longtemps (au moins 24 heures) et la perte de masse doit être clairement attribuée à la formation des acides gras et des LysoPC à la suite de l'activité enzymatique. La perte lipidique est susceptible de se produire à cause de la fuite des produits d'hydrolyse ou de leur mélange avec des phospholipides intactes, sous forme de monomères, de micelles, ou de petites vésicules. Les LysoPC sont solubles dans la phase aqueuse et il a été montré qu'elles désorbent de la surface membranaire (Kupferberg, 1981; Speijer, 1996). Les acides gras ont une solubilité inférieure dans la phase aqueuse par rapport à la LysoPC. Donc, on peut supposer que les acides gras restent dans les VGUs à des concentrations plus

élevées. Cependant, à un moment donné, il faudrait que les acides gras commencent à quitter la membrane pour que la vésicule continue leur rétrécissement progressif. La perte de LysoPC a comme conséquence une diminution du volume interne des VGUs soumettant la bicouche à une contrainte qui amène une expulsion sous forme de micelles ou de petites vésicules de taille inférieure à la résolution optique de mélanges d'acide gras, de LysoPC et de phospholipides. En effet, le coefficient de partition du palmitate et celui estimé du 1-palmitoyl-lysophospholipide supposent que ces espèces désorbent de la membrane quand la concentration en phospholipide est basse (0.06 μM). En fait, ~ 99% de la LysoPC et ~ 70% de l'acide gras désorbent de la membrane (Brown, 1993; Bent, 1995). En revanche, les concentrations de phospholipide généralement utilisées dans les études sur LUVs sont presque de trois ordres plus élevées et les vésicules devraient retenir la majorité du produit hydrolysé. En retenant les produits d'hydrolyse, les membranes pourraient rester intactes comme il a été montré dans certaines études (Kupferberg, 1981). Cependant, il faut se rendre compte que les coefficients de partition dépendent de la température ou de pH et aussi de la force ionique du tampon utilisé.

L'hypothèse que l'action de la $sPLA_2$ sur la structure des vésicules peut avoir des effets significatifs n'est pas nouvelle et elle a été discutée (Burack, 1995, 1997a). Par l'utilisation de la microscopie électronique, de la ^{31}PNMR, et de la diffusion de lumière, ces auteurs ont clairement montré que les changements morphologiques fondamentaux des LUVs sont attribuables à l'addition de la $sPLA_2$ de *A. p. piscivorus.* Sanchez *et al.* (2002) ont démontré que l'addition de la $sPLA_2$ de *Crotalus atrox* sur des VGUs composées d'un seul lipide (DPPC ou DMPC) ou de mélanges lipidiques (DPPC/DPPE, DLPC/DAPC) qui favorisent la coexistence des domaines en phase gel et en phase liquide désordonnée dans un intervalle de température déterminé, amène aux changements morphologiques significatifs comme la distorsion de la membrane vésiculaire et le rétrécissement vésiculaire.

Une deuxième observation importante sur l'hydrolyse des phospholipides membranaires par la $sPLA_2$ porte sur le temps de latence d'activité enzymatique (Bell, 1989, 1996; Henshaw, 1998). Les membranes des VGUs composées d'un lipide unique, EYPC dans notre cas, se trouvent à l'état de phase L_d à 30°C. L'hydrolyse des acides gras en position *sn*-2 par la $sPLA_2$ se caractérise par une période de latence, c'est-à-dire, une

période d'activité très basse, suivie d'une accélération rapide (Apitz-Castro, 1982). Il a été suggéré que cette augmentation soudaine de l'activité est provoquée par l'accumulation des produits d'hydrolyse pendant la période de latence, ce qui change la susceptibilité des membranes à la dégradation par l'enzyme (Apitz-Castro, 1982; Burack, 1993; Henshaw, 1998). La période de latence peut durer plusieurs heures et elle s'achève quand la vitesse catalytique augmente de trois ordres de grandeur en quelques secondes. Le mécanisme exact de l'activation de l'enzyme n'est pas encore élucidé mais on a émis l'hypothèse qu'au cours de l'hydrolyse initiale, ils se forment des structures non équilibrées qui représentent des domaines enrichis en produits d'hydrolyse. La séparation latérale de phase des produits est une des causes qui provoquent une hydrolyse rapide. La séparation de phase se produit quand la fraction molaire des produits d'hydrolyse atteint 8 mol% des lipides totaux (Burack, 1994; 1997a; 1997b). Dans les monocouches, on a observé une séparation de phase à grande échelle entre la LysoPPC (1-palmitoyl-2-hydroxy-*sn*-phosphocholine) et l'acide palmitique, aussi bien que la formation des domaines dans le mélange ternaire DPPC/Lyso-PPC/PA (Maloney, 1993). Ces domaines sont chargés négativement ce qui indique qu'ils sont composés principalement de l'acide palmitique. Ces données ont été confirmées par AFM sur les bicouches (Nielsen, 2002). Les images AFM montrent la formation des domaines (les auteurs les appellent des défauts compositionnels) quand dans la bicouche (DPPC), la quantité des produits d'hydrolyse atteint 75 mol % (Nielsen, 2002). Cependant, la taille de ces domaines est assez petite et ils ne seraient pas détectables en microscopie de fluorescence. Ceci est conforme à nos résultats car nous n'avons jamais observé l'apparition de la séparation de phase après l'injection d'enzyme. Les régions enrichies en PA apparaissent comme de petites dépressions (Nielsen, 1999, 2002) à cause de la taille plus courte de la PA par rapport à celle de la PC. La diminution de longueur de la molécule provoquée par la perte de la tête polaire de PC est comparable à celle générallement mesurée (entre 3 - 5 Å). Le degré d'hydrolyse est influencé par la désorption de la Lyso PC et de l'acide gras. La formation des dépressions, due principalement à la séparation latérale de phase des acides gras, n'est absolument pas prouvée car dans la littérature, il y a des données montrant que l'enrichissement des bicouches de EYPC en LysoPC mène aussi à la réduction de l'épaisseur membranaire et la diminution de la barrière de perméabilité (Mandersloot, 1975; McIntosh, 1995) .

La présence de tels produits (LysoPC et acides gras) dans la bicouche sans enzyme même à des concentrations très élevées n'est pas suffisante pour détruire l'intégrité structurale de ces bicouches. Cela vaut aussi pour des vésicules dont l'intégrité structurale peut être atteinte même après addition de grandes quantités de produits d'hydrolyse; allant jusqu'à 40% (Bhamidipati, 1995). C'est contraire à la situation où les vésicules sont en présence d'enzyme. On observe des changements morphologiques à grande échelle et la perte d'intégrité structurale à des degrés très bas d'hydrolyse (5-10%) pendant la période de latence (Callisen, 1998). Les domaines enrichis en produit d'hydrolyse sont également stables dans les expériences d'AFM alors que l'enzyme n'a pas été ajouté. Une fois qu'il est néanmoins présent, la bicouche commence immédiatement à perdre son intégrité structurale (Nielsen, 2002).

Dans le système modèle tel que VGUs, le temps de déclenchement du rétrécissement (environ de 40 s à 2 min) et le temps total de la disparition complète de la vésicule varient sensiblement (de 1 min à 2 min selon la taille vésiculaire). Si cela est attribuable au temps de latence, la variabilité est une conséquence normale. Les études précédentes ont été réalisées sur un grand nombre de vésicules (LUV, SUV) et les résultats correspondent donc à un temps moyen. Dans nos expériences, nous avons mesuré la réponse de différentes vésicules et nos résultats ne sont donc pas directement comparables à une réponse moyenne.

Cependant, l'avantage d'observer une vésicule unique s'apparente aux approches d'une molécule unique. De cette manière, nous pouvons potentiellement obtenir une image plus complète du comportement moléculaire fondamental de ces processus. Nous pouvons mieux expliquer ce que représente la réponse moyenne. Le déroulement de la réaction est grandement dépendant des propriétés de la membrane avec laquelle la PLA_2 interagit.

La période de latence peut être modulée en variant les paramètres expérimentalement accessibles tels que concentration de Ca^{2+}, force ionique, température, composition lipidique, fluctuations de densité, la courbure vésiculaire, et aussi l'addition des produits d'hydrolyse (Fernandez, 1991; Ghomashchi, 1991; Honger, 1996; Nielsen, 2000) etc. Les changements induits par l'addition de produits d'hydrolyse et le rôle de ceux-ci pendant les différentes étapes de l'hydrolyse ont été beaucoup étudiés (Brown, 1993; Burack, 1994; 1997a; Callisen, 1998; Henshaw, 1998). Bent et Bell (1995) discutent la nécessite de la présence des acides gras à l'activation de la PLA_2. Il a été montré que

l'addition de la seule LysoPC peut faire disparaitre la période de latence. Cependant, l'addition simultanée d'acides gras et de LysoPC produit le même effet à des concentrations beaucoup plus basses. L'effet est plutôt synergétique qu'additif. Les données essentielles indiquent que la ségrégation latérale des acides gras dans la membrane est en corrélation avec l'activité enzymatique augmentée. Il est néanmoins clair que cela ne fournit pas l'explication complète du mécanisme de l'activation de PLA_2 induite par les produits d'hydrolyse car la LysoPC, à elle seule, peut mimer l'événement et car la partition de la LysoPC semble moduler (réduire) la durée de la période de latence.

Evidemment, la grande différence de durée de la période de latence dans les expériences de volume standard et celles avec VGUs est due à la spécificité de leur mise en pratique. Le plus souvent les espèces lipidiques sont très variées, les tampons contiennent des sels à concentrations différentes et par conséquent la force ionique change et enfin la courbure vésiculaire n'est pas toujours négligeable. En augmentant la quantité d'enzyme, la période de latence (la période de déclenchement du rétrécissement) commence à diminuer progressivement malgré la grande variabilité de cette valeur d'une vésicule à l'autre. Cependant comme nous l'avons indiqué dans la section « Résultats », si on choisit des vésicules de diamètre identique et si on fixe la distance entre la micropipette et le front de la vésicule, on peut trouver une quantité d'enzyme qui diminuerait la période de latence sous une seconde (la limite de la résolution temporelle de cet expérience) en passant par une désintégration complète de la membrane (Figure III-18) ou un éclatement immédiat de toute la vésicule (données non montrées) et enfin par une ouverture des pores micrométriques immédiatement après l'injection (Figure III-19). Dans ces cas, le nombre des molécules enzymatiques par unité de surface est si grand que la concentration des produits d'hydrolyse par unité de surface augmente par sauts, ce qui mène à la désintégration immédiate complète de la membrane vésiculaire. Si on diminue la quantité d'enzyme, les vésicules restent intactes ou elles se rétrécissent en réduisant au plus de 20% leur surface.

Une approche mécanique

Les LysoPC ajoutées de façon exogène sont préférentiellement localisées dans la monocouche externe des membranes cellulaires ou vésiculaires car le mouvement transversal des LysoPCs (le flip-flop) est extrêmement lent par rapport au flip-flop des

acides gras (Bhamidipati, 1995; Kamp, 1995). L'incorporation des LysoPC ou des acides gras dans la membrane lipidique mène à la formation de structures séparées de petite taille. Il a été suggéré que l'augmentation observée de la perméabilité soit intimement liée à ces structures avec des frontières perméables (Mouritsen, 1998). La perméabilité accrue causée par des LysoPC et des acides gras dépend de la longueur et du degré de saturation de la chaîne carbonée (Hoyrup, 2001). Ceci peut être mieux compris en considérant la forme conique des LysoPC. Elles ne forment pas de bicouche à cause du déséquilibre inhérent entre le volume et l'aire de la section transversale occupés par la tête polaire et par la région non polaire de la chaîne carbonée. La présence d'autres composants lipidiques qui ont une forme moléculaire contraire à celle de la LysoPC, par exemple le cholestérol, peut contrebalancer les effets de déstabilisation de la membrane lipidique causés par la LysoPC (Jain, 1980; 1981; Ramsammy, 1982). La LysoPC a une chaîne carbonée unique ce qui amène une solubilité plus élevée dans la solution aqueuse par rapport aux lipides diacylés et donc un taux d'échange plus rapide avec le volume. Le taux d'echange de LysoOPC (1-oleoyl-2-hydroxy-*sn*- phosphocholine) avec des membranes de EYPC est de l'ordre de 0,3 s^{-1} (Needham, 1995; Zhelev, 1996), tandis que le lipide diacylé est pratiquement nonéchangeable. Structurellement, la LysoOPC est très compatible avec la bicouche et elle est placée de manière à ce que sa tête polaire soit dans le même plan que les têtes polaires des lipides diacylés (McIntosh, 1995). Cette description géométrique de la LysoPC va nous permettre de mieux expliquer comment mécaniquement elle induit la déformation membranaire.

Au premier niveau de description, la membrane est assimilable à un simple film. On peut ignorer la présence de deux monocouches distinctes. Mécaniquement, ce film peut être courbé, comprimé ou étiré, et cisaillé. A l'équilibre et dans la limite linéaire, on caractérise les réponses à ces contraintes par les constantes k_C (module de courbure moyenne), K (module de courbure gaussienne), K_a (module de compressibilité), et μ (module de cisaillement) (les modules sont définis dans l'introduction).

La stabilité (cohésion) mécanique des membranes cellulaires naturelles est déterminée principalement par leur composition lipidique. Par exemple, la présence du cholestérol augmente la stabilité membranaire (Needham, 1990) tandis que la présence des molécules formant des micelles, telles que les LysoPC, la diminue. La stabilité

membranaire est caractérisée par la tension maximale (tension critique) que la membrane (la bicouche) peut supporter avant sa rupture. Bien que le mécanisme exact de formation de défaut membranaire soit inconnu, on sait que la stabilité membranaire est étroitement liée à l'élasticité membranaire caractérisée par le module d'expansion. La mesure des caractéristiques mécaniques montre que celles-ci changent en fonction de la composition membranaire (Evans, 1987; Needham, 1995). Cette dépendance est confirmée par la comparaison entre le changement de l'arrangement dans la région hydrophobe de la membrane en présence du cholestérol mesuré par diffraction de rayon X (McIntosh, 1978; 1989; Simon, 1992), le module d'expansion et la limite d'élasticité (Needham, 1990). Par exemple, l'addition du cholestérol à la membrane augmente l'arrangement lipidique et augmente en même temps le module d'expansion et la résistance à la traction (la limite d'élasticité).

Zhelev a mesuré le module d'expansion et la limite d'élasticité des membranes composées de EYPC en présence de LysoOPC (Zhelev, 1998). Le module d'expansion diminue de 171 mN/m pour la membrane de EYPC à 82 mN/m pour une membrane contenant 30mol % de LysoOPC. Cette diminution significative du module d'expansion, liée à la tension membranaire, est attribuée au changement de l'aire membranaire dû à l'échange de LysoOPC entre le volume et la membrane. Comme le module d'expansion, la limite d'élasticité de la membrane diminue avec l'augmentation de la concentration molaire de LysoOPC dans la membrane. La limite d'élasticité d'une membrane de EYPC est de 9.4 mN/m tandis que pour une membrane contenant 30 mol% de LysoOPC elle est seulement de 1,8 mN/m, et pour une membrane contenant 50 mol% de LysoOPC elle est encore plus petite, de l'ordre de 0.07 mN/m. La diminution de la limite d'élasticité est couplée à une diminution du travail pour la rupture membranaire lequel change de 4.3×10^{-2} kT pour la membrane de EYPC à 2×10^{-6} kT pour une membrane avec 50 mol% de LysoOPC. De façon générale, ces résultats prouvent que la diminution du module d'expansion en présence des molécules échangeables est une propriété fondamentale pour toutes les membranes et dépend de l'aire occupée par ces molécules.

Le travail a effectué pour rompre une membrane de EYPC est de l'ordre de 0.045 kT. Cette valeur est 20 fois plus petite que kT ce qui suggère que le processus de rupture membranaire n'est pas un événement causé par une molécule unique mais qu'il implique un grand nombre de molécules (Needham, 1990). À cet égard, la rupture

membranaire est considérée comme une réaction chimique de premier ordre caracterisée par une energie de barrière. Zhelev estime que par ces expériences on ne peut pas mesurer le changement total de l'énergie de Gibbs. Cependant, il considère que le travail nécessaire à la rupture donne le changement de l'énergie de Gibbs de l'état initial jusqu'à la rupture. Il suppose donc, que le changement de l'énergie de Gibbs pendant la transition de l'état initial soumis à une contrainte, à l'état activé de pore est semblable pour toutes les membranes. Dans ce contexte, le travail pour la rupture donne la différence des énergies de barrière pour des membranes contenant différentes quantités de LysoOPC. Par conséquent, l'augmentation de la concentration de LysoOPC dans la membrane diminue l'énergie d'activation nécessaire à sa rupture. Le fait que le travail pour la rupture devienne nul pour des concentrations de LysoOPC au-dessus de 50 mol% suggère que l'énergie de barrière pour la formation de défaut devient très petite et que les fluctuations thermiques sont suffisantes pour initier la rupture membranaire. Par conséquent, une augmentation de la concentration de LysoOPC au-dessus de 50 mol% aura comme conséquence une désintégration des bicouches spontanément formées et leur remplacement par des structures micellaires. Ceci est observé expérimentalement dans ce travail à des quantités plus élevées de la $sPLA_2$ par rapport au cas du rétrécissement vésiculaire.

Bien entendu, un modèle plus exact mimant l'activité de la $sPLA_2$ sur une vésicule homogène composée d'un seul lipide, est celui basé sur la mesure du module d'expansion en présence des deux produits d'hydrolyse à l'aide de la technique « micropipette ». A notre connaissance, une telle étude n'a pas encore été réalisée.

En résumé: nous avons reproduit et puis classé les trois transformations morphologiques principales que subissent les VGUs (formées de EYPC) en raison d'activité de la $sPLA_2$ dans l'ordre suivant:

1) *rétrécissement progressif de la vésicule (Figure III-17);*

2) *rupture et désintégration complète de la membrane (éclatement de la vésicule) (Figure III-18)*

3) *rupture locale de la membrane–ouverture et fermeture des pores macroscopiques géants dans la bicouche (Figure III-19)*

La première étude sur ce sujet est du fait de Wick *et al*. (1996): VGUs composées de POPC, $sPLA_2$ du venin de serpent, éclatement vésiculaire. La deuxième étude a été réalisée par Sanchez *et al.* (2002): DPPC, DMPC, DMPE/DMPC, DLPC/DAPC, $sPLA_2$ de

Crotalus atrox, rétrécissement vésiculaire. Nos résultats sont comparables. Dans ce contexte, la valeur de notre étude sur des VGUs homogènes et $sPLA_2$ n'est pas novatrice. Cependant, nous avons réussi à observer une gamme plus riche des transformations morphologiques en augmentant la quantité d'enzyme. Cette partie de notre étude a plutôt une valeur de contrôle pour nous. Dans la discussion précédentep nous avons essayé de chercher le parallèle sur l'activité de la $sPLA_2$ entre les VGUs et les LUVs (études en volume), et les monocouches et les bicouches.

III.2.2.1.2VGUs composées de deux espèces lipidiques

Le rôle inhibiteur de la sphingomyéline

Les résultats des études précédentes ont montré que l'inhibition de la $sPLA_2$ par la SM n'est apparemment pas due à un changement de la fluidité de la matrice de phospholipide servant comme substrat (Koumanov, 1997). L'augmentation de la densité d'empilement et de la viscosité à la région hydrophobe dues aux chaînes saturées de SM, ne peut expliquer le bas niveau d'accessibilité ou d'activité de l'enzyme. Ceci est confirmé par utilisation de la D-DPPC (D -α - Dipalmitoyl phosphatidylcholine), un énantiomère non hydrolysable de DPPC capable de rigidifier les bicouches de glycérophospholipides jusqu'à un degré à peu près identique à celui provoqué par la SM. Les expériences faites avec ce lipide n'ont montré aucun effet modulateur sur l'activité de la $sPLA_2$ (Koumanov, 1997). De cette manière, l'effet non spécifique de la SM étant éliminé, il était fortement probable que l'inhibition de la $sPLA_2$ soit due à un effet plus spécifique de la SM sur la réaction enzymatique.

Koumanov *et al.* (1998) ont observé que la SM inhibe la $sPLA_2$ indépendamment du fait que le sphingolipide soit co-dispersé avec le substrat avant l'incubation ou qu'il soit ajouté séparément sous forme de liposomes purs. D'ailleurs, on a observé que l'inhibition est immédiate dès que la SM est présente. Les auteurs concluent que l'interface créée par la SM entre en concurrence avec le substrat (les glycérophospholipides) pour se lier à la $sPLA_2$. Quand des liposomes de SM sont ajoutés après le substrat dans le milieu d'incubation, l'activité de la $sPLA_2$ diminue très rapidement ce qui indique que l'enzyme peut être aisément déplacée de l'interface du substrat hydrolysable par la SM. Dans ce cas, il pourrait s'agir d'un mécanisme selon lequel l'activité enzymatique serait réglée par la

partition de la $sPLA_2$ entre l'interface de la SM et l'interface du substrat. L'affinité de l'enzyme pour une interface pure de SM a été démontrée par des expériences de « binding » de la $sPLA_2$ (14 kDa) sur des phospholipides différents (Koumanov, 1998).

Sur la base de ces données nous pensons que l'enzyme interagit spécifiquement avec la SM et par conséquent, que la SM se comporte comme un inhibiteur compétitif, en séquestrant l'enzyme.

L'augmentation du pourcentage de la fraction de SM dans les vésicules amène une augmentation du temps du délai avant le commencement de leur rétrécissement progressif que nous avons observé. Quand le rapport entre le substrat (EYPC) et l'inhibiteur (SM) est équimolaire (ou dès 40 % de SM), après l'action de la $sPLA_2$, les vésicules restent intactes ou elles perdent comparativement très peu de leur aire (au plus 20 %) pendant le rétrécissement transitoire. Dans notre expérience, nous ne pouvons pas mesurer la quantité des produits d'hydrolyse et donc nous ne pouvons pas déduire une relation entre leur fraction dans la bicouche et la transformation morphologique observée. La seule déduction qu'on peut faire de ceci est que si 50 % du matériel lipidique reste intact, l'intégrité de la membrane est préservée. Wilschut *et al.* (1979) ont rapporté que LUVs composées de PC/PE (1/1) et traitées au venin d'abeille ont retenu le marqueur encapsulé dans les vésicules même si le pourcentage des produits d'hydrolyses atteint 60%. Cependant, il faut tenir compte du fait que la désorption des produits à partir de la membrane (ce qui influence la perméabilité et l'intégrité de la bicouche) dépend de la concentration molaire en lipide. Nous avons remarqué ci–dessus que la concentration en lipide dans la chambre de formation des VGUs est de l'ordre de 0.06 µM. Dans ce cas, la désorption des produits ou plus précisément le coefficient de partition lipide/eau pour la LysoPC est au moins 5 fois plus petite que sa valeur dans le cas où la concentration en lipide est dans l'intervalle milimolaire (Bent, 1995). Le coefficient de partition lipide/eau pour l'acide gras est approximativement deux fois plus grand dans l'intervalle micromolaire (Bent, 1995). Puisque le coefficient de partition de l'acide gras est plus grand que celui de la LysoPC, les acides gras sont présents dans la bicouche en excès par rapport à la LysoPC lorsque la concentration des LUVs diminue. L'équipe de Wilschut utilise des concentrations des LUVs 1mM. Cette expérience est la plus proche de la nôtre. Ces auteurs ont trouvé que pendant la période d'incubation les vésicules restent intactes même quand les membranes

contiennent de 60 % de produits d'hydrolyse. Donc, si on tient compte de la tendance de la désorption à des concentrations micromolaires, nous pouvons supposer que les VGUs perdent leur intégrité aux concentrations des produits plus petites que 60%. D'un côté, si on admet que dans le cas PC/SM (1/1) l'enzyme hydrolyse toute la fraction de PC, il est probable que la membrane soit plus résistante en raison de l'empilement plus dense à la région hydrophobe, imposé des chaînes saturées de la SM.

III.2.2.2 Interaction de la $sPLA_2$ avec des VGUs hétérogènes. La $sPLA_2$ induit le bourgeonnement et la fission des domaines en phase L_o à partir des vésicules

III.2.2.2.1 VGUs ternaires : séparation de phase L_d/L_o

Après l'injection de la $sPLA_2$, l'enzyme s'adsorbe asymétriquement sur le feuillet externe de la membrane vésiculaire car il ne peut pas traverser la bicouche lipidique. La phase L_d dans le mélange PC/PC*/SM/Chol (40:5:45:10) est enrichie en EYPC qui est un bon substrat de la $sPLA_2$. En raison de l'hydrolyse enzymatique, une molécule de PC se transforme en LysoPC et en acide gras. La phase L_o est appauvrie en substrat (PC) mais enrichie en SM qui est l'inhibiteur de la $sPLA_2$. La SM se lie à l'enzyme et le retient sur son interface vésiculaire, donc sur le feuillet externe des domaines en phase L_o.

Les acides gras ont un flip – flop très rapide de l'ordre de la milliseconde (Kamp, 1995), c'est-à-dire qu'ils vont se distribuer rapidement entre les deux monocouches à l'échelle temporelle de notre expérience. Par contre, la LysoPC a un flip-flop très lent de l'ordre de plusieurs heures (Bhamidipati, 1995) ce qui montre que pendant nos expériences, la LysoPC est distribuée principalement au niveau du feuillet externe de la membrane. La phase L_d reste intacte en raison de l'activité enzymatique ce qui suggère que s'il y a une désorption, principalement de la LysoPC, alors elle serait assez lente et sa contribution serait insignifiante. Ceci mènerait à une distribution asymétrique de la LysoPC entre les feuillets externes et internes de la membrane en phase L_d.

En raison de l'activité de la $sPLA_2$ sur la phase L_d et de son adsorption sur les domaines en phase L_o (liaison de la PLA_2 à SM), l'enzyme induit le bourgeonnement et la fission des domaines à partir des vésicules. En effet, le bourgeonnement semble être une propriété intrinsèque des membranes multicomposantes (Lipowsky, 2002). Dans une membrane biphase, la différence entre les compositions des deux phases est associée à une

différence dans la courbure spontanée. Le bord entre deux phases possède un coût énergétique proportionnel à son périmètre, l'énergie de ligne (l'énergie de bord). Cette énergie rapportée à l'unité de longueur est proportionnelle à une force, la tension de ligne. En général, la courbure spontanée et la tension de ligne fournissent une force motrice pour le bourgeonnement d'un domaine à partir de la matrice lipidique car ce processus tient compte des différences dans la courbure spontanée et il mènera à une diminution de la longueur de la frontière interphase. Si le bourgeonnement se produit réellement, c'est lié à l'effet d'opposition de l'énergie de courbure du domaine et dans le cas général, à n'importe quelle tension latérale mécanique appliquée sur la membrane (Lipowsky, 1992). L'énergie de bord d'un domaine bourgeonné est beaucoup plus petite que l'énergie de bord d'un domaine plat (ou faiblement courbé). Plus précisément, l'instabilité du domaine plat est gérée par la compétition entre la tension de ligne le long du bord du domaine et l'énergie de courbure de ce domaine.

Nos expériences indiquent que la présence des domaines en phase L_o n'est pas intrinsèquement suffisante pour que les domaines bourgeonnent même lorsque les VGUs sont flasques (ondulations thermiques présentes).

En revanche, l'adsorption de $sPLA_2$ sur les domaines foncés (liaison de l'inhibiteur SM à la $sPLA_2$) déclenche le bourgeonnement. L'effet de déstabilisation de la $sPLA_2$ pourrait être dû à la modification de la courbure spontanée locale de la membrane en phase L_o aussi bien en phase L_d. La $sPLA_2$, ajoutée par l'extérieur s'adsorbe sur la membrane vésiculaire d'une manière asymétrique, car l'enzyme ne peut pas traverser la bicouche. En raison de la contrainte asymétrique produite sur la bicouche lipidique, la pénétration partielle des molécules de l'enzyme dans le feuillet externe est susceptible d'induire une courbure spontanée (c.-à-d., un bourgeonnement vers l'extérieur). La différence dans l'adsorption de protéine entre deux phases L_d et L_o aussi bien que des modifications de la tension superficielle à l'interface bicouche lipidique/phase aqueuse pourraient également contribuer à cet effet.

Le processus de fission peut être expliqué par différentes causes.

Plusieurs études sur la $sPLA_2$ suggèrent que l'activité enzymatique est dépendante et modulée par l'état physique du substrat. N'importe quel événement qui augmente le désordre lipidique d'empilement, par exemple la ségrégation des composants membranaires et la formation de domaines subissant des transitions de phase (Burack, 1993; Bell, 1996;

Burack, 1997a; Grandbois, 1998; Jørgensen, 2002), favorisent l'activité enzymatique. Pour expliquer cette activité accrue de $sPLA_2$, beaucoup d'auteurs ont postulé l'existence de défauts sur la surface de la bicouche. Ces défauts ont été imaginés comme des cavités membranaires qui serviraient à favoriser l'affinité de l'enzyme pour l'interface et qui faciliteraient l'accès d'enzyme à l'acide gras de la position *sn-2* par la rupture de la *lattice* lipidique du substrat. Par conséquent, cette activité sur la membrane est susceptible d'être plus élevée à l'interface L_o/L_d.

Il a été bien établi que la LysoPC déstabilise la structure de la bicouche. En effet, sous son action, on a observé la diminution de la rigidité membranaire (diminution du module d'expansion), l'augmentation de sa perméabilité à l'eau, la formation de pores hydrophiles, un amincissement progressif de la bicouche et à la suite sa rupture (van Echteld, 1981; Needham, 1995; Zhelev, 1998). Récemment, Grandbois *et al.* (1998) ont visualisé par AFM une hétérogénéité membranaire (formation de canaux) apparue dans une bicouche lipidique supportée de DPPC en raison de l'hydrolyse par $sPLA_2$. Les auteurs ont conclu qu'il se produit une ségrégation dans la bicouche et que les domaines néoformés sont enrichis en LysoPC et que, par consequent, leur épaisseur est plus petite. Ils ont trouvé que la différence d'épaisseur (hauteur), entre la bicouche intacte et les domaines, était de 1,5 nm. En utilisant la même technique, Rinia *et al.* (2001) ont étudié des bicouches supportées composées de DOPC/EYSM/Chol (45:45:10 mol/mol). Ils ont constaté que l'épaisseur de la bicouche en phase L_o était plus grande (0.9±0.1) nm qu'en phase L_d. Dans notre cas, la $sPLA_2$ hydrolyse majoritairement la phase L_d parce que les domaines en phase L_o sont enrichis en SM et Chol mais pas en substrat et donc ils resteront intacts. Par conséquent, on peut considérer que la différence d'épaisseur entre la phase L_o et la phase L_d déjà enrichis en LysoPC, augmenterait au moins de 1,5 nm en raison de l'accumulation des deux effets. Tenant compte de tout cela, nous suggérons un mécanisme suivant pour la vésiculation des domaines en phase L_o induite par l'activité de la $sPLA_2$: L'adsorption de la $sPLA_2$ déclenche le bourgeonnement membranaire initial à partir des domaines L_o. La direction de la courbure (la direction du bourgeonnement) est déterminée par l'adsorption asymétrique et la pénétration partielle de la protéine dans la monocouche externe de la membrane. L'hydrolyse enzymatique commence autour du bord du domaine L_o et elle se répand dans la phase L_d. L'accumulation des produits d'hydrolyse dans la région du bord perturbe l'arrangement lipidique, ce qui mène à la formation d'une espace pour que les

molécules d'eau pénètrent plus profondément dans la bicouche lipidique. La différence d'épaisseur des bicouches à la frontière entre les domaines et la membrane en phase L_d augmente en parallèle.

A cause des effets décrits, les domaines deviennent instables, c'est à dire qu'ils se trouvent de plus en plus dans un environnement polaire (les molécules d'eau). Cependant, en ce qui concerne à l'énergie de bord, un disque circulaire plat (ou presque plat) ne représente pas l'état caractérisé par la plus basse énergie puisque le périmètre du bord peut être encore réduit si le domaine se déforme dans la troisième dimension. Il est donc soumis au bourgeonnement puis à la formation d'une vésicule à partir du bourgeon en phase L_o et enfin à la fission de cette vésicule néoformée.

Comme il a été suggéré ci-dessus, ce processus se produit en l'absence d'un flux intensif d'eau et sans mélange entre les compartiments aqueux interne et externe. Par conséquent, ce processus pourrait représenter un modèle approprié pour le bourgeonnement membranaire et la néoformation d'une vésicule.

En abaissant la température nous avons observé la tendance suivante :

- à 30°C, quand les domaines (un ou deux domaines par vésicule) passent l'étape de la demi–sphère ils se ferment régulièrement par saut et enfin ils se perdent en volume (Figure III-10, Figure III-11)
- à 20°C, (le nombre des domaines étant plus grand) après le bourgeonnement et la fission apparente, les vésicules néoformées restent souvent proches de la vésicule mère ce qui nous a amené penser qu'elles sont attachées à la membrane par un cou infinitésimal (Figure III-12) et bien visible sur la Figure III-13 (f) où la vésicule néoformée tire la vésicule mère
- à 14°C (on détecte un ou deux grands domaines faiblement mobiles en 2s exposition en fluorescence), les domaines atteignent à l'étape de la demi–sphère après qu'ils reviennent dans la vésicule (Figure III-14)

L'abaissement de la température diminue l'activité enzymatique et augmente aussi la rigidité membranaire. Cependant, même si on garde la température à 30°C et qu'on diminue l'activité enzymatique en utilisant de l'EDTA (Figure III-16), les domaines bourgeonnent mais la fission ne se produit pas. Dans les deux cas, il y a des traces d'activité. L'EDTA ne peut pas inhiber complètement l'activité de la $sPLA_2$. La

diminution de la température et l'inhibition incomplète de la $sPLA_2$ sont deux facteurs qui empêchent la fission du bourgeon. Donc à partir de ces données, on ne peut que déduire : pour produire la fission le système a besoin d'une activité enzymatique seuil. Une question demeure : est-ce qu'une inhibition complète de la $sPLA_2$ supprimera complètement le bourgeonnement ? Une réponse serait que l'effet du bourgeonnement dans le cas de la présence d'EDTA est dû à l'adsorption asymétrique de la protéine au feuillet externe des domaines ou à la faible activité enzymatique sur la phase L_d.

III.2.2.2.2 Le Céramide comme modulateur de l'activité enzymatique

Les données présentées à la section «Résultats» montrent que les transformations morphologiques des vésicules sont influencées fortement par la présence dans ces vésicules de céramide en concentrations relativement basses.

Comme nous l'avons déjà décrit, la substitution de seulement 2 mol% de SM par Cer dans des vésicules composées de PC/SM (1/1) provoque une désintégration complète de la vésicule (Figure III-25), suite à une activation de la $sPLA_2$, ce qui n'est pas le cas en l'absence de Cer (Figure III-20). La présence de 10 mol% dans les vésicules contenant 2 mol% de Cer cause un bourgeonnement plus rapide et une désintégration complète de la phase L_d laquelle reste intacte sans Cer (Figure III-10, Figure III-11).

Les études précédentes de notre groupe (Koumanov, 1997; 1998) ont montré que l'addition de la SM aux dispersions de glycérophospholipides inhibe l'activité la $sPLA_2$. Le traitement des dispersions contenant de SM avec la sphingomyélinase bactérienne a non seulement supprimé l'inhibition mais a provoqué également une augmentation de l'activité de la $sPLA_2$ au-dessus de l'activité basale (Koumanov, 1997; 1998). Ceci a été attribué à l'effet du Cer formé par l'action de la SMase.

Sur la base des données de la littérature, on peut proposer deux mécanismes par lesquels le Cer influence l'activité de $sPLA_2$: i) l'accumulation du Cer dans les membranes pourrait favoriser la liaison de l'enzyme au substrat ; ii) le Cer pourrait interagir avec l'enzyme en modulant ainsi directement son activité. Il a été montré que le deuxième mécanisme est possible, mais qu'il diminue plutôt l'activité enzymatique (Klapisz, 2000). L'effet est complètement différent de celui dû à la co-dispersion de Cer/substrat. Le Cer se lie probablement à la PLA_2 comme la SM ce qui provoque une séquestration de l'enzyme de la réaction enzymatique. Le résultat final est une diminution de l'hydrolyse du substrat.

Par rapport au premier mécanisme, Huang *et al.* (1996) ont montré que le Cer induit des défauts de phase dans les bicouches de DPPC. L'apparition des microdomaines enrichis en Cer en phase gel a été détecté aussi dans les bicouches de DMPC (Holopainen, 1997). Les auteurs ont prouvé également que la production enzymatique du Cer à partir de SM induit la formation de microdomaines dans des vésicules de DOPC à partir de 10 mol% de Cer (Holopainen, 1998). Cependant ces auteurs ont trouvé qu'au–dessous de 5 mol% Cer, il se distribue d'une manière homogène aux membranes de POPC, alors qu'au-dessus de 5 mol% de Cer, il résulte une séparation de phase et la formation des microdomaines. Le Cer agit en tant qu'activateur effectif de la $sPLA_2$ même lorsque sa présence dans le substrat n'est que 2.5 mol% (Koumanov, 2002). Cependant il n'a pas été possible de détecter la formation des microdomaines dans les mélanges contenant 2.5 mol% Cer dans ces conditions expérimentales.

D'un côté, dans notre étude, à l'échelle micrométrique, les VGUs composées du mélange PC/SM/Cer (50:48:2) (Figure III-25) sont toujours homogènes à 30°C et à 37°C, même si la concentration de Cer atteint 5 mol%. Le mélange PC/PC*/SM/Cer/Chol (40/5/43/2/10) (Figure III-26) montre une séparation de phase L_d/L_o à l'échelle micrométrique. D'un autre côté, l'étude par diffraction des rayons X montre l'apparition de faibles traces de phase gel à 30°C, lesquelles disparaissent à 37°C (absence du pic bien formé en WAXS (la diffraction des rayons X aux grands angles)) et pourtant le pic reste asymétrique (SAXS, la diffraction des rayons X aux petits angles). Ce qui nous fait penser que si ce n'est pas une phase gel, c'est probablement une faible modulation de la densité membranaire causé par les concentrations molaires basses du Cer.

Donc, le problème principal reste d'expliquer l'activité élevée de la $sPLA_2$ si des microdomaines ne sont pas formés. La tendance du Cer à subir une ségrégation provoquerait un agrégat qui se comporte comme point de nucléation autour duquel d'autres molécules sont recrutées sur la base de l'interaction entre les chaînes acyles saturées. Les phospholipides exclus de la phase lamellaire enrichie en Cer seraient les espèces moléculaires polyinsaturées. Cette hypothèse émise par Koumanov *et al.* (2002) est faite sur la base de l'analyse des acides gras libérés au cours de la réaction enzymatique. Dans nos études, nous faisons nos conclusions sur l'activité enzymatique à partir de la réponse vésiculaire au niveau des transformations morphologiques. Il faut se rendre compte que cette réponse n'est pas uniquement due à l'activité enzymatique mais aussi au changement

de l'élasticité membranaire des VGUs (modulée par des composants membranaires, l'état de phase…).

Les résultats obtenus avec SUV et VGU ont prouvé une corrélation étroite entre l'activité enzymatique et la réponse vésiculaire, présentés dans le Tableau III-1.

Composition de SUV et VGU	Activité enzymatique [%]	Transformation morphologique
PC pure	100	1) rétrécissement progressif 2) rupture et désintégration complète ou éclatement vésiculaire 3) rupture locale de la membrane et refermeture
PC/SM 75/25	40	
PC/SM 1/1	8	intacte ou une minorité perd au plus 20% d'aire
PC/SM/CER 50/48/2	92	rupture locale de la membrane accompagnée par un rétrécissement progressif
PC/SM/CER 50/45/5	au dessus 100	éclatement immédiat

Tableau III-1 Etude comparative entre SUVs et VGUs. Activité enzymatique mesurée sur SUVs et transformations morphologiques sur VGUs

En résumé : le céramide représente un activateur fort de l'activité de la $sPLA_2$. Le mécanisme exact de cette activation est encore inconnu. L'opinion très répandue est que cette activation est due de la formation des microdomaines (en phase gel) quand la concentration du Cer est au moins 5 mol%. Mais nos études et celles de nos collaborateurs ont montré que cette activation apparaît dès 2 mol% Cer ce qui provoque des transformations morphologiques drastiques des VGUs (PC/SM/Cer (50:48:2)) lors de l'attaque d'enzyme, lesquelles resteraient intactes en l'absence de Cer (PC/SM (1/1)). Cer en 2 mol% n'est pas suffisant pour former des microdomaines mais les molécules de Cer servent de point de nucléation autour duquel les espèces lipidiques plus saturées sont

distribuées en formant un gradient d'ordre au sein de la membrane. Donc, on pourrait conclure que le Cer représente une espèce lipidique qui module la densité membranaire.

III.2.2.3 Modulation du bourgeonnement et de la fission par l'activité enzymatique et par la morphologie de phase

On a déduit ci-dessus que pour que la fission se produise, le système a besoin d'une activité enzymatique seuil. Quand l'activité enzymatique est basse, on n'observe que le bourgeonnement, pas la fission. En revanche, quand l'activité enzymatique est élevée, le bourgeonnement et la fission se produisent plus rapidement (Figure III-26) que dans le cas où on observe un bourgeonnement continu, la fission et la refermerture de la vésicule mère (Figure III-10, Figure III-11). L'activité élevée mène à la désintégration rapide de la membrane en phase L_d (la partie brillante de la vésicule) qui est plutôt accompagné d'une expulsion du bourgeon (de 1 à 4s) (Figure III-26) que d'un bourgeonnement progressif (plus de 5s) (Figure III-10). Le cas limite est quand la membrane en phase L_d s'est désintégrée si vite que le domaine en phase L_o reste en dehors de celle-ci et qu'il se referme en formant une vésicule (Figure III-21). Le domaine se referme pour minimiser les interactions lipides–eau donc on observe une fermeture spontanée si l'énergie associée à l'existence d'une ligne de contact entre les chaînes lipidiques et l'eau est plus grande que l'énergie nécessaire pour courber la bicouche jusqu'à la forme sphérique. Cette condition est évidemment remplie.

Dans ces cas là, l'activité de la $sPLA_2$ est élevée en raison de la présence du Cer ou du rapport lipidique molaire (PC/PC*/SM/Chol (55:5:20:20)) ce qui suppose que la membrane en phase L_d est composée principalement du substrat. Indépendamment de la raison de la modulation de l'activité enzymatique, on obtiendra:

- *activité enzymatique insuffisante* → **bourgeonnement des domaines, sans fission**
- *activité enzymatique suffisante (activité enzymatique de seuil)* → **bourgeonnement progressif, fission des domaines et refermerture de la vésicule mère (presque intacte)**
- *activité enzymatique élevée* → **expulsion des domaines (sans bourgeonnement progressif), désintégration complète ou partielle de la vésicule mère, le domaine se referme en formant une vésicule**

Le changement de la morphologie de phase, un phénomène connu dans la littérature sous le nom de percolation des phases dans le cas d'un mélange lipidique équimolaire (PC/SM/Chol (1/1/1)) (Figure III-22), supprime complètement le processus du bourgeonnement. À 31°C, après l'injection d'enzyme les vésicules restent intactes. À 25°C, on observe la disparition des domaines brillants pourtant les vésicules restent intactes et ces domaines ne subissent pas le bourgeonnement.

Quand la séparation de phase est visualisée par le mélange EYPC/PC*/**DPPC**/Chol (40:5:45:10) à 30°C (Figure III-23), la morphologie des domaines semble la même que dans le mélange EYPC/PC*/**EYSM**/Chol (40:5:45:10) à 30°C. Cependant, après l'attaque de la $sPLA_2$, le bourgeonnement ne se produit pas. La cause principale est que la DPPC est aussi un substrat de l'enzyme. Dans ce cas, les domaines foncés en phase L_o sont aussi hydrolysés comme la phase L_d. Donc ces domaines n'ont probablement pas les mêmes propriétés viscoélastiques avant et après l'attaque d'enzyme. Scherfeld *et al.* (2003) ont montré que les propriétés moléculaires d'empilement et les dynamiques de diffusion sont un reflet des interactions plus faibles entre PC/Chol en comparaison avec SM/Chol. Par conséquent, la DPPC est une espèce lipidique qui peut mimer la SM au niveau de la morphologie de phase. Par contre, le rôle de la SM est rigoureusement spécifique en ce qui concerne l'interaction de la $sPLA_2$ avec les membranes hétérogènes de type L_d /L_o.

III.3 Interaction de molécules actives au bord (edge-active molecules) avec des VGUs contenant des rafts

III.3.1 Résultats

III.3.1.1 Interaction de Lyso PC avec des VGUs hétérogènes

La Figure III-28 et la Figure III-29 montrent l'interaction entre des VGUs hétérogènes (mimant la coexistence des domaines en phase L_o dans la phase dominante L_d) avec la LysoPC. Sur la Figure III-28 (a et b), on voit une vésicule à la fois en contraste de phase et en fluorescence. On distingue deux domaines foncés circulaires, un grand et un petit, indiqués par les flèches blanches. Trois secondes après la première injection de la LysoPC (92 mM) à une distance d'environ 50 µm de la vésicule, les domaines en phase L_o commencent à bourgeonner. Ce processus est très prononcé pour le petit domaine (Figure III-28, c et d) tandis que le grand domaine est seulement légèrement courbé (Figure III-28, d - f). Le contour membranaire à l'endroit du domaine est plus foncé, ce qui suggère soit une membrane plus épaisse soit une membrane plus dense que le reste, ou les deux ensemble. La séquence d'images (Figure III-28 c – f) présente le bourgeonnement et la fission du petit domaine à partir de la vésicule mère. La petite vésicule détachée en phase L_o se perd rapidement dans la solution en raison des courants convectifs, ce qui gêne sa détection en régime de fluorescence. L'absence du petit domaine foncé dans la vésicule mère (Figure III-28 g) est une preuve que le bourgeonnement est apparu exactement à l'endroit du domaine. Une seconde injection de LysoPC a eu lieu 1.16 min plus tard. Le grand domaine était situé au niveau de l'équateur et il était accessible pour l'observation en contraste de phase. La Figure III-28, (h – l) montre le bourgeonnement du grand domaine mais la fission ne se produit pas et le domaine revient à sa place initiale (Figure III-28 l). La courbure du domaine ne revient pas complètement à sa valeur initiale. Après la troisième injection de LysoPC à 4.08 min, le bourgeonnement recommence (Figure III-28 m), se développe (Figure III-28 n – p), mais dans ce cas-là, la forme du domaine change au cours du bourgeonnement. Elle ne reste pas sphérique comme dans les expériences avec la $sPLA_2$. Le bourgeon en phase L_o prend une forme allongée,

axisymétrique et son contour subit des fluctuations. Ce fait suggère que la LysoPC est partitionnée au niveau de la phase L_d aussi bien qu'au niveau de la phase L_o. Le bourgeonnement se termine avec la fission de la vésicule en phase L_o (Figure III-28 q). Pendant le processus de bourgeonnement la vésicule mère en phase L_d fluctue aussi (Figure III-28, o – q) et après la fission elle se rétrécit progressivement (Figure III-28 r). L'image prise en fluorescence (Figure III-28 r) présente l'absence du signal fluorescent à l'endroit de la vésicule détachée aussi bien que l'absence du domaine foncé dans la vésicule mère.

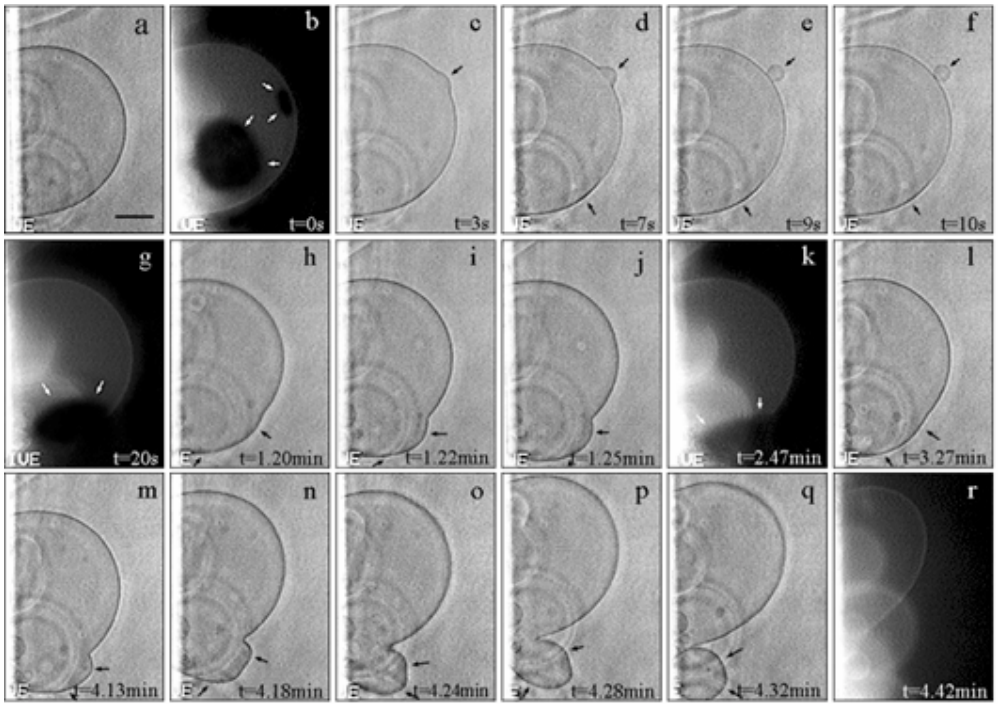


Figure III-28 Bourgeonnement et fission des domaines en phase L_o induits par la LysoPC à partir d'une vésicule composée de PC/PC*/SM/Chol (40:5:45:10) à 30°C (barre 20 µm)

La Figure III-29 montre aussi une vésicule après l'injection de la LysoPC. La séquence d'images décrit tout le processus expérimental des transformations morphologiques des domaines en phase L_o après l'injection de la LysoPC à une distance d'environ 50 µm de la VGU afin d'éviter la pression hydrodynamique sur la vésicule. Dans la Figure III-29 (a1 - a7, b1 - b8, c1 - c4, d1 - d3, e1 - e13), les lettres présentent les différentes injections et les chiffres le développement du processus après ces injections.

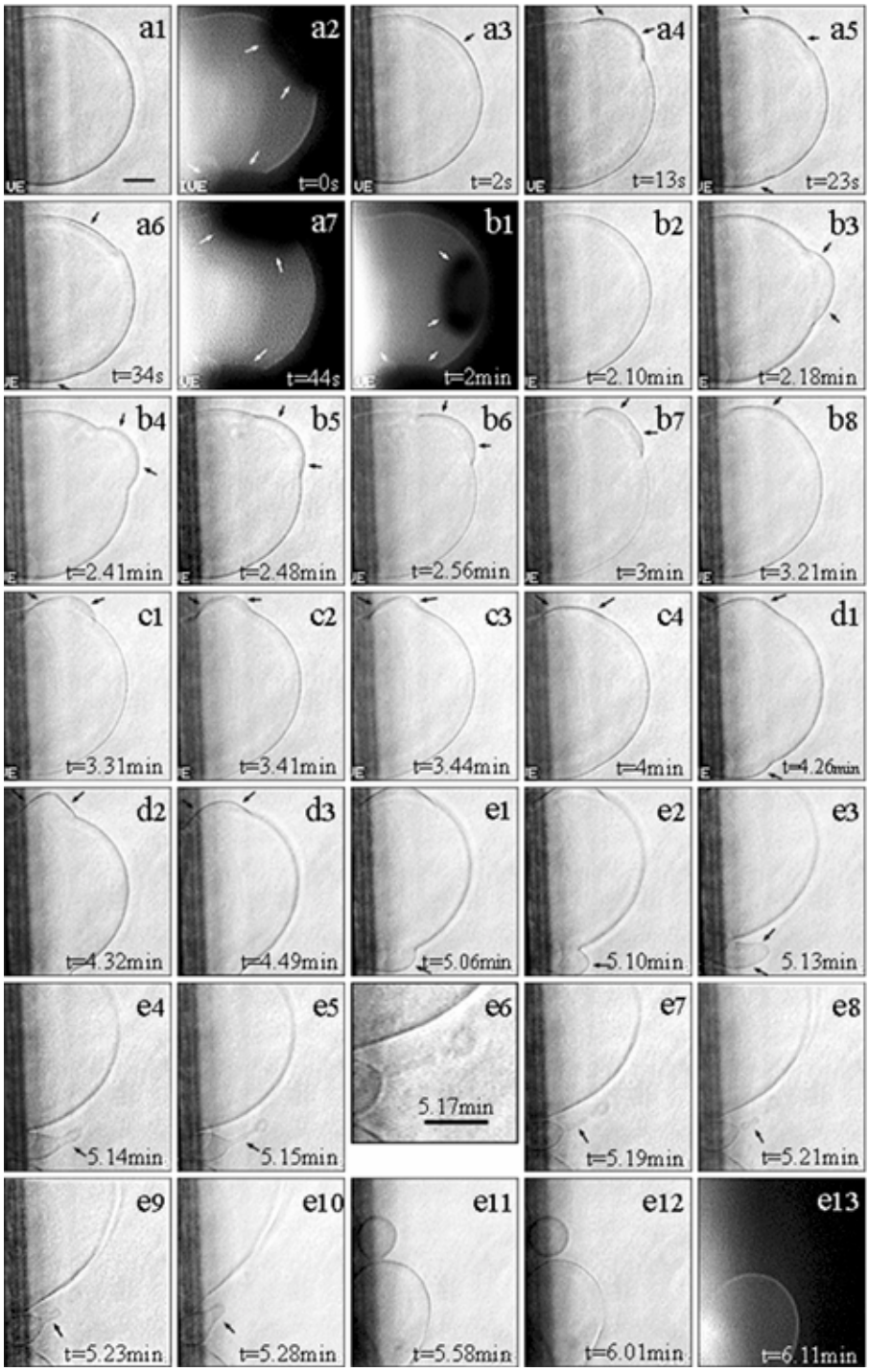


Figure III-29 Bourgeonnement, transformations morphologiques du bourgeon et fission des domaines en phase L_o induits par la LysoPC à partir d'une vésicule composée de PC/PC*/SM/Chol (40:5:45:10) à 30°C (barre 20 µm)

Sur la Figure III-29 (a1 - a7), nous observons le bourgeonnement d'un domaine situé à l'équateur durant lequel le contour du bourgeon reste lisse et étiré (Figure III-29 a4). La fission ne se produit pas. Le domaine retourne à sa position initiale dans la vésicule mère (état pas complètement réversible). La séquence d'images (Figure III-29, b1 - b8, c1 - c4, d1 - d3) montre qu'à un moment donné durant le bourgeonnement, le domaine s'amollit et on peut observer des ondulations thermiques. Le bourgeon subit des transformations de type «selle de cheval» (Figure III-29, b7, c1 - c3, d1 et d2). Après la dernière injection l'un des domaines bourgeonne mais la forme du bourgeon pendant l'événement n'est pas sphérique ou globulaire. Il prend dans un premier temps une forme ovale (Figure III-29 e1 - e3) et après la fission du domaine, il s'allonge encore puis subit l'instabilité de type « perle » (connue dans la littérature sous le nom « pearl instability »). Il s'agit d'une transformation de forme tubulaire (Figure III-29, e4 et e5). Son pincement se fait à intervalle régulier (Figure III-29 e6) et finit par se détacher en plusieurs vésicules (Figure III-29, e7 et e8). Lors de l'étape finale, il y a une fusion de certaines vésicules, détachées du tube (Figure III-29, e9 et e10). Les images (Figure III-29, e11 - e13) montrent la fission du deuxième domaine en contraste de phase aussi bien qu'en régime de fluorescence. Aucune trace du signal de fluorescence n'est observée à l'endroit de la vésicule détachée (Figure III-29 e13), ce qui montre que cette vésicule se forme à partir de la phase L_o. La petite vésicule reste longtemps près de la vésicule mère. Ceci suggère qu'elle serait reliée à la vésicule mère, quasi-sphérique, par un cou infinitésimal.

En généralisant ces données expérimentales, on peut conclure que la lysoPC induit le bourgeonnement et la fission des domaines en phase L_o et le bourgeon subit aussi des transformations morphologiques complémentaires (décrites ci-dessus).

III.3.1.2 Interaction de détergents avec des VGUs hétérogènes

III.3.1.2.1 Brij 98 à 34°C

Pour ces expériences les VGUs ont été formées de EYPC/PC*/SM/Chol (55/5/20/20) à 34°C (Figure III-30, Figure III-31). Dans le premier chapitre de la section « Résultats », nous avons expliqué pourquoi nous avons effectué nos études à 34°C. Juste après la formation des vésicules, la coupure du champ électrique alternatif et l'ouverture de la chambre de préparation, la température peut varier d'un intervalle de ± 1°C même si on

prend des précautions en augmentant progressivement la température du thermostat. On observe alors à 34°C plusieurs domaines d'une taille plus petite (Figure III-30 b). Si on laisse les vésicules plus longtemps à cette température, les petits domaines fusionnent pour former un ou deux domaines plus grands dans la vésicule (Figure III-31 b). Ce phénomène ne change pas nos résultats expérimentaux et nos conclusions. Deux panneaux d'images le confirment (Figure III-30, Figure III-31).

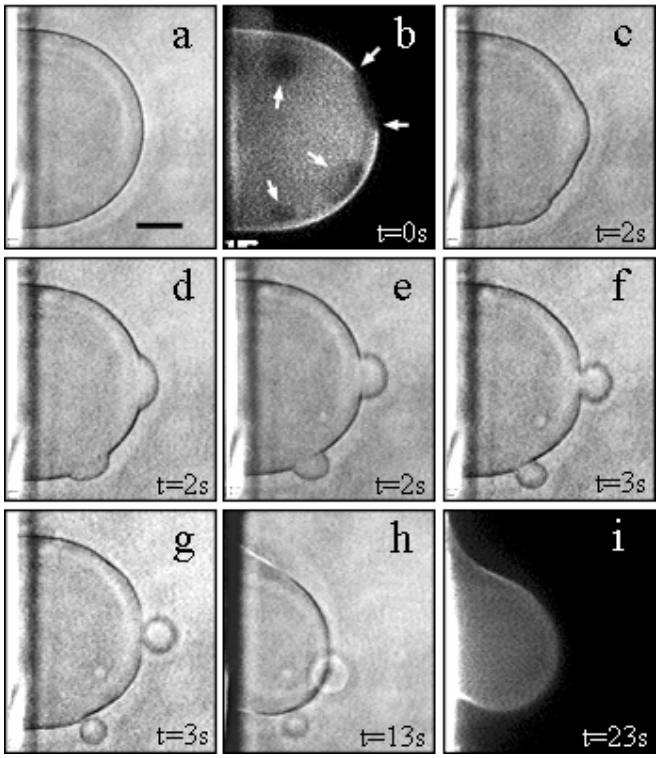


Figure III-30 Interaction de Brij 98 avec VGUs hétérogènes (PC/PC*/SM/Chol (55:5:20:20)) avec le Brij 98 à 34°C. Deux événements de bourgeonnement et de fission des domaines en phase L_o à la région de l'équateur (barre 20µm)

Une solution de Brij 98 à 15% a été injectée à une distance d'environ 50 µm de la vésicule avec les paramètres d'injection suivants : $p \approx 100$ - 200 *hpa* et $\Delta t \approx 1$ - 2 s afin que la vésicule ne subisse pas les déformations dues à l'injection elle-même. Sur la Figure III-30 (a) est présentée la vésicule contenant des rafts en contraste de phase et en (b) la même vésicule en fluorescence, les flèches indiquant quatre domaines foncés. 1s après avoir injecté le détergent à proximité de la vésicule, le bourgeonnement commence

(Figure III-30, c), se développe (Figure III-30, d - f et Figure III-31, c - e) et se termine par fission de la vésicule en phase L_o de la vésicule mère (Figure III-30, g et h, Figure III-31, f - h). La capture d'images des deux événements de bourgeonnement et de fission simultanément dans la section équatoriale coïncidant avec le plan focal est une phénomène rare à cause du mouvement relatif des domaines les uns par rapport aux autres (Figure III-30). La vésicule mère présentant la phase L_d se rétrécit (Figure III-30, g et h, Figure III-31, f - h) et perd sa masse lipidique qui se transforme alors en micelles mélangées détergent - lipide. Sur l'image en fluorescence (Figure III-30 i), on n'observe pas de domaines foncés sur la vésicule mère. Une image en fluorescence ne fournirait une information maximale dans cette expérience que si elle était accompagnée d'une image en contraste de phase (Figure III-31 h) dans laquelle la vésicule mère et la vésicule détachée resteraient dans le plan de focalisation assez longtemps pour pouvoir capturer une image en fluorescence (Figure III-31 i). Ceci est parfaitement visible sur la Figure III-31 (g et h) parce que la vésicule détachée reste reliée à la vésicule mère par un cou très fin. Dans le cas contraire cette vésicule issue du bourgeon serait emportée par les courants convectifs. L'image fluorescente (Figure III-31 i) montre l'absence de traces du domaine foncé dans la vésicule mère aussi bien que l'absence du signal fluorescent à l'endroit où se trouve la vésicule détachée, ce qui prouve l'origine de cette vésicule. Les deux domaines qui se trouvent aux régions du tropique (à l'intérieur du contour vésiculaire) se sont probablement déplacés vers les pôles et c'est la raison pour laquelle nous n'observons pas leur bourgeonnement en contraste de phase.

III.3.1.2.2 Triton X-100 à 34°C

Des injections d'une solution de Triton X-100 à 15 % ont été réalisées sur des VGUs composées du même mélange lipidique que dans l'expérience précédente à température de 34°C (Figure III-32). Dans ce cas, on observe aussi le bourgeonnement et la fission des domaines foncés exactement comme dans le cas du Brij 98 à 15%. La seule différence se produit au moment du bourgeonnement. En effet, immédiatement après l'injection, au bout de la deuxième seconde, le domaine forme momentanément une demi–sphère (Figure III-32 c) et puis en 1 s, il reprend sa place dans la vésicule.

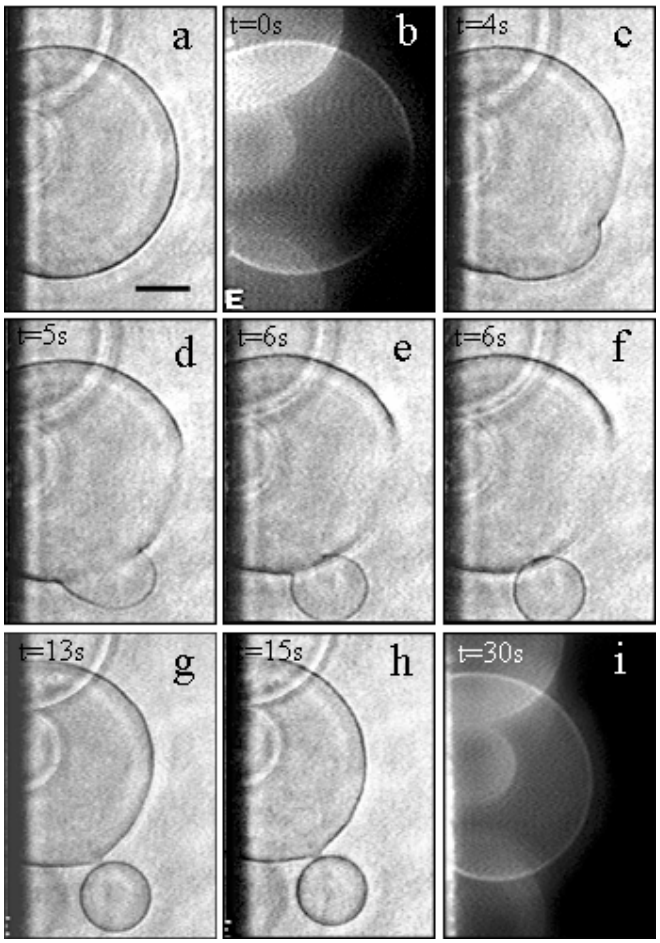


Figure III-31 Interaction de VGUs hétérogènes (PC/PC*/SM/Chol (55:5:20:20)) avec le Brij 98 à 34°C. Le bourgeonnement et la fission d'un domaine en phase L_o (barre 20µm)

La membrane présente un degré d'élasticité élevée pendant cette transformation morphologique. Après, il se produit un deuxième bourgeonnement et une fission particulièrement rapide (Figure III-32, e - h) qui s'accompagne d'une désintégration de la membrane en phase L_d. Sur la Figure III-32 (i et j), le contour membranaire est stabilisé et on n'observe plus en fluorescence de traces du domaine Lo dans la vésicule mère. Le petit domaine marqué par une seule flèche noire est situé à l'un des pôles et donc son bourgeonnement ne peut pas être observé en contraste de phase.

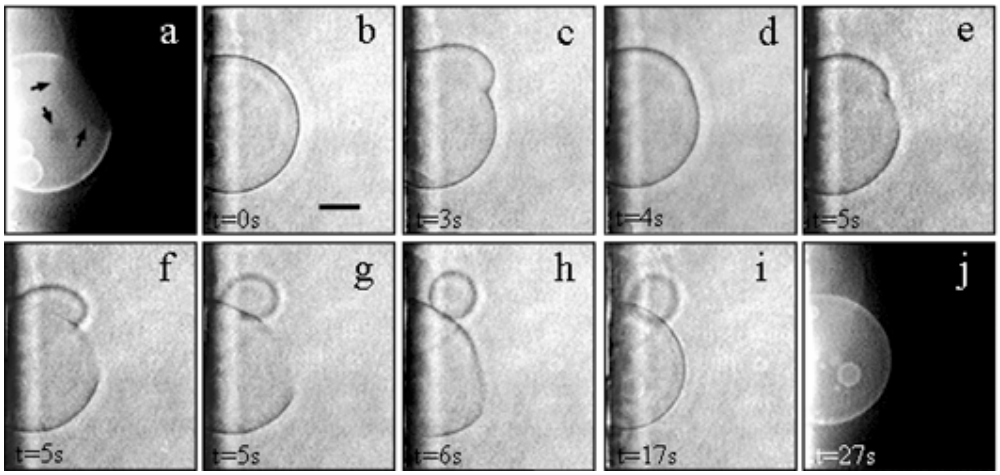


Figure III-32 Interaction de VGUs hétérogènes (PC/PC*/SM/Chol (55:5:20:20)) avec le Triton X – 100 à 34°C. Le bourgeonnement et la fission d'un domaine en phase L_o (barre 20µm)

III.3.1.2.3 Brij 98 à 4°C

Les VGUs sont composées de EYPC/PC*/SM/Chol (55:5:20:20) à 34°C. Ensuite, la température est graduellement réduite pendant 3h jusqu'à 4°C. A cette température, on observe des domaines foncés qui occupent une grande surface de la vésicule, de ¼ à ½ de la surface vésiculaire (Figure III-33 et Figure III-34, a). Lors de l'injection de Brij 98 à 15% à 4°C, apparemment le détergent ne différencie pas les deux phases et un pore micrométrique s'ouvre dans le domaine en phase L_o (Figure III-33, c - f) mais se referme rapidement. Les bords de ce pore se courbent à l'intérieur de la vésicule afin de minimiser leur contact avec les molécules d'eau. En rencontrant la bicouche lipidique, il se forme un long tubule fermé (Figure III-33 g) qui subit une transformation morphologique appelée «le bourgeonnement inversé» (inversed budding) en transformant un discocyte en un stomatocyte (Figure III-33, g - l). Quand le pore micrométrique se referme, le domaine en phase L_o bourgeonne (Figure III-33, g et h) et à partir d'un certain moment le processus s'arrête et on observe une rétraction progressive du bourgeon (Figure III-33, i - l).

Pendant la formation du pore et la transition du tube au stomatocyte, la vésicule en phase L_d se rétrécit progressivement (Figure III-33, c - l). A 16s, elle éclate soudainement en formant des micelles ou des petites vésicules (Figure III-33, m - o). Nous avons observé également d'autres types de transformations morphologiques, par exemple, l'éclatement de la vésicule et sa désintégration complète, sans que le détergent différencie les deux phases.

C'est probablement la variation relativement petite de la composition des VGUs qui favorise les différentes propriétés viscoélastiques de la membrane. Ces deux transformations ont été les plus communes dans la grande population des vésicules injectées avec du Brij 98 à 15% à 4°C. On a observé aussi une dépendance de la tension membranaire. Quand les vésicules sont tendues, c'est-à-dire dans le cas où il est difficile de visualiser les ondulations thermiques, après l'attaque du détergent, les vésicules éclatent mais certains domaines subissent le bourgeonnement et la fission.

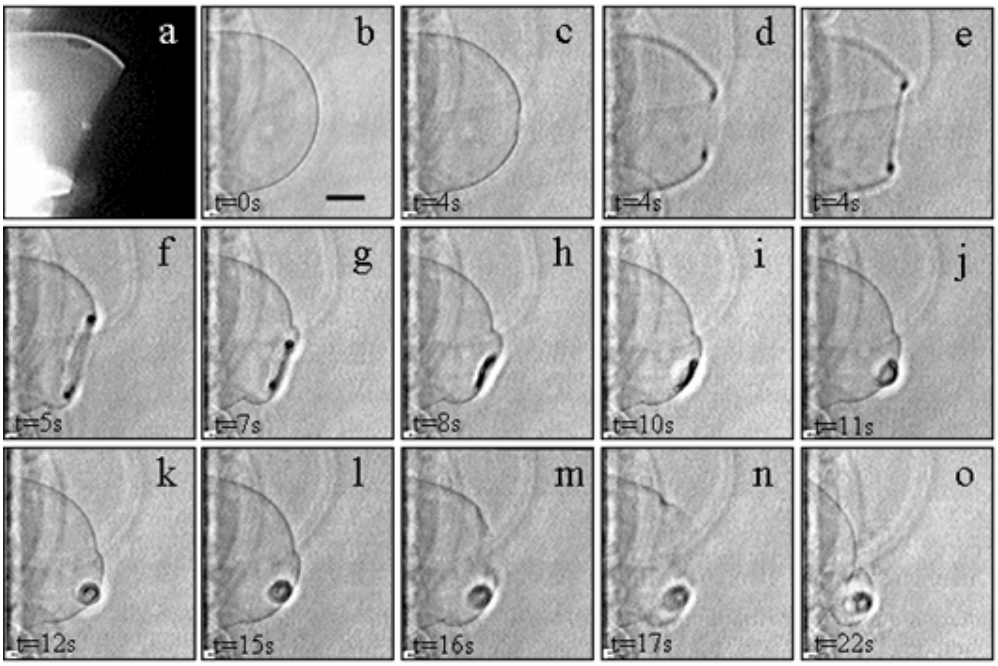


Figure III-33 Interaction de VGUs hétérogènes (PC/PC*/SM/Chol (55:5:20:20)) avec le Brij 98 à 4°C. La rupture d'un domaine en phase L_o accompagné d'un bourgeonnement sans fission (barre 20µm)

III.3.1.2.4 Triton X-100 à 4°C

A la différence du Brij 98, le Triton X-100 à 15% à 4°C fournit des résultats nettement reproductibles (Figure III-34) en ce qui concerne la transformation morphologique. Les domaines foncés bourgeonnent toujours et la vésicule formée à partir du bourgeon (en phase L_o) est exclue de la phase brillante (L_d). De cette façon, sous l'attaque du Triton X-100, les deux phases coexistant dans la membrane se séparent en

vésicules en phase liquide uniforme ; au moins à l'échelle micrométrique, ce qui représente les limites de notre résolution optique.

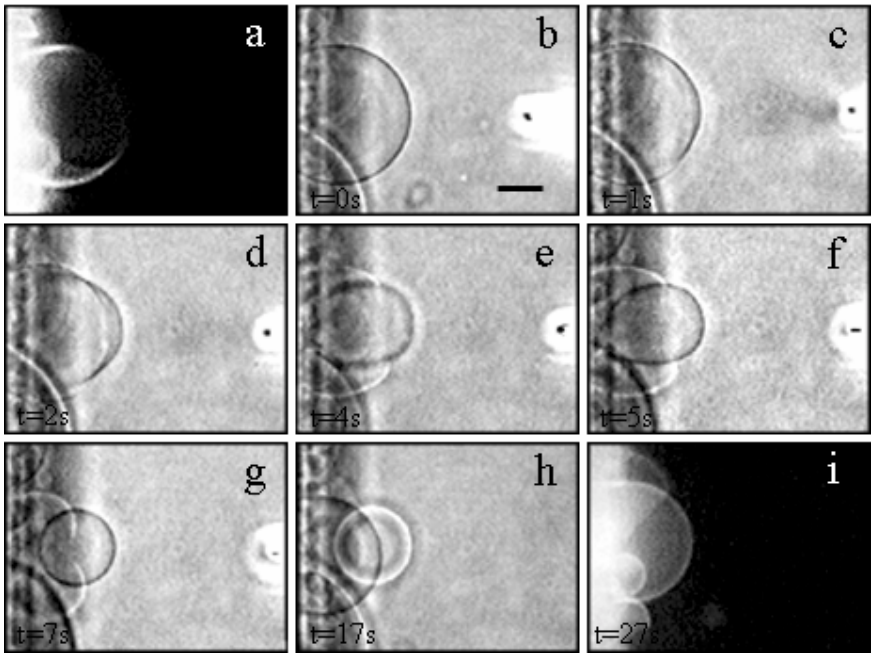


Figure III-34 Interaction de VGUs hétérogènes (PC/PC*/SM/Chol (55:5:20:20)) avec le Triton X – 100 à 4°C. Le bourgeonnement et la fission d'un domaine en phase L_o (barre 20µm)

III.3.2 Discussion

Mécanisme possible et Modèle pour le bourgeonnement et la fission des domaines en phase L_o

Récemment nous avons démontré (Staneva, 2004), chapitre III.2), que la $sPLA_2$ de venin d'abeille était capable de déclencher, développer et finaliser le processus du bourgeonnement et de la fission des domaines en phase L_o à partir d'un système modèle (VGU). Nous avons postulé que l'un des produits d'hydrolyse-la LysoPC s'accumule à l'interphase L_d/L_o. Ceci suggère une perturbation de l'empilement lipidique à cette frontière: la différence d'épaisseur des deux bicouches augmente, la perméabilité à l'eau augmente aussi, il se forme des pores hydrophiles résultant de la présence de la LysoPC. Cette dernière est une molécule conique d'asymétrie stérique positive caractérisée par la

formation d'une courbure spontanée c_o positive en monocouche. Comme elle se localise exactement aux bords libres des membranes et que sa présence diminue l'énergie de bord des pores, la LysoPC peut être considérée comme une molécule tensioactive. Nous utiliserons le terme de «molécules actives au bord » (edge active molecules) qui est le plus souvent employé dans notre domaine de recherche. Afin d'élucider le mécanisme moléculaire du phénomène de bourgeonnement et de fission des domaines en phase L_o induits par un agent biologique comme la $sPLA_2$, nous avons émis l'hypothèse que les molécules coniques, qui diminuent l'énergie de bord, sont à l'origine de ce phénomène. Les molécules qui correspondent à cette condition sont aussi les détergents.

Dans cette étude nous avons cherché les réponses aux questions fondamentales suivantes:

1) Est-ce que les molécules actives au bord déclenchent le bourgeonnement à partir des membranes hétérogènes L_o/L_d ? Quel est le mécanisme physico-chimique du bourgeonnement et de la fission dans un système modèle très simplifié constitué uniquement de lipides.

2) Si notre hypothèse était confirmée, nous pourrions montrer par visualisation directe la résistance aux détergents des domaines SM/Chol dans des vésicules géantes et leur mécanisme d'extraction à l'aide de contraste de phase et de microscopie fluorescente.

Dans le chapitre précédent nous avons supposé que la LysoPC produite par l'action de la $sPLA_2$ dans la phase L_d est la molécule qui déclenche le bourgeonnement et la fission des domaines en phase L_o. Ces domaines se caractérisent par leur courbure spontanée, la rigidité de courbure, la tension de ligne et enfin l'épaisseur de la bicouche des domaines en phase L_o est plus grande que l'épaisseur de la membrane en phase L_d.

Dans ce but un bon contrôle de cette hypothèse était l'injection directe de LysoPC exogène sur les VGUs dans lesquelles coexistent les deux phases L_d et L_o (Figure III-28, Figure III-29). Le substrat de la $sPLA_2$ se trouve préférentiellement dans la phase L_d et les produits d'hydrolyse s'accumulent dans cette phase. Les deux scénarios suivants sont possibles au sujet de l'accumulation de la LysoPC à l'interphase L_d/L_o:

1) l'enzyme se lie aux régions brillantes et hydrolyse le substrat qui compose la phase L_d d'une manière homogène (Sanchez, 2002). Un arrangement moléculaire favorable est la concentration des molécules d'asymétrie stérique positive au bord des pores ou au bord des défauts membranaires, dans notre cas à l'interphase L_d/L_o;

2) quand dans la membrane se produit une séparation de phase, apparaissent des défauts d'empilement lipidique et des fluctuations de la densité. Comme cela a déjà été décrit, la $sPLA_2$ peut être particulièrement active dans ces régions altérées, à la ligne entre les deux phases (Wilschut, 1978; Jain, 1983; Burack, 1997b), ce qui mène naturellement à l'accumulation initiale des produits d'hydrolyse à cet endroit. Dans nos études, la LysoPC, ajoutée d'une manière exogène, ne pourrait pas mimer complètement l'activité de la $sPLA_2$. L'enzyme catalyse l'hydrolyse d'une molécule PC et la convertit en LysoPC et acide gras, tandis que la LysoPC exogène s'incorpore dans la monocouche externe de la phase L_d mais aussi dans la phase L_o même si le coefficient de partition est plus faible. Néanmoins nous ne disposons pas d'une référence précise pour le rapport des coefficients de partition de la LysoPC entre les deux phases. Hoyrup *et al.* (2001) ont conclu que la grande tête polaire des lysolipides impose des contraintes additionnelles à leur partition, ce qui défavorise leur intercalation aux niveaux des membranes composées de chaînes acyles fortement ordonnées comme par exemple dans des membranes de DPPC en phase gel (à 20°C et 30°C). Nous pensons que la tendance à une partition plus élevée de la LysoPC dans la phase L_d est préservée même lorsque l'ordre des chaînes acyles en phase L_o est inférieure par rapport à la phase gel. Needham et Nunn (1990) ont mesuré un module de compressibilité des bicouches SM/Chol plus grand par rapport à la DOPC, ce qui signifie que pour la séparation des chaînes acyles en phase L_o, c.-à-d. pour surmonter la cohésion, il est nécessaire d'avoir beaucoup plus d'énergie. Ceci rend par conséquent, l'incorporation de la LysoPC énergétiquement moins favorable (Needham, 1990). L'intercalation des molécules de LysoPC dans la monocouche externe mènera à une augmentation de son aire, ce qui provoquera, par conséquent, une augmentation proportionnelle de l'aire de la monocouche interne. Cette augmentation de l'aire de la monocouche interne tandis que son nombre de molécules reste presque constant (en raison du flip – flop lent), crée une tension de monocouche. Quand l'augmentation de l'aire par molécule dans la monocouche interne atteint 5 %, la membrane va se désintégrer ou le matériel lipidique sera transféré transversalement pour que cette tension relaxe (Needham, 1996). Sans savoir si les molécules de LysoPC sont distribuées d'une manière homogène dans la monocouche externe de la membrane ou préférentiellement à l'interphase à la suite de la formation d'un défaut du aux épaisseurs de bicouches différentes *, l'accumulation de cet agent tensioactif

naturel aura lieu exactement à la frontière des domaines où l'empilement lipidique est perturbé.

* **Remarque :**

La différence d'épaisseur des deux phases L_d/L_o

Des méthodes physiques comme l'AFM ou la diffraction des rayons X aux grands angles permettent d'estimer l'épaisseur relative des bicouches en phases L_d/L_o. Rinia *et al.* ont montré par AFM que la différence d'épaisseur des deux phases dans des bicouches constituées de DOPC/SM/Chol (1:1:1) est de l'ordre de 4 Å (Rinia, 2001). Les profils de densité d'électrons indiquent que l'épaisseur d'une bicouche en phase L_d (présentée par des bicouches DOPC ou des bicouches DOPC/Chol (2/1), organisées en MLV) est de l'ordre de 9 à 11 Å inférieure à celle d'une bicouche en phase L_o (présentée par DRM isolées de DOPC/SM/Chol (1/1/1)) (Gandhavadi, 2002). Bien que les auteurs aient étudié le même mélange lipidique, les différences d'épaisseur des bicouches sont dues plutôt à la résolution de la méthode physique utilisée ou à une organisation différente du substrat lipidique.

L'effet de la LysoPC

D'autre part les résultats obtenus par les rayons X présentent une diminution de l'épaisseur de la bicouche avec l'augmentation de la concentration de la LysoPC sur un système de EYPC (Mandersloot, 1975). Grandbois *et al.* ont mesuré une différence d'épaisseur de l'ordre de 1.5 nm entre les régions blanches (bicouche intacte de DPPC) et les régions grises attribuées aux produits d'hydrolyse suite à l'action de la PLA_2 (Grandbois, 1998).

Par conséquent la frontière du domaine sera la région où un grand nombre de nanopores seront formés pendant une période courte. En effet, l'utilisation de technique « micropipette » et les mesures effectuées sur l'échange de LysoPC avec une bicouche vésiculaire (Zhelev, 1998) fournissent la preuve directe de l'apparition des nanopores dans la membrane vésiculaire. Avant la formation des pores hydrophiles par des études de simulation, on observe un amincissement significatif de la bicouche (Figure III-35, a et b ; Figure III-36), ce qui est en accord avec les résultats expérimentaux (Mandersloot, 1975; Grandbois, 1998) et la formation de défauts en forme de fil où une chaîne de molécules d'eau traverse la membrane (Figure III-35 c ; Figure III-36). Pour que notre exposé soit

plus clair, nous avons emprunté les images présentant une simulation de formation de pore à (Tieleman, 2003; Leontiadou, 2004).

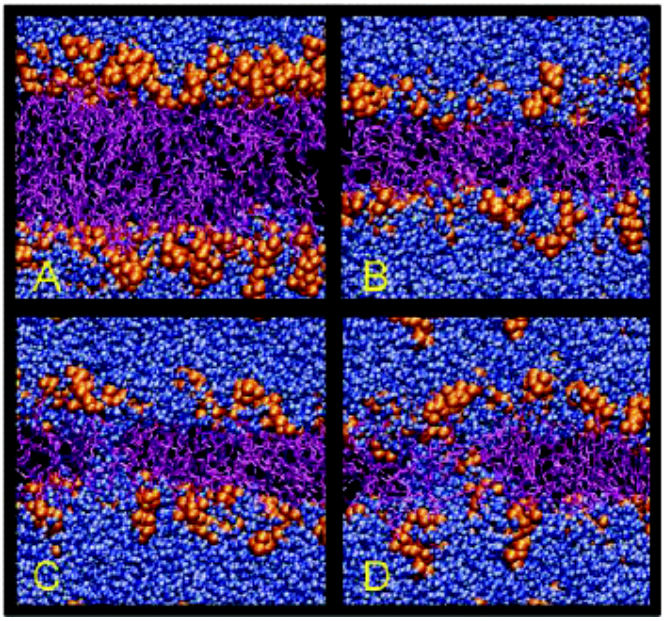


Figure III-35 Formation de pore par stress mécanique dans des bicouches de DPPC: (a) la structure initiale de la bicouche; (b) amincissement de la bicouche ; (c et d) étapes de la formation du pore et la rupture éventuelle : l'eau est montrée en bleu, les chaînes lipidiques en pourpre, et les têtes polaires en orange. D'après (Tieleman, 2003)

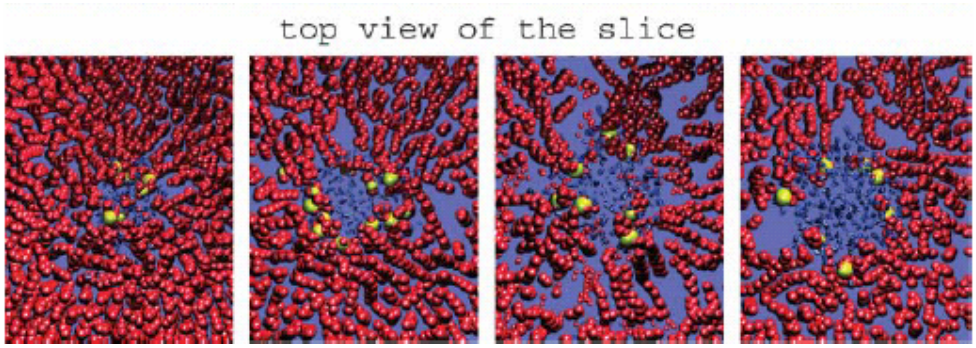


Figure III-36 Vue du dessus du processus d'expansion du pore. Les sphères oranges représentent le groupe phosphate des têtes polaires, les queues lipidiques sont en rouge et les molécules d'eau - en bleu. D'abord le pore est petit, puis avec le temps, sa taille augmente et après plusieurs *ns,* le pore occupe la majeure partie de la boîte de simulation. Enfin la membrane est considérée comme désintégrée. D'après (Leontiadou, 2004)

Si on fait une coupe verticale à l'interface au moment de la formation du pore, il se forme deux bords. L'un appartient à la phase L_d et l'autre à la phase L_o (Figure III-37). L'épaisseur du bord L_o est plus grande que celle de L_d (Figure III-37 a). Les molécules

actives au bord s'accumulent de manière coopérative dans cette région (Figure III-37, b et c). Dans les expériences avec la $sPLA_2$, la LysoPC est produite au sein de la phase L_d et elle s'accumulera au bord de la phase L_d (Figure III-37 a). Par contre quand la LysoPC est exogène, en raison du coefficient de partition plus élevé pour la phase L_d que pour la phase L_o, le bord L_o se saturerait en molécules de LysoPC plus lentement qu'au niveau de la phase L_d (Figure III-37 b). Cela mènerait à une diminution de l'énergie de bord *

*** Remarque :**

L'effet de la LysoPC sur l'énergie de bord (γ)

Les études de BLM (black lipid membrane) montrent une diminution de l'énergie de bord en fonction de l'augmentation de la concentration de la LysoPC (Petrov, 1999).

EYPC/decane (BLM), $\gamma = (0.86\pm0.04).10^{-11}$ J/m, Chernomordik *et al.* (1985), $\gamma = 0.8.10^{-11}$ J/m, Mitov (1981) et Bivas (1991).

EYPC/decane + LysoPC (BLM), $\gamma = (0.33\pm0.06).10^{-11}$ J/m, Chernomordik *et al.* (1985).

L'effet du Chol sur l'énergie de bord (γ)

Zhelev et Needham (1993) montrent que le cholestérol produit une augmentation trois fois plus grande de l'énergie de bord dans des bicouches contenant 50 mol% Chol.

SOPC (bicouche vésiculaire) $\gamma = (0.92\pm0.07).10^{-11}$ J/m.

SOPC + 50 mol% Chol, $\gamma = (3.05\pm0.12).10^{-11}$ J/m

Ainsi, l'effet du cholestérol sur l'énergie de bord est opposé à celui de la LysoPC.

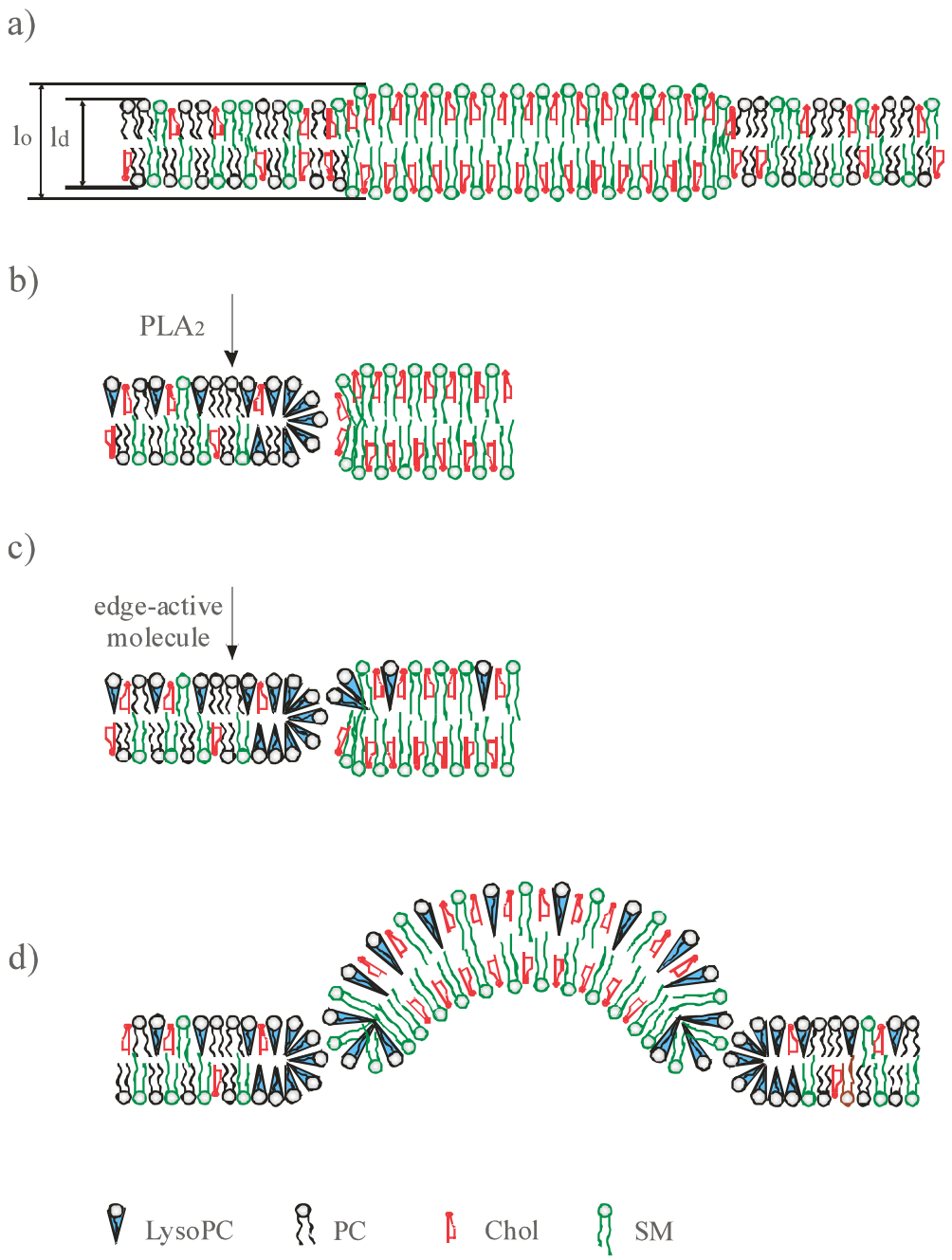


Figure III-37 Un modèle schématique du mécanisme du bourgeonnement et de la fission des domaines L_o à partir des VGUs hétérogènes, contenant de rafts, induits par l'activité asymétrique de la $sPLA_2$ et les molécules actives au bord : (a) la bicouche contenant de rafts; (b) attaque de la $sPLA_2$; (c) molécules actives au bord; (d) exclusion du domaine L_o à partir de la matrice L_d.

Dans le cas de la $sPLA_2$ comme dans celui de la LysoPC exogène, la modification du bord L_d hydrophile stable est atteinte plus rapidement que celui du bord L_o. Cependant, la géométrie réelle du pore est plus complexe : elle est semi-toroïdale (Figure III-38). Notre but est de proposer un modèle qui est cohérent avec nos résultats. Dans l'état intermédiaire de la formation du pore, la géométrie du pore est hybride (Figure III-38, B) (transition progressive du pore hydrophobe au pore hydrophile ; termes définis par Chizmadzhev *et al.* (1981)) avec des bords qui deviennent asymétriquement hydrophiles (Figure III-37, b et c). L'étape suivante est la formation d'une cascade de pores (Figure III-39). Les pores s'agrandissent par augmentation progressive de leur diamètre, mais aussi par fusion. Au fur et à mesure de la progression du processus, le périmètre du bord de la phase L_o étant en contact avec l'eau augmente progressivement. Les domaines L_o commencent à s'extraire de la matrice L_d par le bourgeonnement induit par la tension de ligne (Figure III-37 d). Les expériences avec la LysoPC exogène confirment le mécanisme suggéré car après les premières injections, les domaines les plus petits, subissent le bourgeonnement et la fission, tandis que les grands subissent le bourgeonnement mais pas la fission. Le périmètre plus petit des domaines amène la formation d'un plus petit nombre de pores c.-à-d. un plus petit nombre de molécules de LysoPC est requis pour la formation d'un bord hydrophile stable du coté de la phase L_d. Le déclenchement du bourgeonnement des plus grands domaines demande un plus grand nombre de molécules de LysoPC (nombre seuil), afin de saturer le bord L_d, ce qui arrive après des multiples injections. En parallèle de ce processus, les molécules de LysoPC s'incorporent aussi aux domaines L_o, ce qui provoque des « tremblements fins de la membrane des domaines » (connu dans la littérature sous le nom "quaking ») et des courbures de type « selle de cheval » (Figure III-28, n - p). Cette transition de l'état tendu à un état transitoire est caractérisée par des fluctuations importantes (« quaking state »), ce qui a été également observé dans des vésicules homogènes par Nomura *et al*. (2001). Les domaines s'amollissent en présence de molécules de LysoPC et donc l'énergie de bord de la bicouche L_o diminue. Etant donné que la longueur linéaire plus grande du bord exige un nombre plus grand de molécules de LysoPC pour la formation d'un bord hydrophile stable L_d, le processus de la fission des grands domaines ne se produit pas. Ces processus représentent une barrière énergétique pour la croissance du bourgeon et enfin pour sa fission.

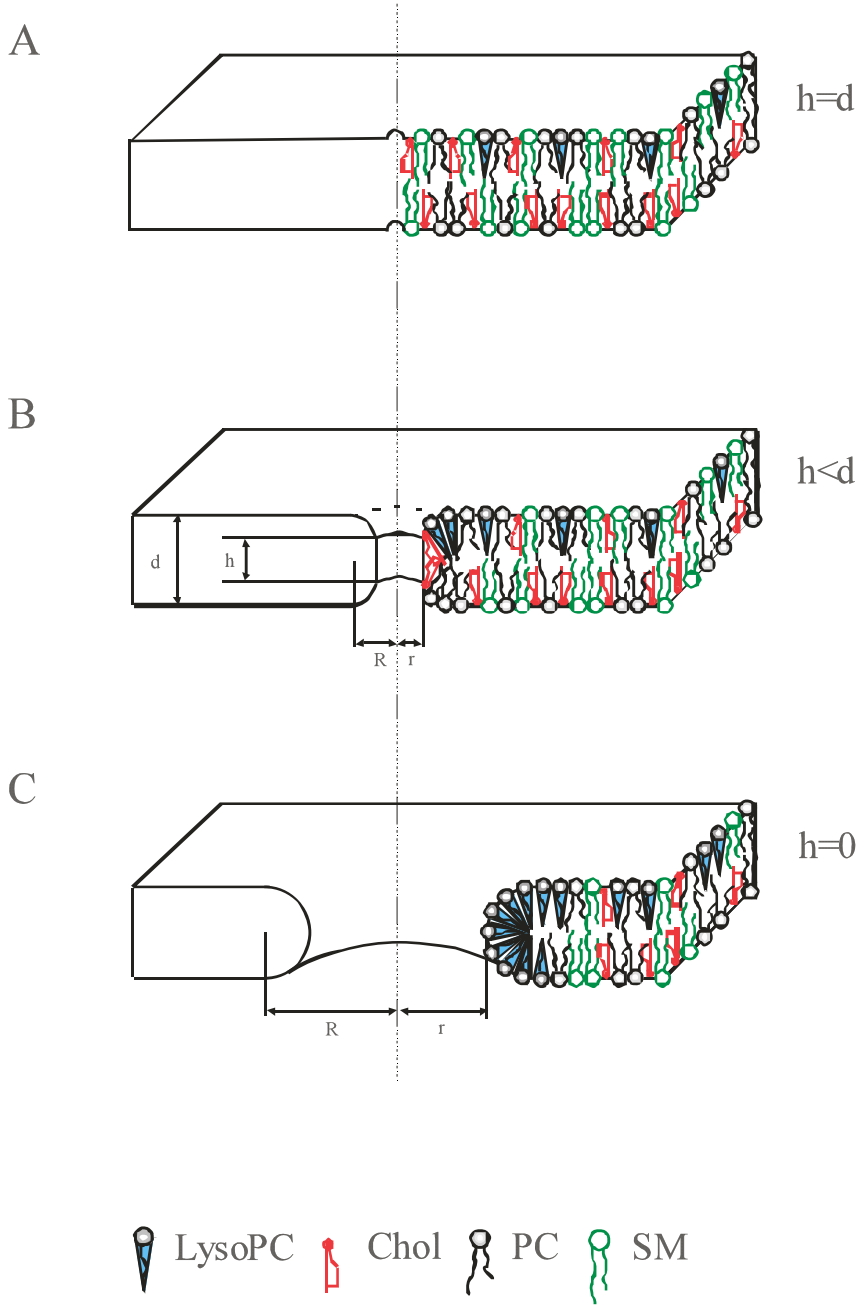


Figure III-38 Modèle des transformations structurales d'un pore suivant sa croissance: a) pore hydrophobe, *h=d* ; b) pore hybride, *h<d* ; c) pore hydrophile, *h=0* : *R* est le rayon du cercle axial de la surface toroïdale, *r* est le rayon de la section transversale fermée du pore, *d* est l'épaisseur de la bicouche et *h* est la taille de la région hydrophobe du pore

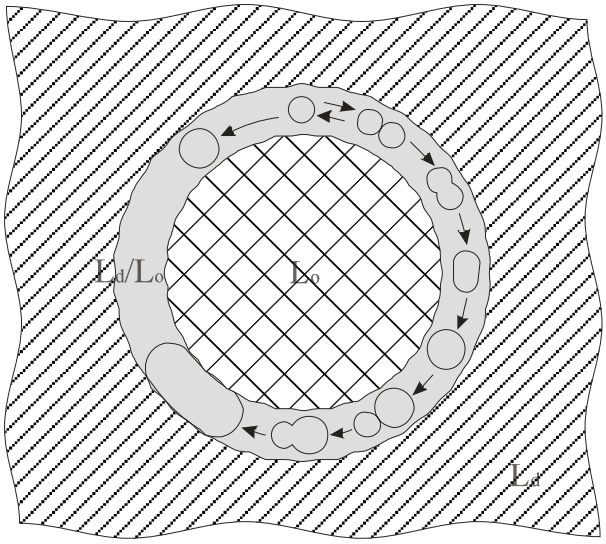


Figure III-39 Mécanisme d'exclusion des domaines en phase L_o à partir de la phase L_d. Formation de pores aux alentours de l'interface L_d/L_o

Lorsque la quantité de LysoPC aux alentours de l'interface atteint une valeur seuil (différente pour chaque domaine), les grands domaines L_o entament le bourgeonnement et la fission. Les bourgeons ne sont pas sphériques et subissent aussi des transformations morphologiques : le bourgeon s'allonge en se transformant en tube et prend un peu plus tard une forme perlée, puis les petites vésicules se détachent du tube perlé.

Pendant le bourgeonnement et la fission de grands domaines L_o, la membrane en phase L_d passe d'un état tendu à un état fluctuant (Figure III-28, o – q).

On peut se poser cependant la question de savoir pourquoi les domaines L_o subissent de transformations morphologiques de type: tube, forme perlée, courbures « selle de cheval », alors que la bicouche en phase L_d ne subit pas de telles transformations bien que les LysoPC s'incorporent préférentiellement dans cette phase.

La capacité de lyse et la perméabilité membranaire augmentée, causées par des molécules tensioactives, se déterminent essentiellement par la structure des phases de la membrane lipidique. Ceci se manifeste par une perturbation mineure et une perméabilité accrue des membranes fluides. Par contre, on observe une perméabilité augmentée de manière dramatique et une lyse quand la membrane est en état ordonné de gel (Weltzien, 1979; van Echteld, 1981). On peut donc conclure que les phases moins ordonnées ont

besoin d'une concentration plus élevée de molécules LysoPC pour que la micellisation s'effectue.

En injectant seulement de la LysoPC, nous avons reproduit le phénomène « bourgeonnement et fission » produit par l'attaque de la $sPLA_2$, décrit dans le chapitre précédent, ce qui prouve que la LysoPC est la molécule qui déclenche le bourgeonnement. Nous avons élargi notre hypothèse en supposant que les événements du bourgeonnement et de la fission sont des phénomènes fondamentaux des membranes hétérogènes déclenchés par des molécules d'asymétrie stérique positive. Comme modèle de telles molécules, nous avons choisi les détergents Triton X-100 et Brij 98 en supposant aussi que le mécanisme d'extraction des rafts à partir des cellules pourrait s'effectuer par bourgeonnement et fission. A 34°C, nous avons observé une extraction rapide des domaines L_o à partir de la matrice L_d par bourgeonnement et fission et une solubilisation partielle de la matrice L_d exactement comme dans le cas de la $sPLA_2$. Nous admettons que le mécanisme de vésiculation induit par les détergents est le même (Figure III-37). Les résultats, obtenus avec le Triton X-100 sont reproductibles en ce qui concerne la vésiculation des domaines. Par contre, ils le sont moins en traitant des vésicules avec le Brij 98 à 4°C. Ce détergent dissout les domaines en phase L_o dans moins de 50% des cas. En biologie cellulaire, les membranes résistantes au détergent (DRM) à 37°C, isolées à partir des thymocytes de souris, sont visibles sous formes de vésicules membranaires ayant un diamètre vésiculaire moyen de l'ordre de 67±39 nm (Drevot, 2002). Les domaines résistants au détergent Triton X-100 à 4°C ont un diamètre vésiculaire entre 0.5 et 1μm (Brown, 2000). Au cours de nos expériences, la taille moyenne des vésicules néoformées à 34°C sous l'attaque des deux détergents (séparément) est plus petite que celle des vésicules formées par Triton X-100 à 4°C. C'est en raison de la taille plus petite des domaines L_o à 34°C. Apparemment, les basses températures mènent à la surestimation du contenu lipidique formant les domaines si nous faisons une comparaison entre 4°C et 37°C. Dans notre système modèle, cet effet est dû aux glycérophospholipides qui ont des niveaux d'insaturation plus bas. Leur coefficient de partition est plus élevé pour la phase L_o aux températures plus basses (Schroeder and Brown, 1998). La solubilisation des domaines foncés (L_o) sous l'attaque de Brij 98 à 4°C est due probablement aux propriétés perturbées de la phase L_o en raison de l'effet décrit ci-dessus. Sot *et al.* (2002) ont observé, avec le même mélange lipidique que

le nôtre, qu'une solubilisation de 50% à 4°C exige moins de détergent qu'à 37°C, bien que le détergent utilisé ait été le Triton X-100. Dans nos expériences, la même quantité de Triton X-100 à 37°C et à 4°C induit presque la même sorte de transformation.

L'avantage principal de ce type d'expériences est la possibilité de faire une observation directe des transformations morphologiques pendant la solubilisation. Ce problème a toujours été discuté dans des expériences de volume à l'aide des SUV et des LUV en utilisant différentes techniques, par exemple, les mesures de la turbidité, la spectroscopie de fluorescence, la microscopie électronique, la cryofracture etc., pour trouver la relation entre les changements morphologiques des vésicules et les interactions moléculaires des détergents avec les phospholipides (Lasch, 1995).

La contribution principale de nos résultats est que nous avons visualisé directement la solubilisation d'une membrane hétérogène modèle (VGU) de type L_d/L_o, traitée avec des molécules d'asymétrie stérique positive (actives au bord). Ces membranes subissent le bourgeonnement et la fission ce qui mène à un tri de phase (phase sorting). La vésicule en phase L_o reste intacte et la vésicule en phase L_d (vésicule-mère) perd une partie de son aire, donc elles sont soumises à la solubilisation ultérieure.

IV Conclusions générales et Perspectives

Dans son article de 2001, Deborah Brown (2001) avait écrit: **"**Dietrich *et al.* have pioneered a new approach that allows direct microscopic visualization in model membranes of domains with properties expected of rafts. The results support the tenets of the raft hypothesis to a remarkable degree".

Notre étude est une continuation de l'etude du comportement des VGUs, contenant des domaines en phase L_o, vis-à-vis d'effecteurs différents ayant une importance au niveau cellulaire. La réponse spécifique des VGUs pourrait être exprimée par le changement de l'état de phase, la morphologie de phase lorsque deux phases différentes coexistent ou plus loin lorsque le changement au niveau moléculaire se traduit par une réponse mécanique, les transformations morphologiques des VGUs.

Dans le chapitre III.1, nous avons décrit la manière dont nous avons visualisé la coexistence de deux phase liquides L_d et L_o. La séparation latérale de phases liquides immiscibles est probablement la cause de la formation des rafts dans les membranes cellulaires. Notre laboratoire et d'autres groupes aussi, ont récemment utilisé la microscopie de fluorescence pour observer directement la coexistence de deux phases liquides dans les membranes des VGUs, composées des mélanges ternaires des lipides saturés, des lipides non saturés et de cholestérol (Dietrich, 2001; Samsonov, 2001; Veatch, 2002; 2003; Staneva, 2004). Nous avons détecté des domaines liquides à l'échelle micrométrique dans un large intervalle de températures et de composition lipidique. Nous avons étudié le changement de la morphologie de phase, de la forme et de la stabilité des domaines en phase L_o en fonction de la température, de la composition lipidique et des agents exogènes (tels que la méthyl-β-cyclodextrine et la sphingomyélinase) qui interagissent avec les membranes et modifient le taux du cholestérol (méthyl-β-cyclodextrine) ou transforment la SM en Cer (sphingomyélinase). La perturbation de la stabilité des domaines et de leur morphologie par leur désintégration est complètement différente en fonction de l'agent. Dans le premier cas, les domaines gardent leur bord toujours circulaire, ce qui veut dire que la déplétion de Chol associée intimement à la perte progressive d'aire des domaines ne mène pas à un changement de l'état de phase des domaines. Cependant, lorsque le contenu de Chol diminue progressivement, l'équilibre

chimique du système se déplace, ce qui induit le changement de la morphologie de phase. Le système passe en phase liquide uniforme. Dans le deuxième cas, pendant la désintégration des domaines, le bord prend une forme irrégulière, ce qui nous fait penser qu'il se produit un changement d'état de phase des domaines. Les domaines ne sont plus circulaires ce qui diffère de l'état original où la tension de ligne de la frontière des domaines est isotrope et alors les domaines prennent sa forme d'équilibre circulaire. La résolution effective ne nous a pas permis de définir la structure de la périphérie des domaines pendant la désintégration. Ceci suggère que des comparaisons claires, qualitatives et quantitatives entre différentes méthodes (NMR, AFM etc.) sont nécessaires, particulièrement puisque les rafts biologiques sont à l'echelle nanométrique (Anderson, 2002). Nous avons une collaboration effective avec l'équipe de Pr M. Ben Amar (Laboratoire de Physique Statistique, Ecole Normale Supérieure) afin d'élucider la corrélation entre le mécanisme d'extraction du cholestérol et la morphologie de phase. Il s'agit de l'application d'un modèle, développé par Pr Ben Amar, à partir de la théorie d'instabilité de Saffman-Taylor (Ben Amar).

Au cours de ce travail, nous avons posé les bases de certains axes de recherche importants, concernant l'étude du bourgeonnement et de la fission des domaines en phase L_o à partir des VGUs hétérogènes. Nous avons présenté les expériences modèles et nous avons décrit un mécanisme possible pour l'expulsion d'une vésicule en phase L_o due à l'activité enzymatique de la $sPLA_2$. Jusqu'à présent, le bourgeonnement et la fission ont été observé dans des systèmes modèles composées d'un seul lipide ou d'un mélange binaire (Sackmann, 1986; Berndl, 1990; Farge, 1992; Traikia, 2002). Le bourgeonnement dans un système modèle composé de mélange ternaire, mimant plus précisément la membrane biologique, a été observé seulement en fonction de la température (Baumgart, 2003). D'après nous, la plus grande valeur de notre étude représente la visualisation et la description du bourgeonnement et de la fission induits par des agents biologiques ($sPLA_2$ ou Lyso PC).

Le mécanisme du bourgeonnement et de la fission que nous avons proposé, a été construit avec la théorie de Lipowsky basée sur la tension de ligne (Lipowsky, 1992; 1993; 2002; 2003). Lorsque la tension latérale de la membrane est petite, la membrane formera beaucoup de petits bourgeons à partir des domaines fluides. En général, la courbure spontanée et la tension de ligne représentent une force motrice pour le bourgeonnement.

Cependant, cette théorie, créée uniquement pour expliquer le bourgeonnement à partir des membranes contenant deux phases liquides, n'inclut pas la contribution des protéines.

Nous avons postulé que l'un des produits d'hydrolyse, la LysoPC, s'accumule à l'interface L_d/L_o et que cette molécule déclenche le bourgeonnement en raison de sa forme conique (molécule d'asymétrie stérique positive), ce qui mène à la diminution de l'énergie de bord de la membrane en phase L_d. Les détergents sont des molécules qui correspondent aussi à cette condition. Nous avons corroboré cette hypothèse en injectant de laLysoPC exogène et des détergents. Dans ces cas là, on a observé également le bourgeonnement et la fission des domaines en phase L_o.

Une question reste ouverte: Est-ce que l'enzyme, la $sPLA_2$, a une contribution directe au déclenchement du bourgeonnement ? La $sPLA_2$ est une protéine hydrosoluble dont une grande partie de sa surface est hydrophile. Elle peut se localiser aussi à l'interface L_d / L_o (Burack, 1993; Bell, 1996; Burack, 1997a; Grandbois, 1998; Jorgensen, 2002) et sa présence pourrait favoriser la formation des pores dans cette région car la protéine diminuerait l'énergie de bord. Voilà pourquoi la protéine (ou en principe certaines protéines) peut aussi être considérée comme une molécule tensioactive et agir d'une manière semblable à la LysoPC. La protéine s'adsorbe aussi asymétriquement sur le feuillet externe de la membrane vésiculaire. Pour s'adapter à la différence d'aires entre les deux monocouches, la membrane formera des invaginations locales. Expérimentalement, cette hypothèse pourrait être vérifiée en microscopie optique par le marquage fluorescent de la $sPLA_2$. Ceci nécessiterait une camera CCD numérique, rapide et de haute résolution, adaptée pour des applications en lumière faible. Une méthode alternative est l'AFM.

Comme nous avons remarqué précédemment, la théorie de Lipowsky n'est basée que sur la coexistence de deux phases liquides et sur le fait que le bourgeonnement dans un tel système est attribué à la tension de ligne. Voilà pourquoi, nous avons engagé une collaboration avec le laboratoire du Pr Martine Ben Amar, spécialisé dans la modélisation par l'approche de physique statistique. Grâce à ce type d'approche où la contribution de la protéine est inclue, nous espérons disposer d'une modélisation du phénomène du bourgeonnement et de la fission plus proche des conditions expérimentales. La modélisation de Allain et Ben Amar (Allain, 2003) montre deux régimes: à fort couplage lorsque l'effet des protéines est non négligeable et peut déstabiliser la membrane à des

concentrations plus élevées (accessibles expérimentalement), et à faible couplage (article en préparation) lorsque l'effet des protéines n'est pas suffisant pour perturber la forme vésiculaire. Toutefois, il y a un effet des protéines sur la rigidité effective de la membrane qui conduit à un changement de la tension de ligne effective. Dans un régime de membrane tendue, comme dans notre cas, ce changement conduit à une modification de la forme du système. Il cesse d'être une sphère et il passe en état de deux calottes spheriques (mimant le bourgeonnement du domaine L_o). Le modèle théorique proposé par Allain et Ben Amar amène des perspectives et il est en train d'être perfectionné. Ce modèle pourrait être validé ou invalidé avec une protéine marquée ayant une structure semblable à la $sPLA_2$ s'adsorbant sur la membrane sans causer l'hydrolyse des glycérophospholipides.

Enfin, il a été montré que le bourgeonnement et la fission sont modulés par l'activité enzymatique et par la morphologie de phase.

Le bourgeonnement membranaire est un phénomène omniprésent, lié aux fonctions cellulaires et qui représente l'étape initiale de la formation vésiculaire pour le trafic intramembranaire des lipides et des protéines (Muniz, 1997). Le complexe de Golgi semble être un dispositif central, impliqué dans le tri des protéines des voies d'endocytose/exocytose. La biosynthèse de certains composants lipidiques importants des rafts, par exemple les sphingolipides, a lieu dans le complexe de Golgi. Les rafts enrichis en SM, en Chol et en certaines protéines, produits dans la membrane de Golgi, pourraient être triées et transportées vers la membrane plasmique suivant les étapes suivantes : la formation d'un bourgeon à partir d'un compartiment « donneur », la fission du bourgeon en une vésicule et la fusion de la vésicules avec un compartiment « accepteur » selon un processus analogue à celui de l'exocytose (Pagano, 1990). Par exemple, les vésicules transportant des sphingolipides ont été isolés à partir des cellules perméabilisées (Kobayashi, 1992). D'autre part, Bruger *et al.* (2000) présentent une preuve pour la ségrégation des sphingomyélines et du cholestérol pendant la formation des vésicules couvertes de COPI (COPI - coated). Les rafts semblent être également impliqués dans les processus d'endocytose et le transport rétrograde des composants membranaires plasmiques vers le compartiment intracellulaire. L'observation récente que ces derniers processus pourraient également se produire par un mécanisme indépendant de clathrine qui

pourraient impliquer intrinsèquement des rafts lipidiques (van der Goot, 2002) est d'importance particulière.

Le mécanisme cellulaire exact impliqué dans le trafic vésiculaire des rafts lipidiques est de nature discutable (Ikonen, 2001; van der Goot, 2002). Dans ce travail, nous avons présenté des expériences modèles et nous avons décrit un mécanisme possible pour l'expulsion d'une vésicule en phase L_o due à l'activité de la PLA_2. La conséquence de cette activité est le tri de phase. Ceci nous a amené à la supposition que, indépendamment d'autres facteurs possibles (p.e. l'aminophospholipide-translocase, qui crée une asymétrie transitoire par rapport à la concentration lipidique (Farge, 1999)), la présence de la PLA_2 active dans la cellule pourrait être un facteur important pour le déclenchement, le développement et l'achèvement du processus de la formation des vésicules de transport à partir des rafts des membranes intracellulaires. Par exemple, la PLA_2 pourrait jouer un rôle important dans le transport direct des rafts de Golgi vers la membrane plasmique au moyen d'une « navette » de vésicules. L'efficacité de ce transport direct possible serait d'importance cruciale pour l'assurance des fonctions de rafts, dans la membrane plasmique, en tant que plateformes accumulant une grande variété de protéines biologiquement actives.

Une autre contribution principale de nos études est que nous avons visualisé directement la solubilisation d'une membrane hétérogène modèle (VGU) de type L_d/L_o, traitée avec des détergents. Ces expériences ont démontré que l'isolement de DRM par des détergents n'est pas probablement un artefact. Ce processus dans des systèmes modèles s'effectue par un bourgeonnement et une fission des domaines en phase L_o à partir des membranes hétérogènes de type L_d/L_o, ce qui mène à un tri de phase. Les vésicules néoformées sont en phase liquide uniforme. Bien sur, quand il s'agit de telles comparaisons, il devrait être pris en compte que l'isolement de DRM à partir des membranes cellulaires, qui à la différence des membranes artificielles contiennent également des protéines, pourrait etre changé.

Nous espérons continuer nos recherches sur la dynamique des rafts au sein des VGU sur des modèles comportant des protéines incorporées dans les rafts, ce qui nous rapprocherait de la réalité cellulaire. Cela, évidement, ne pourrait se faire que par une large coopération avec des équipes ayant le savoir faire nécessaire.

Références

Ahmed, S. N., D. A. Brown, and E. London (1997). "On the origin of sphingolipid/cholesterol-rich detergent-insoluble cell membranes: physiological concentrations of cholesterol and sphingolipid induce formation of a detergent-insoluble, liquid-ordered lipid phase in model membranes." Biochemistry **36**: 10944-10953.

Allain, J.-M., and M. Ben Amar (2003). "Bi-phasic vesicle:instability induced by adsorption of proteins."

Almeida, P. F., W. L. Vaz, and T. E. Thompson (1992). "Lateral diffusion and percolation in two-phase, two-component lipid bilayers. Topology of the solide-phase domains in-plane and across the lipid bilayer." Biochemistry **31**: 7198-7210.

Anderson, R. G. W., and K. Jacobson (2002). "A role for lipid shells in targeting proteins to caveolae, rafts, and other lipid domains." Science **296**: 1821-1825.

Angelova, M. (2000). "Liposome electroformation. In: Luisi, P. L., Walde, P. (Eds.), Giant Vesicles, Perspectives in Supramolecular Chemistry." **6**(Wiley, Chichester): 27-36.

Angelova, M., and D. Dimitrov (1986). "Liposome electroformation." Faraday Discuss Chem Soc **81**: 303-311.

Angelova, M., S. Soleau, P. Meleard, J.- F. Faucon, and P. Bothorel (1992). Prog. Colloid. Polym. Sci **89**: 127-131.

Apitz-Castro, R., M. K. Jain, and G. H. De Haas (1982). "Origin of the latency phase during the action of phospholipase A2 on unmodified phosphatidylcholine vesicles." Biochim. Boiphys. Acta **688**: 349-356.

Bagatolli, L. A., and E. Gratton (2001). "Direct observation of lipid domains in free-standing bilayers using two-photon excitation fluorescence microscopy." J. Fluorescence **11**: 141-160.

Bagatolli(a), L. A., T. Parasassi, and E. Gratton (2000). "Giant phospholipid vesicles: comparison among the whole lipid sample characteristics using different preparation methods. A two photon fluorescence microscopy study." Chem. Phys. Lipids **105**: 135-147.

Bagatolli(b), L. A., and E. Gratton (2000). "A correlation between lipid domain shape and binary phospholipid mixture composition in free standing bilayers: A two-photon fluorescence microscopy study." Biophys. J. **79**: 434-447.

Bagatolli(c), L. A., and E. Gratton (2000). "Two photon fluorescence microscopy of coexisting lipid domains in giant unilamellar vesicles of binary phospholipid mixtures." Biophys. J. **78**: 290 –305.

Bai, J., and R. E. Pagano (1997). "Measurement of spontaneous transfer and transbilayer movement of BODIPY-labeled lipids in lipid vesicles." Biochemistry **36**: 8840-8848.

Bar, L. K., T. E. Barenholz, and T. E. Thompson (1997). "Effect of sphingomyelin composition on the phase structure of phosphatidylcholine-sphingomyelin bilayers." Biochemistry **36**: 2507-2516.

Barenholz, Y., and T. E. Thompson (1980). "Sphyngomyelins in bilayers and biological membranes." Biochim. Biophys. Acta **604**: 129-158.

Baumgart, T., S. T. Hess and W. W. Webb (2003). "Imaging coexisting fluid domains in biomembrane models coupling curvature and line tension." Nature **425**: 821-824.

Bell, J. D., and R. L. Biltonen (1989). "The temporal sequence of events in the activation of phospholipase A2 by lipid vesicles. Studies with the monomeric enzyme from Agkistrodon piscivorus piscivorus." J. Biol. Chem. **264**: 12194–12200.

Bell, J. D., M. Burnside, M. L. Royall, and M. L. Baker (1996). "Relationship between bilayer structure and phospholipase A2 activity: interactions among temperature, diacylglycerol, lysolethicin, palmatic acid and dipalmatoylphosphstidylcholine." Biochemistry **35**: 4945–4955.

Ben Amar, M. "A viscous blob in contraction." en preparation.

Bent, E. D., and J. D. Bell (1995). "Quantification of the interactions among fatty acid, lysophosphatidylcholine, calcium, dimyristoylphosphatidylcholine vesicle, and phospholipase A2." Biochim. Boiphys. Acta **1254**: 349-360.

Benvegnu, D. J., and H.M. McConnell (1992). "Line tension between liquid domains in lipid monolayers." J. Phys. Chem. B **96**: 6820–6824.

Berndl, J., J. Kas, R. Lipowsky, E. Sackmann, and U. Seifert (1990). "Shape transformations of giant vesicles: Extreme sensitivity to bilayer asymmetry." Eur. Phys. Lett. **13**: 659-664.

Bhamidipati, S. P., and J. A. Hamilton (1995). "Interactions of Lyso 1-Palmitoylphosphatidylcholine with Phospholipids: A 13C and 31P NMR Study." Biochemistry **34**: 5666-5677.

Binder, W. H., V. Barragan, and F. M. Menger (2003). "Domains and rafts in lipid membranes." Angew. Chem. Int. Ed. **42**: 5802-5827.

Bittman, R. (1992). "A review on the kinetics of cholesterol movement between donor and acceptor bilayer membranes." In Cholesterol in Model Membranes. L. X. Finegold, editor. CRC Press, Boca Raton, FL.: 45-65.

Bittman, R., C. Kasireddy, P. Mattjus, and J. Slotte (1994). "Interaction of cholesterol with sphingomyelin in monolayers and vesicles." Biochemistry **33**: 11776–11787.

Bivas, I. (1991). "Molecular theory of the lifetime of black lipid membranes." J. Coll. Interface Sci. **144**: 63-71.

Bivas, I., P., P. Hanusse, P. Bothorel, J. Lalanne, and O. Aguerre-Chariol (1987). J. Physique **48**: 855-867.

Boesze-Battaglia, K., and R. Schimmel (1997). "Cell membrane lipid composition and distribution: implications for cell function and lessons learned from photoreceptors and platelets." J. Exp. Biol. **200**: 2927-2936.

Boggs, J. M. (1987). "Lipid intermolecular hydrogen bonding: influence on structural organization and membrane function." Biochim. Biophys. Acta **906**: 353-404.

Botelho, R. J., M. Teruel, R. Dierckman, R. Anderson, A. Wells, et al. (2000). "Localized biphasic chages in phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate at sites of phagocytosis." J. Cell Biol. **151**: 1353-1368.

Brown, D. A. (2001). "Seeing is believing: Visualization of rafts in model membranes." PNAS **98**(19): 10517-10518.

Brown, D. A., and E. London¶ (2000). "Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts." J. Biol. Chem. **275**: 17221-17224.

Brown, R. E. (1998). "Sphingolipid organization in biomembranes: what physical studies of model membranes reveal." J. Cell Sci. **111**: 1-9.

Brown, S. D., B. L. Baker, and J. D. Bell (1993). "Quantification of the interaction of lysolecithin with phosphatidylcholine vesicles using bovine serum-albumin: relevance to the activation of phospholipase A2." Biochim. Boiphys. Acta **1168**: 13-22.

Brugger, B., R. Sandhoff, S. Wegehingel, K. Gorgas, J. Malsam, J. Helms, W. Lehmann, and F. Wieland (2000). "Evidence for segregation of sphingomyelin and cholesterol during formation of COPI-coated vesicles." J. Cell Biol. **151**: 507–517.

Burack, W. R., A. R. Dibble, and R. L. Biltonen (1997a). "The relationship between compositional phase separation and vesicle morphology :implications for the regulation of phospholipase A2 by membrane structure." Chem. Phys. Lipids **90**: 87-95.

Burack, W. R., A. R. Dibble, M. M. Allietta, and R. L. Biltonen (1997b). "Changes in vesicle morphology induced by lateral phase separation modulate phospholipase A2 activity." Biochemistry **36**: 10551–10557.

Burack, W. R., and R. L. Biltonen (1994). "Lipid bilayer heterogeneities and modulation of phospholipase A2 activity." Chem. Phys. Lipids **73**: 209-222.

Burack, W. R., M. E. Gadd, and R. L. Biltonen (1995). "Modulation of phospholipase A2: identification of an inactive membrane-bound state." Biochemistry **34**: 14819–14828.

Burack, W. R., Q. Yuan, and R. L. Biltonen (1993). "Role of lateral phase-separation in the modulation of phpspholipase-A2 activity." Biochemistry **32**: 583-589.

Callisen, T. H., and Y. Talmon (1998). "Direct imaging by cryo-TEM shows membrane break -up by phospholipase A2 enzymatic activity." Biochemistry **37**: 10987-10993.

Carter, W. G., and S. Hakomori (1981). "A new cell surface, detergent-insoluble glycoprotein matrix of human and hamster fibroblasts. The role of disulfide bonds in stabilization of the matrix." J. Biol. Chem. **256**: 6953-6960.

Chernomordik, L. V., M. M. Kozlov, G. B. Melikyan, I. G. Abidor, V. S. Markin and Yu. A. Chizmadzhev (1985). "The shape of lipid molecules and monolayer membrane fusion." **812**: 643-655.

Chizmadzhev, Y. A. (1981). "Membrani:ionnie kanali." Mir, Moskow.

Cremesti, A., F. M. Goni, and R. Kolesnick (2002). "Role of sphingomyelinase and ceramide in modulating rafts: do biophysical properties determine biologic outcome." FEBS Letters **531**: 47-53.

Cremesti, A., F. Paris, H. Grassme, N. Holler, J. Tschopp, Z. Fuks, E. Gulbins, and R. Kolesnick (2001). "Ceramide enables Fas to cap and kill." J. Biol. Chem. **276**: 23954-23961.

Cullis, P. R., and B. de Kruijff (1978). "The polymorphic phase behaviour of phosphatidylethanolamines of natural ant synthetic origin. A 31P NMR study." Biochim. Biophys. Acta **513**: 31-42.

Cullis, P. R., and B. de Kruijff (1979). "Lipid polymorphism and the functional roles of lipids in biological membranes." Biochim. Biophys. Acta **559**: 399-420.

de Figueredo, P., D. Drecktrah, R. Polizotto, N. Cole, J. Lippincott-Schwartz, and W. Brown (2000). "Phospholipase A2 antagonists inhibit constitutive retrograde membrane traffic to the endoplasmic reticulum." Traffic **1**: 504–511.

de Kruyff, B. (1975). "Lipid-sterol interactions in liposomes and membranes." Biochem. Soc. Trans. **3**: 618-621.

Delattre, J., P. Couvreur, F. Puisieux, J.- R. Philippot, F. Schuber (coordinateurs) (1993). "Les Liposomes." Les editions INSERM Faucon, J. F., and P. Meleard, chapitre1.

Dennis, E. A. (1994). "Diversity of group types, regulation, and function of phospholipase A2." J. Biol. Chem. **269**: 13057-13060.

Dennis, E. A. (1997). "The growing phospholipase A2 superfamily of signal transduction enzymes." Trends. Biochem.Sci **22**: 1-3.

Dietrich, C., L. A. Bagatolli , Z. N. Volovyk , N. L. Tompson , M. Levi , K. Jacobson , and E. Gratton (2001). "Lipid rafts reconstituted in model membranes." Biophys. J. **80**: 1417-1428.

Drevot, P., C. Langlet, X.-J. Guo, A.-M. Bernard, O. Colard, J.-P. Chauvin, R. Lasserre, and H.-T. He (2002). "TCR signal initiation machinery is pre-assembled and activated in a subset of membrane rafts." EMBO Journal **21**: 1899-1908.

Duwe, H.-P. (1989). Thesis, TU Munchen.

Duwe, H.-P., and E. Sackmann (1990). Physica A **163**: 410-428.

Duwe, H. P., J. Kas, and E. Sackmann (1990). "Bending elastic moduli of lipid bilayers: Modulation by solutes." J. Phys. France **51**: 945–962.

Edidin, M. (2001). "Shrinking patches and slippery rafts: scales of domains in the plasma membrane." Trends. Cell Biol. **11**: 492-496.

Englund, P. T. (1993). "The structure and biosynthesis of glycosyl phasphatidylinositol protein anchors." Annu. Rev. Biochem. **62**: 121-138.

Evans, E. A., and D. Needham (1987). "Physical properties of surfactant bilayer membranes: thermal transitions, elasticity, rigidity, cohesion, and colloidal interactions." J. Phys. Chem. B **91**: 4219–4228.

Fanani, M. L., S. Hartel, R. Oliveira, and B. Maggio (2002). "Bidirectional control of sphingomyelinase activity and surface topography in lipid monolayers." Biophys. J. **83**: 3416-3424.

Farge, E., and P. F. Devaux (1992). "Shape changes of giant liposomes induced by an asymmetric transmembrane distrubution of phospholipids." Biophys. J. **61**: 347-357.

Farge, E., D. M. Ojcius, A. Subtil, and A. Dautry-Varsat (1999). "Enhancement of endocytosis due to aminophospholipid transport across the plasma membrane on living cells." Am. J. Physiol. **276**: C725–C733.

Faucon, J. F., M. D. Mitov, P. Meleard, I. Bivas and P. Bothorel (1989). **50**: 2389-2414.

Fernandez, M. S., R. Mejia, and E. Zavala (1991). "The interfacial calcium ion concentration as modulateur of the latency phase in the hydrolysis of dimiristoylphosphatidylcholine liposomes by phospholipase A2." Biochem. Cell Biol. **69**: 722-727.

Fielding, C. J., and P. E. Fielding (2000). "Cholesterol and Caveolae:structural and functional relationships." Biochim. Boiphys. Acta **1529**.

Fridriksson, E. K., P. A. Shipkova, E. D. Sheets, D. Holowka, B. Baird, and F. W. McLafferty (1999). "Quantitative analysis of phospholipids in functionally important membrane domains from RBL-2H3 mast cells using tandem high-resolution mass spectrometry." Biochemistry **38**: 8056-8063.

Fukasawa, M., M. Nishijima, H. Itabe, T. Takano, and and K. Hanada (2000). "Reduction of sphingomyelin level without accumulation ceramide in chinese hamster ovary cells affects detergent-resistant membrane domains and enhances cellular cholesterol efflux to methyl-beta-cyclodextrin." J. Biol. Chem. **275**: 34028-34034.

Gandhavadi, M., D. Allende, A. Vidal, S. A. Simon, and T. J. McIntosh (2002). "Structure, composition, and peptide binding properties of detergent soluble bilayers and detergent resistant rafts." Biophys. J. **82**: 1469-1482.

Gardam, M., and J. R. Silvius (1989). "Intermixing of dipalmitoylphosphatidylcholine with phospho- and sphingolipids bearing highly asymmetric hydrocarbon chains." Biochim. Biophys. Acta **980**: 319-325.

Ge, M., K. A. Field, R. Aneja, D. Holowka, B. Baird, and J. H. Freed (1999). "Electron spin resonance characterisation of liquid ordered phase of detergent resistant membranes from RBL-2H3 cells." Biophys. J. **77**: 925-933.

Ghomashchi, F., B-Z. Yu, O. Berg, J. M. Jain, and M. H. Gelb (1991). "Interfacial catalysis by phospholipase -A2: substrate specificity in vesicles." Biochemistry **30**: 7318-7329.

Giocondi, M.-C., V. Vie, E. Lesniewska, P. E. Milhiet, M. Zinke-Allmang, and C. Le Grimellec (2001). "Phase topology and growth of single domains in lipid bilayers." Langmuir **17**: 1653-1659.

Grainger, D. W., A. Reichert, H. Ringsdorf, and C. Salesse (1990). "Hydrolytic action of phospholipase A2 in monolayers in the phase transition region: direct observation of enzyme domain formation using fluorescence microscopy." Biochim. Biophys. Acta **1023**: 365-379.

Graler, M. H., and E. J. Goetzl (2002). "Lysophospholipids and their G protein-coupled receptors in inflammation and immunity." Biochim. Biophys. Acta **1582**: 168-74.

Grandbois, M., H. Clausen-Schaumann, and H. Gaub (1998). "Atomic force microscope imaging of phospholipid bilayer degradation by phospholipase A2." Biophys. J. **74**: 2398-2404.

Harder, T., and K. Simons (1997). "Caveolae, DIGs, and the dynamicsof sphingolipid-cholesterol microdomains." Curr. Opin. Cell Biol. **9**: 534-542.

Harmala, A.-S., M. I. Parn, and J. P. Slotte (1993). "Sphingosine inhibits sphingomyelinase-induced cholesteryl ester formation in cultured fibroblasts." Biochim. Biophys. Acta **1210**: 97-104.

Haynes, M. P., M. C. Phillips, and G. H. Rothblat (2000). "Efflux of cholesterol from different cellular pools." Biochemistry **39**: 4508-4517.

Haynes, M. P., M. C. Phillips, and G. H. Rothblat (2000). "Efflux of Cholesterol from Different Cellular Pools." Biochemistry **39**(15): 4508-4517.

Henshaw, J. B., C. A. Olsen, A. R. Farnbach, K. H. Nielson, and J. D. Bell (1998). "Deffinition of the specific roles of lysolecithin and palmitic acid in altering the susceptibility of dipalmitoylphosphatidylcholine bilayers to phospholipase A2." Biochemistry **37**: 10709-10721.

Holopainen, J. M., H. L. Brockman, R. E. Brown, and P. K. J. Kinnunen (2001). "Interfacial interactions of ceramide with dimyristoylphosphatidylcholine:Impact of the N-acyl chain." Biophys. J. **80**: 765-775.

Holopainen, J. M., J. Y. A. Lehtonen, and P. K. J. Kinnunen (1997). "Lipid microdomains in dimyristoylphosphatidylcholine/ceramide liposomes." Chem. Phys. Lipids **88**: 1-13.

Holopainen, J. M., M. Subramanian, and P. K. J. Kinnunen (1998). "Sphingomyelinase induces lipid microdomains formation in fluid phosphatidylcholine/sphingomyelin membrane." Biochemistry **37**: 17562-17570.

Honger, T., K.Jorgensen, R. L. Biltonen, and O. G. Mouritsen (1996). "Systematic relationship between phospholipase A2 activity and dynamic lipid bilayer microheterogeneity." Biochemistry **35**: 9003-9006.

Houslay, M. D., and K. K. Stanley (1982). "Dynamics of Biological Membranes, Wiley, New York." 1-92.

Hoyrup, P., J. Davidsen, and K. Jorgensen (2001). "Lipid membrane partitioning of lysolipid and fatty acids: effects of membrane phase." J. Phys. Chem. B **105**: 2649-2657.

Huang, J., and G. W. Feigenson (1999). "A microscopic interaction model of maximum solubility of cholesterol in lipid bilayers." Biophys. J. **76**: 2142-2157.

Huang, J. W., E. M. Goldberg, and R. Zidovetzki (1996). "Ceramide reduces structural defects in phosphatidylcholine bilayers and activates phospholipase A2." Biochem. Biophys. Res. Commun **220**: 834-838.

Ikonen, E. (2001). "Roles of lipid rafts in membrane transport." Curr. Opin. Cell Biol. **13**: 470–477.

Ilangumaran, S., H. T. He, and D. C. Hoessli (2000). "Microdomains in lymphocyte signalling: beyond GPI-anchored proteins." Immunol Today **21**: 2-7.

Ilangumaran, S., S. Arni, G. van Echten-Deckert, B. Borisch, and D. C. Hoessli (1999). "Microdomain-dependent regulation of Lck and Fyn protein-tyrosine kinases in T lymphocyte plasma membranes." Mol. Biol. Cell **10**: 891–905.

Israelachvili, J. N. (1985). "Intermolecular and surface forces, Academic press, New York."

Jain, M. K., and G. H. De Haas (1983). "Activation of phospholipase A2 by freshly added lysophospholipids." Biochim. Boiphys. Acta **736**: 157-162.

Jain, M. K., and G.H. De Haas (1981). "Structure of 1-acyl lysophosphatidylcholine and fatty acid complex in bilayers." Biochim. Biophys. Acta. **642**: 203–211.

Jain, M. K., C. J. Van Echteld, F. Ramirez, J. de Gier, G. H. de Hass, and L. L. van Deenen. . (1980). "Association of lysophosphstidylcholine with fatty acids in aqueous phase to form bilayers." Nature **284**: 486–487.

Jain, M. K., G. Ranadive, B. Z. Yu, and H. M. Verheij (1991). "Interfacial catalysis by phospholipase A2: monomeric enzyme is fully catalytically active at the bilayer interface." Biochemistry **30**: 7330–7340.

Jorgensen, K., J. Davidsen, and O. Mouritsen (2002). "Biophysical mechanism of phospholipase A2 activation and their use in liposome-based drug delivery." FEBS Lett. **531**: 23–27.

Jorgensen, K., M. M. Sperotto, O. G. Mouritsen, J. H. Ipsen, and M. J. Zuckermann (1993). "Phase equilibria and local structure in binary lipid bilayers." Biochim. Biophys. Acta **1152**: 135–145.

Julicher, F., and R. Lipowsky (1993). "Domain-induced budding of vesicles." Phys. Rev. Lett. **70**: 2964–2967.

Kamp, F., D. Zakim, F. Zhang, N. Noy, and J. A. Hamilton (1995). "Fatty acid flip-flop in phospholipid bilayers is extremely fast." Biochemistry **34**: 11928.

Kenworthy, A. K., N. Petranova, and M. Edidin (2000). "High-resolution FRET microscopy of cholera toxin B-subunit and GPI-anchored proteins in cell plasma Membranes." Mol. Biol. Cell **11**: 1645-1655.

Kilsdonk, E. P., P. G. Yancey, G. V., Stoudt, F. V. Bangerter, W. J. Johnson, M.C. Phillips, and G. H. Rothblat (1995). "Cellular cholesterol efflux mediated by cyclodextrins." J. Biol. Chem. **270**: 17250-17256.

Klapisz, E., J. Masliah, G. Bereziat, C. Wolf, and K. S. Koumanov (2000). "Sphingolipids and cholesterol modulate membrane susceptibility to cytosolic phospholipase A2." J. Lipid Res. **41**: 1680-1688.

Knoll, W., G. Schmidt, H. Rotzer, T. Henkel, W. Pfeiffer, E. Sackmann, S. Mittler-Neher, and J. Spinke (1991). "Lateral order in binary lipid alloys and its coupling to membrane functions." Chem. Phys. Lipids **57**: 363-374.

Kobayashi, T., S. Pimplikar, R. Parton, S. Bhakdi, and K. Simons (1992). "Sphingolipid transport from the trans-Golgi network to the apical surface in the permeabilized MDCK cells." FEBS Lett. **300**: 227–231.

Kolesnick, R., and Y. A. Hannun (1999). "Ceramide and apoptosis." TIBS **24**: 224-225.

Kolesnick, R. N., and Z. Fuks (1995). "Ceramide: a signal for apoptosis or mitogenesis?" J. Exp. Med. **181**: 1949-1952.

Kolesnick, R. N., F. M. Goni, and A. Alonso (2000). "Compartmentalization of ceramide signaling: physical foundations and biological effects." J. Cell Physiol. **184**: 285-300.

Kolrach, J., P. Schwille, W. W. Webb, and G. W. Feigenson (1999). "Characterization of lipid bilayer phases by confocal microscopy and fluorescence correlation spectroscopy." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **96**: 8461-8466.

Koumanov, K., C. Wolf, and G. Bereziat (1997). "Modulation of human type II secretory phospholipase A2 by sphingomyelin and annexin VI." Biochem. J. **326**: 227-233.

Koumanov, K. S., A. B. Momchilova, P. J. Quinne, and C. Wolf (2002). "Ceramides increase the activity of the secretory phospholipase A2 and alter its fatty acid specificity." Biochem. J. **363**: 45-51.

Koumanov, K. S., P. J. Quinn, G. Bereziat, and C. Wolf (1998). "Cholesterol relieves the inhibitory effect of sphingomyelin on type II secretory phospholipase A2." Biochem. J. **336**: 625-630.

Koynova, R., and M. Caffrey (1995). "Phases and phase transitions of the sphingolipids." Biochim. Biophys. Acta **1255**: 213-236.

Kupferberg, J. P., S. Yokoyama, and F. J. Kezdy (1981). "The kinetics of the phospholipase A2-catalyzed hydrolysis of egg phosphatidylcholine in unilamellar vesicles." J. Biol. Chem. **256**: 6274–6281.

Kwik, M., S. Boyle, M. S. Sheetz, and M. Edidin (2002). "Membrane cholesterol, lateral diffusion of membrane proteins and the PI(4,5)P2-dependent organization of cell actin." Mol. Biol. Cell **13S**: 142-149.

Kwork, R., and E. Evans (1981). Biophys. J. **35**: 637-652.

Lang, T., D. Bruns, D. Wenzel, D. Riedel, P. Holroyd et al. (2001). "SNAREs are concentrated in cholesterol dependent clusters that define docking and fusion sites for exocytosis." EMBO J. **20**: 2202-2213.

Lange, Y., and T. L. Steck (1996). "The role of intracellular cholesterol transport in cholesterol homeostasis." Trends. Cell Biol. **6**: 205-208.

Lange, Y., J. Ye, M. Rigney, and T. L. Steck (1999). "Regulation of endoplasmic reticulum cholesterol by plasme membrane cholesterol." J. Lipid Res. **40**: 2264-2270.

Lasch, J. (1995). "Interaction of detergents with lipid vesicles." Biochim. Boiphys. Acta **1241**: 269-292.

Leontiadou, H., A. E. Mark, and S. J. Marrink (2004). "Molecular dynamics simulations of hydrophilic pores in lipid bilayers." Biophys. J. **86**: 2156-2164.

Li, X.-M., J. M. Smaby, M. M. Momsen, H. L. Brockman, and R. E. Brown (2000). "Sphingomyelin interfacial behavior: The impact of changing acyl chain composition." Biophys. J. **78**: 1921-1931.

Lipowsky, R. (1992). "Budding of membranes induced by intramembrane domains." J. Phys. II France **2**: 1825-1840.

Lipowsky, R. (1993). "Domain-induced budding of fluid membranes." Biophys. J. **64**: 1133-1138.

Lipowsky, R. (2002). "Domains and rafts in membranes-hidden dimensions of selforganization." J. Biol. Phys **28**: 195-210.

Lipowsky, R., and R. Dimova (2003). "Domains in membranes and vesicles." J. Phys. Condens. Matter. **15**: S31-S45.

Liscum, L., and K. W. Underwood (1995). "Intrecellular cholesterol transportand compartmentation." J. Biol. Chem. **270**: 15443-15446.

London, M., and E. London (2004). "Ceramide selectively displaces cholesterol from ordered lipid domains (rafts): Implications for lipid raft structure and function." J. Biol.Chem. **279**: 9997-10004.

Mabrey, S., and J. M. Sturtevant (1976). "Investigation of phase transition of lipids and lipid mixtures by high sensitivity differential scanning calorimetry." Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **73**: 3862–3866.

Madore, N., K. L. Smith, C. H. Graham, A. Jen, K. Brady, S. Hall, and R. Morris (1999). "Functionally different GPI proteins are organized in different domains on the neuronal surface." EMBO J. **18**: 6917–6926.

Maloney, K. M., and D. W. Grainger (1993). "Phase separated anionic domains in ternary mixed lipid monolayers at the air-water interface." Chem. Phys. Lipids **65**: 31–42.

Mandersloot, J. G., F. C. Reman, L. L. M. Van Deenen, and J. De Gier (1975). "Barrier properties of lecithin/lysolecithin mixtures." Biochim. Boiphys. Acta **382**: 22-26.

Mason, J. T. (1988). "Mixing behavior of symmetric chain length and mixed chain length phosphatidylcholines in two-component multilamellar bilayers: evidence for gel and liquid-crystalline phase immiscibility." Bichemistry **27**: 4421-4429.

Masserini, M., and D. Ravasi (2001). "Role of sphingolipids in the biogenesis of membrane domains." Biochim. Biophys. Acta **1532**: 149-161.

Masserini, M., P. Palestini, and E. Freire (1989). "Influence of glycolipid oligosaccharide and long-chain base composition on the thermotropic properties of dipalmitoylphosphatidylcholine large unilamellar vesicles containing gangliosides." Biochemistry **28**: 5029-5034.

Massey, J. B. (2001). "Interaction of ceramides with phosphatidylcholine, sphingomyelin and sphingomyelin/cholesterol bilayers." Biochim. Boiphys. Acta **1510**.

McIntosh, T. J. (1978). "The effect of cholesterol on the structure of phosphatidylcholine bilayers." Biochim. Biophys. Acta. **513**: 43–58.

McIntosh, T. J., A. D. Magid, and S. A. Simon (1989). "Cholesterol modifies the short-range repulsive interactions between phosphatidylcholine membranes." Biochemistry **28**: 17–25.

McIntosh, T. J., S. Advani, R. E. Burton, D. V. Zhelev, D. Needham, and S. A. Simon (1995). "Experimental tests for protrusion and undulation pressures in phospholipid bilayers." Biochemistry **34**: 8520–8532.

Meleard, P. (1990). "Elasticite de courbure de la bicouche lipidique: analyses statique et dynamique des fluctuations thermiques de vesicules geantes." These de l'Universite de Bordeaux I.

Meleard, P., C. Gerbeaud, T. Pott, L. Fernandez-Puente, I. Bivas, M.D. Mitov, J. Dufourcq and P. Bothorel (1997). "Bending elasticities of model membranes: influences of temperature and sterol content." Biophys. J. **72**: 2616-2629.

Mesquita, R. M. R. S., E. Melo, T. E. Thompson, and W. L. C. Vaz (2000). "Partitioning of amphiphiles between coexisting ordered and disordered phases in two-phase lipid bilayer membranes." Biophys. J. **78**: 3019-3025.

Mitov, M. D. (1981). Ph. D. Thesis, Bulg. Acad. Sciences, Sofia.

Mitov, M. D., J.-F. Faucon, P. Meleard, and P. Bothorel (1992). Advances in Supramolecular Chemistry, G. W. Gokel, Editor **1992, JAI Press Inc.**: 93-139.

Moolenaar, W. H. (1999). "Bioactive lysophospholipids and their G protein-coupled receptors." Exp Cell Res **253**(1): 230-238.

Mouritsen, O. G. (1991). "Theoritical models of phospholipid phase transition." Chem. Phys. Lipids **57**: 179-194.

Mouritsen, O. G., and K. Jorgensen (1998). "A new look at lipid membrane structure in relation to drug research." Pharm. Res. **15**: 1507-1519.

Muniz, M., M. Martin, J. Hidalgo, and A. Velasco (1997). "Protein kinase A activity is required for the budding of constitutive transport vesicles from the trans-Golgi network." Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **94**: 14461–14466.

Murakami, M., I. Kudo, and K. Inoue (1995). "Secretory phospholipase A2." J. Lipid Mediat. Cell Signal. **12**: 119-130.

Mutz, M., and W. Helfrich (1990). J. Phys. France **51**: 991-1002.

Needham, D. (1995). "Cohesion and permeability of lipid bilayer vesicles. In permeability and stability of lipid bilayers." E. A. Disalvo and S. A. Simon, editors. CRC Press, Boca Raton: FL. 49–75.

Needham, D., and D. V. Zhelev (1995). "Lysolipid exchange with lipid vesicle membranes." Ann. Biomed. Eng. **23**: 287–298.

Needham, D., and D. Zhelev (1996). "Vesicles." edited by M. Rossoff, Marcel Dekker Inc, New York, Basel, Hong Kong **chapter 9**: 411.

Needham, D., and R. S. Nunn (1990). "Elastic deformation and failure of lipid bilayer membranes containing cholesterol." Biophys. J. **58**: 997-1009.

Nielsen, L. K., J. Risbo, T. H. Callisen, and T. Bjornholm (1999). "Lag-burst kinetics in phospholipase A2 hydrolysis of DPPC bilayers visualized by atomic force microscopy." Biochem. Biophys. Acta. **1420**: 266–271.

Nielsen, L. K., K. Balashev, T. H. Callisen, and T. Bjornholm (2002). "Influence of product phase separation on phospholipase A2 hydrolysis of supported phospholipid bilayers studied by force microscopy." Biophys. J. **83**: 2617-2624.

Nielsen, L. K., T. Bjornholm, and O. G. Mouritsen (2000). "Fluctuations caught in the act." Nature **404**: 352.

Nomura, F., M. Nagata, T. Inaba, H. Hiramatsu, H. Hotani, and K. Takiguchi (2001). "Capabilities of liposomes for topological transformation." PNAS **98**: 2340-2345.

Ohtani, Y., T. Irie, K. Uekama , K. Fukunaga , and J. Pitha (1989). "Differential effects of alfa, beta and gama-cyclodextrins on human erythrocytes." Eur. J. Biochem **186**: 17-22.

Ohvo, H., and J. P. Slotte (1996). "Cyclodextrin-mediated removal of sterols from monolayers: effects of sterol structure and phospholipids on desorptiom rate." Biochemistry **35**: 8018-8024.

Ohvo-Rekila, H., B. Ramstedt, P. Leppimaki, and J. P. Slotte (2002). "Cholesterol interactions with phospholipids in membranes." Prog. Lipid Res. **41**: 66-97.

Ostermeyer, A. G., B. T. Beckrich, K. A. Ivarson, K. E. Grove, and D. A. Brown (1999). "Glycosphingolipids are not essential for formation of detergent -resistant membrane rafts in melanoma cells. Methyl-beta-cyclodextrin does not affect cell surface transport of GPI-anchored protein." J. Biol. Chem. **274**: 34459-34466.

Pagano, R. (1990). "Lipid traffic in eucaryotic cells: mechanism for intracellular transport and organelle-specific enrichment of lipids." Curr. Opin. Cell Biol. **2**: 652–663.

Palade, G. E. (1953). "Fine structure of blood capillaries." J. Appl. Physics **24**: 1424.

Parasassi, T., G. De Stasio, A. d'Ubaldo, and E. Gratton (1990). "Phase fluctuation in phospholipid membranes revealed by Laurdan fluorescence." Biophys. J. **57**: 1179 –1186.

Parasassi, T., M. Loiero, M. Raimondi, G. Ravagnan, and E. Gratton (1993). "Absence of lipid gel-phase domains in seven mammalian cell lines and in four primary cell types." Biochim. Biophys. Acta **1153**: 143-154.

Parton, R. G. (1996). "Caveolae and caveolins." Curr. Opin. Cell Biol. **8**: 542-548.

Patra, S. K., A. Alonso, and F. M. Goni (1998). "Detergent solibilisation of phospholipid bilayers in the gel state: the role of polar and hydrophobic forces." Biochim. Biophys. Acta **1373**: 112-118.

Petrov, A. (1999). "The Lyotropic state of matter. Molecular physics and living matter physics." Gordon and Breach Science Publishers.

Phillips, M. C., J. W. Johnson, and G. W. Rothblat (1987). "Mechanisms and consequences of cellular cholesterol exchange and transfer." Biochim. Boiphys. Acta **906**: 223-276.

Pike, J. L. (2004). "Lipid rafts: heterogeneity on the high seas." Biochem. J. **378**: 281-292.

Pike, J. L., and J. M. Miller (1998). "Cholesterol depletion delocalizes phosphatidylinositol bisphosphate and inhibits hormone stimulated phosphotidylinositol turnover." J. Biol. Chem. **273**: 22298-22304.

Pike, L. J., X. Han, K.-N. Chung, and R. Gross (2002). "Lipid rafts are enriched in plasmalogens and arachidonate-containing phospholipids and the expression of caveolin does not alter the lipid composition of these domains." Biochemistry **41**: 2075–2088.

Ramsammy, L. S., and H. Brockerhoff (1982). "Lysophosphatidylcholine– cholesterol complex." J. Biol. Chem. **257**: 3570– 3574.

Ramstedt, B., and J. P. Slotte (1999). "Interaction of cholesterol with sphingomyelins and acyl-chain-matched phosphatidylcholines: A comparative study of the effect of the chain length." Biophys. J. **76**: 908-915.

Raucher, D., T. Stauffer, W. Chen, K. Shen, S. Guo, et al. (2000). "Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate functions as a second messenger that regulates cytoskeleton-plasma membrane adhesion." Cell **100**: 221-228.

Ridgway, N. D. (1995). "Inhibition of acyl-CoA: cholesterol acyltransferase in chinese hamster ovary (CHO) cells by short-chain ceramide and dihydroceramide." Biochim. Biophys. Acta **1256**: 39-46.

Rinia, H., M. Snel, J. van der Eerden, and B. de Kruijff (2001). "Visualizing detergent resistant domains and model membranes with atomic force microscopy." FEBS Lett. **501.**: 92-96.

Rock, P., M. Allietta, W. W. Young, T. E. Thompson, and T. W. Tillack (1991). "Ganglioside GM1 and asialo-GM1 at low concentration are preferentially incorporated into the gel phase in two-component, two-phase phosphatidylcholine bilayers." Biochemistry **30**: 19-25.

Rodal, S. K., G. Skretting, O. Garred, F. Vilhardt, B. van Deurs, and K. Sandvig (1999). "Exctraction of Cholesterol with beta-cyclodextrin perturbs formation of clathrin-coated endocytic vesicles." Mol. Biol. Cell **10**: 961-974.

Roper, K., D. Corbeil, and W. B. Huttner (2000). "Retention of prominin in microvilli reveals distinct cholesterol-based lipid microdomains in the apical plasma membrane." Nat. Cell Biol. **2**: 582–592.

Sackmann, E., H.-P. Duwe, and H. Engellhardt (1986). "Membrane bending elasticity and its role for shape fluctuations and shape transformations of cells and vesicles." Faraday Discuss. Chem. Soc. **81**: 281-290.

Samsonov, A. V., I. Mihalyov, and F. S. Cohen (2001). "Characterization of cholesterol-sphingomyelin domains and their dynamics in bilayer membranes." Biophys. J. **81**: 1486-1500.

Sanchez, S. A., L. A. Bagatolli, E. Gratton, and T. L. Hazlett (2002). "A two-photon view of an enzyme at work: Crotalus atrox venom PLA2. Interaction with single-lipid and mixed-lipid giant unilamellar vesicles." Biophys. J. **82**: 2232-2243.

Sankaram, M. B., and T. E. Thompson (1990). "Interaction of cholesterol with various glycerophospholipids and sphingomyelin." Biochemistry **29**: 10670-10675.

Sankaram, M. B., and T. E. Thompson (1991). "Cholesterol-induced fluid-phase immiscibility in membranes." Proc. Natl. Acad. Sci. **88**: 8686-8690.

Scherfeld, D., N. Kahya, and P. Schwille (2003). "Lipid dynamics and domain formation in model membranes composed of ternary mixtures of unsaturated and saturated phosphatidylcholines and Cholesterol." Biophys. J. **85**: 3758-3768.

Schneider, M. B., J. T. Jenkins, and W. W. Webb (1984). "Thermal fluctuations of large cylindrical phospholipid vesicles." Biophys. J. **45**: 1457-1472.

Schneider, M. B., J. T. Jenkins, and W. W. Webb (1984a). J. Physique **45**: 1457-1472.

Schroeder, F., A. A. Frolov, E. J. Murphy, B. P. Atschaves, J. R. Jefferson, L. Pu, W. G. Wood, W. B. Foxworth, and A. B. Kier (1996). "Recent advances in membrane cholesterol domain dynamics and intracellular cholesterol trafficking." Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **213**: 150-177.

Schroeder, R., E. London, and D. Brown (1994). "Interactions between saturated acyl chains confer detergent resistance on lipids and GPI-anchored proteins: GPI - anchored proteins in liposomes and cells show similar behaviour." Proc Natl Acad Sci **91**: 12130-12134.

Schroeder, R. J., S. N. Ahmed, Y. Zhu, E. London, and a. D. A. Brown (1998). "Cholesterol and sphingolipid enhance the Triton X-100 insolubility of Glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins by promoting the formation of detergent-insoluble ordered membrane domains." J. Biol. Chem. **273**: 1150-1157.

Schuck, S., M. Honsho, K. Ekroos, A. Shevchenko, and K. Simons (2003). "Resistance of cell membranes to different detergents." Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **100**: 5795–5800.

Shah, J., Atienza J. M., Duclos R. I., Rawlings A. V., Dong Z., and Shipley G. G. (1995). "Structural and thermotropic properties of synthetic C16 (palmitoyl) ceramide: effect of hydation." J. Lipid Res. **36**: 1936-1944.

Silvius, J. R. (1986). "Solid- and liquid-phase equilibria in phosphatidylcholine / phosphatidylethanolamine mixtures. A calorimetric study." Biochim. Biophys. Acta **857**: 217-228.

Silvius, J. R., B. D. Read, and R. N. McElhaney (1979). "Thermotropic phase transitions of phosphatidylcholines with odd - numbered n-acyl chains." Biochim. Biophys. Acta **555**: 175-178.

Silvius, J. R., D. del Giudice, and M. Lafleur (1996). "Cholesterol at different bilayer concentrations can promote or antagonize lateral segregation of phospholipids of differing acyl chain lenght." Biochemistry **35**: 15198-15208.

Simon, J. P., I. E. Ivanov, M. A. Adesnik, and D. D. Sabatini (1996). "The production of post-Golgi vesicle requires a protein kinase C-like molecule, but not its phosphorylating activity." J. Cell Biol. **135**: 355-370.

Simon, S. A., T. J. McIntosh, A. D. Magid, and D. Needham (1992). "Modulation of the hydration pressure by the addition of dipoles at the hydrocarbon/water interface." Biophys. J. **61**: 786 –799.

Simons, K., and D. Toomre (2000). "Lipid rafts and signal transduction." Mol. Cell. Biol. **1**: 31-41.

Simons, K., and E. Ikonen (2000). "How cells handle cholesterol." Science **290**: 1721-1726.

Slimane, T. A., G. Trugnan, S. C. D. van Izendoorn, and D. Hoekstra (2003). "Raft mediated trafficking of apical resident proteins occurs in both direct and transcytotic pathways in polarized hepatic cells: role of distinct lipid microdomains." Mol. Biol. Cell **14**: 611–624.

Slotte, J. P., and S. Illman (1996). "Desorption of fatty acids from monolayers to cyclodextrines in the subphase." Langmuir **12**: 5664-5668.

Smaby, J. M., H. L. Brockman, and R. E. Brown (1994). "Cholesterol's interfacial Interactions with sphingomyelins and phosphatidylcholines: Hydrocarbon chain structure determines the magnitude of condensation." Biochemistry **33**: 9135-9142.

Smart, E. J., G. A. Graf, M. A. McNiven, W. C. Sessa, J. A. Engelman, P. E. Scherer, T. Okamoto, and M. P. Lisanti (1999). "Caveolins, liquid-ordered domains, and signal transduction." Mol. Cell. Biol. **19**: 7289-7304.

Smart, E. J., Y.-S. Ying, C. Mineo, and R. G. W. Anderson (1995). "A detergent-free method for purifying caveolae membrane from tissue culture cells." Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **92**: 10104–10108.

Song, K. S., S. Li, T. Okamoto, L. A. Quilliam, M. Sargiacomo, and M. P. Lisanti (1996). "Co-purification and direct interaction of Ras with caveolin, an integral membrane protein of caveolae microdomains: Detergent-free purification of caveolae microdomains." J. Biol. Chem. **271**: 9690–9697.

Sot, J., M. I. Collado, J. L. R. Arrondo, A. Alonso, and F. M. Goni (2002). "Triton X-100-resistant bilayers: Effect of lipid composition and relevance to the raft phenomenon." Langmuir **18**: 2828-2835.

Speijer, H., P. L. Giesen, R. F. Zwaal, C. E. Hack, and W. T. Hermens (1996). "Critical micelle concentrations and stirring are rate-limiting in the loss of lipid mass during membrane degradation by phospholipase A2." Biophys. J. **70**: 2239–2247.

Stan, R.-V., W. G. Roberts, D. Predescu, K. Ihida, L. Saucan, L. Ghitescu, and G. E. Palade (1997). "Immunoisolation and partial characterization of endothelial plasmalemmal vesicles (caveolae)." Mol. Biol. Cell **8**: 595–605.

Staneva, G., M. I. Angelova, and K. Koumanov (2004). "Phospholipase A2 promotes raft budding and fission from giant liposomes." Chem. Phys. Lipids **129**(1): 53-62.

Subtil, A., I. Gaidarov, K. Kobylarz, M. A. Lampson, J. H. Keen, and T. E. McGraw (1999). "Acute cholesterol depletion inhibits clathrin-coated pit budding." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **96**: 6775--6780.

Tanford, C. (1973). "The hydrophobic effect: Formation of micelles and biological membranes." John Wiley and Sons, Inc.

Terzaghi, A., G. Tettamanti, and M. Masserini (1993). "Interaction of glycoshingolipids in bilayers and plasma membranes of mammalians cells." Annu. Rev. Biophys. Chem **14**: 361-386.

Tieleman, D. P., H. Leontiadou, A. E. Mark, and S.-J. Marrink (2003). "Simulation of pore formation in Lipid Bilayers by Mechanical Stress and Electric Fields." JACS communications **125**: 6382-6383.

Traikia, M., D. E. Warschawski, O. Lambert, J.-L. Rigaud, and F. Devaux (2002). "Asymmetrical membranes and surface tension." **83**: 1443-1454.

van der Goot, F., and J. Gruenberg (2002). "Oiling the wheels of the endocytic pathway." Trends Cell Biol. **12**: 296–299.

Van Dijck, P. W. M., A. J. Kaper, H. A. J. Oonk, and J. De Gier (1977). "Miscibility properties of binary phosphatidylcholine mixtures. A calorimetric study." Biochim. Biophys. Acta **470**: 58–69.

van Echteld, C., B. de Kruijff, J. Mandersloot, and J. Gier (1981). "Effects of lysophosphatidylcholines on phosphatidytlcholine and phosphatidylcholine/cholesterol liposomes systems as revealed by ^{31}P-NMR, electron microscopy and permeability studies." Biochim. Biophys. Acta. **649**: 211–220.

van Meer, G. (1998). "Lipids of the Golgi membrane." Trends. Cell Biol. **8**: 29-33.

Veatch, S. L., and S. L. Keller (2002). "Organization in lipid membranes containing cholesterol." Phys. Rev. Lett. **89**: 268101.

Veatch, S. L., and S. L. Keller (2003). "Separation of liquid phases in giant vesicles of ternary mixtures of phospholipids and cholesterol." Biophys. J. **85**: 3074-3083.

Veiga, M. P., J. L. Arrondo, F. M. Goni , and A. Alonso (1999). "Ceramides in phospholipid membranes: Effects on bilayer stability and transition to nonlamellar phases." Biophys. J. **76**: 342-350.

Veldman, R. J., N. Maestre, O. M. Aduib, J. A. Medin, R. Salvayre, and T. Levade (2001). "A neutral sphingomyelinase resides in sphingolipid-enriched microdomains and is inhibited by the caveolin-scaffolding domain: potential implications in tumour necrosis factor signalling." Biochem. J. **355**: 859-868.

Vist, M. R., and J. H. Davis (1990). "Phase equilibria of cholesterol/dipalmitoylphosphatidylcholine mixtures: 2H nuclear magnetic resonance and differential scanning calorimetry." Biochemistry **29**: 451-464.

Welti, R., and M. Glaser (1994). "Lipid domains in model and biological membranes." Chem. Phys. Lipids **73**: 121-137.

Weltzien, H. U. (1979). "Cytolytic and membrane-perturbing properties of lysophosphatidylcholine." Biochim. Biophys. Acta. **559**: 259-287.

Wick, R., M. I. Angelova, P. Walde, and P. L. Luisi (1996). "Microinjection into giant vesicles and light microscopy investigation of enzyme-mediated vesicle transformations." Chem. and Biol. **3**: 105-111.

Wilschut, J. C., J. Regts, H. Westenberg, and G. Scherphof (1978). "Action of phospholipases A2 on phosphatidylcholine bilayers. Effects of the phase transition, bilayer curvature and structural defects." Biochim. Boiphys. Acta **508**: 185-196.

Yamada, E. (1955). "The fine structure of gall bladder epitheliumof the mouse." J. Biophys. Biochem. Cytol. **1**: 445-458.

Yancey, P. G., W. V. Rodrigueza, E. P. C. Kilsdonk G. W. Stoudt, W. J. Johnson, M. C. Phillips, et al. (1996). "Cellular cholesterol efflux mediated by cyclodextrins. Demonstration of kinetic pools and mechanism of efflux." J. Biol. Chem. **271**(27): 16026-16034.

Yeagle, P. L. (1985). "Cholesterol and the cell membrane." Biochim. Biophys. Acta. **822**: 267-287.

Yeagle, P. L. (1993). "The biophysics and cell biology of cholesterol: an hypothesis for the essential role of cholesterol in mammalian cells. In "Cholesterol in membrane models", F. L., ed. (Boca Raton, FL: CCR Press)."

Yeagle, P. L., A. D. Albert, K. Boesze-Battaglia, J. Young, and J. Frye (1990). "Cholesterol dymanimics in membranes." Biophys. J. **57**: 413-424.

Zhelev, D. V. (1996). "Exchange of monooleoylphosphatidylcholine with single egg phosphatidylcholine vesicle membranes." Biophys. J. **71**: 257–273.

Zhelev, D. V. (1998). "Material property characteristics for lipid bilayers containing lysolipid." Biophys. J. **75**: 321-330.

Zundel, W., L. M. Swiersz, and A. Giaccia (2000). "Caveolin 1-mediated regulation of receptor tyrosine kinase-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity by ceramide." Mol. Cell. Biol. **20**: 1507-1514.

Liste des Figures

Figure I-1 a) Arrangement d'une bicouche de membrane biologique; b) Coupe d'une vésicule (demi vésicule) constituée d'une bicouche lipidique. D'après (Binder, 2003)..... 13

Figure I-2 Bicouche lipidique mélangée avec deux types principaux de séparation de phase des lipides biquatérnaires: a) séparation de phase latérale, b) séparation de phase verticale. D'après (Binder, 2003).. 14

Figure I-3 Les différents modes de la séparation de phase dans des bicouches lipidiques: I) Séparation de phase latérale de deux lipides; II) divers stimuli externes menant à différents modes de séparation de phase: a) séparation de phase latérale dans la monocouche externe induite par des ions, b) séparation de phase verticale induite par l'adsorption des polymères, c) séparation de phase latérale dans les deux monocouches induite par la température, et d) séparation de phase latérale autour d'une macromolécule incorporée dans la bicouche. D'après (Binder, 2003)..... 15

Figure I-4 Structures des principaux lipides des membranes de mammifères : les glycérophospholipides 19

Figure I-5 Structures des principaux lipides des membranes de mammifères : les sphingolipides 20

Figure I-6 Structure des principaux lipides des membranes de mammifères: le cholestérol..... 21

Figure I-7 Comportement de phase des mélanges lipidiques (lipide A et lipide B): a) miscibilité complète des lipides en état liquide et b) immiscibilité partielle des lipides en état liquide. D'après (Welti, 1994)..... 25

Figure I-8 Diagramme de phase de DMPC/DPPC (a) et de DLPC/DSPC (b). D'après (Knoll, 1991) et (Silvius, 1996). 27

Figure I-9 Miscibilité de DSPC et C_{18}-C_{10}-PC. D'après (Mason, 1988) 27

Figure I-10 a) Image de microscopie de fluorescence d'une monocouche composée de DMPC/C24:1-ceramide (30/70), 1 mol% du lipide fluorescent ; b) Une présentation schématique du réseau, formé par DMPC et C24:1-ceramide (les flèches montrent les liaisons hydrogènes ce qui mène à la formation du réseau). D'après (Gardam, 1989; Masserini, 2001)..... 30

Figure I-11 Influence du cholestérol sur la structure lipidique de la bicouche. Une quantité croissante de cholestérol stabilise la phase L_d au-dessus de la température de transition de phase de DPPC. La transition de phase disparaît aux niveaux du cholestérol au-dessus de 30 mol%, apparition de la phase L_o. D'après (Sankaram, 1991)..... 31

Figure I-12 Images de fluorescence des vésicules géantes avec une séparation de phase à 25°C a) DLPC/DPPC=40/60. La couleur rouge montre les domaines ordonnés solides (enrichit en DPPC), la couleur verte les domaines liquides (enrichit en DLPC) ; b) DLPC/DPPC=50/50 avec 5 mol% Chol (Barre 10 µm). D'après (Kolrach, 1999) 34

Figure I-13 Images fluorescentes (excitation de deux photons) des VGUs composées de DLPC/DPPC (A et D), DLPC/DSPC (B et E), et DLPC/DAPC (C et F) (1/1 mol/mol), marqueur lipidique N-Rh-DPPE. Les images sont capturées aux températures correspondant à la phase liquide (A-C) et à la coexistence de phase liquide/solide (D-F). D'après (Bagatolli(b), 2000)..... 36

Figure I-14 GP de Laurdan en fonction de la différence CH_2 entre les chaînes hydrophobes de différentes PCs dans le mélange binaire. Les symboles ouverts et remplis dénotent des domaines fluides et solides respectivement. VGUs composées de DLPC (les cercles) et DMPC/DSPC (les triangles). D'après (Bagatolli, 2001) 36

Figure I-15 a) Caveolae, b) domaines (présentation schématique), et c) protocole d'extraction pour l'isolement des fractions des rafts. D'après (Binder, 2003) 39

Figure I-16 Modèles d'une structure de raft basés sur des résultats de différents protocoles d'isolement de raft. D'après (Pike, 2004) 45

Figure I-17 Formation des domaines dans des VGUs composées de DOPC/BBSM/Chol (1/1/1) ; a) formation des VGUs à 24.3°C ; b) destruction des domaines en augmentant la température à 30.5°C. D'après (Dietrich, 2001)....47

Figure I-18 Hydrolyse des glycérophospholipides par les PLA_2....51

Figure I-19 Action sélective de la phospholipase PLA_2 sur des domaines ordonnés solides des monocouches composées de DPPC. a) Présentation schématique de l'action enzymatique par l'hydrolyse sélective des lipides dans les domaines ordonnés solides. b) Domaines ronds avant l'addition de la PLA_2. c) Destruction des domaines par l'hydrolyse sélective et enfin leur dissolution. D'après (Grainger, 1990)....53

Figure I-20 La structure chimique de β-cyclodextrine....55

Figure I-21 Le plan de la molécule de β-cyclodextrine....55

Figure I-22 Hydrolyse des shingomyélines par les SMases 56

Figure I-23 Représentation des déformations élastiques d'une surface, S_o, initialement plane : shear – cisaillement à surface et courbure constantes ; stretching – expansion ; bending – modification de la courbure avec $c_1.c_2>0$ (à gauche) et modification de la courbure à surface constante avec $c_1.c_2<0$ (à droite). D'après (Meleard, 1990)....66

Figure I-24 Technique « micropipette » pour la mesure du module de courbure k_c....67

Figure I-25 Bourgeonnement d'un domaine membranaire inclus dans la matrice membranaire liquide. Le bord du domaine est indiqué par la ligne hachurée. La longueur de ce bord diminue pendant le processus de bourgeonnement de (1) à (3). D'après (Lipowsky, 1992)....69

Figure II-1 Structure chimique de la C_{12} PC – NBD....75

Figure II-2 Structure chimique de Triton X-100 75

Figure II-3 Structure chimique de Brij 98....76

Figure II-4 La présentation schématique (A) de la chambre thermostatée pour l'électroformation et la micromanipulation des VGUs et (B) la microinjection des macromolécules actives à proximité d'une vésicule. 78

Figure II-5 Jeu de filtres de fluorescence....81

Figure III-1 Visualisation des domaines en phase L_o en fluorescence (série d'images en z). VGUs composées de EYPC/PC/SM/Chol (55/5/20/20) à 34°C (barre 20 μm)....85*

Figure III-2 Visualisation des domaines en phase L_o en fluorescence (z-scan), VGUs composées de EYPC/PC/SM/Chol (55/5/20/20) à 37°C (barre 20 μm) 86*

Figure III-3 Visualisation des domaines en phase L_o, VGUs composées de EYPC/PC/SM/Chol (55/5/20/20) à 34°C. a) immédiatement après la coupure du champ électrique et l'ouverture de la chambre de préparation ; b) au bout de 15 min (les barres mesurent 20 μm) 87*

Figure III-4 Visualisation des domaines en phase L_o. a) EYPC/PC/SM/Chol (45/5/45/5) à 31°C ; b) EYPC/PC*/SM/Chol (40/5/45/10) à 31°C ; c) EYPC/PC*/SM/Chol (55/5/20/20) à 31°C ; d) EYPC/PC*/SM/Chol (35/5/40/20) à 31°C ; e) EYPC/SM/Chol (1/1/1) à 31°C ; f) EYPC/SM/Chol (1/1/1) à 25°C (les barres mesurent 20 μm) 89*

Figure III-5 Visualisation des domaines en phase l_o. a) EYPC/PC/SM/Chol (40/5/45/10) à 10°C ; b) EYPC/PC*/SM/Chol (40/5/45/10) à 20°C (les barres mesurent 20 μm)..... 90*

Figure III-6 Vésicule non tendue, le bourgeonnement du domaine (indiqué avec des flèches), EYPC/PC/SM/Chol (40/5/45/10) à 31°C ; a) en contraste de phase ; b) en fluorescence (barre 20 μm)..... 90*

Figure III-7 Déplétion du cholestérol par la méthyl-β-cyclodextrine à partir des vésicules composées de EYPC/PC/SM/Chol (55/5/20/20) à 34°C (barre 20 μm) 94*

Figure III-8 Hydrolyse de la sphingomyéline par la sphingomyélinase à partir des vésicules composées de EYPC/PC/SM/Chol (55/5/20/20) à 34°C (barre 20 μm) 98*

Figure III-9 EYPC/PC/EYCER/Chol (75/5/10/10) (barre 20 μm) 99*

Figure III-10 Bourgeonnement et fission d'un domaine en phase L_o induits par la $sPLA_2$ à partir d'une vésicule composée de PC/PC/SM/Chol (40:5:45:10) à 30°C (barre 20 μm)..... 105*

Figure III-11 Bourgeonnement et fission d'un domaine en phase L_o induits par la $sPLA_2$ à partir d'une vésicule composée de PC/PC/SM/Chol (40:5:45:10) à 30°C (barre 20 μm)..... 106*

Figure III-12 Plusieurs événements du bourgeonnement et de la fission des domaines en phase L_o induits par la $sPLA_2$ à partir d'une vésicule composée de PC/PC/SM/Chol (40:5:45:10) à 20°C (barre 20 μm)..... 107*

Figure III-13 Formation d'un cou infinitésimal d'un bourgeon en phase L_o induit par la $sPLA_2$ à partir d'une vésicule composée de PC/PC/SM/Chol (40:5:45:10) à 20°C (barre 20 μm)..... 109*

Figure III-14 Deux événements du bourgeonnement induits par la $sPLA_2$ sans fission des domaines en phase L_o à partir d'une vésicule composée de PC/PC/SM/Chol (40:5:45:10) à 14°C (barre 20 μm) 110*

Figure III-15 a) Bourgeonnement avancé induit par la $sPLA_2$ à partir d'une vésicule composée de PC/PC/SM/Chol (40:5:45:10) à 14°C : a) en contraste de phase, b) en fluorescence (barre 20 μm)..... 111*

Figure III-16 Deux événements du bourgeonnement sans fission des domaines en phase L_o induits par la $sPLA_2$ inactive (inhibée par EDTA, 10mM) à partir d'une vésicule composée de PC/PC/SM/Chol (40:5:45:10) à 30°C (barre 20 μm) 112*

Figure III-17 Rétrécissement progressif d'une vésicule composée de EYPC à 30°C (barre 20 μm)..... 114

Figure III-18 Rupture et désintégration complète de la membrane d'une vésicule composée de EYPC à 30°C (barre 20 μm)..... 115

Figure III-19 Rupture locale et refermeture de la vésicule composée de EYPC à 30°C (barre 20 μm) 116

Figure III-20 Interaction de la $sPLA_2$ avec une vésicule composée de PC/PC/SM (45:5:50) à 30°C (barre 20 μm)..... 117*

Figure III-21 Interaction de la $sPLA_2$ avec une vésicule composée de PC/PC/SM/Chol (55:5:20:20) à 31°C, exclusion d'un domaine en phase L_o et désintégration de la phase L_d (barre 20 μm) 119*

Figure III-22 Interaction de la $sPLA_2$ avec une vésicule composée de PC/SM/Chol (1/1/1) (barre 20 μm) . 120

Figure III-23 Interaction de la $sPLA_2$ avec une vésicule composée de EYPC/PC/DPPC/Chol (40/5/45/10) à 30°C (barre 20 µm) 121*

Figure III-24 Visualisation d'une vésicule de morphologie de phase différente composée de EYPC/PC/D-DPPC /Chol (40/5/45/10) en fonction de la température (barres mesurent 20 µm) 122*

Figure III-25 Interaction de la $sPLA_2$ avec une vésicule composée de PC/PC/SM/Cer (45/5/48/2) à 37°C (barre 20 µm) 124*

Figure III-26 Interaction de la $sPLA_2$ avec une vésicule composée de PC/PC/SM/Cer/Chol (40/5/43/2/10) à 37°C (barre 20 µm) 125*

Figure III-27 Activité de la $sPLA_2$ sur SUV composées de PC et différentes concentrations de la SM et du Cer 126

Figure III-28 Bourgeonnement et fission des domaines en phase L_o induits par la LysoPC à partir d'une vésicule composée de PC/PC/SM/Chol (40:5:45:10) à 30°C (barre 20 µm) 147*

Figure III-29 Bourgeonnement, transformations morphologiques du bourgeon et fission des domaines en phase L_o induits par la LysoPC à partir d'une vésicule composée de PC/PC/SM/Chol (40:5:45:10) à 30°C (barre 20 µm) 148*

Figure III-30 Interaction de Brij 98 avec VGUs hétérogènes (PC/PC/SM/Chol (55:5:20:20)) avec le Brij 98 à 34°C. Deux événements de bourgeonnement et de fission des domaines en phase L_o à la région de l'équateur (barre 20µm).....150*

Figure III-31 Interaction de VGUs hétérogènes (PC/PC/SM/Chol (55:5:20:20)) avec le Brij 98 à 34°C. Le bourgeonnement et la fission d'un domaine en phase L_o (barre 20µm).....152*

Figure III-32 Interaction de VGUs hétérogènes (PC/PC/SM/Chol (55:5:20:20)) avec le Triton X – 100 à 34°C. Le bourgeonnement et la fission d'un domaine en phase L_o (barre 20µm).....153*

Figure III-33 Interaction de VGUs hétérogènes (PC/PC/SM/Chol (55:5:20:20)) avec le Brij 98 à 4°C. La rupture d'un domaine en phase L_o accompagné d'un bourgeonnement sans fission (barre 20µm).....154*

Figure III-34 Interaction de VGUs hétérogènes (PC/PC/SM/Chol (55:5:20:20)) avec le Triton X – 100 à 4°C. Le bourgeonnement et la fission d'un domaine en phase L_o (barre 20µm) 155*

Figure III-35 Formation de pore par stress mécanique dans des bicouches de DPPC: (a) la structure initiale de la bicouche; (b) amincissement de la bicouche ; (c et d) étapes de la formation du pore et la rupture éventuelle : l'eau est montrée en bleu, les chaînes lipidiques en pourpre, et les têtes polaires en orange. D'après (Tieleman, 2003) 159

Figure III-36 Vue du dessus du processus d'expansion du pore. Les sphères oranges représentent le groupe phosphate des têtes polaires, les queues lipidiques sont en rouge et les molécules d'eau - en bleu. D'abord le pore est petit, puis avec le temps sa taille augmente et après plusieurs ns le pore occupe la majeure partie de la boîte de simulation. Enfin la membrane est considérée comme désintégrée. D'après (Leontiadou, 2004) 159

Figure III-37 Un modèle schématique du mécanisme du bourgeonnement et de la fission des domaines L_o à partir des VGUs hétérogènes, contenant de rafts, induits par l'activité asymétrique de la $sPLA_2$ et les molécules actives au bord : (a) la bicouche contenant de rafts; (b) attaque de la $sPLA_2$; (c) molécules actives au bord; (d) exclusion du domaine L_o à partir de la matrice L_d.....161

Figure III-38 Modèle des transformations structurales d'un pore suivant sa croissance: a) pore hydrophobe, h=d ; b) pore hybride, h<d ; c) pore hydrophile, h=0 : R est le rayon du cercle axial de la surface toroïdale, r est le rayon de la section transversale fermée du pore, d est l'épaisseur de la bicouche et h est la taille de la région hydrophobe du pore *163*

Figure III-39 Mécanisme d'exclusion des domaines en phase L_o à partir de la phase L_d. Formation de pores aux alentours de l'interface L_d/L_o *164*

Liste des Tableaux

Tableau I-1 Réduction de pourcentage de l'aire de la tête polaire des monocouches, composées des mélanges équimolaires de SM/Chol et de PC/Chol à une compression définie. D'après (Binder, 2003).....32

Tableau I-2 Influence de la géométrie moléculaire sur la stabilité des phases lipidiques. D'après (Israelachvili, 1985).....63

Tableau I-3 Module de courbure.....68

Tableau I-4 Module d'expansion.....68

Tableau III-1 Etude comparative entre SUVs et VGUs. Activité enzymatique mesurée sur SUVs et transformations morphologiques sur VGUs.....143

Articles

1. Staneva, G., M. I. Angelova, and K. Koumanov, *Phospholipase A_2 promotes raft budding and fission from giant liposomes.* Chemistry and Physics of Lipids, 2004. **129**(1): p. 53-62.

2. Staneva, G., A. Momchilova, M. Angelova, and K. Koumanov, *Regulatory effect of sphingolipids on secretory phospholipase A_2. Comparative study using SUV and GUV*. Comptes rendus de l'Academie Bulgare des Sciences, 2004. **57**(1): p. 59-64

3. Staneva, G., K. Koumanov, G. Trugnan, and M. I. Angelova, *Detergents induce raft-like domains fission from giant unilamellar vesicles. A direct microscopy observation.* (soumis)

Dynamique des membranes hétérogènes et effets des molécules d'asymétrie stérique positive. Étude sur des vésicules géantes

Résumé

Les systèmes modèles (vésicules géantes unilamellaires) représentent un outil indispensable pour étudier la formation, la stabilité, la dynamique et les fonctions des rafts dans les membranes biologiques. L'originalité de notre étude réside : i) dans la visualisation du bourgeonnement et de la fission induits par des agents biologiques ($sPLA_2$ ou Lyso PC) et ii) dans la visualisation directe de la solubilisation d'une membrane modèle de type L_d/L_o ainsi que le bourgeonnement et la fission des domaines L_o traitée avec des détergents (Triton X-100, Brij 98). Ces expériences appuient l'idée que l'isolement de DRM à partir des membranes cellulaires n'est probablement pas un artefact. Nous avons décrit un mécanisme possible pour l'expulsion d'une vésicule en phase L_o déclenché par des molécules d'asymétrie stérique positive. Enfin, les VGU hétérogènes peuvent présenter un modèle assez proche des phénomènes observés sur les membranes biologiques.

Abstract

The model systems (giant unilamellar vesicles, GUVs) represent an essential tool to study the formation, stability, dynamics and the functions of rafts in biological membranes. We developed a methodology for studding domain budding and fission from a heterogeneous GUV. That made it possible: i) to visualize vesicle budding and fission events induced by biological agents ($sPLA_2$, Lyso PC), and, ii) to directly visualize the effects of detergents (Triton X100, Brij 98) on GUVs - the selective solubilization of the L_d/L_o membrane and the budding and fission of L_o domains. These experiments support the idea that DRM extraction from cell membranes was not an artefact. We suggested as well a possible mechanism for the L_o domain vesicle fission induced by molecules having positive steric asymmetry. Finally, our results show that giant heterogeneous vesicles present an essential progress in the development of model membrane systems mimicking biological membrane structure and functions.

MOTS-CLES: GUV; Rafts; PLA_2; DRM ; Detergents ; Budding ; Fission