



Instabilités des membranes lipidiques inhomogènes. Implications biologiques.

Jean-Marc Allain

► To cite this version:

Jean-Marc Allain. Instabilités des membranes lipidiques inhomogènes. Implications biologiques.. Biophysique [physics.bio-ph]. Université Paris-Diderot - Paris VII, 2005. Français. NNT: . tel-00011333

HAL Id: tel-00011333

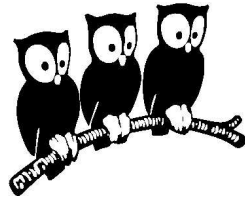
<https://theses.hal.science/tel-00011333>

Submitted on 10 Jan 2006

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.

Ecole normale supérieure
Département de Physique
Laboratoire de Physique Statistique



Thèse de doctorat de l'université Paris VII

présentée par

Jean-Marc Allain

pour obtenir le titre de Docteur de l'Université Paris VII

Spécialité : Champs Particules Matières

**Instabilités des
membranes lipidiques inhomogènes.
Implications biologiques.**

Soutenue le 12 juillet 2005 devant le jury composé de :

Patricia Bassereau	Rapporteur
Martine Ben Amar	Directeur
Elisabeth Charlaix	Examineur
Jean-Baptiste Fournier	Examineur
Alain Goriely	Rapporteur
Germain Trugnan	Examineur

Table des matières

Remerciements	7
Introduction générale	9
I Introduction	13
I.1 Les vésicules : modèles de la membrane cellulaire	13
I.2 Propriétés des vésicules	15
I.3 Applications des vésicules	17
I.3.a Intérêt thérapeutique	17
I.3.b Intérêt cosmétologique	18
I.3.c Intérêt biologique	18
I.3.d Intérêt en micro-manipulation	19
I.4 Mélange de lipides	21
I.4.a Les lipides de la membrane	21
I.4.b Différents états des bicouches lipidiques	23
I.4.c Mélanges ternaires de lipides	24
I.4.d Domaines dans la membrane cellulaire	26
I.5 Résumé	28
II Physique de la bicouche	29
II.1 Elasticité de Helfrich	29
II.2 Fluctuations	32
II.3 Formes d'équilibre	35
II.4 Modèle en double couche : effets de différence d'aires	36
II.5 Absorption de molécules	37
II.6 Hydrodynamique	39
II.7 Membrane à deux domaines	41
II.7.a Elasticité	41
II.7.b Hydrodynamique	43

II.8 Résumé	43
III Fission de tubes membranaires à deux phases	45
III.1 Présentation	45
III.2 Tubes homogènes	49
III.2.a Description énergétique	49
III.2.b Stabilité d'un tube homogène.	50
III.3 Fission d'un tube à deux domaines	51
III.3.a Equations de forme - Conditions aux limites	52
III.3.b Calcul linéaire - solutions analytiques	54
III.3.c Méthode numérique	57
III.3.d Formes d'équilibre	60
III.3.e Etat de transition	62
III.3.f Temps de fission	65
III.3.g Evolution du temps de fission avec la tension du tube	66
III.4 Effets de taille finie	68
III.5 Résumé	70
III.6 Article "Fission of a Multiphase Membrane Tube"	70
IV Bourgeonnement et fission de vésicules bi-phasiques	75
IV.1 Présentation	75
IV.2 Instabilité due à l'absorption de molécules sur une bicouche en calotte sphé- rique	83
IV.2.a Introduction	83
IV.2.b Résultats complémentaires	86
IV.2.c Développements	88
IV.3 Bourgeonnement et fission d'une vésicule à deux domaines	88
IV.3.a Introduction	88
IV.3.b Résultats complémentaires	91
IV.3.c Développements	94
IV.4 Article "Biphasic vesicle : instability induced by adsorption of molecules" . .	95
IV.5 Article "Budding and Fission of Multiphase Vesicle"	111
V Instabilité hydrodynamique d'un domaine lipidique	149
V.1 Présentation	149
V.2 Equations hydrodynamiques	152
V.2.a Hydrodynamique	153
V.2.b Conditions de raccord	155

V.3	Modèle de Saffman-Taylor	155
V.3.a	Solution axisymétrique	156
V.3.b	Analyse de stabilité	157
V.4	Modèle simple : bicouche sans eau environnante	160
V.4.a	Solution axisymétrique	160
V.4.b	Analyse de stabilité	161
V.5	Modèle complet	165
V.5.a	Solution axisymétrique	166
V.5.b	Analyse de stabilité	168
V.5.c	Cas limite : friction négligeable	170
V.6	Cas général	171
V.7	Résumé	172
Conclusion générale		173
Annexes		177
A Éléments de géométrie différentielle		179
A.1	Éléments de géométrie différentielle	179
A.2	Calotte sphérique	181
A.2.a	Calcul des courbures	181
A.2.b	Equations d'Euler-Lagrange	184
B Calcul variationnel		185
B.1	Éléments de calcul variationnel	185
B.1.a	Equations d'Euler-Lagrange	185
B.1.b	Multiplicateurs de Lagrange	186
B.1.c	Conditions aux limites	188
B.1.d	Quelques simplifications	189
B.2	Vésicule axisymétrique	190
C Equation de Stokes		195
Bibliographie		199

Remerciements

Le présent manuscrit est l'aboutissement de trois années de travail au Laboratoire de Physique Statistique de l'Ecole Normale Supérieure, où j'ai bénéficié de conditions de travail exceptionnelles. Je remercie Jacques Meunier de m'y avoir accueilli.

Je remercie très chaleureusement Martine Ben Amar qui a accepté de m'encadrer pendant ces années. J'ai pu bénéficier de ses conseils sur les aspects à la fois scientifiques et humains de la thèse. J'ai ainsi eu l'occasion d'apprécier son sens physique, son acharnement dans les aspects techniques et sa rigueur mais aussi sa grande disponibilité pour ses étudiants.

Patricia Bassereau et Alain Goriely ont accepté la lourde tâche d'être rapporteurs de ce manuscrit. Elisabeth Charlaix, Jean-Baptiste Fournier et Germain Trugnan ont bien voulu faire parti de mon jury. Je voudrais les remercier pour l'intérêt et le regard critique qu'ils ont porté sur ce travail.

Pendant ces années, j'ai profité largement de l'environnement extraordinaire du Département de Physique. Trop de gens ont apporté une contribution à cette thèse pour que je puisse les citer tous. Je voudrais remercier particulièrement Moktar Adda-Bedia, Arezki Boudaoud et Sébastien Neukirch ; j'ai largement profité de leurs lumières et de leurs amitiés. Mes remerciements vont aussi à Cyril Dubus et Alberto Sicilia qui sont venus en stage sous ma responsabilité. Ce travail n'aurait pas été possible sans les compétences informatiques de Rémi Portier et Daniel Lemoal. Nora Sadaoui, Carole Philippe m'ont aidé dans mes toujours difficiles rencontres avec les démarches administratives.

Pendant ces trois années, mon travail s'est largement appuyé sur des collaborations extérieures. Je voudrais remercier les gens du CHU Saint Antoine : Miglena Angelova, qui est à la base de ces travaux, Nicolas Puff, Antonin Lamazière et Germain Trugnan. Un remerciement particulier va à Galya Staneva, qui est repartie en Bulgarie, pour la patience dont elle a fait preuve pour m'expliquer ses expériences.

Ma route a croisé celle d'Aurélien Roux dans un congrès. Cela a été l'occasion d'une collaboration très enrichissante avec l'Institut Curie. Je le remercie, ainsi que Cornelis Storm, Patricia Bassereau et Jean-François Joanny. Ils m'ont apporté une grande expérience de la biophysique, à la fois expérimentale et théorique.

De nombreuses personnes ont éclairé ces années par leurs amitiés. Le condensat de la DC21, auquel ont contribué Eric Sultan, Paul François, Camille Enaud, Chi-Tuong Pham, Christophe Mora, Olaf Dümmer et Hervé Rouault, m'a accueilli à bras ouverts, malgré la distance. Frédéric Caupin, Eric Herbert, Agnès Huynh, Sophie Mora et Jérôme Tignon ont contribué au charme de ces années.

Enfin, j'adresse un immense merci à ma femme, Clémence, qui m'a accompagné chaque jour.

Introduction générale

Les cellules sont entourées d'une paroi, la membrane cellulaire, qui évite la dispersion de l'intérieur de la cellule dans le milieu environnant. Une membrane similaire forme la paroi des compartiments internes de la cellule, permettant ainsi une organisation complexe. La membrane cellulaire est principalement formée de lipides, qui lui donnent ses propriétés mécaniques. C'est un milieu complexe et actif : elle peut être déformée par l'action des protéines et est constamment renouvelée par le transport de lipides dans la cellule.

Pour mimer la membrane et mieux en comprendre les propriétés, il est possible d'utiliser un système modèle formé uniquement de lipides. Ceux-ci ont la capacité de s'assembler spontanément en une double couche de molécules, comme dans la membrane cellulaire. Lorsqu'elle est plongée dans l'eau, cette bicouche se referme sur elle-même pour former une vésicule. Cette organisation spontanée est due au caractère amphiphile et à la forme cylindrique des lipides ; aussi, les vésicules présentent des similitudes avec les bulles de savon et avec les cristaux liquides smectiques.

Les propriétés physico-chimiques des bicouches ont été largement étudiées et sont aujourd'hui assez bien cernées. Ainsi, les lipides sont en général libres de diffuser librement dans le plan de la bicouche car il n'y a pas d'interaction structurante assez forte. De plus, la bicouche est très facile à courber, au point qu'elle est sensible à l'agitation thermique. Les vésicules présentent des effets entropiques qui ont été largement étudiés par les physiciens statisticiens. La souplesse de la bicouche la rend de plus facilement déformable et permet aux vésicules d'adopter des formes très diverses.

Si les vésicules ont permis de mieux comprendre les propriétés de la membrane cellulaire, il est possible d'améliorer le modèle en fabriquant des vésicules à partir d'un mélange de lipides, dont la composition se rapproche de celle de la cellule. Ces mélanges peuvent se séparer en deux phases, conduisant à l'apparition de domaines à la surface de la vésicule. Ces domaines, enrichis en cholestérol, ont des propriétés similaires à la bicouche classique mais sont plus structurés, c'est à dire plus visqueux et plus durs à courber. Les vésicules à base de mélanges de lipides forment un système modèle des 'rafts' cellulaires, des petits domaines encore mal connus mais potentiellement impliqués dans de nombreuses fonctions cellulaires.

Dans ce mémoire, nous étudions analytiquement et numériquement l'influence de la présence de domaines de type 'raft' sur le comportement mécanique des vésicules. Nous sommes partis de plusieurs situations expérimentales, montrant toutes des instabilités de la forme du domaine. Comprendre l'origine physique de ces instabilités permet de cerner comment interagissent les deux phases sur une même bicouche.

Ce mémoire est divisé en cinq chapitres, deux chapitres d'introduction et trois chapitres présentant des instabilités d'un domaine. Dans le premier chapitre, nous introduisons les vésicules, leurs propriétés spécifiques et leurs applications, en tant que système mimétique de la membrane cellulaire mais aussi en tant qu'objet physico-chimique en pharmacie, en micro-manipulation etc. Nous y introduisons aussi les mélanges de lipides avec les différentes phases possibles et les impacts potentiels de l'existence de domaines de composition différente pour la cellule.

Le deuxième chapitre est consacré plus spécifiquement au formalisme décrivant le comportement de la bicouche. Nous introduisons ainsi la réponse de la bicouche à une déformation hors du plan, avec l'énergie de Helfrich, en tenant compte des effets entropiques mais aussi d'effets supplémentaires comme l'absorption de molécules; nous présentons l'hydrodynamique adaptée au fluide bidimensionnel qu'est la bicouche. Enfin, nous montrons comment ces formalismes décrivant une bicouche homogène peuvent être utilisés pour permettre la description d'une vésicule bi-phasique.

Le troisième chapitre est consacré à l'étude d'une instabilité de forme : la fission de tubes membranaires. Cette instabilité a lieu lorsque la séparation de phase se produit dans une bicouche repliée en un tube; on constate alors que le tube casse au niveau de l'interface entre les deux phases. Notre modèle nous permet de déterminer la forme du tube de membrane comportant un domaine puis de construire un temps caractéristique compatible avec les temps expérimentaux.

Le quatrième chapitre porte sur des instabilités de forme d'une vésicule tendue lors de l'absorption de molécules. Suivant la nature des molécules et leur concentration, deux instabilités peuvent se développer, éventuellement en même temps : une instabilité de la forme d'une des phases, qui va alors perdre sa forme initiale en calotte sphérique, et une instabilité de la forme du système complet, qui va entraîner un bourgeonnement puis une fission des domaines. Ces instabilités étant observées pour des détergents, c'est à dire des molécules amphiphiles chimiquement passives mais de forme coniques, nous avons construit un modèle strictement mécanique : c'est l'impact de la forme de la molécule sur la forme locale de la membrane qui détermine si le système initial est stable ou s'il se développe une seule instabilité, ou les deux. Notre approche, complètement analytique, permet aussi de montrer une similitude entre l'éjection d'un domaine induite par l'absorption et celle observée lors d'un choc osmotique.

Le dernier chapitre présente une instabilité du contour d'un domaine lorsque celui est dissout progressivement dans le milieu environnant. La dissolution du domaine n'entraîne pas la rupture de la membrane mais un mouvement des lipides vers la source ; aussi, nous sommes en présence d'une instabilité hydrodynamique proche de celle de Saffman-Taylor. Toutefois, l'aspect bidimensionnel du fluide de lipides entraîne une grande différence de comportement avec les fluides tridimensionnels, même confinés.

Ces travaux illustrent comment la présence de domaines dans la bicouche permet de sonder les différentes propriétés de ce matériau anisotrope. La présence des domaines, en créant une inhomogénéité latérale, fragilise la bicouche en favorisant le développement d'instabilités ; comprendre les origines physiques de ces instabilités nous permet à la fois de tester les modèles de la bicouche mais aussi de mieux cerner comment ces domaines peuvent être utilisés.

Chapitre I

Introduction

I.1 Les vésicules : modèles de la membrane cellulaire

La cellule, la brique élémentaire des êtres vivants, est un objet d'une très grande complexité : c'est une structure capable de s'auto-entretenir, de se dupliquer, d'interagir avec son environnement, etc. La richesse des propriétés de la cellule est liée à son organisation interne : la cellule comporte plusieurs compartiments distincts, les organelles (voir figure I.1). L'existence de cette organisation interne a été découverte par Golgi à la fin du XIX^{ème} siècle mais les principaux progrès datent du milieu du XX^{ème} siècle avec la mise au point de la microscopie électronique et des techniques de centrifugation.

Un élément clé pour le fonctionnement de la cellule est sa membrane. Celle-ci forme une barrière physique, délimitant autant la cellule que les différentes organelles. Elle est aussi utilisée dans des processus cellulaires actifs, comme le transport de lipides ou de protéines. La structure de la membrane est connue depuis le début du siècle : elle est principalement composée d'une double couche de lipides, des molécules amphiphiles, de forme cylindrique (voir figure I.2). La bicouche est très fine (5 nm) par rapport à la taille des organelles (environ 1 μm) mais c'est une barrière infranchissable pour les ions ou les grosses molécules. En plus des lipides, la membrane cellulaire comporte des protéines, des sucres, etc. C'est donc un milieu complexe, chimiquement actif et en constant renouvellement [1].

La forme des lipides est très importante car elle impose la structure et les propriétés de la membrane. Les molécules amphiphiles, tels les lipides, sont formées par un fragment hydrophile et un fragment hydrophobe ; la nécessité de minimiser le contact entre l'eau et la partie hydrophobe provoque une organisation spontanée des molécules. La structure adoptée dépend de la géométrie des molécules (voir figure I.3) ; ainsi, les molécules fortement coniques, comme les savons classiques, vont s'organiser en petites sphères ou micelles. Les principaux lipides membranaires, formés par une tête hydrophile et deux queues carbonées

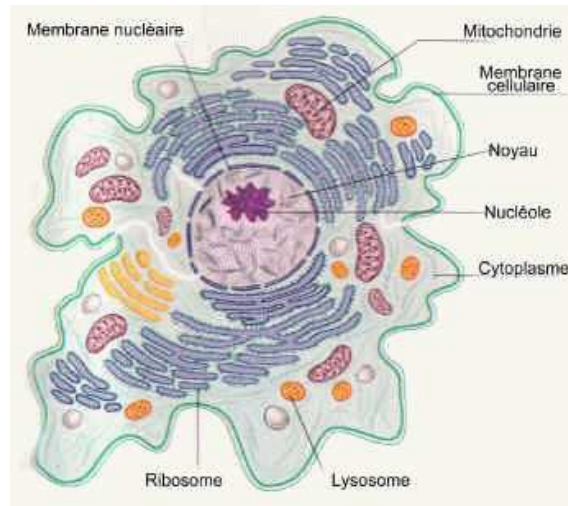


Figure I.1: Représentation schématisée d'une cellule eucaryote, vue en coupe. La cellule possède une organisation très élaborée, avec différentes organelles dont le noyau, l'appareil de Golgi, le réticulum endoplasmique et les mitochondries. Image provenant de biologie-net.free.fr.

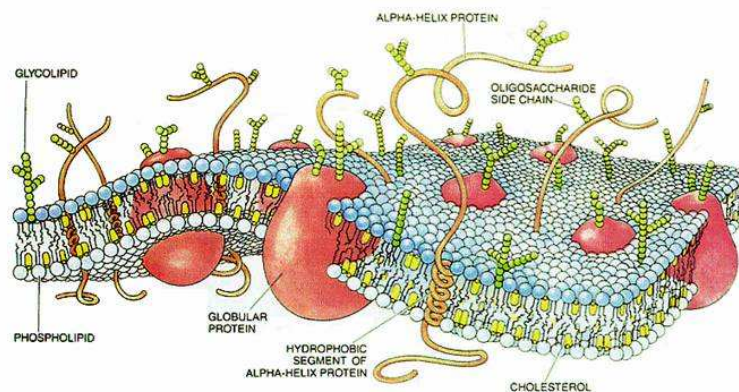


Figure I.2: Représentation schématisée de la membrane cellulaire. La membrane est constituée d'un double feuillet de lipides associé à des protéines et des sucres. Image extraite de en.wikipedia.org/wiki/Cell_membrane.

hydrophobes, ont une forme cylindrique et s'auto-organisent en une bicouche plane. C'est probablement cette faculté d'assemblage spontané qui fait des lipides le matériau de choix pour la construction de la membrane cellulaire.

En raison de la complexité et de l'activité des membranes cellulaires, il n'est pas facile d'étudier leurs propriétés *in vivo*. Il paraît alors judicieux d'utiliser un système modèle formé uniquement de lipides. Les lipides s'organisent en bicouches, qui peuvent s'organiser en une phase lamellaire ou, lorsqu'elles sont plongées en milieu aqueux, se replier sur elles-

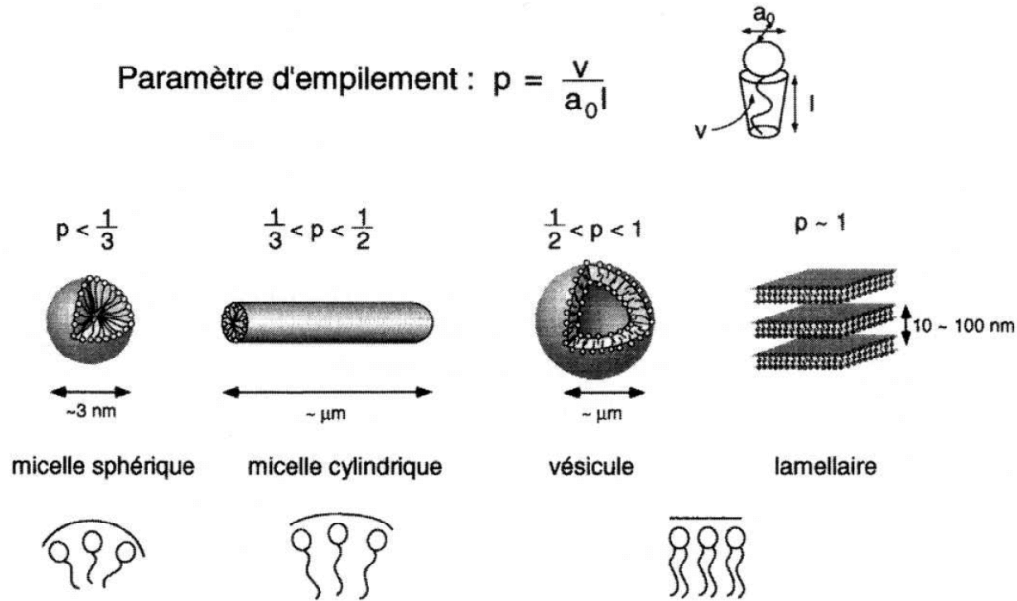


Figure I.3: Organisation des molécules amphiphiles en fonction de leurs géométries. Les détergents classiques ont une forme conique et s'organisent en micelles sphériques. Les lipides ont, en général, une forme cylindrique et s'organisent en bicouche. Figure extraite de [4].

mêmes pour éviter les bords, formant alors une vésicule (voir figure I.4). Par rapport à la membrane cellulaire, les vésicules sont des objets beaucoup plus simples mais aussi beaucoup plus aisés à contrôler expérimentalement. Notons qu'une vésicule peut être formée de plusieurs bicouches de lipides superposées en une structure lamellaire ; si un nombre important de bicouches est présent, les propriétés sont proches de celles des cristaux liquides de type smectiques, conduisant aux figures de myéline [2,3].

Suivant le mode de préparation, le rayon d'une vésicule varie entre 30 nm et 10 μm . Dans la suite, nous nous intéresserons uniquement aux vésicules géantes unilamellaires (GUV), des vésicules formées d'une seule bicouche de lipides avec des rayons typiques de 10 μm , correspondant à la taille des cellules et aux expériences que nous modélisons.

I.2 Propriétés des vésicules

L'étude des systèmes modèles a permis de mieux cerner les propriétés de la bicouche de lipides et donc des membranes cellulaires. Nous présentons ici ces propriétés et quelques unes de leurs conséquences. Nous les détaillerons au chapitre II où nous présentons le formalisme associé.

La forme des lipides et leur organisation spontanée en deux feuillets font de la bicouche

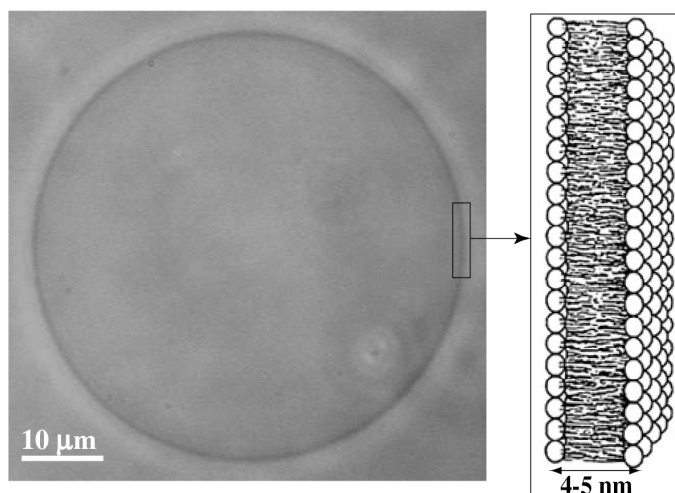


Figure I.4: Image en microscopie de contraste de phase d'une vésicule géante. Le schéma de droite correspond au détail moléculaire de la vésicule, formée d'une bicouche de lipides. Image extraite de [5].

un matériau aux propriétés très anisotropes. Toutes les déformations qui séparent les têtes hydrophiles facilitent la pénétration de l'eau vers le cœur hydrophobe et sont donc défavorisées. En conséquence, les bicouches sont pratiquement inextensibles à l'échelle moléculaire. Les lipides ne pouvant pas se dissoudre dans l'eau environnante, ils sont confinés dans le plan de la bicouche mais, comme ils n'ont pas d'interaction structurante aux températures usuelles, ils peuvent glisser les uns par rapport aux autres dans ce plan. Aussi, la bicouche se comporte dans son plan comme un fluide.

Courber la membrane nécessite d'écarter légèrement les têtes d'un feuillet et de comprimer celles de l'autre ; c'est une déformation qui a un coût énergétique assez proche de l'énergie thermique (entre dix et cent fois plus). Aussi, la bicouche est un objet très souple, facilement déformable. Les vésicules peuvent donc adopter de nombreuses formes : depuis celle d'une sphère à celle d'un tore en passant par une étoile, etc (voir figure I.5) [6–10].

En raison de sa souplesse, la bicouche fluctue autour d'une position moyenne sous l'effet de l'agitation thermique du milieu environnant. La plupart de ces fluctuations ont lieu à des échelles inférieures à la résolution des microscopes et sont donc invisibles. La surface observée en microscopie optique est alors la position moyenne de la bicouche. Il est possible d'augmenter la surface visible en supprimant des fluctuations, lesquelles servent de réservoir de matière [11] ; pour cela, il faut soit augmenter le volume intérieur de la vésicule, par exemple en changeant la pression osmotique [12], soit gêner les fluctuations, par exemple en imposant un flux hydrodynamique [13] ou en approchant la membrane d'un obstacle [14]. Toutefois, supprimer des fluctuations a un coût entropique ; ceci entraîne

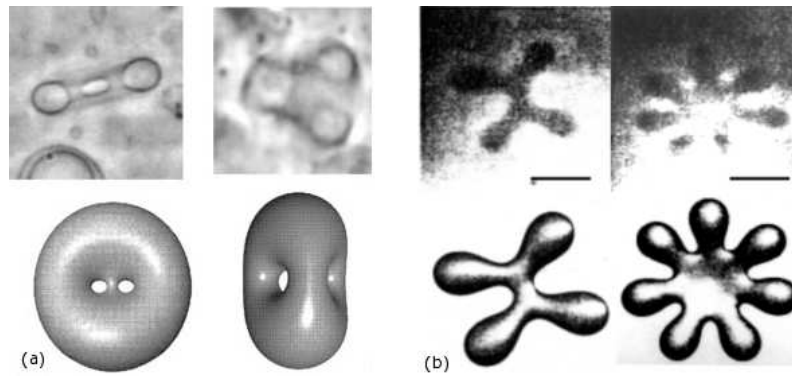


Figure I.5: Différentes formes de vésicules. (a) Vésicules de genre topologique non sphérique ainsi que les formes numériques associées. Image extraite de www.chem.ucla.edu/~michalet/papers/larecherche/f-larecherche.html. (b) Vésicules en 'étoiles de mer', observées en microscopie de contraste de phase et comparées aux formes obtenues numériquement (figures du bas). La barre représente $5\ \mu m$. Image extraite de [9].

l'existence d'une tension de surface dépendante de l'étirement de la vésicule : moins il reste de fluctuations, plus il est entropiquement favorable de regagner des degrés de liberté. De même, lorsque la vésicule est approchée d'un obstacle, il apparaît une force répulsive, dite de Helfrich, à longue portée [8, 14].

Les fluctuations de la bicouche ont aussi des effets sur les molécules absorbées dans la membrane : la présence de molécules absorbées dans la bicouche va empêcher certaines fluctuations. Aussi, il est préférable d'éloigner le plus possible les molécules pour augmenter l'entropie ; il apparaît donc une force répulsive à longue portée entre les molécules, qui peut jouer un rôle dans l'arrangement des molécules sur la bicouche [15, 16].

I.3 Applications des vésicules

En plus d'être un système mimétique de la membrane cellulaire, les vésicules sont largement utilisées dans d'autres applications, principalement pour leur capacité à séparer deux milieux aqueux l'un de l'autre.

I.3.a Intérêt thérapeutique

Les vésicules utilisées à des fins thérapeutiques sont appelées liposomes. Elles peuvent être utilisées pour transporter dans l'organisme des médicaments hydrophiles ou non : un médicament soluble dans l'eau sera dissout dans le milieu aqueux à l'intérieur de la vésicule alors qu'un médicament hydrophobe sera dissout dans la bicouche. Les liposomes

permettent plusieurs modes de délivrance des médicaments soit en fusionnant avec la membrane cellulaire soit en étant endocytés dans la cellule soit même en diffusant progressivement la molécule active à proximité de la cellule [17].

Les liposomes peuvent être, suivant les besoins, inhalés dans les poumons, injectés dans un muscle ou injectés dans le sang. Toutefois, sans préparation spéciale, les liposomes sont rapidement éliminés de la circulation par l'organisme, qui les accumule dans le foie et la rate. Aussi, c'est une méthode bien adaptée pour traiter des affections spécifiques de ces deux organes. Il est possible d'augmenter la durée de vie des liposomes dans le sang, par exemple par addition de polyéthylèneglycol ou de gangliosides. Ceci permet le traitement d'autres organes mais nécessite une préparation plus complexe du liposome.

Leur capacités à fusionner avec la membrane rend les liposomes intéressants pour la thérapie génique : ils permettent d'amener des fragments d'ADN dans la cellule. Toutefois, cette technique nécessite une préparation complexe de la vésicule et ne permet pas encore un aussi bon ciblage du noyau cellulaire que les vecteurs viraux [18]. Par contre, la capacité à exposer des protéines à la surface permet d'utiliser les liposomes comme vaccins, ayant l'avantage de ne pas contenir de matériel génétique tout en présentant la molécule antigénique [17].

I.3.b Intérêt cosmétologique

Les vésicules utilisées dans la cosmétique sont aussi appelées liposomes. Tout comme celles utilisées en pharmacie, elles servent à appliquer localement une substance, sur la peau dans le cas présent. En effet, la cosmétique utilise largement des préparations à base d'émulsions huileuses ou de solutions alcooliques ; l'application prolongée d'huile ou d'alcool pouvant abîmer la peau, il est préférable de localiser le traitement. De plus, l'utilisation de liposomes capables de fusionner avec les cellules pourrait augmenter l'efficacité de certains produits.

I.3.c Intérêt biologique

Les vésicules, utilisées comme systèmes modèles de la membrane cellulaire, ont largement contribué à en comprendre les propriétés mécaniques. Mais leur intérêt biomimétique ne s'arrête pas là : elles permettent aussi de mimer des processus cellulaires impliquant la membrane. Ainsi, il est possible de tester un mécanisme supposé de formation de tubes de membrane dans les cellules [19] (voir chapitre III). De même, il est possible de reconstituer dans une vésicule un aster de microtubules, c'est à dire une structure de microtubules en étoile (voir figure I.6) [20]. Les microtubules sont des filaments de tubulines polymérisées et sont utilisés par la cellule comme composants de son cytosquelette ; lors de la réplika-

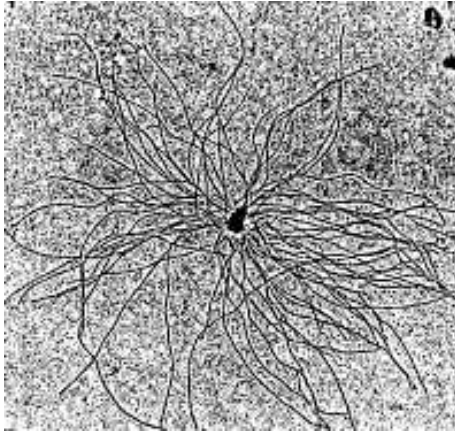


Figure I.6: Photographie de microtubules poussant en étoile depuis un centrosome; la structure formée mime celle d'un aster cellulaire. Cette structure a été réalisée en solution. Image extraite de users.rcn.com/~jkimball.ma.ultranet/BiologyPages/C/Cytoskeleton.html

tion de la cellule, il apparaît un aster de microtubules qui va permettre de tirer de part et d'autre le matériel génétique. Comprendre comment ces structures grandissent et interagissent avec la membrane est une étape dans la compréhension du processus de division.

A plus long terme, il est envisageable d'utiliser les vésicules pour déterminer les constituants essentiels au fonctionnement d'une cellule. Ainsi, l'équipe d'Albert Libchaber a construit un système permettant l'expression de gènes dans une vésicule [21]. Le système est formé d'une vésicule contenant des extraits cellulaires, comportant tout l'appareillage protéique pour l'expression des gènes ainsi que des gènes à exprimer. L'énergie nécessaire au fonctionnement de ce système est fourni par l'ATP dissout dans le milieu environnant; pour permettre à l'ATP de pénétrer dans la vésicule, une protéine formant des pores est synthétisée par le génome présent dans la vésicule. Ces pores sont suffisamment grands pour faire rentrer l'ATP mais suffisamment petits pour ne pas permettre la sortie du contenu de la vésicule. Le bon fonctionnement de cette cellule artificielle est vérifié en exprimant un peptide fluorescent : l'intensité de fluorescence croît pendant plusieurs heures (voir figure I.7).

I.3.d Intérêt en micro-manipulation

Les vésicules forment des réservoirs de petits volumes, isolés du milieu environnant. Aussi, il est possible de les utiliser comme des petits réacteurs chimiques, en induisant des réactions à l'intérieur de l'espace confiné d'une vésicule [22–24]. La possibilité de connecter les vésicules par des tubes de membrane permet aussi de former des circuits micro-fluidiques [25] (voir figure I.8). Les contenus peuvent être transférés d'une vésicule à une autre simplement en appuyant sur la vésicule à remplir : la présence d'un obstacle augmente la tension de surface, qui provoque un flux de lipides et un écoulement depuis la vésicule voisine [26].

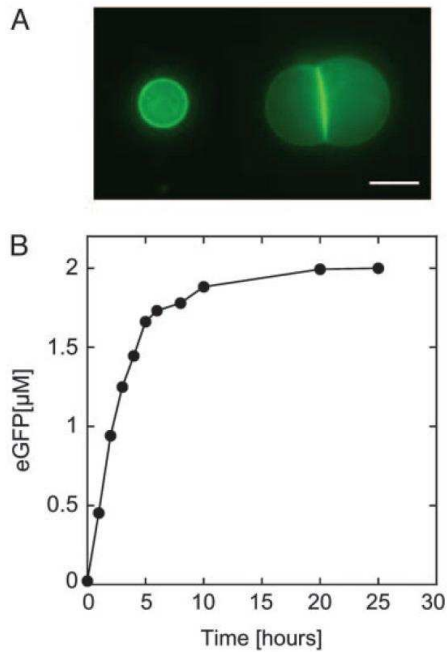


Figure I.7: Vésicule exprimant le peptide fluorescent 18L-eGFP ; la vésicule contient un plasmide contenant le gène pour ce peptide ainsi que des extraits cellulaires de la bactérie *E. Coli*. L'énergie est fournie pour l'ATP dissout dans le milieu environnant. (A) Images en fluorescence d'une vésicule unique et d'un doublet de vésicules exprimant le peptide fluorescent 18L-eGFP depuis cinq heures. La barre représente 15 μm . (B) Cinétique de l'expression au cours du temps. Images extraites de [21].

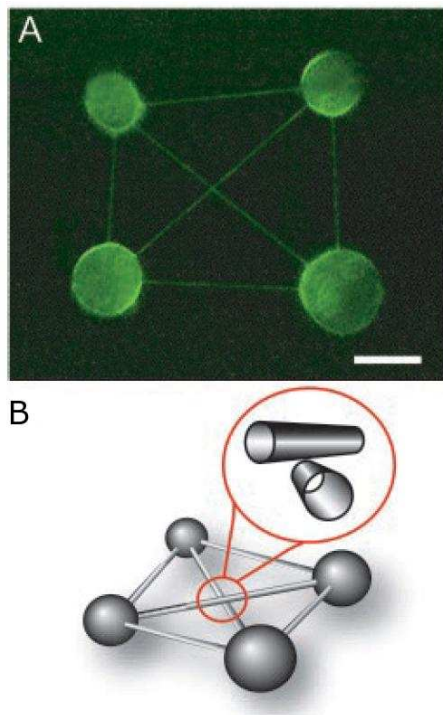


Figure I.8: Réseau de vésicules complètement connecté. (A) Image en fluorescence de quatre vésicules connectées par un réseau de tubes. Les bicouches lipidiques sont rendues fluorescentes à l'aide d'un marqueur. Barre : 10 μm . (B) Schéma du réseau formé. Images extraites de [25].

Les vésicules peuvent aussi servir pour mesurer des forces, bien que les globules rouges soient plus souvent utilisées. Elles sont alors utilisées comme des ressorts de petite taille, par exemple pour mesurer l'interaction entre deux molécules uniques [27]. Le principe de ce type d'expérience est le même que celui du microscope à force atomique : on approche deux

surfaces couvertes des molécules pertinentes ; lorsque les deux surfaces sont suffisamment proches, les molécules interagissent, ce qui exerce une force sur le système. Cette force peut être mesurée en observant la déformation de la vésicule supportant l'une des deux surfaces, l'équivalent de la cantilever du microscope à force atomique.

I.4 Mélange de lipides

La membrane cellulaire n'est pas formée d'un seul type de lipides mais d'un mélange. En raison de la faible interaction entre les lipides de la membrane cellulaire, les molécules diffusent librement dans le plan de la bicouche et la membrane cellulaire semble pouvoir être décrite comme un fluide homogène, servant de solvant pour les protéines [28]. Toutefois, la situation est plus complexe : il existe des domaines dans la membrane. Certains domaines sont dus à des assemblages de protéines, comme les puits formés par la polymérisation de la clathrine ou les cavéolines (voir figure I.9). De plus, il y a de bonnes preuves de l'existence de 'rafts' ou radeaux, des domaines de composition lipidique différente, formés par une séparation de phase des constituants de la membrane. L'existence de ces domaines a été supposée d'abord pour expliquer un transport spécifique de certains lipides, expliquant la différence de composition des différentes organelles. Depuis, de nombreux travaux ont porté sur les 'rafts' mais ceux-ci restent encore mal connus sur beaucoup de points, comme leur composition précise, leur taille et leur rôle exact dans le fonctionnement de la cellule. Ainsi, si les 'rafts' ont été supposés impliqués dans un nombre impressionnant de fonctions ou de maladies de la cellule, il y a aujourd'hui une remise en question de leur rôle réel.

Il est possible de former une bicouche comportant plusieurs types de lipides. L'étude de tels systèmes a permis de mieux comprendre dans quelles conditions un mélange de lipides peut se séparer en des phases différentes, ainsi que les propriétés physico-chimiques des domaines formés. En utilisant des vésicules reproduisant la composition d'une membrane cellulaire, on peut observer une séparation de phase avec la formation de domaines de compositions différentes. Ce système modèle permet de mieux comprendre les interactions entre ces domaines et la bicouche classique et, ainsi leur importance biologique. Il faut néanmoins souligner que ce système modèle est très différent des 'rafts' : les domaines observés dans les vésicules sont beaucoup plus grands et stables que les 'rafts', probablement en raison de l'absence d'activité de la bicouche de la vésicule.

I.4.a Les lipides de la membrane

La membrane cellulaire est formée principalement de trois familles de lipides, de structures chimiques différentes, et donc de propriétés physico-chimiques différentes. Une famille

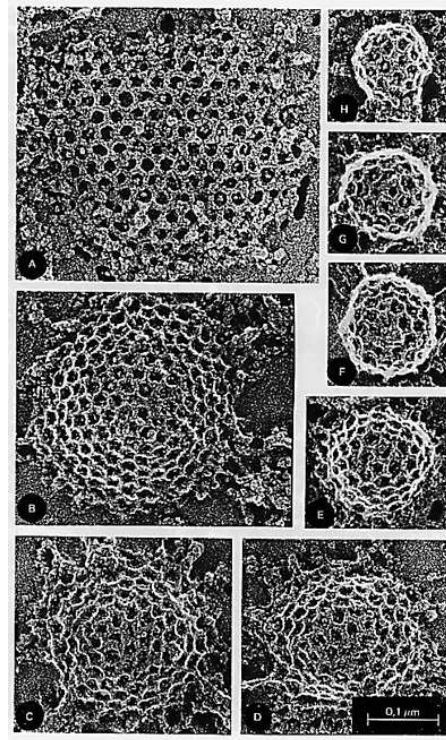


Figure I.9: Domaine membranaire recouvert par la protéine clathrine. La protéine polymérise à la surface de la bicouche et entraîne, sous certaines conditions, la formation d'un bourgeon. Image extraite de www.ub.es/biocel/wbc/biocel/matrices_clatrina.htm

de lipides comporte plusieurs molécules avec une structure de base commune, différant soit par l'extrémité de la tête hydrophile, soit par la longueur des chaînes carbonées (voir figure I.10). Les sphingolipides (comme la sphingomyéline) diffèrent, au moins dans les extraits naturels, des glycérolipides (comme la phosphatidylcholine) par des chaînes carbonées plus longues et plus saturées et par la présence d'un groupement céramide à la place du glycérol entre les chaînes carbonées et la tête hydrophile. La longueur et la saturation des chaînes privilégient une compaction plus importante des chaînes dans la bicouche. Les groupements céramides ont la capacité de former une liaison hydrogène entre eux, à l'inverse des groupements glycérols.

Le cholestérol a une structure très différente : c'est une molécule très hydrophobe, très rigide, avec une petite tête hydrophile. Il est plus petit que les autres lipides de la membrane. Le cholestérol peut interagir avec les lipides environnants soit par des liaisons hydrogènes soit en favorisant la compaction des chaînes.

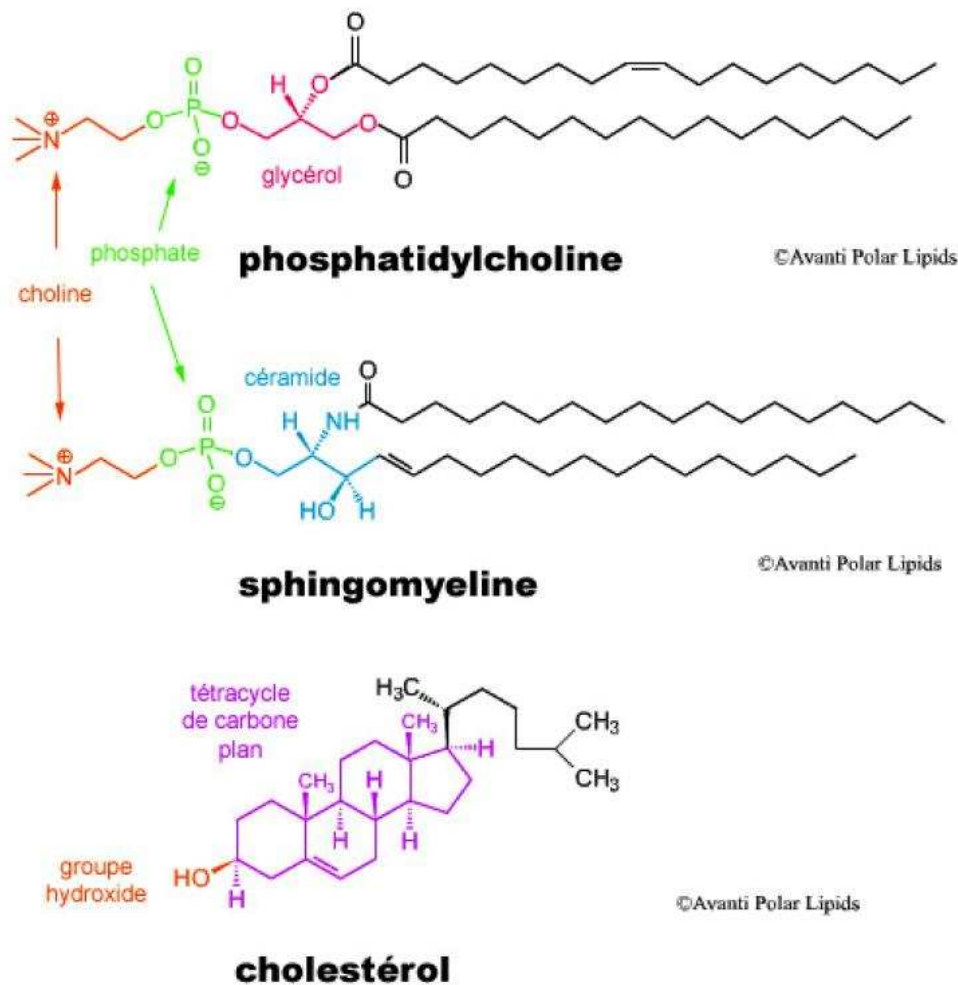


Figure I.10: Structure chimique des trois composants majeurs des membranes cellulaires : un glycérolipide (phosphatylcholine), un sphingolipide (sphingomyéline) et le stérol cholestérol. L'image est extraite de [29] à partir de structures provenant de www.avantilipids.com

I.4.b Différents états des bicouches lipidiques

L'utilisation de vésicules a permis d'étudier les différentes phases possibles de la bicouche, en changeant la température ou la composition [30]. Il existe ainsi une phase lamellaire fluide ou liquide-désordonnée, correspondant à la bicouche 'classique', dite L_α ou l_d ; les lipides y sont libres de se déplacer les uns par rapport aux autres et les chaînes hydrophobes ont un niveau d'entropie élevé. Lorsque la température devient inférieure à la température de fusion (T_M , ou 'melting temperature'), les lipides se structurent en une phase solide-ordonnée ou phase gel, dite L_β ; les interactions de Van der Waals entre les chaînes hydrophobes sont alors optimisées et les lipides ne bougent pratiquement pas.

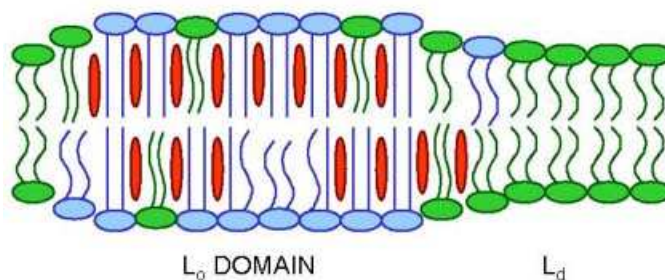


Figure I.11: Coupe schématique d'une bicouche comportant un domaine liquide-ordonné. Les lipides dans le domaine peuvent bouger librement mais sont plus ordonnés ; le domaine est légèrement plus épais.

Bien sûr, la température dépend des interactions et donc du lipide considéré ; par exemple, plus les chaînes carbonées sont longues, plus la température de transition est élevée. La coexistence entre des phases gel et liquide-désordonnée a été clairement observée sur des vésicules binaires [31]. Par contre, il semble qu'il ne puisse pas exister de phase gel dans les membranes biologiques [32] : la température de transition est trop basse.

La coexistence de deux phases liquides peut être observée sur des vésicules binaires contenant du cholestérol. Il existe alors une phase 'classique' liquide-désordonnée et une phase liquide-ordonnée (ou l_o). Dans une phase liquide-ordonnée, les chaînes carbonées des lipides sont allongées à leur maximum, comme dans une phase gel, mais les lipides conservent leur mobilité latérale, comme dans la phase liquide-désordonnée. L'existence de phases liquide-ordonnées semble due à la présence du cholestérol, qui gênerait les mouvements des autres lipides et donc les forcerait à s'ordonner, tout en les empêchant d'atteindre la compaction nécessaire à la phase gel. De plus, la plus grande structuration des chaînes entraîne un épaissement de la bicouche (voir figure I.11) : environ 5 nm au lieu de 4 nm pour une bicouche classique [33].

Il suffit d'utiliser une vésicule binaire pour observer une séparation de phase, mais pour mieux imiter la membrane cellulaire, il est possible d'utiliser un mélange ternaire : la membrane cellulaire est formée essentiellement d'un mélange de trois familles de lipides, les sphingolipides (dont la sphingomyéline), les glycérolipides (dont la phosphatidylcholine) et les stérols (dont le cholestérol)

I.4.c Mélanges ternaires de lipides

A haute température, les bicouches formées d'un mélange ternaire sont en phase liquide-désordonnée. En abaissant la température, il est possible d'observer des phases soit liquide-ordonnée soit gel. Dans les mélanges phospholipides / sphingolipides / cholestérol, il se

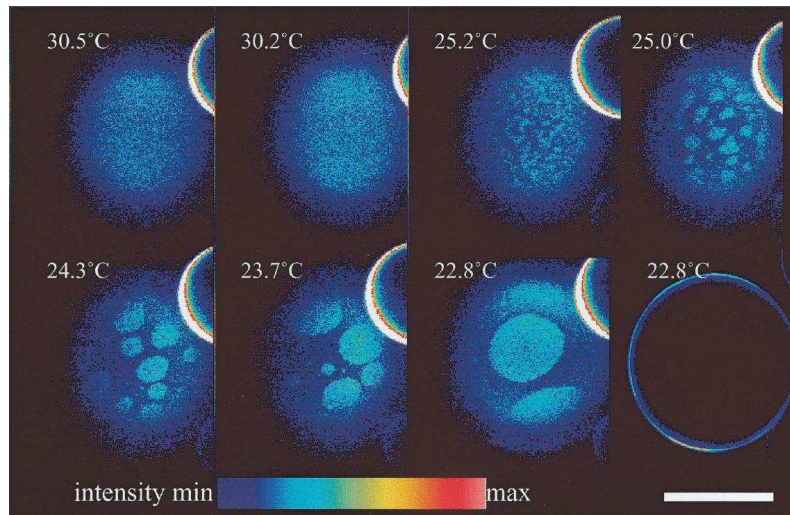


Figure I.12: Images de vésicules géantes unilamellaires en fonction de la température. Les images correspondent au niveau de fluorescence en excitation à deux photons, la bicouche étant marquée au LAURDAN dont la fréquence d'émission dépend de l'environnement. Les vésicules sont formées d'un mélange DOPC/cholestérol/sphingomyeline en proportion 1/1/1 avec 1% en mole de marqueur. Les images montrent une vue du pôle de la vésicule, sauf celle en bas à droite qui montre une vue équatoriale, pour vérifier l'absence d'autres vésicules à l'intérieur. La barre représente 50 μm . Image extraite de [34].

forme, dans la plupart des cas, un mélange de deux phases : une phase liquide-ordonnée et une liquide-désordonnée [34], la phase liquide-ordonnée étant enrichie en sphingomyéline et en cholestérol. Il est relativement simple d'observer en fluorescence les phases séparées, soit en marquant une petite quantité de phospholipides qui va être pratiquement exclu de la phase ordonnée, soit en utilisant un marqueur lipidique dont la longueur d'onde d'émission dépend de son environnement. Sur une vésicule géante, on observe alors des domaines dont la taille atteint facilement 10 μm ; cette taille diminue lorsque la température augmente, jusqu'à disparaître (voir figure I.12).

L'observation de bicouches bi-phasiques a permis de constater que les domaines liquide-ordonnés se déplacent aléatoirement à la surface de la bicouche liquide-désordonnée et que deux domaines qui se rencontrent peuvent fusionner. Notons qu'il n'y a pas d'observation de dissymétrie entre les deux feuillets, avec un domaine sur un feuillet et pas sur l'autre, ce qui suggère l'existence d'un couplage entre les feuillets de la bicouche [35].

Le diagramme de phase du mélange phospholipides/sphingolipides/cholestérol a été établi pour différentes températures et différents lipides de chaque famille [29, 30, 36, 37]) (voir figure I.13).

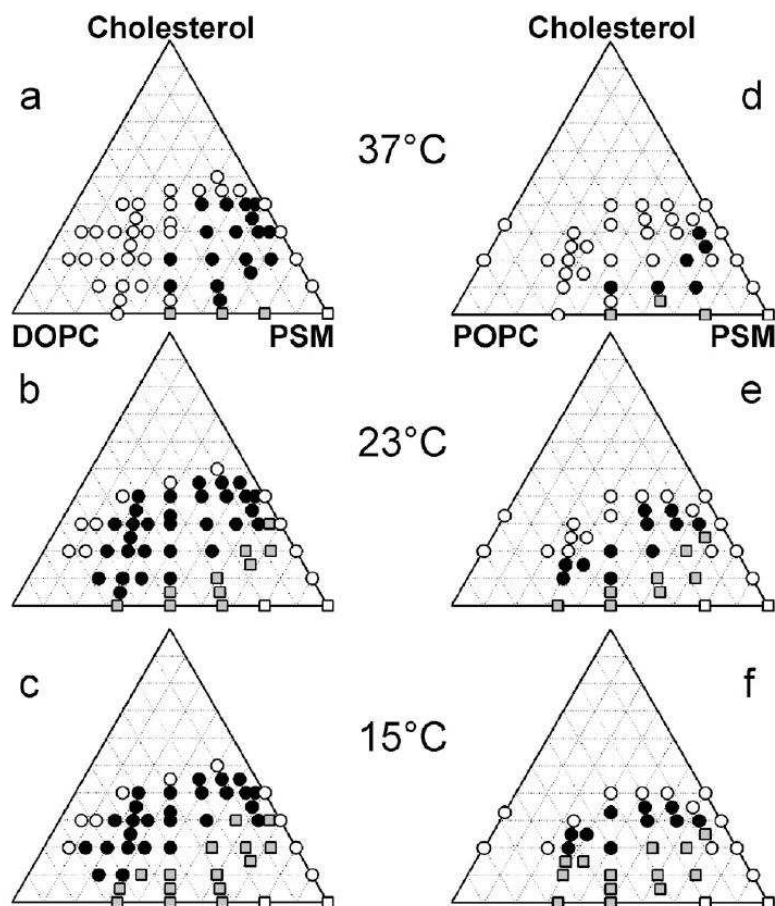


Figure I.13: Diagrammes de phase partiels pour des vésicules composées d'un mélange ternaire de lipides pour différentes températures. Les figures (a-c) correspondent à un mélange DOPC/PSM/Cholestérol, avec DOPC un phospholipide (le dioleoyl-phosphatidylcholine) et PSM un sphingolipide. Les figures (d-f) correspondent à un mélange POPC/PSM/Cholestérol avec POPC un phospholipide différent de DOPC (une des deux chaînes est plus courte). Les points blancs indiquent que la vésicule est homogène, soit en phase liquide (cercle) soit en phase gel (carrés). Les cercles noirs indiquent la coexistence de deux phases liquides et les carrés gris la coexistence d'une phase gel et d'une phase liquide. Image extraite de [37].

I.4.d Domaines dans la membrane cellulaire

L'étude des domaines liquide-ordonnés dans des systèmes modèles permet de cerner leurs propriétés physico-chimiques. Toutefois, la pertinence de ces domaines comme modèle des domaines cellulaires est une question encore ouverte : si leur existence est pratiquement certaine, la composition, la taille et les origines des rafts ne sont pas parfaitement définis.

Les premières analyses de la composition des rafts ont été réalisées à la fin des années 80. Pour isoler les rafts, la membrane est partiellement solubilisée avec des détergents

doux, tels que le Triton X-100 ou le Brij 98. Il reste alors une fraction de la membrane qui est insoluble, la DRM pour Detergent Resistant Membrane. Elle ne serait pas solubilisée à cause d'interactions internes et donc correspondrait à une phase liquide-ordonnée. Toutefois, l'utilisation de détergents différents donne des compositions différentes pour la DRM. L'utilisation de méthodes sans détergents, comme la destruction par ultra-son, pour isoler les rafts conduit aussi à des compositions différentes. Plusieurs hypothèses ont été avancées pour expliquer ces résultats [38] : soit les rafts n'ont pas une composition homogène, soit tous les rafts sont homogènes et identiques mais les différentes méthodes extraient spécifiquement certains lipides, soit il existe plusieurs types de rafts, homogènes mais de compositions différentes, tous n'étant pas extrait par les mêmes détergents. C'est cette dernière hypothèse qui semble la plus probable.

Un autre problème est la détermination de la taille des 'rafts'. Sur une vésicule, la taille des domaines est facilement supérieure au micromètre, ce qui les rend facilement observables. Toutefois, il n'existe pas de domaines de cette taille dans les cellules non traitées. *In vivo*, les différentes méthodes de mesures conduisent à des tailles entre 1 et 20 nm, en tout cas inférieures à 100 nm, très petites devant la taille des domaines observés *in vitro* [39]. Ici encore, les résultats varient avec la méthode utilisée.

L'impact de l'existence des rafts sur la cellule est par contre mieux cerné. La présence des rafts crée une organisation latérale de la membrane, qui permet de confiner certaines protéines dans un petit espace ou, au contraire, de séparer différentes protéines. Ainsi, les rafts peuvent jouer un rôle en concentrant dans une même zone différents partenaires protéiques, et éventuellement en modifiant leur activité. L'existence de protéines associées aux DRM, comme les protéines GPI, va dans le sens de cette hypothèse.

Parmi les conséquences de l'existence des rafts, il y a le tri de composants membranaires : le transport spécifique des rafts fournit une explication à la différence de composition lipidique entre les différentes organelles d'une même cellule. Toutefois, les rafts pourraient aussi être impliqués dans plusieurs processus cellulaires, comme l'endocytose, l'adhésion cellulaire ou la motilité [39, 40].

Du point de vue biologique, le problème des rafts cellulaires est donc encore largement ouvert. Si il paraît clair que les rafts sont des objets de petite taille, enrichis en sphingolipides et en cholestérols, leur composition exacte, leur taille, leurs mécanismes de formation et leurs fonctions précises restent encore mal compris. L'étude des vésicules à plusieurs phases ne permettra pas de répondre à l'ensemble de ces questions mais elle fournit un moyen simple pour tester certaines hypothèses, en particulier sur le comportement mécanique de ces domaines ou leur interaction avec d'autres molécules.

I.5 Résumé

Les lipides possèdent la propriété de s'organiser spontanément en une bicouche. Cette structure, à la base de la membrane cellulaire, a des propriétés très anisotropes : elle est fluide dans son plan et élastique en dehors. C'est un matériau très facilement déformable, sensible à l'agitation thermique. Les vésicules, des bicouches refermées sur elles-mêmes, sont largement utilisées à la fois en biologie, comme système modèle de la membrane cellulaire, et en physico-chimie, en particulier pour leur capacité à séparer physiquement un petit volume d'eau du milieu aqueux environnant.

Les propriétés de la bicouche homogène sont aujourd'hui bien comprises. Pour progresser dans la modélisation de la membrane, des vésicules composées de plusieurs types de lipides ont été développées. De tels mélanges présentent des séparations de phases, conduisant à la formation de domaines de composition différente, flottant dans une membrane classique.

Le mélange ternaire de phospholipides, de sphingolipides et de cholestérol a été largement étudié récemment car il semble un bon modèle de la composition de la membrane cellulaire. Ce mélange présente une séparation de phase en une phase liquide-désordonnée et une phase liquide-ordonnée, plus riche en cholestérol et sphingomyéline. La phase liquide-ordonnée mimerait alors les rafts, des domaines de la membrane cellulaire, auxquels on attribue un rôle possible dans un grand nombre de fonctions ou de dérèglements cellulaires.

Les 'rafts' cellulaires sont encore mal connus et l'étude des phases liquide-ordonnées permettra d'apporter des réponses sur l'origine de la séparation de phase et sur la mécanique de telles structures. En plus de présenter un intérêt biologique, l'étude des domaines liquide-ordonnés permet de tester les modèles décrivant les bicouches de lipides à la fois pour les déformations hors du plan et pour le comportement hydrodynamique dans le plan, comme nous le verrons dans la suite.

Chapitre II

Physique de la bicouche

Dans ce chapitre, nous présentons les propriétés mécaniques de la bicouche lipidique ainsi que le formalisme associé. Nous introduisons la description de Helfrich de la bicouche, qui donne son comportement pour des contraintes hors de son plan ; nous décrivons aussi des extensions de ce modèle, en particulier pour décrire l'absorption de molécules dans la bicouche. Nous introduisons aussi l'hydrodynamique adaptée aux bicouches fluides. Enfin, nous montrons comment ces formalismes sont mis en place pour décrire une vésicule à plusieurs domaines.

II.1 Elasticité de Helfrich

La bicouche lipidique est, comme nous l'avons vu au chapitre précédent, formée par une double couche de molécules, d'une épaisseur d'environ $40 \text{ \AA}$. Pour les expériences visualisées en microscopie optique (avec une résolution de l'ordre du micromètre), la bicouche apparaît donc comme un milieu continu, bien décrit par une surface d'épaisseur nulle. La bicouche est un milieu anisotrope : elle se comporte comme un fluide pour les déformations dans son plan et comme un solide pour les déformations en dehors du plan. L'élasticité classique des plaques ne décrivant pas cette anisotropie, Canham [41] puis Helfrich [42] ont introduit un modèle adapté, que nous présentons ici.

Trois déformations élémentaires permettent de décrire la mécanique de la membrane : l'étirement, le cisaillement et la courbure (figure II.1).

Etirement

L'étirement déforme la membrane dans son plan, sans conserver sa surface. A l'échelle moléculaire, il entraîne un écartement des têtes hydrophiles et favorise la pénétration de l'eau vers le cœur hydrophobe. Les énergies nécessaires sont très grandes devant les autres énergies de ce système. Il est donc très difficile d'augmenter la surface de la bicouche en

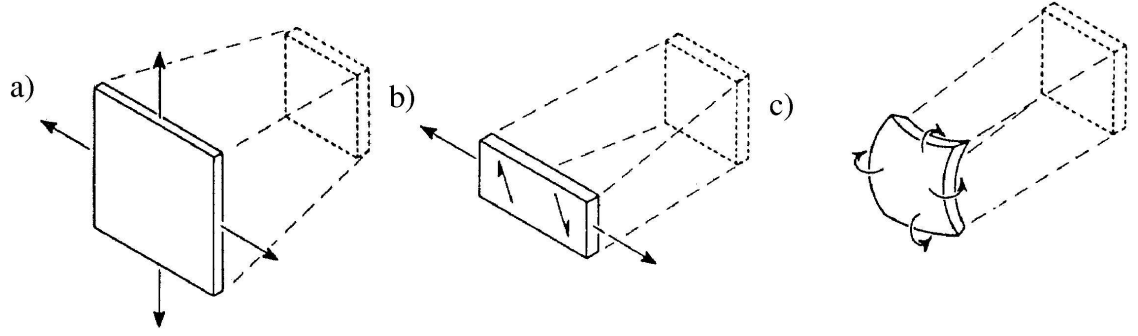


Figure II.1: Représentation schématique des trois déformations élémentaires d'une membrane plane : (a) Étirement ; (b) Cisaillement ; (c) Flexion (d'après [43]).

l'étirant. Aussi, on considère classiquement que l'aire de chaque lipide, et donc celle de la bicouche, est constante.

Cisaillement

La fluidité de la membrane dans son plan entraîne la relaxation des contraintes de cisaillement. Les mouvements dans le plan de la membrane sont donc décrits par l'hydrodynamique d'un fluide bidimensionnel incompressible et visqueux. Aussi, il n'y a pas de cisaillement dans une vésicule.

Flexion

Cette déformation se fait en dehors du plan, à surface quasi-constante. Elle nécessite d'écarter légèrement les têtes hydrophiles du feuillet externe de la bicouche, tout en comprimant celles du feuillet interne. Cette déformation demande des énergies plus faibles que l'étirement et contrôle la forme de la vésicule pour des contraintes usuelles.

Il est possible de construire une énergie élastique en utilisant les invariants du tenseur de courbure de la surface : la courbure moyenne H et la courbure de Gauss K . Pour des courbures faibles, nous pouvons nous limiter à l'ordre le plus bas du développement de l'énergie en fonction de la courbure. L'énergie obtenue est celle introduite par Helfrich [42] en 1973 :

$$F_{courb} = \frac{\kappa}{2} \int_S (H - H_0)^2 dS + \kappa_G \int_S K dS, \quad (\text{II.1})$$

où κ , le module de flambage, et κ_G , le module de Gauss, sont les constantes élastiques. Ces deux modules sont homogènes à des énergies. H_0 est la courbure spontanée, représentant une possible dissymétrie des deux feuillets de la bicouche. Les vésicules géantes sont en général symétriques [35] et nous considérerons dans la suite que $H_0 = 0$. Cette hypothèse

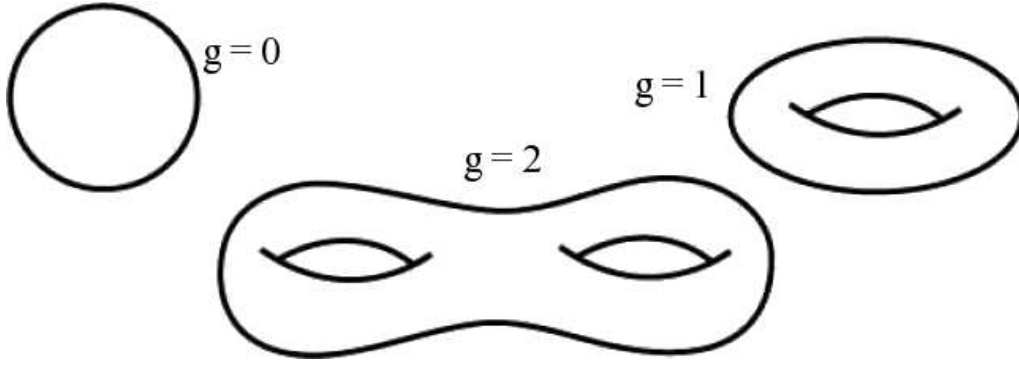


Figure II.2: Exemples de vésicules pour différentes valeurs du genre topologique : une sphère ($g = 0$), un tore ($g = 1$) et un double tore ($g = 2$) (d'après [5]).

n'est pas adaptée pour les parois cellulaires, en raison des protéines flippases qui échangent des lipides entre les feuillet de la bicouche [44,45]. Notons que, dans la formule précédente, H est la courbure totale, valant deux fois la courbure moyenne, le terme "courbure moyenne" étant couramment utilisé par abus pour désigner aussi la courbure totale.

La contribution de la courbure de Gauss est un invariant topologique pour une vésicule homogène fermée, selon le théorème de Gauss-Bonnet :

$$\kappa_G \int_S \kappa dS = 4\pi\kappa_G(1 - g),$$

où g est le genre topologique de la vésicule. g peut être compris simplement comme le nombre de poignées dans la vésicule : $g = 0$ pour une sphère, 1 pour un tore... (voir figure II.2). En conséquence, la valeur du module de Gauss κ_G est délicate à mesurer car elle nécessite un changement de topologie. La stabilité thermodynamique des vésicules impose $-2\kappa \leq \kappa_G \leq 0$. La mesure de l'énergie de transition entre une phase lamellaire et une phase cubique inversée de bicouches a permis récemment de déterminer une valeur de la courbure de Gauss, égale à $-0,83 \kappa$ [46] (voir figure II.3). Notons ici encore que le modèle diffère de l'élasticité classique des plaques : le module de Gauss est négatif.

L'énergie de Gauss ne contribue pas à la réponse à la courbure de la bicouche si il n'y a pas de changement de topologie. L'énergie typique des déformations élastiques de la bicouche est donc donnée par le module de flambage κ . Son ordre de grandeur est bien connu, bien que sa valeur dépende fortement de la composition de la membrane et des conditions de mesure [8]. Pour une membrane classique, liquide-désordonnée, l'ordre de grandeur est $\kappa \simeq 20k_B T$ et, pour une membrane liquide-ordonnée, $\kappa \simeq 60k_B T$ [48].

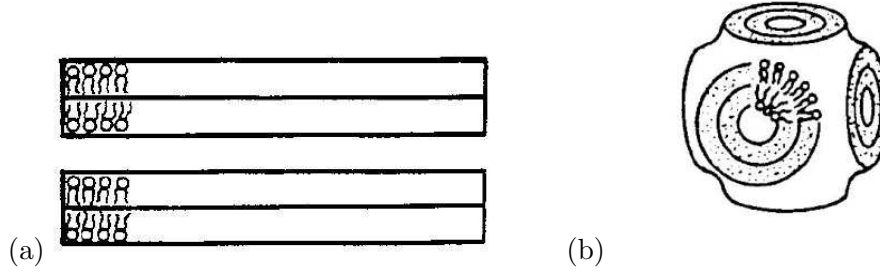


Figure II.3: Structures de base des phases lamellaire (a) et cubique inversée (b). Images extraites de [47].

II.2 Fluctuations

Le module de flambage de la bicouche, κ , est suffisamment peu supérieur à l'énergie thermique, $k_B T$, pour que la membrane soit soumise au mouvement brownien et fluctue autour d'une position moyenne. L'énergie élastique de la bicouche n'introduit pas de taille caractéristique pour les déformations de courbure. Aussi, il existe des fluctuations à toutes les échelles et, en particulier, à des échelles inférieures à l'échelle "d'observation" à laquelle la bicouche est décrite dans le modèle de Canham et Helfrich [12, 49]. Trois surfaces caractérisent alors la membrane : la surface à l'échelle d'observation (A), la surface à l'échelle moléculaire ($\bar{A}$) et la surface occupée par la position moyenne de la membrane (S) (voir figure II.4) ; l'aire observée A doit satisfaire $S \leq A \leq \bar{A}$. Pour une vésicule sphérique de rayon R , on a $S = 4\pi R^2$.

Entraver les fluctuations est entropiquement défavorable, la membrane exerçant alors une force de réaction pour les augmenter de nouveau [14, 49]. Suivant la valeur de l'excès d'aire $\alpha_m = (\bar{A} - S)/S$, la membrane peut se trouver dans deux régimes [11]. Pour un large excès d'aire, la membrane est dans un régime "souple" où elle fluctue à toutes les échelles et donc à des échelles supérieures à l'échelle d'observation ; on a alors $S < A$ (voir figure II.5a). Pour un faible excès d'aire, la membrane est dans un régime "tendu" dans lequel il n'y a plus de fluctuations à l'échelle d'observation, bien qu'il en reste à des échelles plus petites (voir figures II.4 et II.5b) ; on a alors $S = A$.

L'énergie de courbure introduite par Canham et Helfrich peut être adaptée pour prendre en compte les fluctuations en introduisant une tension de surface effective Σ [49] :

$$F_b = \frac{\kappa}{2} \int_S (H - H_0)^2 dS + \kappa_G \int_S K dS + \Sigma \int_S dS. \quad (\text{II.2})$$

C'est cette énergie que nous utiliserons dans la suite pour décrire le comportement pour des déformations de la bicouche hors de son plan. Les formes d'équilibre de la vésicule sont alors obtenues par un processus variationnel, qui conduit aux équations de formes (ou Euler-

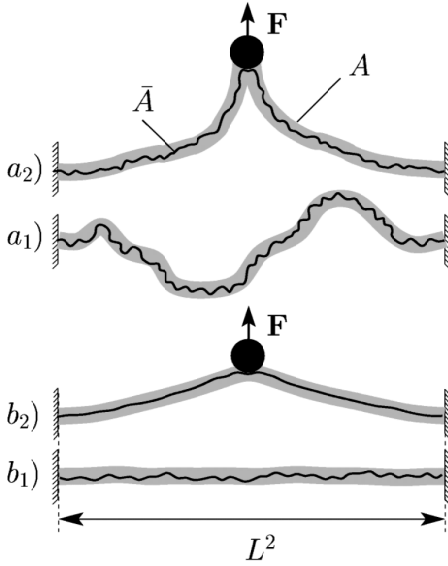


Figure II.4: Représentation schématique d'une membrane d'aire microscopique $\bar{A}$ et d'aire optique A , attachée à un cadre solide de taille $S = L^2$. (a) Une membrane avec un large excès d'aire présente de larges fluctuations visibles à l'échelle d'observation. (b) Une membrane avec un faible excès d'aire ne fluctue pas à l'échelle d'observation. La présence d'une sollicitation extérieure modifie l'excès d'aire (a_2 et b_2) (d'après [11]).

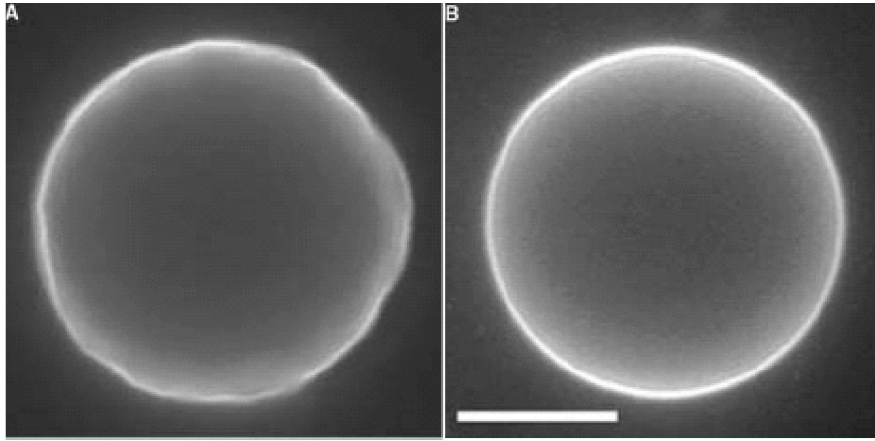


Figure II.5: Vésicules vues en microscopie de fluorescence. (a) La vésicule est détendue, sa surface présentant des fluctuations de grandes échelles. Les fluctuations sont clairement résolues car la viscosité du milieu environnant a été rendue nettement supérieure à celle de l'eau par l'ajout de glycérol. (b) La vésicule est tendue, sa surface est parfaitement sphérique. Barre d'échelle : $10 \mu m$ (d'après [50]).

Lagrange) et, éventuellement, aux conditions aux bords. L'utilisation de multiplicateurs de Lagrange permet d'assurer les contraintes sur le système dans le processus variationnel. La détermination des expressions des courbures moyennes et de Gauss est donc une étape essentielle pour la détermination des formes de vésicules. Nous présentons dans l'annexe A les bases de géométrie différentielle nécessaires pour y parvenir.

La tension de surface effective dépend fortement du régime de la membrane. Pour une membrane souple, $\Sigma \simeq 0$: la vésicule fluctue suffisamment pour pouvoir être étirée pratiquement sans coût. Pour une membrane tendue, la tension de surface varie exponen-

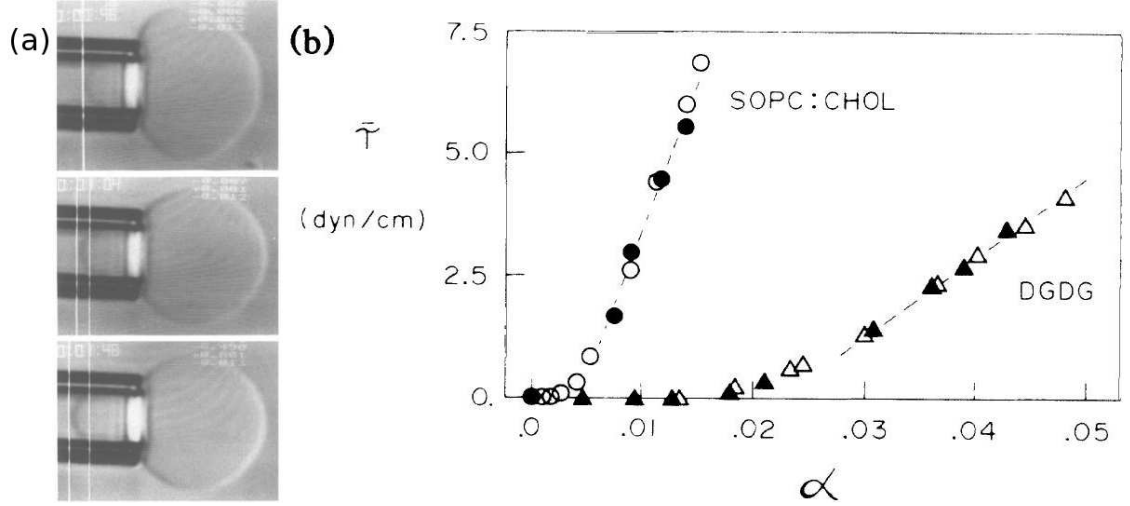


Figure II.6: Variation de surface d'une vésicule aspirée par une micro-pipette. (a) Image en microscopie d'une vésicule aspirée dans une micro-pipette; le diamètre de la vésicule est d'environ $20 \mu m$, celui de la micro-pipette d'environ $8 \mu m$. Les images de haut en bas correspondant à une aspiration croissante, associée à une augmentation de la tension de la vésicule et de sa surface (environ 1% entre deux images). (b) Courbe de la tension de surface de la vésicule en fonction de l'augmentation de l'aire visible. Images extraites de [12].

tiellement avec la surface visible A (avec $A = S$ ici) de la vésicule [49] :

$$\Sigma = \Sigma_0 \exp \left(-\frac{8\pi\kappa}{k_B T} \frac{\bar{A} - A}{A} \right).$$

Aussi, pour une membrane tendue, une petite variation de la surface visible entraîne une variation d'énergie grande par rapport à l'énergie élastique. Tant que nous considérons des déformations de courbure, nous pouvons donc supposer la surface constante. Lorsque des contraintes importantes, comme une pression osmotique, sont appliquées, la tension de surface et l'aire visible varient [12] (voir figure II.6). Toutefois, au delà de quelques pourcents d'augmentation de la surface, un pore circulaire va se former pour relaxer la tension de surface, en vidant une partie du volume de la vésicule [8, 50] (voir figure II.7). Il est donc aussi possible de supposer constante la surface d'une vésicule déjà tendue.

Les ions et les grosses molécules présentes dans la solution ne peuvent pas traverser la bicouche de lipides. Par contre, elle est perméable aux molécules d'eau; la bicouche est donc une surface semi-perméable, permettant l'apparition d'une différence de pression osmotique P entre l'intérieur et l'extérieur de la vésicule. La forme d'équilibre de la vésicule est alors donnée par la minimisation de l'énergie :

$$F_{ves} = \frac{\kappa}{2} \int_S (H - H_0)^2 dS + \kappa_G \int_S K dS + \Sigma \int_S dS - P \int_V dV. \quad (\text{II.3})$$

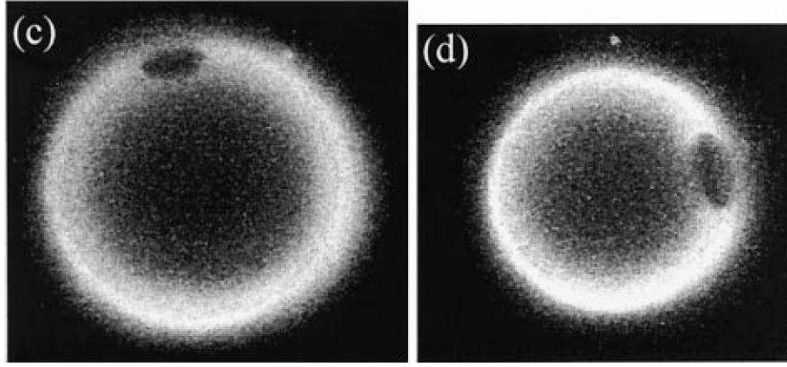


Figure II.7: Pores transitoires, à différentes positions, lorsque la vésicule devient trop tendue. Images extraites de [51].

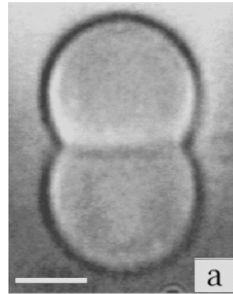


Figure II.8: Vue latérale d'une vésicule adhérente sur un substrat. La vésicule apparaît aussi en miroir car le substrat réfléchit la lumière. Barre d'échelle : $10 \mu m$ (d'après [54]).

II.3 Formes d'équilibre

Lorsque la membrane n'est pas tendue, elle dispose d'un réservoir important de surface, ce que lui permet d'adopter des formes très variées [52, 53] : oblongue, discoïde, poire, étoile, etc (voir figure I.5). La minimisation de l'énergie de la vésicule se fait alors en supposant que la surface et le volume de la vésicule sont fixes. Ces hypothèses ne sont pas en contradiction avec l'hypothèse de tension de surface nulle. En effet, la surface conservée n'est pas la surface visible (A) mais la surface de la position moyenne (S), dont la valeur n'est pas connue à priori mais mesurée expérimentalement.

Lorsque la vésicule est tendue par une pression osmotique, elle se comporte comme une bulle de savon pour des longueurs supérieures à la longueur élastique l_e :

$$l_e = \sqrt{\frac{\kappa}{2\Sigma}}.$$

Sa forme d'équilibre est alors simplement celle d'une sphère (voir figure II.5b), sauf si une contrainte importante est imposée, comme lors de l'adhésion à un substrat (voir figure II.8). Les effets élastiques affectent alors le raccord entre la zone d'adhésion et la zone décollée. Les effets élastiques sont aussi importants lorsqu'une force localisée est exercée sur la

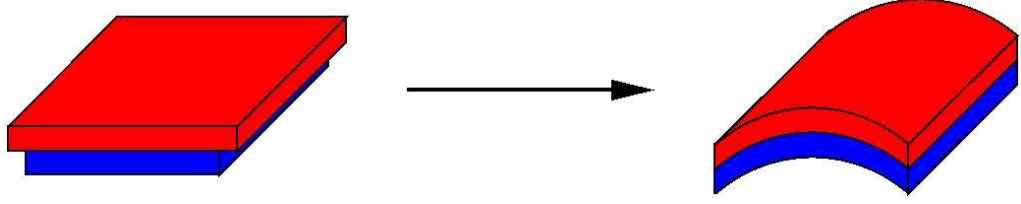


Figure II.9: Principe de l'élasticité de différence d'aire. Les deux feuillets de la bicouche ont des surfaces différentes. Pour que leur surface en contact soit la même, il faut les courber, le feuillet le plus large se trouvant alors à l'extérieur.

membrane : ils permettent la formation de tubes, comme nous le verrons au chapitre III.

II.4 Modèle en double couche : effets de différence d'aires

Le modèle introduit par Canham et Helfrich permet d'expliquer l'essentiel des propriétés de la bicouche à partir d'arguments simples. Toutefois, dans le cas de membranes détendues, il ne permet pas d'expliquer toutes les formes observées expérimentalement [9,55,56]. Aussi, le modèle a été complété, en particulier pour mieux prendre en compte la structure en double couche de la membrane lipidique [56].

Les deux feuillets de la membrane n'ont pas forcément le même nombre de lipides, ce qui impose une différence d'aires à l'équilibre et force la membrane à se courber, avec le feuillet le plus large à l'extérieur (figure II.9). Ceci peut être décrit par un couplage entre la densité de lipides dans un feuillet et la courbure de la bicouche. L'énergie adaptée est alors [57] :

$$F_c = \int_S \left(\frac{\kappa}{2} H^2 - \Lambda \phi_\Delta H + \frac{\alpha}{2} \phi_\Delta^2 + \frac{\alpha}{2} \phi_\Sigma^2 \right) dS, \quad (\text{II.4})$$

en considérant une membrane sans courbure spontanée ($H_0 = 0$). $\phi_\Delta = (\phi_+ - \phi_-)/2$ est la différence de densité entre les deux feuillets; $\phi_\Sigma = (\phi_+ + \phi_- - 2\phi_0)/2$ est l'écart entre la densité moyenne des deux feuillets avec la densité d'équilibre ϕ_0 . Le terme en Λ couple la courbure moyenne à l'écart de densité. Les termes en α décrivent les interactions latérales entre lipides et peuvent être compris comme un développement de Landau autour de la concentration d'équilibre ϕ_0 . Cette énergie présente des similitudes avec l'énergie d'interaction entre une membrane et des protéines, telle qu'introduite par S. Leibler [58], sur laquelle nous reviendrons par la suite.

Pour une vésicule fermée, il n'y a pas de réservoir de lipides et l'énergie précédente doit être minimisée à nombre de lipides constant. Deux modèles sont alors possibles, le modèle dit BC pour "Bilayer couple" qui impose un nombre de lipides constant sur chaque feuillet [59, 60] et le modèle dit ADE pour "Area-Difference-Elasticity" qui autorise l'échange de

lipides entre les deux feuillets [61,62]. Notons qu'imposer localement la valeur de ϕ_Δ revient à introduire une courbure spontanée dans la membrane.

L'énergie de courbure, pour le modèle ADE, peut s'écrire sous la forme de la somme d'un terme local, identique à celui de Canham et Helfrich, et d'un terme global :

$$F_{ADE} = \frac{\kappa}{2} \int_S (H)^2 dS + \frac{\kappa\alpha\pi}{8Ad^2} (\Delta A - \Delta A_0)^2, \quad (\text{II.5})$$

où ΔA est la différence d'aire entre les deux feuillets et ΔA_0 est la différence d'aire optimale entre les deux feuillets. Le modèle BC est la limite $\alpha \rightarrow \infty$. Une courbure spontanée peut être introduite, comme dans le modèle de Canham et Helfrich. Ces modèles permettent de prédire les formes d'équilibre de vésicules dégonflées [10,63] et de proposer un mécanisme de formation des vésicules dans les membranes cellulaires, pour les organelles peu tendues [45].

Dans le cas d'une vésicule tendue, l'énergie de Helfrich est suffisante pour la description de la membrane. En effet, la forme sphérique est imposée par la pression osmotique et la partie tendue sert de réservoir de lipides pour les zones où l'élasticité de courbure n'est pas négligeable. Ceci permet de relaxer les contraintes latérales à la base des modèles de différence d'aires.

II.5 Absorption de molécules

L'absorption de molécules dans la bicouche peut modifier la forme de la vésicule : les molécules peuvent induire une augmentation de la surface du feuillet où elles s'absorbent ou forcer une courbure locale de la membrane. Le premier cas affecte principalement les vésicules détendues et est bien décrit par les modèles de type différence d'aire (BC ou ADE), présentés précédemment. Ici, nous nous intéressons au deuxième effet, dont nous introduisons une description énergétique.

La déformation locale induite par les molécules peut être due à leur forme conique, comme dans le cas de détergents [58], les molécules imposant alors une forme locale à la bicouche (voir figure II.10a). La présence d'un fragment souple de la molécule dans l'eau environnante peut aussi courber la bicouche : le fragment exerce une pression osmotique sur la membrane pour augmenter son nombre de fluctuations [64,65] (voir figure II.10b). Quels que soient les détails du mécanisme moléculaire, il apparaît un couplage entre la concentration en molécules et la courbure de la bicouche.

La présence des molécules dans la bicouche peut être décrite en rajoutant un terme dans l'énergie (II.3). Le couplage avec la courbure s'exprime alors par un terme en ϕH où ϕ est la concentration en molécules, comme introduit par S. Leibler [58]. Il s'agit du terme de couplage de plus bas degré possible en la courbure. La contribution des molécules à

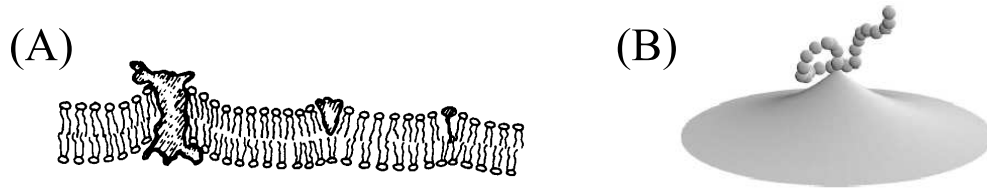


Figure II.10: Courbure induite par l'absorption de molécules : (A) courbure imposée par la forme des molécules (d'après [58]) (B) courbure induite par la pression entropique de la chaîne sur la membrane : la chaîne et la membrane veulent conserver le plus possible d'espace pour pouvoir fluctuer (d'après [64]).

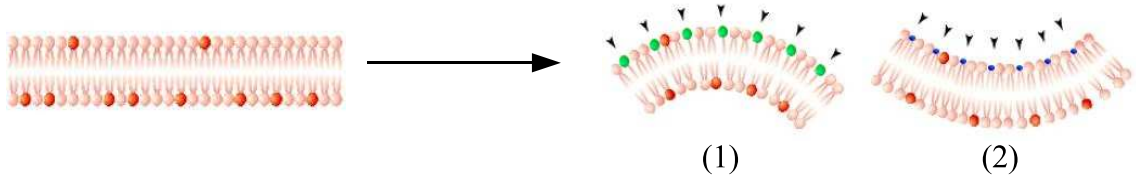


Figure II.11: Courbure d'une bicouche par absorption de molécules coniques sur le feuillet supérieur. Les molécules courbent la bicouche pour avoir préférentiellement la partie large vers l'extérieur. Dans le cas (1), les molécules absorbées ont une partie hydrophile plus large que la partie hydrophobe. Dans le cas (2), les molécules absorbées ont une partie hydrophile plus petite que leur partie hydrophobe. Notons que la courbure du cas (2) peut être obtenue à partir du cas (1) en inversant le feuillet d'absorption des molécules.

l'énergie de la bicouche est alors :

$$F_{mol} = \int_S \left\{ \Lambda H \phi + \left[\frac{\alpha}{2} (\phi - \phi_{eq})^2 - \mu \phi + \frac{\beta}{2} (\nabla \phi)^2 \right] \right\} dS, \quad (\text{II.6})$$

avec Λ la constante de couplage entre les molécules et la courbure. Les autres termes sont un développement de Landau de l'énergie autour de la concentration optimale ϕ_{eq} . S'écarter de ϕ_{eq} a un coût, supposé quadratique à l'ordre dominant. Le terme en β s'oppose à la formation de gradient de concentration de molécules et peut être interprété comme un effet de la diffusion des molécules. Le potentiel chimique μ donne l'équilibre de concentration avec l'eau environnante. Notons que si les molécules ne sont pas solubles dans l'eau (comme certaines protéines), leur nombre est constant sur la vésicule et μ est alors le multiplicateur de Lagrange associé à cette contrainte.

Le signe de Λ est lié à la forme des molécules et à la face d'absorption des molécules : si nous considérons une bicouche sur laquelle sont absorbées des molécules avec une partie hydrophile plus large que la partie hydrophobe, nous attendons une bicouche courbée avec les molécules sur le feuillet externe. Si on change les molécules de feuillet ou si on utilise des molécules avec une partie hydrophile moins large que la partie hydrophobe, la courbure de

la bicouche va s'inverser (voir figure II.11). Il faut toutefois noter que ce modèle ne permet pas de traiter correctement le cas de molécules absorbées sur les deux feuillets : il faudrait alors deux champs de concentration avec un couplage opposé. Pour une bicouche plane, les deux feuillets sont initialement équivalents et c'est l'absorption de molécules qui brise la symétrie. Aussi, le comportement du système ne doit pas dépendre du signe de Λ .

La dimension de Λ est celle d'une énergie multipliée par une longueur. L'échelle d'énergie des déformations est κ , le module élastique de la bicouche. Il est possible de définir une longueur typique pour les déformations de la bicouche comme le rayon de courbure optimal R_0 de la bicouche avec les molécules absorbées. Plus R_0 est petit, plus le couplage est fort. Ceci suggère que Λ est proportionnel à $1/R_0$. Un raisonnement dimensionnel permet de construire Λ comme $\kappa R^2/R_0$.

Il existe d'autres expressions possibles que celle introduite par S. Leibler pour le couplage entre la concentration en molécules et la courbure, prenant en compte des termes d'ordres supérieurs. Ainsi, des études ont porté sur le couplage avec la courbure de Gauss [66]. L'expression en toute généralité de l'énergie de couplage doit être obtenue par une approche de théorie des champs, qui permet de passer de l'échelle microscopique à l'échelle d'observation. Cette approche est la même que celle utilisée pour la description des fluctuations par une tension de surface. Si il existe de nombreuses descriptions microscopiques de l'interaction entre molécules avec la bicouche [67–73], le passage à l'échelle d'observation n'a été traité que dans le cas d'une molécule unique [74].

II.6 Hydrodynamique

Les parties précédentes de ce chapitre ont été consacrées à la description des déformations hors du plan de la bicouche, qui sont celles qui ont été le mieux explorées. Dans cette section, nous nous intéressons à la bicouche en tant que fluide, ce qui concerne les déformations dans le plan. Nous ferons l'hypothèse que la bicouche se comporte comme un fluide visqueux newtonien. Ceci semble justifié car il n'y a pas d'interaction structurante entre les lipides nécessitant des temps de relaxation comparables aux temps expérimentaux (de l'ordre de la seconde).

Dans le cas d'une bicouche plane, les lipides sont confinés dans deux feuillets et ne peuvent pas avoir de mouvement vertical. L'écoulement des lipides peut donc être décrit par un fluide bidimensionnel. Les films de Langmuir à l'interface entre l'eau et l'air forment un système équivalent : les molécules peuvent être dans un état liquide et sont confinées dans un plan. Dans une bicouche, les deux feuillets ont le même mouvement, sauf si la bicouche est cisailée de manière dissymétrique ; ce ne sera pas le cas dans la suite, aussi nous décrirons la bicouche comme un seul fluide homogène et il n'est pas nécessaire de tenir

compte de la présence de deux feuillets. Prendre en compte une dissymétrie est possible en modifiant légèrement le modèle.

La viscosité du film liquide peut être évaluée en mesurant la friction sur une bille absorbée à la surface [75], en étudiant la diffusion de molécules dans la bicouche [8] ou en mesurant la force d'extraction d'un tube de membrane [76]. Les viscosités typiques obtenues sont de l'ordre de $0,1 N.s/m^2$. Notons que la mesure de la vitesse de fermeture d'un pore permet aussi d'évaluer la viscosité de la bicouche [77] mais conduit à des valeurs de l'ordre de $1000 N.s/m^2$. Dans les expériences que nous considérons dans la suite, la vitesse d'écoulement des lipides est de l'ordre de quelques micromètres par minute. Nous pouvons donc négliger les effets inertiels et décrire les écoulements par les équations de Stokes.

A l'échelle moléculaire, la bicouche est incompressible. A l'échelle d'observation, les fluctuations non visibles rendent la bicouche compressible, même si elle est tendue. Toutefois, les énergies nécessaires pour provoquer un écoulement sont très petites devant l'énergie de courbure et donc largement insuffisantes pour entraîner un changement de l'aire de la vésicule (voir la section II.2). Pour une vésicule tendue, les fluctuations non observables n'affectent pas la valeur effective de la viscosité [78]. Dans le cas d'une succion de la bicouche, que nous traitons au chapitre V, la masse n'est plus conservée, ce qui introduit un terme similaire à une compressibilité. Aussi, nous avons écrit les équations de Stokes pour un fluide bidimensionnel dans le cas de fluides compressibles (voir annexe C). Dans l'hypothèse de Stokes, l'équation pour un fluide bidimensionnel compressible est identique à celle d'un fluide incompressible :

$$\vec{\nabla} P = \mu \Delta \vec{v}, \quad (\text{II.7})$$

où μ est la viscosité de la membrane. Ce résultat est spécifique des fluides de Stokes bidimensionnels.

La description de la bicouche comme un fluide bidimensionnel demande de prendre en compte l'eau environnante : les conditions de raccord entre les deux fluides sont la continuité des vitesses et la continuité des contraintes de cisaillement [79]. La difficulté réside dans la détermination du cisaillement en raison de l'aspect bidimensionnel du fluide : il faut rajouter un terme de traction dans l'équation de Stokes, comme introduit par Saffman [80].

Nous obtenons alors l'équation décrivant une bicouche de viscosité μ :

$$\vec{\nabla} P = \mu \Delta \vec{v} - \frac{2\mu_w}{H} \delta \frac{\partial \vec{v}^w}{\partial z} \Big|_{z \rightarrow 0}, \quad (\text{II.8})$$

avec P la pression dans la bicouche, $\vec{v}$ la vitesse d'écoulement des lipides et $\vec{v}^w$ la vitesse d'écoulement de l'eau. μ_w est la viscosité de l'eau, H l'épaisseur de la bicouche et δ une

fonction valant 1 pour $z < 0$ et -1 pour $z > 0$. Notons que le terme de Saffman dépend de l'environnement ; ainsi, il faudrait le modifier pour tenir compte d'une dissymétrie dans le comportement des deux feuillets.

L'équation de Stokes ne suffit pas à déterminer complètement l'hydrodynamique : elle relie le champ de vitesse à la pression. Il faut utiliser le bilan de masse pour déterminer la vitesse de l'écoulement en tout point :

$$\operatorname{div}_2 \vec{v} = q, \quad (\text{II.9})$$

où div_2 est la divergence à deux dimensions et q un terme source. Pour un fluide incompressible, la masse est conservée et $q = 0$. Dans le cas de la succion, q est négatif : la masse diminue localement.

II.7 Membrane à deux domaines

Jusqu'à présent, nous avons décrit uniquement le cas d'une bicouche homogène. Nous nous intéressons maintenant au cas d'une vésicule à deux phases : une phase liquide-ordonnée l_o et une liquide-désordonnée l_d , de compositions différentes. Comme nous l'avons présenté au chapitre I, le domaine l_o est légèrement plus épais et plus structuré que le domaine l_d , tout en conservant les mêmes propriétés d'élasticité et de fluidité.

II.7.a Elasticité

L'énergie (II.2) est adaptée pour décrire la réponse aux déformations hors du plan de chaque phase avec deux jeux de constantes physiques différentes. De manière générale, nous utiliserons l'indice o pour le domaine l_o , l'indice d pour le domaine l_d et l'indice i pour désigner l'un ou l'autre. Il est possible d'absorber des molécules dans les deux domaines, mais avec des affinités différentes. Aussi, l'énergie (II.6) est adaptée pour les deux phases, avec des constantes différentes. Lorsque nous considérons des molécules insolubles dans l'eau, deux situations sont possibles : soit les molécules ne s'échangent pas entre les domaines soit les molécules s'échangent et il faut tenir compte de l'équilibre de potentiel chimique entre les deux phases. Dans le premier cas, il y a un multiplicateur de Lagrange par phase μ_i ; dans le deuxième cas, il faut assurer l'équilibre des potentiels chimiques et les μ_i sont des potentiels chimiques mais il faut rajouter un multiplicateur de Lagrange pour assurer la conservation du nombre de molécules.

L'énergie du système inhomogène est la somme des énergies individuelles de chaque domaine plus deux termes d'ensemble. Le premier terme est dû à la pression osmotique. En effet, la pression osmotique est la même pour les deux domaines, qui séparent les deux mêmes milieux. Le deuxième terme est dû à l'interface séparant les deux domaines, bien

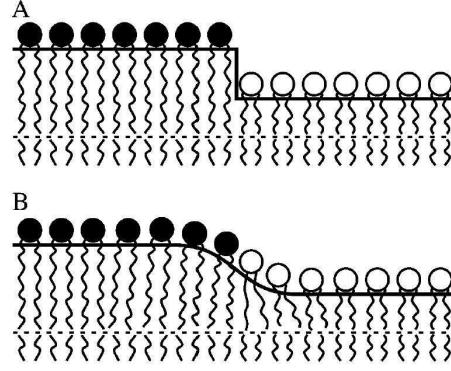


Figure II.12: Représentation schématisée de l'interface entre deux domaines. Le domaine liquide-ordonné, sur la gauche, est plus épais que le domaine liquide-désordonné sur la droite. (A) Une marche dans l'épaisseur de la monocouche expose une grande surface hydrophobe. (B) Une déformation de la monocouche à l'interface diminue la surface hydrophobe exposée à l'eau. Image extraite de [82].

décrit par une ligne à l'échelle d'observation. Le coût de transition est alors donné par une tension de ligne σ , équivalente à la tension de surface pour un mélange eau-huile. La tension de ligne tend à réduire la longueur de l'interface entre les deux domaines.

La tension de ligne de l'interface peut être prédite à partir d'une description du raccord entre les deux phases. Si l'interface a une forme de marche d'escalier (voir figure II.12a), la tension de ligne est due principalement à l'exposition à l'eau d'une épaisseur d'environ 1 nm de fluide. R. Lipowsky a alors évalué la tension de ligne à $\sigma \approx 10^{-11}\text{ N}$ [81]. Par contre, si l'interface est lissée pour minimiser l'exposition à l'eau (voir figure II.12b), la tension de ligne dépend surtout du coût élastique pour déformer les lipides. Pour un écart de hauteur de $0,3\text{ nm}$ dans une monocouche, P. Kuzmin et co-auteurs ont évalué la tension de ligne à $\sigma \approx 10^{-12}\text{ N}$ [82].

Expérimentalement, il est possible de mesurer la tension de ligne à partir de la forme d'une vésicule bi-phasique, à la condition de connaître les différents paramètres dont la pression osmotique et le module élastique [83–85]. Ces méthodes conduisent à des tensions de ligne de l'ordre de $5 \cdot 10^{-13}\text{ N}$, qui semblent plutôt indiquer que l'interface est continue. La tension de ligne dépend alors de la configuration des lipides à proximité et donc de la forme de la membrane. Aussi, pour des membranes très pincées, comme dans le cas de tubes de membrane (voir chapitre III), la tension de ligne pourrait être supérieure. Nous pouvons donc considérer que la tension de ligne entre deux domaines est comprise entre 10^{-13} N et 10^{-11} N , qui correspond à la tension de ligne mesurée à un interface bicouche-eau [50].

L'énergie d'une vésicule à deux domaines est donc :

$$F_{TOT} = F_{b_o} + F_{b_d} + F_{mol_o} + F_{mol_d} + \sigma \int_{\mathcal{C}} dl - P \int dV, \quad (\text{II.10})$$

avec $\mathcal{C}$ l'interface entre les deux domaines. Les énergies F_{b_i} et F_{mol_i} sont données respectivement par les intégrales de surface (II.2) et (II.6). Toutefois, la contribution de la courbure de Gauss se réduit à une intégrale sur le contour de l'interface. La forme de la vésicule est donnée par la minimisation de l'énergie F_{TOT} . Ceci peut être obtenu par un processus variationnel, dans lequel les contraintes (par exemple la surface) sont imposées par des multiplicateurs de Lagrange (voir annexe B), et qui fournit les équations de formes (ou équations d'Euler-Lagrange) ainsi que les conditions aux limites.

II.7.b Hydrodynamique

Les équations (II.8) et (II.9) décrivent l'hydrodynamique de chacune des phases, en utilisant des constantes physiques différentes dans chaque phase ; Ainsi, le domaine l_o est sensé avoir une viscosité supérieure au domaine l_d , bien qu'il n'y ait pas de mesure venant confirmer cet argument.

Entre les deux domaines, les conditions de raccord sont [79] :

- la continuité de la vitesse tangentielle,
- la continuité de la vitesse normale,
- la continuité du cisaillement,
- la loi de Laplace.

Les deux dernières conditions sont liées au tenseur des contraintes $\bar{\bar{\tau}}$. Le cisaillement est donné par $S = \vec{t} \cdot \bar{\bar{\tau}} \cdot \vec{n}$, avec $\vec{t}$ (resp. $\vec{n}$) le vecteur tangent à l'interface (resp. normale) ; la loi de Laplace donne le saut de contrainte normale pour un interface abrupt. Le saut de contrainte entre les domaines 1 et 2 est donné par :

$$\bar{\bar{\tau}}_{nn}^{(2)} - \bar{\bar{\tau}}_{nn}^{(1)} = \frac{\gamma}{R_c},$$

où R_c est le rayon de courbure de l'interface et γ la tension de surface de l'interface, reliée à la tension de ligne σ par $\gamma = \sigma/h$, avec h l'épaisseur de la bicouche.

II.8 Résumé

L'échelle de longueur utilisée pour la modélisation des bicouches de lipides étant grande devant la taille des molécules, la bicouche est bien décrite par une surface d'épaisseur nulle. C'est un milieu avec un comportement anisotrope : elle est élastique pour les déformations hors de son plan et fluide pour celles dans son plan. La description de la réponse d'une vésicule à une déformation hors de son plan repose sur le modèle phénoménologique de

Helfrich ; les fluctuations de la bicouche, dues à l'agitation thermique, sont prises en compte dans un terme de tension de surface entropique. Les molécules extérieures sont considérées comme des défauts coniques, se couplant à la courbure. On admet que le comportement fluide de la bicouche est décrit par l'hydrodynamique d'un fluide de Stokes, en tenant compte de l'eau environnante, qui exerce une force de friction sur la bicouche.

Une vésicule à deux phases peut être vue comme la juxtaposition de deux domaines, connectés par un interface décrit par une ligne. Chaque domaine est décrit par le formalisme décrivant une bicouche homogène, avec des coefficients différents pour les différentes phases. De plus, il apparaît des termes communs : la pression osmotique et la tension de l'interface, qui vont coupler les différents domaines.

Chapitre III

Fission de tubes membranaires à deux phases

Dans ce chapitre, nous nous intéressons au problème de la stabilité d'un tube membranaire bi-phasique : nous considérons le système formé par la jonction entre deux domaines tubulaires semi-infinis. Ce problème est lié au transport intra-cellulaire, les tubes étant des précurseurs possibles à la formation de vésicules. Nous étudions l'influence des différentes constantes physiques sur la forme de la jonction. Nous en déduisons une estimation du temps de fission, que nous pouvons comparer aux expériences.

III.1 Présentation

Une bicouche de lipides forme spontanément une structure plane, éventuellement repliée en une vésicule de grand rayon (environ $10\ \mu m$). Toutefois, lorsqu'une force est exercée sur la bicouche perpendiculairement à son plan, il est possible d'extraire un tube de la bicouche initiale (voir figure III.1a). Le rayon typique des tubes formés à partir d'une vésicule géante est de l'ordre de 100 nm [86], grand devant l'épaisseur de la bicouche mais petit devant le rayon de la vésicule. La formation du tube est due à une compétition entre la tension de surface et l'élasticité de la bicouche ; pour des petites déformations, la forme est donnée par la tension de surface de la vésicule mais avec une singularité au point d'application de la force [87]. Cette singularité focalise l'énergie élastique, jusqu'à ce qu'il soit plus intéressant de former un tube pour continuer à stocker de l'énergie élastique sans augmenter la courbure de la singularité (voir figure III.1). Le passage de la membrane pointue au tube est une transition du premier ordre [89], comme illustré par la courbe force-déplacement (voir figure III.2). Une fois le tube initié, il est possible de l'étirer à force constante, du moins tant que la tension de la vésicule mère ne change pas.

Dans la cellule, l'extraction de tubes à partir de membranes lipidiques peut être mis

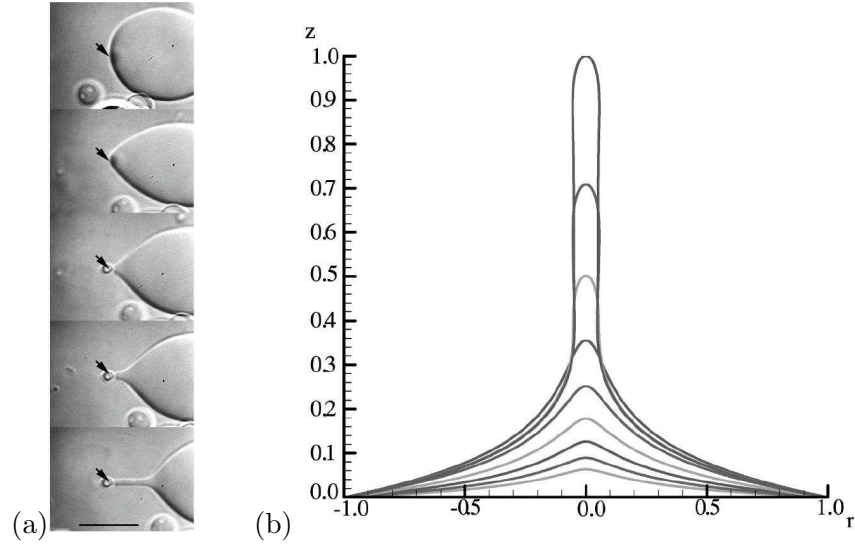


Figure III.1: Formation d'un tube de membrane à partir d'une vésicule. (a) Formes d'équilibre d'une vésicule fluctuante tirée par une pince optique. Les flèches indiquent la position de la pince. La barre représente $10\mu m$. Image extraite de [88]. (b) Formes d'équilibre de la bicouche calculées pour différentes distances entre la position d'équilibre sans force ($z = 0$) et le point d'application de la force. Image extraite de [87].

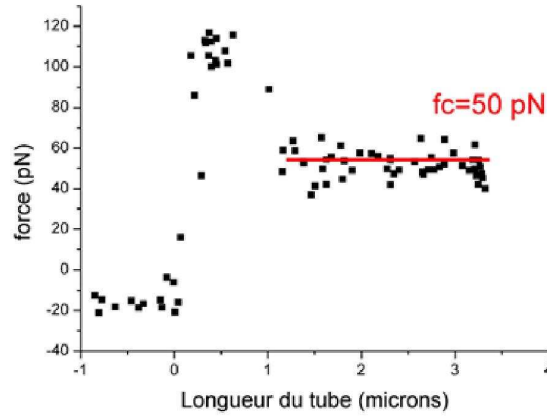


Figure III.2: Mesure de la force en fonction de la position du point de traction lors de la formation d'un tube. La vésicule est composée d'un mélange 50 : 50 sphingomyéline/cholestérol, qui forme une phase liquide-ordonnée. La force négative initiale ($-20pN$) permet de coller la bille à la membrane. En fois le tube initié, la force mesurée est constante (ici, $50pN$) quelque soit la longueur du tube. Image extraite de [29].

à profit dans le transport intra-cellulaire [90]. Celui-ci demande, en effet, de former des vésicules de petits rayons [91] à partir d'une membrane plane, ce qui peut être réalisé en utilisant un tube. Des expériences suggèrent de plus que des tubes de membranes

relient directement différents compartiments cellulaires, permettant l'échange de molécules [92, 93]. Toutefois, ces expériences utilisent des cellules mutantes favorisant la formation des tubes. Aussi, elles ne prouvent pas que de telles structures existent dans la cellule normale. Les tubes de membrane peuvent avoir d'autres fonctions, comme par exemple la communication entre cellules [94].

Les expériences sur des vésicules géantes permettent d'étudier de manière contrôlée les tubes de membrane et ainsi d'essayer de mieux comprendre les procédés existant *in vivo*. Ainsi, Aurélien Roux, dans l'équipe de Patricia Bassereau à l'Institut Curie de Paris, s'est attaché à extraire des tubes en imitant les mécanismes de la cellule [29]. Le système utilisé est formé d'une vésicule géante sur laquelle sont attachés des moteurs moléculaires, des kinésines, soit par des billes [19] (voir figure III.3a) soit directement aux lipides [95, 96]. Ces moteurs moléculaires sont des protéines qui ont la propriété de pouvoir s'attacher (et se détacher) à un élément du squelette de la cellule, les microtubules, et d'avancer dessus de manière directionnelle en présence d'ATP. Les vésicules couvertes de moteurs sont posées sur un substrat recouvert de microtubules; en présence d'ATP, il se forme alors un réseau de tubes (voir figure III.3) : des moteurs s'accumulent à la pointe des tubes pour exercer la force nécessaire à leurs extractions [96]. Avec la croissance du réseau, la tension de la vésicule mère augmente, ce qui augmente la force nécessaire pour accroître le tube jusqu'à ce que cette force soit égale à la force d'arrêt des moteurs; le tube est alors à l'équilibre : il n'avance pas mais il ne se rétracte pas non plus. Ce système modèle confirme qu'un mécanisme de formation de tubes par des moteurs moléculaires est bien possible *in vivo*. Notons que ce n'est pas le seul mécanisme : le tube peut par exemple être formé par la poussée d'un filament de cytosquelette (par exemple, d'actine) [90], le mécanisme dépendant du rôle du tube pour la cellule.

Le système développé à l'Institut Curie a été utilisé sur une vésicule formée d'un mélange de lipides : sphingomyéline (SM), Cholestérol (Chol) et dioleylphosphatidylcholine (PC), une fraction (0,5%) des lipides PC étant marquée par un fluorophore (Bodipy). L'objectif était de savoir si la composition du tube est la même que celle de la vésicule ou si le changement de courbure entraîne un tri de lipides [29]. Le réseau de tube est formé à partir d'une vésicule homogène. Toutefois, si le mélange est proche de la séparation de phase (mélanges de SM/Chol/PC en proportion 1,1,1 ou 3,4,1), celle-ci peut être induite par une oxydation photo-induite du cholestérol. Il se forme alors des domaines à la fois sur le tube et la vésicule mère. L'apparition de domaines est visualisée en fluorescence, la phase ordonnée apparaissant moins brillante que la phase désordonnée, plus riche en PC. Les domaines liquides-ordonnés formés sont répartis aléatoirement sur le tube, sans structure particulière (voir figure III.4). Les détails du protocole expérimental peuvent être trouvés dans [29].

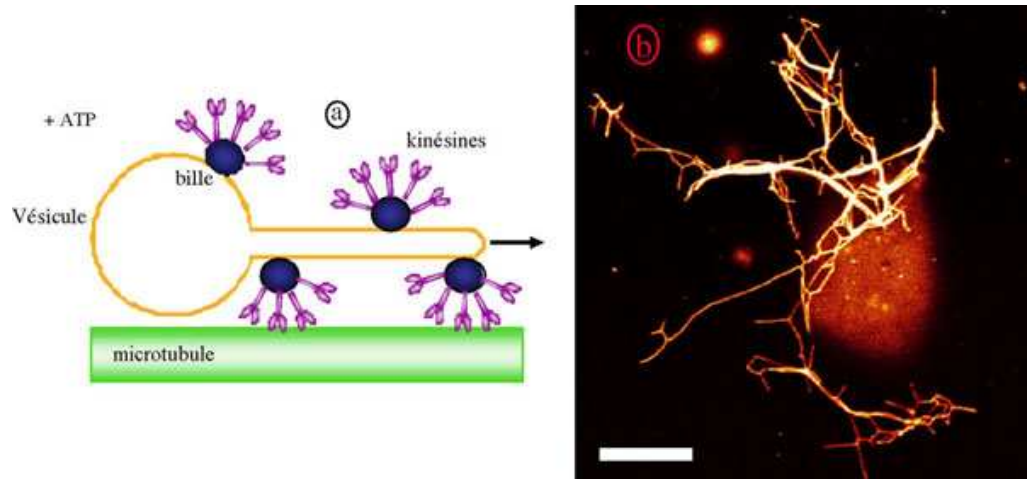


Figure III.3: Formation d'un réseau de tube à partir d'une vésicule recouverte de moteurs moléculaires, sur un substrat de microtubules [19]. (a) Principe de la formation du tube : les moteurs moléculaires, accrochés à la vésicule par une bille (ou directement aux lipides de la membrane [95]) se mettent en mouvement sur le microtubule, fournissant la force pour former un tube. (b) Image en microscopie de fluorescence de la vésicule après formation du réseau de tubes. Les traits brillants sont des tubes, le sac foncé étant la vésicule. La barre représente 5 μm .

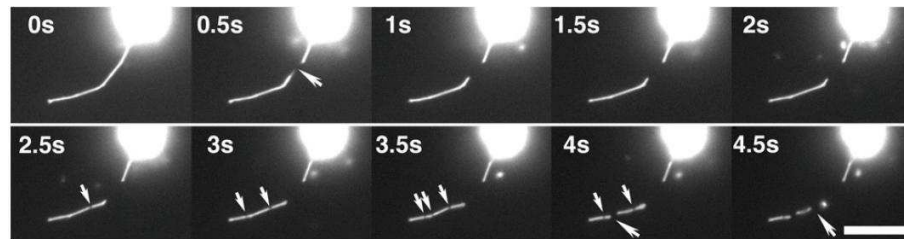


Figure III.4: Fission d'un tube lipidique provoquée par une séparation de phase. La séparation de phase est induite par photo-oxidation à partir d'une vésicule composée d'un mélange (SM/Chol/PC) 1/1/1. Les événements de fission (grandes flèches) se produisent préférentiellement au niveau des petits domaines non fluorescents (petites flèches). La barre représente 10 μm . Image extraite de [29].

Le tube bi-phasique formé ainsi est instable, avec une rupture préférentiellement à la jonction entre les domaines autant que la résolution expérimentale permette d'en juger (voir figure III.5). La fission se produit typiquement entre 1 et 10 secondes après la formation du domaine, suivant la composition de la membrane et la tension de la vésicule initiale. En particulier, plus la tension est forte, plus le temps de rupture est court.

Nous avons voulu comprendre en quoi l'existence de domaines favorise la rupture d'un tube. Expérimentalement, les rayons des domaines tubulaires sont petits devant leurs lon-

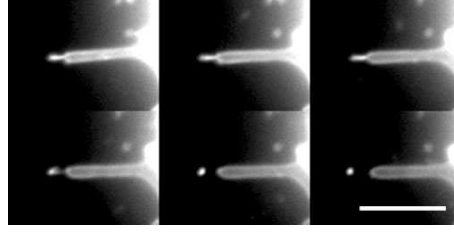


Figure III.5: Fission d'un tube de membrane bi-phasique. La section brillante (et étroite) initialement à la pointe est un domaine désordonné; La section sombre (et large) est liquide ordonné. La fission se produit à la jonction entre les deux domaines. La vésicule est initialement composée d'un mélange (SM/Chol/PC) 3/4/1. Le temps entre deux images est 1 seconde. La barre représente 10 μm . Image extraite de [97]

guez. Nous avons donc utilisé un système adapté : un tube formé de deux domaines semi-infinis connectés. Nous pouvons calculer la forme et l'énergie de ce système en fonction des différents paramètres physiques. Ainsi, nous montrons que la forme de la jonction est complètement donnée par trois paramètres. La rupture est décrite par un processus activé : le système doit franchir la barrière d'énergie entre le tube connecté (calculé pour des valeurs réalistes des constantes physiques) et l'état intermédiaire formé par un tube complètement pincé. Ceci conduit à des temps de rupture en accord avec les données expérimentales. Ce travail a fait l'objet d'une publication [97] reproduite dans la section (III.6), dont nous utilisons les notations, en particulier la tension de surface est σ et la tension de ligne est τ . Nous donnons dans la suite essentiellement des détails non publiés dans cet article.

III.2 Tubes homogènes

Les propriétés des tubes de membrane ont fait l'objet de nombreux travaux, à la fois théoriques [98–101] et expérimentaux [25, 48, 102–104], pour des vésicules homogènes. Nous nous limitons ici à présenter les résultats utiles pour l'étude d'un tube bi-phasique.

III.2.a Description énergétique

L'effet de la force de traction est introduite dans la description énergétique de la vésicule par un terme supplémentaire : le travail de la force. Nous obtenons alors l'énergie :

$$F_{ves} = \frac{\kappa}{2} \int_S H^2 dS + \kappa_G \int_S K dS + \sigma \int_S dS - f \int_l dl, \quad (III.1)$$

où f est la force appliquée. Cette énergie permet à la fois d'étudier la formation du tube [87, 89, 105–107] et les instabilités de "pearling" observées sous différentes sollicitations

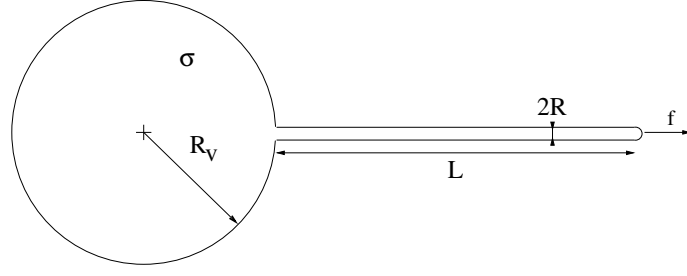


Figure III.6: Schéma d'un tube de membrane tiré depuis une vésicule de tension σ . Le tube a une longueur L et un rayon R . À son extrémité s'exerce une force f , nécessaire pour que le tube ne se résorbe pas dans la vésicule.

[6, 108–110].

Lorsqu'un tube se forme, il puise sa matière dans la vésicule mère qui sert de réservoir de lipides. À l'équilibre, le coût pour augmenter la surface du tube est donc le même que le coût pour augmenter la surface de la vésicule mère et la tension de surface σ du tube est la même que celle de la vésicule. Notons que ceci n'est bien sûr vrai qu'à l'équilibre : si la longueur du tube varie rapidement, la tension de surface dans le tube n'est plus égale à celle dans la vésicule (et n'est plus forcément constante sur tout le tube) [104].

L'énergie (III.1) devrait comporter un terme de pression mais, dans le cas d'une membrane tendue, ce terme est négligeable. La pression osmotique équilibre la tension de surface dans la vésicule mère, suivant la loi de Laplace : $2\sigma = PR_v$, où R_v est le rayon de la vésicule (voir figure III.6). Dans le tube, la pression osmotique est la même que dans la vésicule ; la loi de Laplace pour le tube de rayon R entraîne une contribution à la tension de surface $\sigma_P = PR$. Comme $R \ll R_v$, $\sigma_P \ll \sigma$: la tension de surface due à la pression osmotique est négligeable devant celle imposée par la vésicule mère. Aussi, nous négligerons dans la suite la contribution de la pression osmotique.

III.2.b Stabilité d'un tube homogène.

Un tube homogène est stable si il satisfait les conditions d'équilibre mécanique : il faut que, en chaque point, les forces et les moments se compensent. Deux approches permettent d'obtenir les conditions d'équilibre : l'écriture des bilans locaux des forces ou la recherche d'un minimum d'énergie. Nous présentons ici cette dernière approche qui est proche d'un calcul variationnel.

Nous considérons un tube déjà formé de longueur L et de rayon R . Le tube est tiré depuis une vésicule, qui impose une tension de surface σ . À l'autre extrémité s'exerce une force f (voir figure III.6). La courbure totale du tube est $H = -1/R$ et la surface du tube

est $2\pi RL$. Aussi, l'énergie (III.1) du tube s'exprime :

$$F = 2\pi \left(\frac{\kappa}{2} \frac{L}{R} + \sigma RL \right) - fL. \quad (\text{III.2})$$

Le tube est stable si son énergie est minimum. Ceci est obtenu à condition qu'une petite perturbation de la longueur L ou du rayon R du tube ne change pas l'énergie :

$$\frac{\partial F}{\partial R} = 0 \quad \text{et} \quad \frac{\partial F}{\partial L} = 0.$$

L'équilibre mécanique du tube impose donc :

$$R = \sqrt{\frac{\kappa}{2\sigma}}, \quad (\text{III.3a})$$

$$f = 2\pi\sqrt{2\sigma\kappa}. \quad (\text{III.3b})$$

Ces relations (III.3) permettent de déterminer le module élastique [111], le rayon du tube (environ $100nm$) [86] ou la tension de la membrane [112]. Notons que la longueur L n'est pas fixée par ce calcul : une fois le tube formé, il peut être étiré sans avoir à changer la force, comme le montre la figure III.2. En fait, ceci n'est vrai que pour des petites longueurs de tubes : l'allongement du tube prélève des lipides de la vésicule mère, ce qui diminue la réserve de fluctuations et augmente la tension de surface σ ; le rayon du tube étant petit devant celui de la vésicule, cet effet ne se manifeste que pour des variations de longueur grandes devant le rayon de la vésicule. Lorsqu'on exerce une force supérieure à celle nécessaire pour initier le tube, le tube s'allonge et la tension de surface augmente jusqu'à ce que l'équilibre mécanique (III.3) soit atteint, ce qui fixe la longueur du tube [113]. Cet effet a par exemple été utilisé pour mesurer le module de flambage de filaments du cytosquelette comme les microtubules [88, 114] (voir figure III.7). Un microtubule est formé par la polymérisation de la protéine tubuline ; lorsque la longueur du microtubule devient supérieure au rayon de la vésicule, cela entraîne la formation d'un tube de membrane puis une augmentation de la tension de la membrane, ce qui augmente la force sur le microtubule, qui finit par flamber.

III.3 Fission d'un tube à deux domaines

Les expériences montrent qu'un tube bi-phasique est instable et se rompt au niveau des jonctions entre domaines [29] (voir figure III.5). Le rayon du tube étant trop petit pour être résolu correctement en microscopie optique, nous nous sommes attachés à construire une grandeur accessible expérimentalement : le temps de rupture du tube.

Trois temps caractéristiques déterminent l'évolution d'un tube inhomogène. La séparation de phase se produit très rapidement, à des échelles de temps inférieures à la résolution



Figure III.7: Flambage de microtubules (filaments du cytosquelette) dans une vésicule. La croissance du microtubule conduit à une vésicule en forme de ϕ . Lorsque l’allongement devient trop important, le microtubule flambe jusqu’à être complètement replié sur la dernière image. Barre : 5 μm . Image extraite de [88]

expérimentale ; la rupture du tube se produit avec des temps caractéristiques de l’ordre de la seconde, dépendant à la fois de la composition de la vésicule et de sa tension de surface ; le mouvement des domaines sur le tube ou ”coarsening”, qui nécessite de faire traverser des lipides d’une phase à travers l’autre phase, demande, à priori, des temps très grands et ne peut pas être observé expérimentalement. Aussi, nous pouvons considérer que le tube est à l’équilibre avant la rupture. Le processus de fission nécessite donc de franchir une barrière d’énergie pour quitter cet état d’équilibre : c’est un processus activé. La détermination d’un temps caractéristique de rupture se fait alors en deux étapes. Il faut d’abord trouver l’énergie du tube non rompu, ce qui nécessite d’en déterminer la forme ; ensuite, il faut évaluer l’amplitude de la barrière d’énergie, et donc connaître un état de transition.

Le système est formé de deux domaines cylindriques semi-infinis, connectés (voir figure III.8). La tension de ligne tend à minimiser le périmètre de l’interface ; aussi, nous pouvons supposer que l’interface entre les domaines est perpendiculaire à l’axe du tube. Les coordonnées cylindriques sont bien adaptées pour décrire le tube axisymétrique. Le tube est paramétré par son abscisse curviligne s . La forme de la surface est donnée par r et ψ , les deux coordonnées étant reliées par la relation géométrique $\dot{r}(s) = \cos \psi(s)$ (voir figure III.8).

III.3.a Equations de forme - Conditions aux limites

L’énergie du tube est donnée par la somme des énergies (III.1) de chaque phase ainsi que par un terme de tension de ligne au niveau de l’interface : nous obtenons ainsi l’énergie (1) de l’article

$$F = \sum_{i=\alpha,\beta} \int_{\Omega_i} \left[2\kappa_i H^2 + \kappa_G^{(i)} K + \sigma_i \right] dS + \oint_{\partial\Omega} \tau d\ell - \int f dz. \quad (\text{III.4})$$

La force f est la même dans les deux phases. Les équations de forme ainsi que les conditions de raccord entre les deux phases s’obtiennent à partir de cette énergie F par un processus

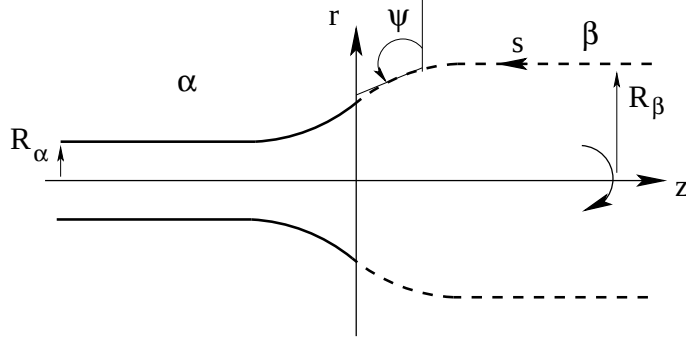


Figure III.8: Représentation schématique du système utilisé : deux domaines tubulaires semi-infinis connectés. La bicouche est supposée avoir une forme axisymétrique. Elle est paramétrée par son abscisse curviligne s et décrite en coordonnées cylindriques r et ψ .

variationnel, similaire à celui présenté dans l'annexe B. La contrainte géométrique reliant r et ψ est assurée par un multiplicateur de Lagrange local, qui rajoute le terme :

$$\int_{\Omega_i} \gamma(\dot{r} - \cos \psi) ds$$

à la fonctionnelle à minimiser. Les équations d'Euler-Lagrange dans chaque domaine [105] sont :

$$\ddot{\psi} = -\frac{\dot{\psi}^3}{2} - 2\frac{\cos \psi}{r}\ddot{\psi} + \frac{3\sin \psi}{2r}\dot{\psi}^2 + \frac{3\cos^2 \psi - 1}{2r^2}\dot{\psi} \quad (\text{III.5a})$$

$$-\frac{\cos^2 \psi + 1}{2r^3}\sin \psi + \frac{\sigma_i}{\kappa_i}\dot{\psi} + \frac{\sigma_i}{\kappa_i}\frac{\sin \psi}{r},$$

$$\dot{r} = \cos \psi. \quad (\text{III.5b})$$

L'énergie ne dépendant pas explicitement de l'abscisse curviligne, l'hamiltonien $\mathcal{H}$ du système est constant, la stabilité par rapport à une perturbation de l'abscisse curviligne s donnant $\mathcal{H} = 0$.

$$\mathcal{H} = 0 = \frac{\kappa_i}{2}r \left(\dot{\psi}^2 - \frac{\sin^2 \psi}{r^2} \right) - \sigma_i r - \frac{f}{2\pi} \sin \psi + \gamma \cos \psi. \quad (\text{III.6})$$

En supposant que le rayon soit continu (il n'y a pas de trou dans la membrane) et que la membrane ne fasse pas de tilt à l'échelle d'observation (l'angle ψ est continu), les conditions de raccord sont :

$$r(\epsilon) = r(-\epsilon), \quad (\text{III.7a})$$

$$\psi(\epsilon) = \psi(-\epsilon), \quad (\text{III.7b})$$

$$\kappa_\alpha \dot{\psi}(\epsilon) - \kappa_\beta \dot{\psi}(-\epsilon) = (\kappa_\beta + \kappa_{G_\beta} - \kappa_\alpha - \kappa_{G_\alpha}) \frac{\sin \psi(0)}{r(0)}, \quad (\text{III.7c})$$

$$\kappa_\alpha \ddot{\psi}(\epsilon) - \kappa_\beta \ddot{\psi}(-\epsilon) = \tau \frac{\sin \psi(0)}{r(0)} + (2\kappa_\alpha + \kappa_{G_\alpha} - 2\kappa_\beta - \kappa_{G_\beta}) \frac{\sin \psi(0) \cos \psi(0)}{r^2(0)}. \quad (\text{III.7d})$$

avec ϵ un infiniment petit positif. α désigne le domaine pour $s \geq 0$ ($z \leq 0$) et β le domaine pour $s \leq 0$ ou $z \geq 0$ (voir figure III.8).

A l'infini, il faut que la solution se raccorde à celle d'un tube non perturbé ($r = R_i$, $\psi = \pi/2$, $\dot{\psi} = \ddot{\psi} = 0$). Le système doit donc satisfaire à l'infini les conditions d'équilibre mécanique (III.3) d'un tube cylindrique pour chaque domaine :

$$R_i = \sqrt{\frac{\kappa_i}{2\sigma_i}} \quad \text{et} \quad f = 2\pi\sqrt{2\sigma_i\kappa_i}. \quad (\text{III.8})$$

La force f exercée est la même pour les deux domaines. Aussi, l'équilibre du tube impose :

$$\frac{\sigma_\alpha}{\sigma_\beta} = \frac{\kappa_\beta}{\kappa_\alpha} = \frac{R_\beta}{R_\alpha}. \quad (\text{III.9})$$

Le rapport des modules élastiques fixe donc le rapport des tensions de surface et des rayons à l'infini des deux tubes. La connaissance de R_α et κ_α permet ainsi de déterminer σ_α , σ_β , R_β et κ_β . Aussi, R_α et κ_α sont adaptés comme échelles de longueur et d'énergie du système. Les solutions des équations (III.5) et (III.7) sont alors complètement données par trois paramètres sans dimension :

$$\tilde{\kappa} = 1 + \delta\tilde{\kappa} = \frac{\kappa_\beta}{\kappa_\alpha}, \quad \Delta\tilde{\kappa}_G = \frac{\kappa_{G_\beta} - \kappa_{G_\alpha}}{\kappa_\alpha} \quad \text{et} \quad \tilde{\tau} = \tau \frac{R_\alpha}{\kappa_\alpha}. \quad (\text{III.10})$$

Il n'y a pas de solution analytique aux équations (III.5), sauf dans des cas particuliers simples. Nous avons donc utilisé une méthode numérique pour trouver les formes d'équilibre. Toutefois, la mise en place de cette méthode ainsi que sa validation demande en préalable d'étudier un cas limite : le tube faiblement perturbé.

III.3.b Calcul linéaire - solutions analytiques

Nous nous plaçons dans le cas où le rayon du tube reste proche du rayon à l'infini R_i : $r(s) = R_i(1 + U_i(s))$ avec $U_i(s) \ll 1$. En développant les relations géométriques $\dot{r} = \cos \psi$ et $\dot{z} = -\sin \psi$ au premier ordre, il vient le changement de variables :

$$\begin{aligned} \sin \psi &= 1 ; z = -s ; r = R_i(1 + U_i(z)) ; \\ \cos \psi &= -U_i'(z)R_i ; \dot{\psi} = -U_i''(z)R_i ; \ddot{\psi} = U_i'''(z)R_i \quad \text{et} \quad \ddot{\psi} = -R_i U_i^{(IV)}(z). \end{aligned} \quad (\text{III.11})$$

Il permet, en utilisant les conditions d'équilibre mécanique (III.9) reliant R à σ/κ de transformer les équations d'Euler-Lagrange (III.5) en une unique équation linéaire [99] :

$$R_i^4 U_i^{(IV)}(z) = -U_i(z), \quad (\text{III.12})$$

dont la solution générale est :

$$\begin{aligned} U_i(z) &= A_i \exp\left(-\frac{z}{\sqrt{2}R_i}\right) \cos\left(-\frac{z}{\sqrt{2}R_i} + \theta_i^{(1)}\right) \\ &\quad + B_i \exp\left(\frac{z}{\sqrt{2}R_i}\right) \cos\left(\frac{z}{\sqrt{2}R_i} + \theta_i^{(2)}\right), \end{aligned} \quad (\text{III.13})$$

les paramètres A_i , B_i , $\theta_i^{(A)}$ et $\theta_i^{(B)}$ étant donnés par les conditions aux bords du domaine.

Le changement de variable (III.11), avec l'adimensionnement (III.10) et les conditions d'équilibre entre les deux phases (III.9), transforme les conditions de raccord entre les deux phases (III.7) en :

$$1 + U_\alpha(0) = \tilde{\kappa}(1 + U_\beta(0)), \quad (\text{III.14a})$$

$$U'_\alpha(0) = \tilde{\kappa}U'_\beta(0), \quad (\text{III.14b})$$

$$\tilde{\kappa}^2 U''_\beta(0) - U''_\alpha(0) = (\tilde{\kappa} - 1 + \Delta\tilde{\kappa}_G) \frac{1}{1 + U_\alpha(0)}, \quad (\text{III.14c})$$

$$\tilde{\kappa}^2 U'''_\beta(0) - U'''_\alpha(0) = -\frac{\tilde{\tau}}{1 + U_\alpha(0)} - (2\tilde{\kappa} + \Delta\tilde{\kappa}_G - 2) \frac{U'_\alpha(0)}{(1 + U_\alpha(0))^2}. \quad (\text{III.14d})$$

Ce système n'est pas un développement au premier ordre dans la perturbation U . Pour que les solutions puissent être approximées par des solutions linéaires, il faut que les rayons des deux tubes soient suffisamment proches : $(R_\beta - R_\alpha)/R_\alpha$ doit être un infiniment petit du même ordre que U . Ceci entraîne que $\delta\tilde{\kappa} = (\tilde{\kappa} - 1)$ est un infiniment petit au plus du même ordre que U . Pour des raisons identiques, $\tilde{\tau}$ et $\Delta\tilde{\kappa}_G$ doivent être des infiniment petits, au plus du même ordre que $U(z)$. Au premier ordre dans la perturbation, le système est alors :

$$U_\alpha(0) = U_\beta(0) + \delta\tilde{\kappa}, \quad (\text{III.15a})$$

$$U'_\alpha(0) = U'_\beta(0), \quad (\text{III.15b})$$

$$U''_\alpha(0) - U''_\beta(0) = -(\delta\tilde{\kappa} + \Delta\tilde{\kappa}_G), \quad (\text{III.15c})$$

$$U'''_\alpha(0) - U'''_\beta(0) = -\tilde{\tau}. \quad (\text{III.15d})$$

Pour résoudre le système pour une valeur quelconque des constantes physiques $\delta\tilde{\kappa}$, $\tilde{\tau}$ et $\Delta\tilde{\kappa}_G$, nous pouvons mettre à profit la linéarité du système : la solution générale est la somme des trois solutions obtenues avec un seul des paramètres non nul.

Tension de ligne non nulle ($\delta\tilde{\kappa} = \Delta\tilde{\kappa}_G = 0$).

Les rayons à l'infini des deux domaines sont les mêmes ($R_\alpha = R_\beta$). La solution U_α pour les z négatifs doit tendre vers 0 quand $z \rightarrow -\infty$, donc $A_\alpha = 0$. Pour des raisons similaires, $B_\beta = 0$. Les conditions aux limites (III.15) donnent

$$B_\alpha = A_\beta = -\tilde{\tau}/2 \text{ et } \theta_\alpha^{(2)} = \theta_\beta^{(1)} = \pi/4.$$

La figure III.9 montre le profil des solutions obtenues pour différentes valeurs de la tension de ligne. La solution est symétrique et le rayon au niveau de l'interface diminue quand la tension de ligne augmente. Ceci correspond bien à l'interprétation physique : la forme est symétrique car les deux domaines ont les mêmes modules élastiques et car τ intervient

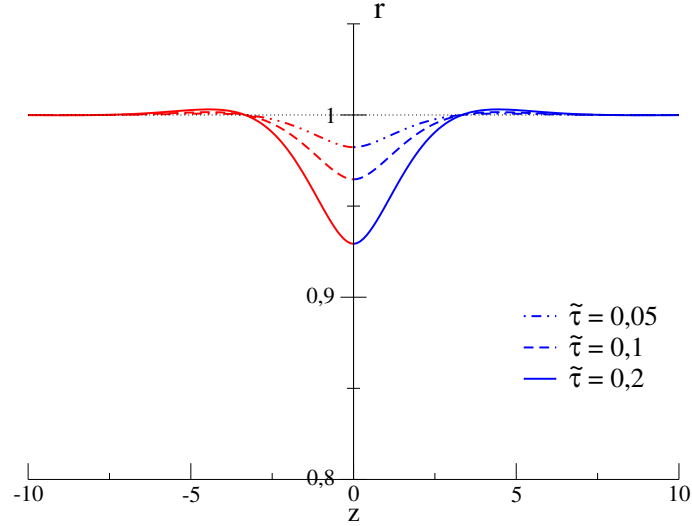


Figure III.9: Rayon en fonction de la position sur l'axe de symétrie (z) d'un tube de membrane formé de deux domaines semi-infinis connectés, pour différentes valeurs de la tension de ligne adimensionnée $\tilde{\tau}$. Les formes ont été calculées dans l'approximation linéaire. Les deux domaines ont les mêmes modules élastiques $\tilde{\kappa} = 1$ et $\tilde{\kappa}_G$. L'interface est placée en $z = 0$.

uniquement à l'interface; de même, la tension de ligne tend à réduire le périmètre de l'interface et donc à pincer le tube.

Modules de flambage différents ($\tilde{\tau} = \Delta\tilde{\kappa}_G = 0$).

Dans ce cas, les rayons à l'infini des deux domaines ne sont pas identiques : $R_\beta = R_\alpha(1 + \delta\tilde{\kappa})$. Les conditions aux limites, à l'interface comme à l'infini, conduisent à :

$$A_\alpha = 0; B_\alpha = -\frac{\delta\tilde{\kappa}}{\sqrt{2}}; \theta_\alpha^{(2)} = \frac{\pi}{4};$$

$$A_\beta = \frac{\delta\tilde{\kappa}}{\sqrt{2}}; B_\beta = 0 \text{ et } \theta_\beta^{(1)} = \frac{\pi}{4}.$$

La figure III.10 montre les profils obtenus pour différentes valeurs de $\delta\tilde{\kappa}$. Les domaines ne sont plus symétriques : les modules de flambage ne sont plus égaux. Le domaine de plus grand rayon est celui de plus grand module de flambage, qui donc plus difficile à courber. Au premier ordre, la différence de module de flambage n'intervient que dans les rayons des tubes : le rayon du tube au niveau du raccord est exactement $(R_\alpha + R_\beta)/2$. Le profil obtenu présente un plateau au niveau du raccord entre les deux domaines. Nous n'avons pas trouvé d'argument mécanique simple permettant d'expliquer ce résultat.

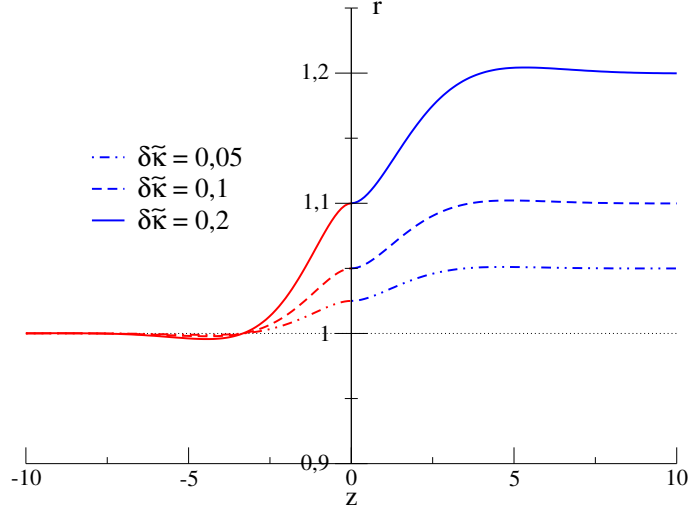


Figure III.10: Rayon en fonction de la position sur l'axe de symétrie (z) d'un tube de membrane formé de deux domaines semi-infinis, pour différents écarts de modules de flamme $\delta\tilde{\kappa}$. Les formes ont été calculées dans l'approximation linéaire. Les deux domaines ont le même module de Gauss $\tilde{\kappa}_G$ et la tension de ligne de l'interface est nulle ($\tilde{\tau} = 0$). L'interface est placée en $z = 0$.

Modules de Gauss différents ($\delta\tilde{\kappa} = \tilde{\tau} = 0$).

Les rayons à l'infini des deux domaines sont les mêmes ($\delta\tilde{\kappa} = 0$). Les conditions aux limites, à l'interface et à l'infini, conduisent à :

$$A_\alpha = 0; B_\alpha = -\frac{\Delta\tilde{\kappa}_G}{2}; \theta_\alpha^{(2)} = \frac{\pi}{2};$$

$$A_\beta = \frac{\Delta\tilde{\kappa}_G}{2}; B_\beta = 0 \text{ et } \theta_\beta^{(1)} = \frac{\pi}{2}.$$

La figure III.11 montre la forme des tubes pour différentes valeurs de $\Delta\tilde{\kappa}_G$. Bien que la contribution des termes de Gauss se résume dans l'énergie à une intégrale de contour, elle brise la symétrie entre les deux domaines : la différence de module de Gauss tend à vouloir diminuer (ou augmenter suivant son signe) l'angle ψ au niveau de l'interface. Le domaine de plus grand module de Gauss est pincé à proximité du raccord alors que le rayon de l'autre domaine augmente (voir figure III.11). Le rayon de l'interface n'est pas affecté par les variations de modules de Gauss ($r(0) = R_\alpha = R_\beta$).

III.3.c Méthode numérique

Les équations de forme (III.5) sont fortement non linéaires et nécessitent en général une résolution numérique. La solution trouvée doit satisfaire les conditions de raccord (III.7) ainsi que les conditions à l'infini.

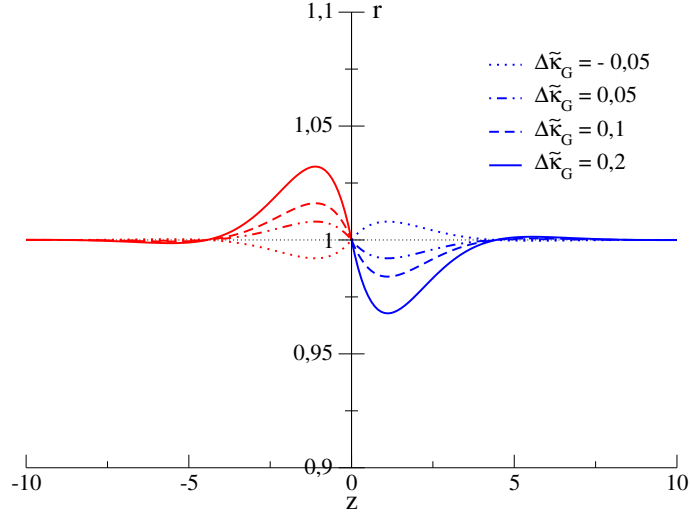


Figure III.11: Rayon en fonction de la position sur l'axe de symétrie (z) d'un tube de membrane constitué de deux domaines semi-infinis, pour différents écarts de modules de Gauss adimensionné $\Delta\tilde{\kappa}_G$. Les formes ont été calculées dans l'approximation linéaire. Les deux domaines ont le même module de flambage $\tilde{\kappa}$ et la tension de ligne de l'interface est nulle ($\tilde{\tau} = 0$). L'interface se trouve en $z = 0$.

Numériquement, la résolution se fait sur une longueur finie, aussi il n'est pas possible d'utiliser une condition à l'infini. Cette difficulté peut être contournée si la résolution se fait sur des longueurs grandes par rapport à l'échelle des variations de rayon du domaine ; le rayon du tube au point d'arrêt est alors très proche du rayon à l'infini et la solution peut être aproximée par la partie convergente de la solution linéaire (III.13). La solution linéaire montre que l'effet de la jonction s'atténue exponentiellement avec $\sqrt{2}R_i$ comme longueur caractéristique, il faut que la longueur de résolution numérique soit typiquement supérieure à 7 fois le rayon du domaine à l'infini pour que l'écart entre la solution au bord et le rayon à l'infini soit inférieur au pourcent.

La résolution des équations nécessite quatre conditions initiales. La solution analytique dans un domaine ne donne que deux conditions car elle comporte deux inconnues (l'amplitude et la phase). Aussi, la résolution numérique du système nécessite d'utiliser les conditions aux deux extrémités : il s'agit d'un problème de valeur limite en deux points. Une méthode numérique adaptée à ce genre de problème est la méthode du tir (ou 'shooting'). Le principe consiste à partir d'une des extrémités, par exemple du point de plus petit z et à résoudre les intégrales jusqu'à l'autre extrémité. Les paramètres non connus au point initial sont ajustés de manière itérative pour que les conditions aux limites connues à l'autre extrémité soient satisfaites (voir figure III.12). Cette méthode est, en générale, efficace à la condition que les 'tirs' soient capables de traverser tout le domaine d'intégration,

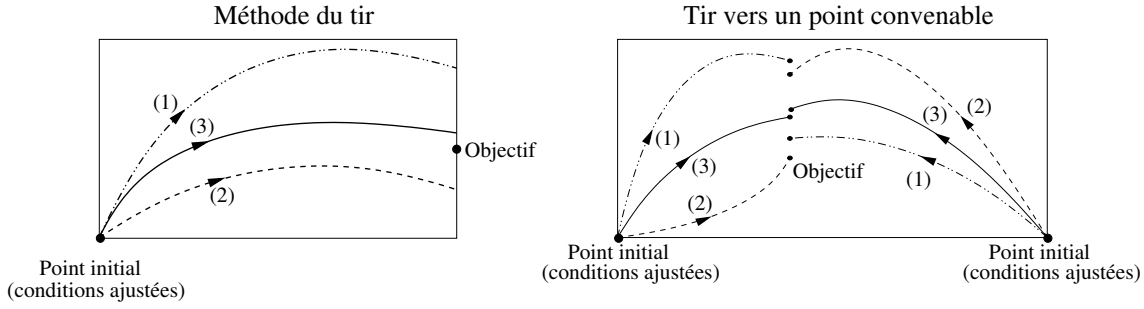


Figure III.12: Principe de la méthode du tir. (a) Méthode du tir standard. Les équations de formes sont intégrées à partir d'une des extrémités. Les conditions initiales non connues sont ajustées de manière itérative pour se rapprocher puis atteindre l'objectif. (b) Méthode de tir vers un point convenable. Les équations de formes sont intégrées à partir des deux extrémités, jusqu'à un point intermédiaire. Les paramètres non connus aux extrémités sont ajustés de manière itérative pour raccorder les deux solutions.

même aux premières étapes du processus de convergence. Pour notre problème, ce n'est pas le cas : la solution loin de l'interface a tendance à diverger. Ceci peut se comprendre grâce à la solution analytique (III.13) : elle contient un terme convergent, qui est celui que nous voulons atteindre, et un terme divergent. Numériquement, la solution que nous voulons obtenir est marginale et c'est le terme divergent qui est le plus facile à trouver, ce qui empêche le fonctionnement de la méthode de tir.

Aussi, nous avons utilisé une méthode de tir modifiée : le tir vers un point convenable ('shooting to a fitting point'). Le principe est le même que pour la méthode de tir sauf que, au lieu d'intégrer d'une extrémité à l'autre, nous partons simultanément des deux extrémités jusqu'à un point intermédiaire, situé à l'écart des singularités et donc convenable. L'ensemble des paramètres non connus aux deux extrémités est ajusté pour obtenir la continuité de l'ensemble des fonctions au point convenable (voir figure III.12).

Notre système peut présenter un troisième point instable : le point où la membrane est pincée. En effet, les équations d'Euler-Lagrange (III.5) sont divergentes quand $r \rightarrow 0$. Cette difficulté concerne principalement les premières itérations, lorsque les formes changent fortement et sont loin de la solution finale. Bien qu'il aurait été probablement encore possible de modifier la méthode de tir pour contourner cette difficulté, nous avons choisi plutôt d'utiliser des paramètres de tirs bien choisis : nous partons du tube homogène puis nous modifions progressivement $\tilde{\kappa}$, $\Delta\tilde{\kappa}_G$ et $\tilde{\tau}$ jusqu'à arriver aux valeurs désirées. Aussi, nous pouvons partir d'une forme proche de celle recherchée, ce qui diminue le risque de divergence. De plus, nous avons évité de placer le point 'convenable' juste au niveau du pincement : le bruit numérique y plus important, ce qui peut empêcher la convergence des itérations.

L'algorithme intègre les équations de forme (III.5) ainsi que la relation géométrique $z' = -\sin \psi$ en fonction du paramètre s . L'ensemble du système est adimensionné en utilisant κ_α et R_α comme échelles d'énergie et de longueur : nous prenons $\kappa_\alpha = 1$ et $R_\alpha = 1$. La résolution se fait dans chaque domaine sur 7 fois le rayon du domaine (entre $z = -7$ et $z = 7\tilde{\kappa}$), ce qui assure un fonctionnement optimal de l'algorithme : il permet un raccord avec la solution linéaire avec des $U \simeq 0,01$; un intervalle plus petit peut rendre l'approximation linéaire fautive alors qu'un intervalle plus grand peut rendre les amplitudes des solutions linéaires trop petites, favorisant le bruit numérique. La valeur 7 du rapport d'aspect est empirique et l'utilisation d'une valeur proche, comme 10, est aussi adaptée, à part pour de très forts pincements.

Il faut cinq conditions aux limites, données par les quatre inconnues des deux extrémités $(A_\beta, B_\alpha, \theta_\beta^{(1)}, \theta_\alpha^{(2)})$ ainsi que le point d'arrêt de l'intégration s_2 : si on fixe l'intervalle sur z , il faut pouvoir changer l'intervalle sur l'abscisse curviligne. L'intégration se faisant des z positifs vers les z négatifs (pour des s croissants), l'intervalle est pris en compte au premier point calculé ayant un $z \leq 0$, en rajoutant les conditions (III.7) aux solutions calculées. Le point 'adapté' est placé empiriquement entre $0,55s_2$ et $0,65s_2$ suivant ce qui favorise le plus la convergence.

L'intégration des équations a été faite par une méthode de Runge-Kutta du quatrième ordre à pas constant. L'utilisation d'un pas adaptatif rend plus complexe la prise en compte de l'interface et n'améliore pas la résolution numérique : il n'y a pas de zones où le rayon varie faiblement sur de grandes longueurs. Les algorithmes (pour la méthode de Runge-Kutta et pour la méthode de tir) sont ceux des Numerical Recipes. Il aurait été possible de raffiner davantage l'algorithme ou d'utiliser d'autres méthodes de résolution pour améliorer la convergence du code. La méthode choisie, tout comme les détails du code, sont un compromis entre le temps requis par le développement et les résultats obtenus. Notre méthode nous permet d'avoir des résultats satisfaisants et suffisants.

III.3.d Formes d'équilibre

L'utilisation d'une méthode numérique permet de trouver la forme du tube pour n'importe quelle valeur des paramètres physiques. Dans l'article, nous avons illustré l'effet des différents paramètres physiques en calculant les formes avec un seul des trois paramètres non nul (voir figure 3 dans la section III.6). Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus pour un calcul linéaire : nous retrouvons les mêmes comportements pour des petites valeurs des paramètres. Toutefois, il apparaît aussi des effets non linéaires. Ainsi, pour la figure (3a), avec deux modules de flambage différents, nous retrouvons bien le plateau. Les effets non-linéaires entraînent par contre que la position de l'interface n'est plus à mi-distance. Bien que l'interface paraisse plus proche de la phase de petit rayon et donc

de petit module élastique, ce n'est pas le cas si on considère la variation relative de rayon : c'est bien la phase la plus souple qui est la plus courbée. De même, pour la figure (3c), avec deux modules de Gauss différents, nous retrouvons bien que la membrane se pince dans le domaine de plus grand module mais le rayon à l'interface est modifié par les non-linéarités et n'est plus celui à l'infini.

Retrouver le comportement linéaire aux petites déformations indique un fonctionnement correct du code. Nous avons aussi confirmé l'absence d'artefact numérique dans les simulations en comparant nos résultats avec un autre code. Ce dernier, développé par Cornelis Storm à l'Institut Curie de Paris, est basé sur un principe complètement différent : il ne part pas des extrémités pour aller vers le centre mais de l'interface pour aller vers les bords. De même, il fixe les valeurs de r et ψ au centre, trouve la forme associée puis en déduit les constantes physiques associées, alors que nous faisons la démarche inverse. Les deux codes donnent des résultats très proches, les différences apparaissant pour des grandes valeurs des constantes physiques et étant probablement dues à la superposition des erreurs numériques.

Contrairement au cas linéaire, la solution pour une valeur quelconque des constantes physiques ne peut pas être obtenue en superposant les solutions calculées avec une constante non nulle à la fois. L'étude systématique des formes de jonction ne présente toutefois pas un intérêt considérable : les résultats ne pourraient pas être comparés à des expériences, faute d'une résolution suffisante en microscopie optique. Nous avons préféré calculer la forme d'équilibre pour des valeurs de paramètres réalistes vis à vis des expériences d'Aurélien Roux :

$$\begin{aligned}\kappa_\alpha &= 40k_B T = 1,6 \cdot 10^{-19} \text{ J} \quad ; \quad \kappa_\beta = 70k_B T = 2,9 \cdot 10^{-19} \text{ J} \\ \kappa_{G_\alpha} &= -0,83.\kappa_\alpha = -1,38 \cdot 10^{-19} \text{ J} \quad ; \quad \kappa_{G_\beta} = -0,83.\kappa_\beta = -2,3 \cdot 10^{-19} \text{ J} \\ \sigma_\alpha &= 10^{-6} \text{ N/m} \quad ; \quad \sigma_\beta = 5,6 \cdot 10^{-6} \text{ N/m} \quad \text{et} \quad \tau = 7 \cdot 10^{-12} \text{ N}\end{aligned}$$

Il s'agit d'estimations et non de valeurs mesurées mais les mesures à posteriori ont conduit aux mêmes ordres de grandeur. La figure III.13 montre le profil du tube calculé pour ces valeurs des paramètres. La tension de ligne impose un très fort pincement du tube au niveau de l'interface. Toutefois, le rayon le plus petit, correspondant au pincement le plus fort, se situe en $z = -0,04$ (dans la phase liquide-désordonnée) et non au niveau de l'interface. Si ce tube devait rompre, on peut alors imaginer qu'il va rester un petit domaine liquide-désordonné avec la phase liquide-ordonnée. Là encore, il s'agit d'effets trop petits pour être observables en microscopie optique.

En utilisant la forme trouvée, nous pouvons calculer l'énergie associée, à partir de (III.4). Pour être sûr de ne pas avoir de problèmes liés à l'intervalle fini d'intégration numérique, nous avons pris comme énergie de référence dans chaque phase l'énergie d'un

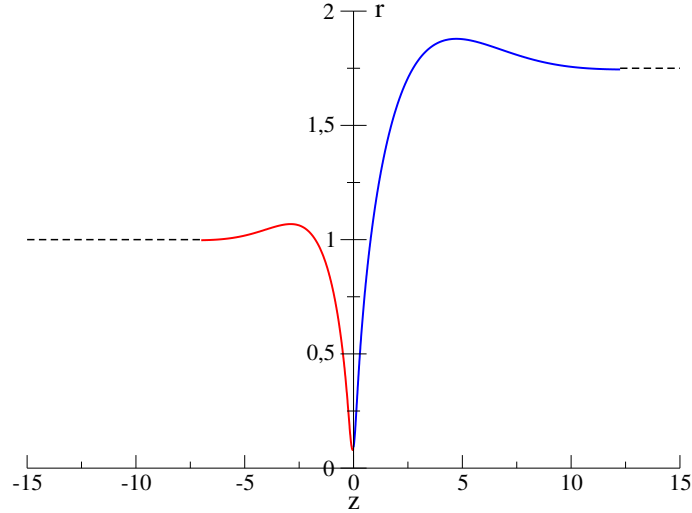


Figure III.13: Rayon du tube en fonction de la position sur son axe de symétrie (z). Les paramètres sont ceux utilisés dans l'article. Les traits continus sont la solution calculée (pour z variant entre -7 et $12,5$). Les lignes pointillées matérialisent le rayon à l'infini. Aux extrémités de l'intégration numérique, l'écart entre la solution numérique et la solution à l'infini est inférieur à $0,3\%$

tube semi-infini, à l'équilibre mécanique, de rayon constant R_i , sans tension de bord. La connaissance des solutions analytiques aux bornes de l'intégration permet de calculer l'énergie pour l'ensemble du tube ; il s'agit de corrections inférieures au pourcent de l'énergie calculée. L'énergie du tube 'réaliste' est de $657 \text{ k}_B\text{T}$ soit $2,63 \cdot 10^{-18} \text{ J}$.

III.3.e Etat de transition

La fission se fait à partir d'une forme d'équilibre et demande donc de franchir une barrière d'énergie. L'amplitude de cette barrière est donnée par l'écart entre l'énergie de la forme d'équilibre (minimum d'énergie) et celle d'un état de transition (maximum d'énergie). L'état de transition devrait donc être solution des équations d'Euler-Lagrange (III.5). Nous avons essayé analytiquement et numériquement de trouver une solution différente de la forme d'équilibre rendant l'énergie extrême mais nous n'en avons pas trouvé. L'absence d'autre solution à nos équations de formes ne signifie pas pour autant qu'il n'y a pas d'état intermédiaire, mais que cet état n'est pas décrit par notre modèle.

La forme du tube calculée avec des paramètres réalistes (voir figure III.13) est fortement pincée près de l'interface. Ceci suggère un mécanisme de fission : la rupture se fait en passant par un état de transition complètement pincé. Ce mécanisme suppose de rendre le rayon au pincement de l'ordre de l'épaisseur de la bicouche. L'énergie d'Helfrich n'est alors plus adaptée, des termes de courbure d'ordres supérieurs devant être rajoutés. De même,

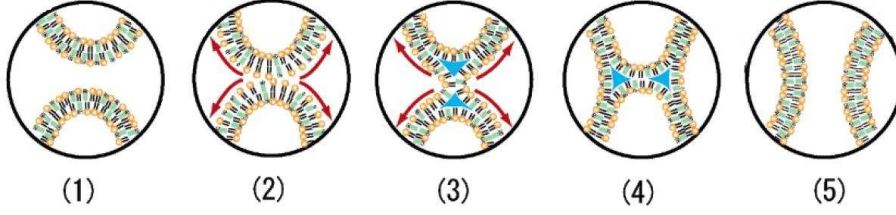


Figure III.14: Exemple de réarrangement moléculaire nécessaire pour la rupture par pincement d'un tube de bicouche. Image extraite de [116]

la rupture nécessite forcément un réarrangement des lipides de la bicouche [115,116] (voir figure III.14), ce qui est hors de notre modèle macroscopique. De tels raffinements dans la description du tube n'étant pas envisageables pour l'instant, nous avons approximé l'état intermédiaire par une forme que nous espérons proche, pour obtenir un ordre de grandeur de la barrière d'énergie.

Le mécanisme de fission n'est possible que si l'énergie du tube ne diverge pas quand le rayon du pincement tend vers 0. Cette divergence est liée aux effets élastiques : la courbure moyenne comporte un terme en $1/r$ au niveau du pincement, qui diverge quand le rayon r_0 au pincement tend vers 0. Nous considérons le cas d'un tube bi-phasique uniquement soumis à la tension de ligne : $\tilde{\kappa} = 1$, $\Delta\tilde{\kappa}_G = 0$. La figure III.15 montre l'énergie du tube, la contribution de la tension de ligne ainsi que l'écart entre les deux, en fonction du rayon r_0 , calculé en utilisant l'algorithme de Cornelis Storm. Pour $r_0 \rightarrow 0$, l'énergie tend vers une valeur finie et la contribution de la tension de ligne devient nulle : l'énergie due à la courbure devient égale à l'énergie totale. Ceci justifie le choix d'un tel intermédiaire pour approximer l'état de transition, bien que l'énergie de l'état de transition soit sûrement sous-évaluée ainsi.

L'énergie reste finie car, lorsque le rayon tend vers 0, le terme élastique devient dominant sur tous les autres. Minimiser l'énergie revient alors à minimiser d'abord la composante élastique et donc à annuler la courbure moyenne : au niveau de l'interface, pour des tubes très pincés, les deux rayons de courbure se compensent exactement : $r(0)$ dans la direction perpendiculaire à l'axe z et $-r(0)$ dans la direction de l'axe de symétrie.

La méthode consistant à faire tendre le rayon de l'interface vers 0 est délicate : il s'agit d'un point divergent. Cette énergie peut être trouvée en considérant le tube juste après la rupture. Nous avons alors deux tubes séparés mais pas encore rétractés. En supposant qu'une force s'exerce sur ces tubes pour les maintenir à l'équilibre mécanique, nous pouvons calculer leur forme. Cette force joue un rôle identique à celui de l'interface de rayon tendant vers 0 : elle assure l'équilibre mécanique tout en s'exerçant sur l'axe. Numériquement, il est facile de calculer l'énergie d'une des extrémités puis d'en déduire l'énergie des deux.

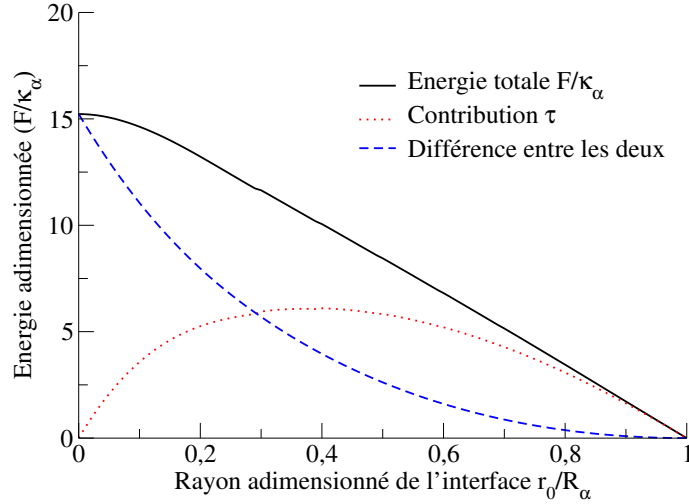


Figure III.15: Energies adimensionnées d'un tube bi-phasique en fonction du rayon adimensionné de l'interface r_0/R_α . La courbe continue est l'énergie totale du tube F/κ_α , la courbe pointillée est la contribution de la tension de ligne et la courbure en tirets l'écart entre les deux. Les deux domaines sont équivalents ($\delta\tilde{\kappa} = 0$ et $\Delta\tilde{\kappa}_G = 0$) et soumis à une tension de ligne $\tilde{\tau}$. La valeur de $\tilde{\tau}$ augmente lorsque le rayon r_0/R_α diminue. Les formes de différentes solutions sont représentées dans la figure 3b de l'article III.6. Les valeurs numériques ont été calculées par Cornelis Storm.

Le principe de la résolution est le même que celui utilisé pour le tube connecté : on part des deux extrémités du tube où la forme de la membrane est approximée par des fonctions analytiques ; on ajuste les constantes inconnues de ces fonctions pour que la forme du tube soit continue en un point intermédiaire. La forme obtenue est présentée sur la figure III.16. L'énergie de flambage associée à une des extrémités est $8,12\kappa$. Notons que l'énergie du tube rompu, même à l'équilibre, doit prendre en compte en plus la contribution de Gauss due au changement de topologie : $-4\pi\kappa_G$.

Nous pouvons donc évaluer la barrière d'énergie pour n'importe quelle valeur des paramètres physiques. Ainsi, pour la forme 'réaliste', nous trouvons une barrière de $7,8k_B T$ soit $3,2 \cdot 10^{-20} \text{ J}$. Notons qu'il s'agit d'un processus associé à un effet dynamique. La stabilité thermodynamique est obtenue en comparant plutôt l'état connecté à l'état rompu. En supposant que la force puisse s'exercer pratiquement en tout point (ce qui est le cas pour une membrane ancrée par des moteurs moléculaires), ceci conduit à une valeur limite du module de Gauss pour la stabilité du tube homogène : $\kappa_G = -1,29\kappa$.

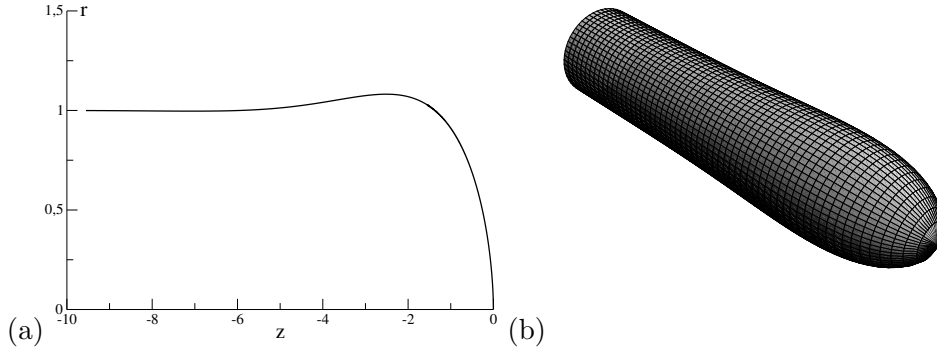


Figure III.16: Forme d'une extrémité de tube. (a) Rayon en fonction de la position sur l'axe de symétrie (z). La forme du tube a été calculée avec $R = 1$ à l'infini et $\kappa = 1$. Les autres paramètres sont déduits par les conditions d'équilibre III.3. (b) Représentation en volume du profil calculé.

III.3.f Temps de fission

La rupture du tube nécessite de franchir la barrière d'énergie : c'est un processus activé. Ce type de processus se retrouve dans les réactions chimiques mais aussi lors de la rupture spontanée d'un cristal courbé [117] : c'est l'énergie nécessaire pour initier la fracture qui détermine la dynamique de rupture. Ce type de comportement est bien décrit par une loi d'Arrhénius, le temps de rupture étant alors donné par :

$$t_{fission} = t_0 \exp \left[\frac{\Delta E}{k_B T} \right], \quad (\text{III.16})$$

où t_0 est un temps caractéristique du processus de rupture et ΔE l'amplitude de la barrière d'énergie à franchir. Notons que dans notre cas, comme dans le cas du cristal, le processus est à priori irréversible. En effet, une fois les deux parties séparées, elles vont s'éloigner spatialement et ne plus pouvoir se rencontrer, ce qui supprime la possibilité d'un processus inverse.

Le temps caractéristique n'est pas donné par notre modèle : nous ne considérons que des objets statiques. Toutefois, connaître son ordre de grandeur est suffisant : le temps varie exponentiellement avec la barrière d'énergie, donc une petite erreur sur l'énergie a des conséquences beaucoup plus importantes, qu'une erreur sur le temps caractéristique.

Nous avons utilisé un argument qualitatif pour construire ce temps caractéristique. Le mécanisme de rupture du tube demande de pincer la membrane, ce qui nécessite de chasser l'eau à l'intérieur du tube. Nous supposons donc que la dynamique de rupture est dominée par le mouvement de l'eau, caractérisée par sa viscosité η . L'énergie caractéristique pour courber la membrane est son module de flambage κ et l'échelle typique de longueur est le rayon à l'infini du tube R . Un argument dimensionnel conduit alors au

temps caractéristique :

$$t_0 = \frac{\eta R_\alpha^3}{\kappa_\alpha}. \quad (\text{III.17})$$

Avec nos valeurs des constantes physiques, il vient $t_0 = 1,44 \cdot 10^{-4}$ s. Le temps hydrodynamique t_0 est très petit devant les temps typiques de fission (environ 1s). Ceci va aussi dans le sens d'un processus activé : les temps associés aux phénomènes dynamiques sont très petits devant les temps de fission. Notons que ce n'est pas la seule expression possible du temps caractéristique : au lieu d'utiliser la phase α comme référence, nous pourrions utiliser l'autre phase ou la moyenne des deux voire autre chose de plus complexe. Quelque soit l'expression choisie, l'ordre de grandeur va rester le même.

Notre évaluation de la barrière d'énergie pour des valeurs 'réalistes' des paramètres conduit à un temps de rupture de 350ms. Ce temps doit être comparé à des temps compris entre 1 et 10 secondes : c'est une bonne évaluation de l'ordre de grandeur. Compte tenu des nombreuses approximations, c'est un résultat très correct, bien qu'il ne permette pas d'affirmer que le modèle soit le bon. Pour continuer de valider cette approche, nous devons comparer nos résultats à un plus grand nombre de données expérimentales.

III.3.g Evolution du temps de fission avec la tension du tube

Des données expérimentales postérieures à la publication de ces travaux montrent que le temps de fission du tube diminue lorsque la tension de surface augmente (voir figure III.17) [118]. Notons qu'il existe des processus de fission quasi-instantanés. Ceci n'est pas incompatible avec un scénario de fission par un processus activé : il s'agit de fissions induites par la présence de défauts. La présence de deux temps caractéristiques, un rapide dû aux défauts et un lent pour le processus activé, se retrouve de manière générale dans les processus activés [117].

Dans notre modèle, la tension de surface du tube n'intervient pas explicitement mais elle est contenue de manière implicite dans l'échelle de longueur R_α à travers la relation $R_\alpha = \sqrt{\kappa_\alpha/2\sigma_\alpha}$ (équation III.3a). Parmi les trois paramètres adimensionnés contrôlant la forme du tube ($\tilde{\kappa}$, $\Delta\tilde{\kappa}_G$ et $\tilde{\tau}$), seule la tension de ligne $\tilde{\tau}$ dépend du rayon et donc de la tension de surface pour son adimensionnement : $\tilde{\tau} = \tau R_\alpha/\kappa_\alpha = \tau/\sqrt{2\kappa_\alpha\sigma_\alpha}$. Ceci entraîne que la forme du tube connecté change quand la tension de surface varie, à travers la tension de ligne $\tilde{\tau}$; la forme de l'intermédiaire de rupture n'est pas modifiée : elle dépend uniquement des constantes élastiques. Une augmentation de la tension de surface entraîne une diminution du rayon du tube, qui se traduit par une diminution du paramètre de contrôle $\tilde{\tau}$; aussi, lorsque la tension augmente, le tube devient relativement moins pincé. Notons qu'il peut sembler y avoir ici un paradoxe : plus le rayon du tube diminue, plus le pincement diminue ; ceci est dû au fait que l'énergie élastique est indépendante de l'échelle :

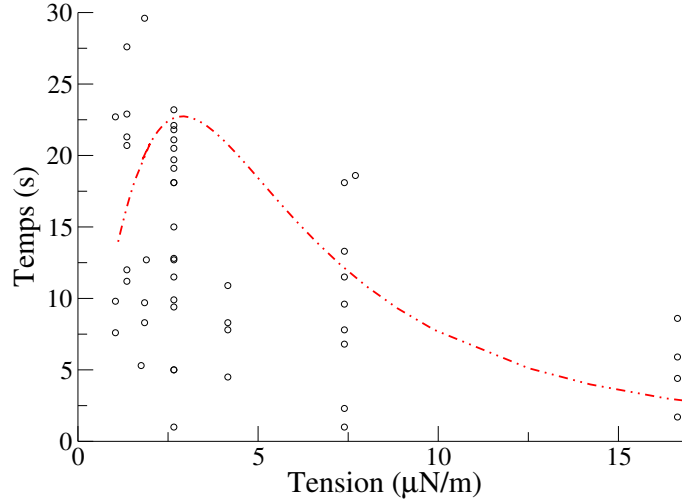


Figure III.17: Temps de fission de tubes bi-phasiques en fonction de la tension de surface de la vésicule mère. Chaque cercle correspond à une mesure. Les données nous ont été fournies par A. Roux (communication personnelle). La courbe pointillée correspond au temps de fission d'une jonction dans un scénario par cassure du tube. Les paramètres physiques de la jonction sont $\kappa_\alpha = 1,6 \cdot 10^{-19} \text{J}$, $\kappa_\beta = 2,9 \cdot 10^{-19} \text{J}$, $\kappa_G = -0,83\kappa$ et $\tau = 3 \cdot 10^{-12} \text{N}$. Les autres paramètres déterminant la fission (le temps caractéristique t_0 et la tension de ligne de nucléation du pore) ont été choisis arbitrairement.

si la contribution de la tension de ligne dans l'énergie diminue, le coût énergétique pour courber le tube reste le même. La barrière d'énergie étant indépendante de l'échelle R_α , elle augmente si le pincement diminue et donc si la tension de surface augmente, ce qui entraîne une augmentation du temps de fission, en désaccord avec les mesures expérimentales. Cette augmentation est beaucoup trop rapide pour être compatible avec les variations mesurées : il s'agit d'une croissance exponentielle.

Aussi, le scénario de rupture par pincement complet ne correspond pas à la situation réelle. Il est probable que le choix de l'intermédiaire de rupture est mauvais ; d'autres scénarii sont imaginables, fournissant d'autres intermédiaires. Ainsi, la fission du tube peut être provoquée par une cassure de la bicouche au niveau du pincement (ou de l'interface), exactement comme deux tuyaux se déboîtent ; il se forme alors deux pores avec l'eau environnante, un dans chaque domaine, qui vont se refermer en deux tubes distincts. Si le coût de formation des pores hydrophobes est important, avec une tension de ligne autour de 10^{-11}N , la bicouche y gagne aussi en supprimant la courbure de Gauss, importante pour un interface fortement pincé, et en réorganisant les lipides. Dans ce scénario, la barrière d'énergie est donnée par l'énergie de nucléation des pores ; elle est donc proportionnelle au rayon ($r(0)$) de l'interface, via une tension de ligne. Une augmentation de la tension de surface entraîne une diminution de la tension de ligne réduite entre les deux domaines et



Figure III.18: Bicouche bi-phasique de forme tubulaire : le domaine noir correspond à la phase liquide-ordonnée et le domaine gris à la phase liquide-désordonnée. La répartition périodique des domaines apparaît spontanément lors de la formation des domaines (par abaissement de la température). Le rayon de la structure tubulaire est de l'ordre du micromètre. Image mise en niveau de gris à partir de [83]. Barre : $0,5\mu m$.

donc une augmentation du rayon adimensionné à l'interface ($r(0)/R_\alpha$). Toutefois, le rayon $r(0)$ peut quand même diminuer car le rayon du tube à l'infini (R_α) diminue quand la tension de surface augmente : ceci se produit pour des tensions de surface suffisamment grandes. Nous avons fait une évaluation du temps de fission basée sur ce mécanisme en fonction de la tension de surface : nous obtenons un comportement qui évolue correctement (voir figure III.17), avec la réserve que les valeurs numériques autres que le rayon du pore ont été fixées arbitrairement. Compte tenu de la dispersion importante des mesures, d'autres courbes sont possibles pour interpréter ces points. Le problème du scénario de rupture des tubes est donc un problème encore ouvert.

III.4 Effets de taille finie

Notre démarche concerne la rupture de tubes de membrane, dans la limite où les domaines sont très allongés par rapport au rayon du tube et répartis aléatoirement sur le tube. Nous supposons alors que les différents interfaces présents sur un tube n'ont pas d'influence les uns sur les autres. Toutefois, ces hypothèses ne sont pas forcément vérifiées. Ainsi, la figure III.18 montre un tube bi-phasique de grand rayon (donc à priori stable) pour lequel les domaines semblent avoir des longueurs comparables aux rayons et dont la répartition pourrait être périodique.

L'étude des effets de taille finie peut nous apporter des informations sur l'interaction entre les interfaces des domaines sur un tube. Elle est aussi une étape nécessaire pour aborder l'étude de structures périodiques. Nous donnons ici uniquement le principe de la démarche que nous sommes en train de développer avec Alberto Sicilia.

Tubes bi-phasiques à trois domaines

Le tube est formé de deux phases (α et β) réparties en $\alpha\beta\alpha$, les deux phases α étant semi-infinies. Le système est symétrique par rapport au milieu de la phase β , ce qui permet des simplifications importantes. L'énergie du système est toujours donnée par (III.4) avec une différence importante sur le terme σ_β : le domaine β n'est plus connecté à un réservoir de lipides et donc sa surface est constante. Aussi, le terme de tension de surface disparaît et doit être remplacé par une contrainte de surface ; la fonctionnelle à minimiser est formellement la même mais σ_β est maintenant un multiplicateur de Lagrange assurant cette contrainte. Une conséquence potentiellement importante est que le terme de surface n'intervient plus dans le calcul de l'énergie.

La résolution du système est simplifiée par les symétries : elles donnent $\psi = \pi/2$ et $\psi'' = 0$ au milieu de la phase β . Il y a encore 6 inconnues : les deux paramètres de la solution linéaire dans la phase α , r , ψ' et σ_β au milieu de la phase β ainsi que l'abscisse curviligne de l'interface s_1 . Une des inconnues est donnée par la condition sur l'hamiltonien ($\mathcal{H} = 0$) au milieu de la phase β . Les autres sont données par les 5 conditions aux limites connues : deux conditions à chaque extrémité ainsi que la surface de la phase β . Le système est alors bien défini et nous devrions pouvoir le résoudre analytiquement ou numériquement.

Tubes périodiques

Le tube est formé d'une alternance infinie de phases ($\dots\alpha\beta\alpha\beta\dots$). Si on considère deux domaines voisins, le système est symétrique par rapport au milieu de chaque domaine. La périodicité nous permet de résoudre le système uniquement entre les milieux de deux domaines voisins. L'énergie du système est toujours (III.4) mais avec les σ_i remplacés par des multiplicateurs de Lagrange assurant la conservation de la surface.

La résolution du système est, ici encore, simplifiée par les symétries, avec l'avantage de ne plus avoir de point à l'infini. Aux deux bords, nous avons deux variables imposées par les symétries : $\psi = \pi/2$ et $\psi'' = 0$. Il reste 8 inconnues : r , ψ' et σ à chacun des bords ainsi que les abscisses curvilignes des deux bords (s_α et s_β). Deux des inconnues sont données par les conditions sur l'hamiltonien $\mathcal{H}$ au milieu de chaque phase ; les 6 autres sont données par les conditions aux limites connues : deux au milieu de chaque phase ainsi que les surfaces des deux phases. Ici encore, le système est bien défini et doit pouvoir être résolu analytiquement ou numériquement.

III.5 Résumé

Les tubes de membrane de petits rayons ne supportent pas la présence de plusieurs phases et se rompent préférentiellement à la jonction entre les différents domaines. L'étude d'une jonction unique montre qu'il existe une forme d'équilibre satisfaisant les équations de forme du tube. La forme de la jonction est alors déterminée complètement par trois paramètres : le rapport des modules de flambage, la différence des modules de Gauss ainsi que la tension de ligne de l'interface. L'équilibre mécanique impose que le rapport des modules de flambage soit égal au rapport des rayons des domaines loin de la jonction ; des domaines de rayon différents, donc de modules de flambage différents, sont fortement courbés près de l'interface. La différence de module de Gauss tend à imposer un plissement de la membrane au niveau de l'interface, alors que la tension de ligne favorise le pincement de l'interface. L'apparition de courbures dues à une différence de paramètre physique tend à favoriser la rupture du système.

Pour modéliser la rupture du tube, nous supposons qu'elle se fait par un pincement. Le temps de rupture est alors piloté par l'écart entre l'énergie de la forme d'équilibre et celle d'un état de transition, que nous avons approximé par l'énergie élastique d'un tube complètement pincé. Ce modèle de processus activé n'est pas le seul possible mais fournit des résultats en bon accord avec les données expérimentales. Toutefois, il faudrait d'autres comparaisons pour valider complètement le modèle et éventuellement l'améliorer.

Nous avons pour l'instant travaillé sur une jonction unique. Il est aussi possible de s'intéresser à l'interaction entre plusieurs jonctions, soit due à la taille finie d'un domaine soit due à une répartition ordonnée des domaines.

III.6 Article "Fission of a Multiphase Membrane Tube"

Fission of a Multiphase Membrane Tube

J.-M. Allain,^{1,*} C. Storm,² A. Roux,² M. Ben Amar,¹ and J.-F. Joanny²

¹*Laboratoire de Physique Statistique, Ecole Normale Supérieure, 24 rue Lhomond, 75231 Paris Cedex 05, France*

²*Physicochimie Curie, Institut Curie Section recherche, 26 rue d'Ulm 75248 Paris Cedex 05, France*

(Received 16 April 2004; published 8 October 2004)

A common mechanism for intracellular transport is the use of controlled deformations of the membrane to create spherical or tubular buds. While the basic physical properties of homogeneous membranes are relatively well known, the effects of inhomogeneities within membranes are very much an active field of study. Membrane domains enriched in certain lipids, in particular, are attracting much attention, and in this Letter we investigate the effect of such domains on the shape and fate of membrane tubes. Recent experiments have demonstrated that forced lipid phase separation can trigger tube fission, and we demonstrate how this can be understood purely from the difference in elastic constants between the domains. Moreover, the proposed model predicts time scales for fission that agree well with experimental findings.

DOI: 10.1103/PhysRevLett.93.158104

PACS numbers: 87.16.Dg, 02.40.-k, 68.03.Cd, 87.16.Ac

Internal organization is one of the most intriguing aspects of the cell. Living cells have to actively maintain gradients of all sorts. Compartmentalization and trafficking aid it in doing so, and both processes extensively use membranes. Not only are the various organelles in eukaryotic cells surrounded by membranes, but the basic intermediates in the intracellular transport pathways as well are membrane structures such as tubes and vesicles [1]. The generation and properties of these structures have been extensively studied, and much is already known about their biology, biochemistry [2], and biophysics [3,4]. The emerging view is that the shape of the bilayer membrane *in vivo* is controlled not only by embedded and associated proteins [5] but also to a large extent by the mechanical properties of the bilayer itself [3,6]. For tubular structures, in particular, mechanical effects play a major role: recent biomimetic experiments [4] have shown that kinesin motors walking on microtubules can exert pulling forces on the membrane and prompt the formation of membrane tubes that resemble tubules identified in living cells.

The existence of small membrane domains with a lipid composition that is markedly different from that of the rest of the membrane (sometimes referred to as “rafts,” although considerable debate remains as to their precise interpretation) appears to be another key element of intracellular vesicular traffic [7] and also seems to be implicated in a multitude of cellular processes [8]. The heterogeneity in membrane composition can be attributed to a phase transition leading to a local segregation between the various lipids constituting the membrane [9]. Sphingolipid domains, in particular, have been shown to be more structured than a classical liquid membrane due to specific interactions between their constituents [1]. Under appropriate conditions they tend to aggregate into so-called *liquid-ordered* domains which are mechanically stiffer than the rest of the bilayer. Recently, an

experimental model system of vesicles including “raft-like domains” has been developed [10]; it provides an elegant and efficient tool to study their properties in a more controlled way than *in vivo*. This procedure allows for systematic studies of the effects of membrane composition [11], temperature changes [9], and protein absorption on the domain [12].

The physics of membrane tube formation from homogeneous vesicles has been studied both theoretically [13,14] and experimentally [15]. Recent experiments involving one of us [16] study the interplay between lipid domains and the behavior of tubes, by pulling tubes from model membranes. Figure 1 illustrates one of the surprising conclusions of these experiments—a sequence of snapshots taken at regular intervals (1 s between two pictures) shows an initially homogeneous tube that first undergoes phase separation (triggered experimentally by photoinduced oxidation of cholesterol), and, after about 1 s, ruptures precisely at the phase boundary and disconnects. The two lipid phases are easily distinguished, once separation has occurred, by the use of a fluorescent

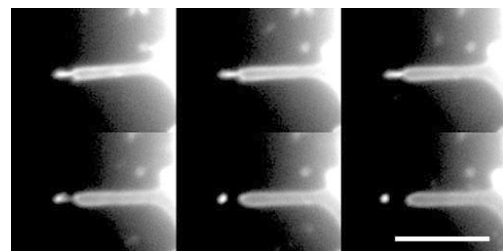


FIG. 1. Breakage of a heterogeneous membrane tube [16]. The brighter (and thinner) section initially on the tip is a liquid-disordered DOPC domain. Fission events occur at the sites of formation of small domains resulting from phase separation. The time between two consecutive pictures is 1 s. Scale bar, 10 μm .

marker that preferentially sits in the liquid-disordered domains. Furthermore, the same experiments show that fission events such as these happen *only* in the phase separated tubes—tubes in which the lipids are mixed are essentially stable indefinitely.

Statement of problem and summary.—In this Letter, we address the dramatic loss of stability following phase separation from a mechanical point of view. We extend the theoretical models developed for homogeneous tubes [14] to study the junction between two distinct phases, each of which far away from the junction has a tubular shape. Experiments suggest that phase separation occurs on a much faster time scale than fission and that the nucleation of the two phases leads to the formation of cylindrical domains between a more rigid and a less rigid phase. Therefore, we do not model the dynamic of the phase separation process [17]. The tube radii and the junction length are generally small compared to the length of each phase domain. In order to minimize the interfacial energy between adjacent domains, the interface rapidly becomes a circle perpendicular to the tube direction. The coarsening stage of the phase separation process proceeds very slowly to eventually form two homogeneous phases in equilibrium, but this slow relaxation is always preempted by tube fission.

We assume here that the tube and junctions are axisymmetric with respect to the direction along which the tube is pulled (the z axis). We consider one junction between two semi-infinite tubes, each consisting exclusively of one of the phases. Finite-size effects associated with the limited size of individual domains, while possibly relevant, fall outside the scope of the present Letter. The small radius of the tubes (about 40 nm) does not allow for a quantitative determination of the shape of the junctions [16], and for this reason we restrict ourselves to a minimal model which emphasizes the roles of the most relevant physical parameters. We show that tube fission can be driven either by the line tension or by the jump of the elastic coefficients at the interface between the two phases, and we compare the two processes, both of which undoubtedly contribute in the experiments.

Model.—We use an elastic membrane free energy, as introduced by Canham and Helfrich [18], and numerically determine equilibrium junction shapes. Figure 2 gives a schematic representation of the tube and the coordinate system used in the following. Our axisymmet-

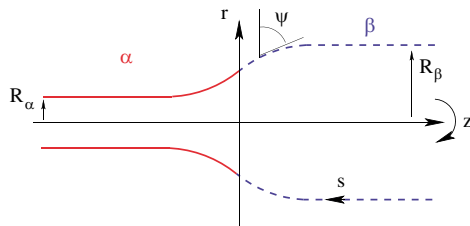


FIG. 2 (color online). Schematic representation of the junction.

ric surface is parametrized by the arc length s along the contour and described by the local tube radius $r(s)$ and the angle $\psi(s)$. They are related by the geometric relations $\dot{r} = \cos\psi$ (dots denote derivatives with respect to s). The interface is located at $z = s = 0$.

The free energy of the system is obtained by extending the description of tubular membranes [14] to the specific case of a biphasic tube [19,20] as follows:

$$\mathcal{F} = \sum_{i=\alpha,\beta} \int_{\Omega_i} \left[2\kappa_i H^2 + \kappa_G^{(i)} K + \sigma_i \right] dS + \oint_{\partial\Omega} \tau d\ell - \int f dz. \quad (1)$$

The two phases are denoted by α and β , and for each phase i the free energy is integrated over its membrane area Ω_i . The κ_i and $\kappa_G^{(i)}$ are the bending and Gaussian rigidities of the respective phases. This free energy includes the bending energy to lowest order in the principal curvatures, where H is the mean curvature and K the Gaussian curvature. The two layers of the membrane are assumed to be symmetric; both phases contain cholesterol molecules which have a high flip-flop rate. Any stress due to area differences between the leaflets or to an asymmetry of the layers is thus quickly relaxed. Finally, Lagrange multipliers σ_i are introduced to ensure a constant surface in each phase. These σ_i are interpreted as surface tensions. We take our tube to be infinite and assume the presence of a lipid reservoir. In the experiments, such a reservoir is provided by the large mother vesicles from which the tubes are drawn. Provided the area per lipid remains constant during the process, this implies a constant surface tension in each of the phases.

The interface between the two phases is described by a jump in the values of the bending rigidities κ_i and $\kappa_G^{(i)}$ and in the surface tension σ_i , and by a positive line tension τ at the interface $\partial\Omega$. The last term in the free energy is the work performed by the external force f needed to pull the tube. We neglect the small effect of pressure [13].

The variational derivation of the shape equations of the surface has been detailed elsewhere [21] and yields

$$\ddot{\psi} = -\frac{\dot{\psi}^3}{2} - \frac{2\cos\psi}{r} \dot{\psi} + \frac{3\sin\psi}{2r} \dot{\psi}^2 + \frac{3\cos^2\psi - 1}{2r^2} \dot{\psi} - \frac{\cos^2\psi + 1}{2r^3} \sin\psi + \frac{\sigma}{\kappa} \dot{\psi} + \frac{\sigma}{\kappa} \frac{\sin\psi}{r}. \quad (2)$$

Far away from the junction, we recover homogeneous cylindrical tubes with $\psi = \pi/2$ and $R_i = (\kappa_i/2\sigma_i)^{1/2}$. Mechanical equilibrium implies that the forces at both extremities are equal and that $f = 2\pi(2\sigma_i\kappa_i)^{1/2}$, which imposes that $\sigma_\alpha/\sigma_\beta = \kappa_\beta/\kappa_\alpha$: the surface tension jumps discontinuously across the interface.

The mismatch between constants such as the bending rigidities appears only in the boundary conditions and strongly affects the interface shape. At the interface

($s = 0$), four boundary conditions must be satisfied. Two conditions are the continuity of the radius $r(s)$ and the angle $\psi(s)$ [19]; two additional conditions stem from the variational procedure and relate the first and the second derivatives of the angle ψ on each side of the interface to the values of r , ψ , κ_α , κ_β , $\Delta\kappa_G = \kappa_G^\beta - \kappa_G^\alpha$, and τ .

Results.—Figure 3 illustrates the different effects that line tension and differences in elastic rigidities individually have on the two-phase tube. The first possible discontinuity at the junction is a jump in bending rigidities [Fig. 3(a)]. The ratio of the bending rigidities in the two phases $\kappa = \kappa_\beta/\kappa_\alpha$ fixes the ratio of the radii away from the junction and of the surface tensions in the two phases. Without line tension and jump in Gaussian rigidity, the radius decreases smoothly from the values of the more rigid phase to the value in the less rigid phase, but with a remarkable structural feature—a small plateau (i.e., a membrane region with a horizontal tangent) occurs around the junction. This plateau is also given by an analytical linear calculation [22].

When line tension dominates [Fig. 3(b)], the radius at the interface decreases with increasing line tension. It vanishes for a huge line tension. Note that our description breaks down at scales comparable to the bilayer width. Despite the fact that the radius goes to zero, the mean curvature remains finite; in the highly pinched limit, a saddle point develops at the neck which keeps the total curvature energy finite.

When the discontinuity in Gaussian rigidities dominates [Fig. 3(c)], numerical evidence suggests that the neck radius does not decrease all the way down to zero. Moreover, stability arguments given below impose a bound on the maximum absolute value of $\Delta\kappa_G$. However, the presence of the neck favors the breaking process. In this case, fission does not occur exactly at the interface but at the neck. One thus expects to find, after fission, a small patch of one phase still attached to the other phase. Since details at the length scale of the neck itself cannot

be resolved experimentally, this effect might be relevant to determine the dominant fission mechanism.

Discussion.—For general experimental conditions, all three effects are superimposed at the junction. A quantitative analysis of the shape in order to extract the various parameters is then difficult, especially as little to nothing is experimentally known about the precise shape of the junction. Typical values of the bending rigidity of liquid bilayers are around $25k_B T$, and the rigidity of the liquid-ordered phases can be up to several times higher. Recently, the bending modulus of a heterogeneous vesicle has been obtained by comparing the experimental shape to numerical solutions of the shape equations [23]. The Gaussian rigidity $\kappa_G^{(i)}$ is notoriously difficult to measure experimentally, but a recent study cites values of $\kappa_G^{(i)} = -0.83\kappa_i$ [24]. Stability arguments impose that $-2\kappa_i < \kappa_G^{(i)} < 0$.

The equilibrium free energy of the tube can be calculated from Eq. (1) and allows for a discussion of the stability of the tube and of its fission. We show in Fig. 4 the free energy of a tube as a function of the dimensionless radius at the neck r_{neck}/R_0 in the specific case of $\kappa_\alpha = \kappa_\beta$ and $\kappa_G^\alpha = \kappa_G^\beta$. This energy is maximal for a vanishing radius: at this point, the membrane is maximally bent. Fission of the tube by pinching requires one to cross this energy barrier. The free energy of the ruptured tube is also shown on the figure. It is lower than the top of the barrier by the contribution of the Gaussian curvature due to the change in topology upon rupture, which equals $4\pi\kappa_G$. Notice that the bending energy does *not* change upon rupture: at vanishing radii, the neck is a saddle point with vanishing mean curvature [22]. The ruptured tube corresponds to a transient shape since, in the absence of an applied force, the tubes retract to form two spheres. In the absence of line tension the tube is uniform $r(z) = R_0$ and its energy is zero, and a homogenous tube is thus thermodynamically stable only if the free energy of the

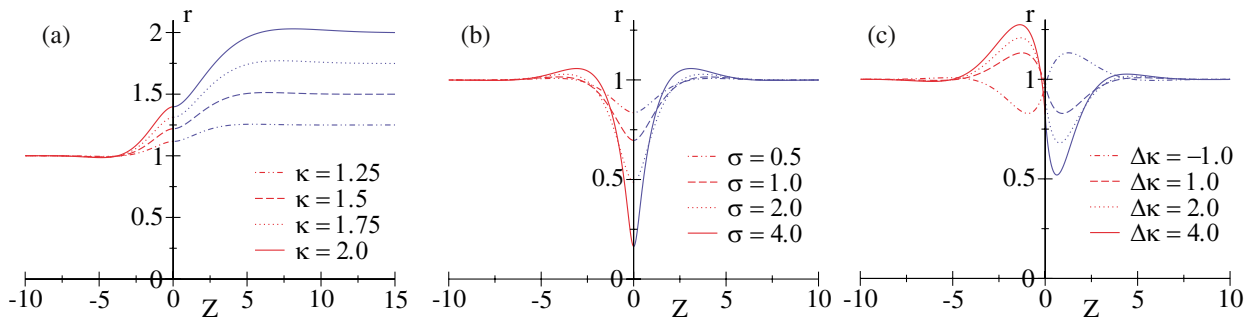


FIG. 3 (color online). Numerical shapes of the junction for various line tensions and differences of elastic rigidities in dimensionless units. The length scale is the radius of phase α ($R_\alpha = 1$); the energy scale is the bending rigidity of phase α so that $\kappa_\alpha = 1$. (a) Shapes for various ratios of bending rigidities. The line tension vanishes ($\tau = 0$) and the Gaussian rigidities are equal ($\Delta\kappa_G = 0$). The values of $\kappa_\beta/\kappa_\alpha$ are 1.25, 1.5, 1.75, and 2.0. (b) Shapes for various line tensions. The elastic rigidities are equal: $\Delta\kappa_G = 0$ and $\kappa_\alpha = \kappa_\beta$. The values of the line tension are $\tau = 0.5, 1.0, 1.5$, and 2.0 . (c) Shapes for various differences in Gaussian rigidity. The line tension vanishes ($\tau = 0$) and the bending rigidities are equal ($\kappa_\alpha = \kappa_\beta$). The values of the difference in Gaussian rigidity are $\Delta\kappa_G = \kappa_G^\beta - \kappa_G^\alpha = -1.0, 1.0, 2.0$, and 4.0 .

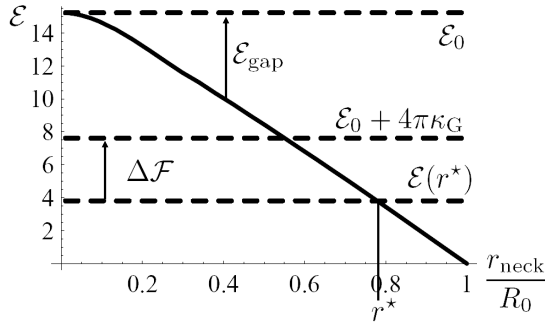


FIG. 4. Schematic energetics of fission. The solid curve plots the free energy of a tube pinched by line tension as a function of the dimensionless neck radius. Every equilibrium radius r^* has a corresponding energy $\mathcal{E}(r^*) = \mathcal{E}_{\text{bend}} + \mathcal{E}_\tau$ which defines in turn an energy barrier for fission $\mathcal{E}_{\text{gap}}$ and a free energy gain upon fission $\Delta\mathcal{F}$. For clarity, this figure assumes identical elastic rigidities on both sides.

ruptured tube is positive. Numerically, we have determined this stability limit as $\kappa_G > -1.29\kappa$.

The values of the parameters then fix the value of r_{neck}/R_0 . We have also evaluated the energy barrier against fission by pinching from this macroscopic model. Note, however, that this is only a lower bound to the real energy barrier, as it ignores effects at the molecular length scale which certainly is attained when the neck becomes very thin. To compare our results to the experiments, we have computed the various energies at the following (measured or realistic) parameter values. With bending rigidities $\kappa_\alpha = 40k_B T = 1.6 \times 10^{-19}$ J and $\kappa_\beta = 70k_B T = 2.9 \times 10^{-19}$ J, Gaussian rigidities $\kappa_G^\alpha = -33.2k_B T = -1.38 \times 10^{-19}$ J and $\kappa_G^\beta = -58k_B T = -2.3 \times 10^{-19}$ J, surface tensions 1×10^{-6} N/m in phase α and 5.7×10^{-7} N/m in phase β , and a line tension 7×10^{-12} N, we have determined the height of the energy barrier to be $\mathcal{E}_{\text{gap}} = 7.8k_B T$. If we assume that fission is a thermally activated process [25], the average time until fission t_b occurs is $t_b = t_0 \exp(\mathcal{E}_{\text{gap}}/k_B T)$. Using a hydrodynamic argument, we estimate the basic time scale as $t_0 = \eta R_\alpha^3/\kappa_\alpha$, where η is the viscosity of water. For the parameter values cited above, this yields a time scale $t_0 \approx 1.44 \times 10^{-4}$ s. We thus expect the experimental time until fission to be approximately 350 ms. This is in good agreement with the experimentally observed typical time for fission, which is of order 1 s.

Conclusion.— We have studied the behavior of a multiphase membrane tube using thermodynamic arguments. The shape of the junction between two domains depends on three quantities: the line tension of the interface and the jumps in the two elastic constants. While experimental precision is not yet at a level where these results can be compared directly to our calculated tube shapes, we have

also considered the breaking time of a two-phase tube. Our modeling, based on an energetic approach, predicts a strong dependence of the fission dynamics on the elastic properties of the phases and yields results that are in good agreement with the experimental data.

We would like to thank Patricia Bassereau, Bruno Goud, and Jacques Prost for stimulating discussion and suggestions. C.S. acknowledges support from the European PHYNECS research network.

*Electronic address: jean-marc.allain@lps.ens.fr

- [1] B. Alberts *et al.*, *Molecular Biology of the Cell* (Garland, New York, 1994), , 3rd ed.
- [2] A. Rustom *et al.*, *Science* **303**, 1007 (2004); J. White *et al.*, *J. Cell Biol.* **147**, 743 (1999).
- [3] U. Seifert, *Adv. Phys.* **46**, 13 (1997).
- [4] A. Roux *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**, 5394 (2002).
- [5] N. Sciaky *et al.*, *J. Cell Biol.* **139**, 1137 (1997).
- [6] A. Upadhyaya and M.P. Sheetz, *Biophys. J.* **86**, 2923 (2004).
- [7] W.B. Huttner and J. Zimmerberg, *Curr. Opin. Cell Biol.* **13**, 478 (2001).
- [8] K. Simons and E. Ikonen, *Nature (London)* **387**, 569 (1997).
- [9] S.L. Veatch and S.L. Keller, *Biophys. J.* **85**, 3074 (2003).
- [10] C. Dietrich *et al.*, *Biophys. J.* **80**, 1417 (2001).
- [11] T.-Y. Wang and J.R. Silvius, *Biophys. J.* **79**, 1478 (2000).
- [12] G. Staneva, M.I. Angelova, and K. Koumanov, *Chem. Phys. Lipids* **129**, 53 (2004).
- [13] T.R. Powers, G. Huber, and R.E. Goldstein, *Phys. Rev. E* **65**, 041901 (2002); I. Derenyi, F. Jülicher, and J. Prost, *Phys. Rev. Lett.* **88**, 238101 (2002).
- [14] D.J. Bukman, J.H. Yao, and M. Wortis, *Phys. Rev. E* **54**, 5463 (1996); B. Bozic, V. Heinrich, S. Svetina, and B. Zeks, *Eur. Phys. J. E* **6**, 91 (2001).
- [15] V. Heinrich, B. Bozic, S. Svetina, and B. Zeks, *Biophys. J.* **76**, 2056 (1999).
- [16] A. Roux *et al.* (to be published).
- [17] C.-M. Chen, P.G. Higgs, and F.C. MacKintosh, *Phys. Rev. Lett.* **79**, 1579 (1997).
- [18] P.B. Canham, *J. Theor. Biol.* **26**, 61 (1970); W. Helfrich, *Z. Naturforsch. C* **28**, 693 (1973).
- [19] F. Jülicher and R. Lipowsky, *Phys. Rev. E* **53**, 2670 (1996).
- [20] J.M. Allain and M. Ben Amar, *Physica (Amsterdam)* **337A**, 531 (2004).
- [21] O.-Y. Zhong-can and W. Helfrich, *Phys. Rev. A* **39**, 5280 (1989).
- [22] J.M. Allain *et al.* (to be published).
- [23] T. Baumgart, S.T. Hess, and W.W. Webb, *Nature (London)* **425**, 821 (2003).
- [24] D.P. Siegel and M.M. Kozlov, *Biophys. J.* **87**, 366 (2004).
- [25] Y. Pomeau, *C.R. Acad. Sci., Ser. 2 Mec. Phys.* **314**, 553 (1992).

Chapitre IV

Bourgeonnement et fission de vésicules bi-phasiques

Dans ce chapitre, nous nous intéressons à des instabilités de la forme d'une vésicule à deux domaines tendue, induites par l'absorption de molécules. La forme initiale de chaque domaine est celle d'une calotte sphérique, sauf à proximité de l'interface. Lors de l'absorption de molécules, deux instabilités peuvent se développer, éventuellement simultanément : une instabilité de la forme en calotte sphérique de l'un des domaines et une instabilité d'ensemble avec un rétrécissement de l'interface puis une éjection des deux domaines en deux vésicules distinctes. Nous présentons ici un traitement analytique pour ces deux instabilités.

IV.1 Présentation

Les vésicules sont des objets fascinants par la richesse de formes qu'elles peuvent adopter : en plus de pouvoir être tendues ou fluctuantes (voir figure II.5), elles peuvent être déformées par des sollicitations extérieures (voir figure I.5), comme les changements de température [10, 55, 119] ou l'absorption de molécules [44, 63, 116, 120–123]. Parmi les déformations possibles, l'une des plus spectaculaires est probablement le bourgeonnement ou 'budding' (voir figure IV.1) : une partie de la vésicule se courbe de plus en plus en une calotte sphérique, jusqu'à ce que la vésicule soit formée par deux sphères qui peuvent se séparer ou rester connectées par un pont de lipides.

Nous nous intéressons ici au bourgeonnement dû à l'absorption de molécules sur une vésicule bi-phasique à deux domaines ; des expériences récentes sur des vésicules comportant un domaine liquide-ordonné dans une membrane liquide-désordonnée ont montré que l'ajout de détergents [124] ou de protéines comme la Phospholipase A₂ [125] pouvaient provoquer un soulèvement spécifique du domaine liquide-ordonné, éventuellement suivi

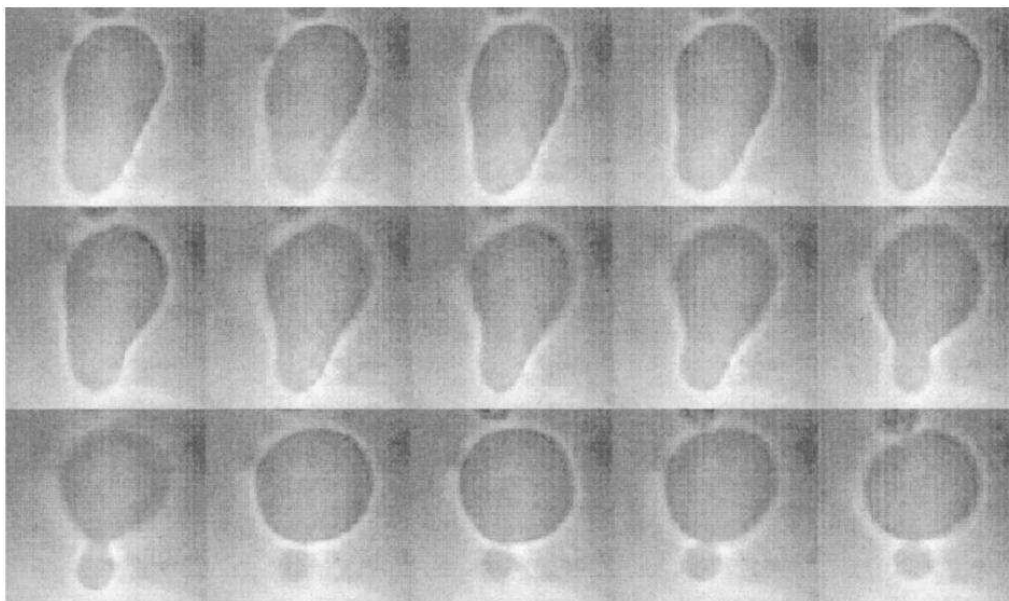


Figure IV.1: Processus de bourgeonnement sur une vésicule initialement en forme de cigare. Le bourgeonnement est provoqué par une augmentation de la température. Le temps entre deux images est de 1,2s. La longueur initiale du grand axe est approximativement $20\mu\text{m}$. Notons que, en dehors de la dernière image, il s'agit d'états hors équilibres et donc instables. Image extraite de [10].

par l'éjection du domaine (voir figure IV.2). Les expériences avec des détergents utilisent des molécules chimiquement passives, aussi nous avons privilégié une description purement mécanique des déformations, les molécules absorbées imposant une courbure locale. Notons que l'utilisation de détergents peut entraîner une solubilisation de la bicouche, qui conduirait à la formation de pores macroscopiques. Les quantités utilisés pour provoquer la fission sont suffisamment faibles pour qu'il soit possible de négliger cet effet dans la suite [126].

Etat de l'art

L'effet de la présence de molécules imposant une courbure à la bicouche a été déjà étudié, que ce soit pour décrire l'absorption de molécules [58, 127] ou le comportement d'un mélange de lipides [128, 129]. Les deux démarches sont formellement très proches, la différence résidant uniquement dans l'hypothèse d'un nombre constant de molécules ou non. La présence d'une molécule n'ayant pas la même forme que les lipides environnants et pouvant se répartir de façon inhomogène sur la surface fournit un degré de liberté supplémentaire favorisant le bourgeonnement. Dans une approche continue, la molécule non cylindrique est décrite par sa concentration, sa forme imposant un couplage entre la

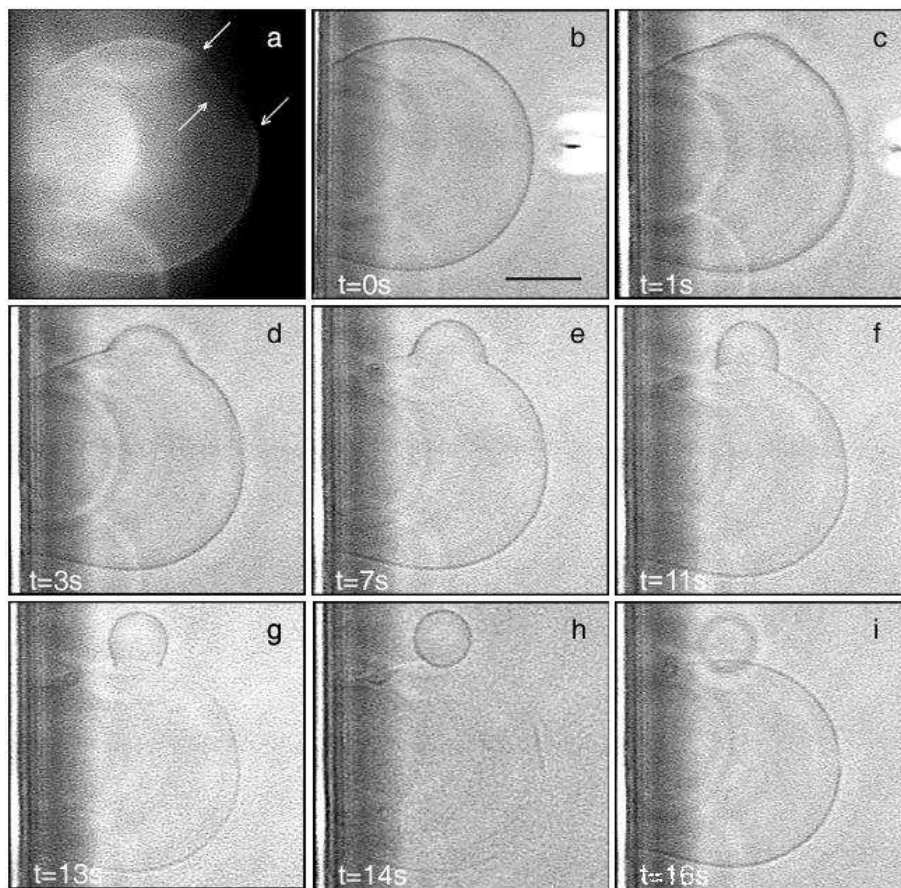


Figure IV.2: Bourgeonnement et fission produit par la Phospholipase A_2 sur une vésicule bi-phasique. La barre représente $20\mu\text{m}$. Image (a) : vue en fluorescence de la vésicule initiale. La phase liquide-désordonnée est marquée par un lipide fluorescent spécifique : le domaine liquide-ordonné apparaît comme un cercle noir. Image (b) : injection de la Phospholipase A_2 à proximité de la vésicule par une micro-pipette (visible à droite). Images (c-g) : bourgeonnement d'une calotte sphérique au niveau de la phase liquide-ordonnée. Images (h et i) : l'état final est formé de deux vésicules séparées spatialement. Image extraite de [125].

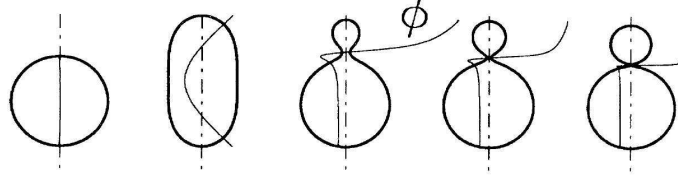


Figure IV.3: Evolution d'une vésicule formée d'un mélange de lipides lorsque le volume enfermé décroît. La courbe fine montre la concentration ϕ dans une molécule courbée présente dans la bicouche. Les volumes réduits sont respectivement $v = 1, 0,89, 0,89, 0,86$ et $0,82$ de gauche à droite. A $v = 0,89$, les deux solutions ont la même énergie, indiquant une transition discontinue. Image extraite de [128].

courbure et la concentration (voir section II.5). Lorsque la vésicule n'est pas sphérique, ce couplage va concentrer les molécules non cylindriques dans les zones avec une courbure favorable ; ainsi, des molécules coniques, avec la pointe du cône du côté hydrophobe, vont préférer se concentrer au pôle d'une vésicule en forme de cigare. Toutefois, lorsque le couplage devient suffisant, il va se produire une transition vers une forme plus bourgeonnée, proche de deux sphères [66,128] (voir figure IV.3). Notons que cette transformation nécessite une vésicule non sphérique, ce qui suppose que la vésicule n'est pas tendue. A notre connaissance, ces études ont toujours porté sur des vésicules homogènes.

Dans le cas d'une vésicule présentant deux domaines distincts, il existe une tension de ligne à l'interface qui, en tendant à réduire la longueur de l'interface, favorise le bourgeonnement [81]. Le problème du bourgeonnement d'une vésicule bi-phasique a été principalement étudié par F. Jülicher et R. Lipowsky [81,130,131]. Ils se sont essentiellement intéressés au rôle de la taille du domaine sur le bourgeonnement et la fission.

Ils ont considéré le cas où le volume est libre de varier, avec une différence de pression osmotique nulle. La forme de la vésicule est alors contrôlée par la longueur d'invagination $\zeta = \kappa/\sigma$ qui décrit la compétition entre la tension de ligne et le flambage : lorsque la taille du domaine est grande devant cette longueur, la tension de ligne est suffisante pour provoquer le soulèvement du domaine. Pour une valeur critique du flambage, la vésicule subit une transition de bourgeonnement du premier ordre ; si la taille du domaine augmente encore, le système peut aller jusqu'à la fission complète (voir figure IV.4).

Ils ont aussi considéré le cas où le volume de la vésicule est fixe. La surface étant fixe aussi, seuls les petits domaines vont avoir un réservoir de surface suffisant pour fissionner, la taille limite dépendant du rapport d'aspect de la vésicule ; ainsi, plus la vésicule est proche de la sphère, plus le bourgeonnement va se limiter aux petits domaines. Notons que la transition de bourgeonnement est continue, sauf pour des très petits domaines. Ici encore, la vésicule initiale n'étant pas sphérique, cela suppose que la vésicule est détendue.

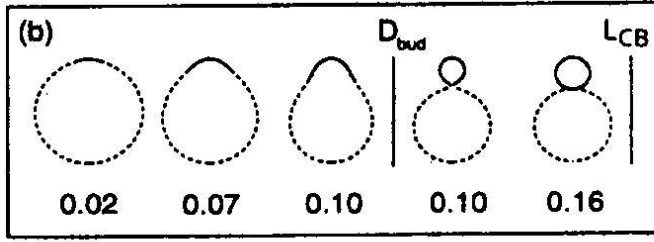


Figure IV.4: Différentes formes d'une vésicule détendue à deux domaines suivant la taille du domaine supérieur. La surface de la vésicule est constante et définit l'échelle de longueur R_0 . Le rapport $\sigma R_0/\kappa$ vaut ici 7 et le volume est libre de changer ($P = 0$). Lorsque la taille du domaine augmente, il se produit une transition discontinue conduisant à la formation de deux sphères. La forme avec un bourgeonnement partiel devient métastable à D_{bud} et instable à L_{CB} . Image extraite de [131].

Toutefois, F. Jülicher et R. Lipowsky se sont aussi intéressés au bourgeonnement induit par une diminution de volume induit par un changement de pression osmotique. Dans ce cas, la vésicule est initialement proche de la sphère et il apparaît un bourgeonnement continu jusqu'à la fission lorsque le volume diminue, à la condition que la tension de ligne soit suffisamment grande (voir figure IV.5). Notons que ces calculs prédisent une éjection préférentielle des grands domaines par rapport aux petits : l'effet de la tension de ligne σ augmente avec le périmètre du domaine alors que le module de flambage κ n'est pas affecté par la taille.

Les approches précédentes utilisent toutes une approche continue pour décrire la forme de la vésicule. Le développement des calculateurs a permis une approche alternative basée sur des simulations de dynamique moléculaire pour étudier le devenir d'un mélange de lipides. Il est alors possible de coupler les molécules à la courbure de la vésicule, comme dans le cas d'un mélange initialement homogène ou de provoquer une agrégation des molécules à l'aide d'une interaction préférentielle. Ces approches reconduisent à des résultats similaires à ceux obtenus avec les approches continues mais en ne se limitant pas au cas axisymétrique, ce qui peut permettre l'apparition de nouvelles formes [132–134] ou la détermination de mécanisme de fission [135].

Positionnement de nos travaux

Nous avons modélisé différentes expériences concernant l'absorption de molécules sur une vésicule bi-phasique. Dans ces expériences, la séparation de phase a déjà eu lieu ; aussi, nous avons utilisé l'approche continue introduite au chapitre II, pour décrire à la fois le

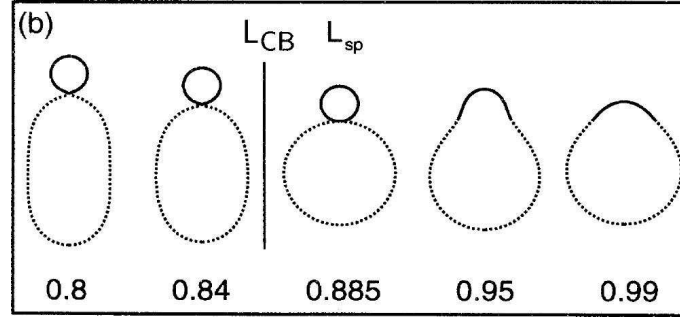


Figure IV.5: Différentes formes d'une vésicule à deux domaines suivant le volume réduit, défini comme le rapport entre le volume réel et le volume de la sphère de même surface. La surface de la vésicule est constante et définit l'échelle de longueur R_0 . Le domaine occupe 10% de la surface et le rapport $\sigma R_0/\kappa$ vaut ici 9. Lorsque le volume réduit devient inférieur à une valeur limite (ici 0,885), la forme est celle de deux sphères connectées et la réduction du volume nécessite de déformer l'une des vésicules filles en une vésicule oblate. Image extraite de [131].

comportement de la vésicule et l'absorption des molécules, ces dernières étant considérées comme des défauts coniques, chimiquement passifs, dans le modèle de S. Leibler.

Dans les expériences modélisées, la vésicule est formée par électro-formation ; elle est alors tendue [136]. Il existe donc une pression osmotique à travers la bicouche qui domine les effets élastiques. Pour une vésicule sphérique de rayon R , le rapport entre l'élasticité de la vésicule et la pression osmotique est donné par la longueur capillaire l_e :

$$l_e = \sqrt{\frac{\kappa}{PR}}, \quad (\text{IV.1})$$

la vésicule ne pouvant se courber élastiquement que à des échelles plus petites que l_e . Dans le cas d'une vésicule tendue, nous avons $l_e \ll R$ et l'élasticité de la vésicule peut être négligée partout sauf lors de points de rebroussement (comme lors de l'adhésion, voir figure II.8).

La tension impose la forme de la vésicule : chaque domaine a une forme de calotte sphérique, sauf à proximité de l'interface. La figure IV.6 montre deux exemples de vésicules tendues : la pression osmotique est de $P = 10^{-2} Pa$ [83], ce conduit à une longueur capillaire de $0,5 \mu m$, très petite devant la taille de la vésicule. La figure montre aussi que l'écart entre les modules élastiques ne contrôle pas la forme globale d'une vésicule tendue ; en effet, les images (a) et (b) sont similaires alors que les phases y sont inversés : le petit domaine est liquide-ordonné pour l'image (a) et liquide-désordonné pour l'image (b).

Nous avons choisi, pour nos calculs, de fixer la pression osmotique plutôt que d'utiliser l'approche usuelle, qui consiste à fixer le volume, à en déduire la forme puis à faire changer le volume fixé pour reproduire le trajet expérimental. Du point de vue des formes obtenues,

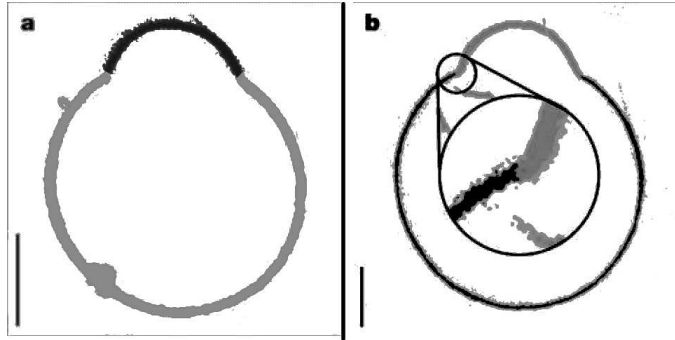


Figure IV.6: Images en microscopie à deux photons montrant des vues équatoriales de vésicules à deux domaines. Le domaine noir est liquide-ordonné, le gris liquide-désordonné. La barre représente 5 μm . Images mises en niveau de gris à partir de [83].

les deux approches doivent conduire aux mêmes solutions. Pour des vésicules détendues, il est adapté de fixer le volume : la pression est faible et une petite variation de pression osmotique a un effet considérable sur le volume de la vésicule car la tension de surface est pratiquement nulle. Pour une vésicule tendue, fixer la pression osmotique est un choix naturel pour décrire des expériences où le volume varie continument.

Les expériences d'absorption de molécules sur une vésicule bi-phasique montrent deux instabilités différentes, pouvant éventuellement se produire en même temps : une instabilité de bourgeonnement et de fission concernant l'ensemble du système (voir figure IV.2) et une instabilité concernant un seul domaine, avec la perte de la forme en calotte sphérique ; cette dernière instabilité se produit principalement pour des concentrations importantes en détergents, des molécules très coniques (voir figure IV.7). Notons que l'instabilité de bourgeonnement est, jusqu'à un certain soulèvement, réversible.

Nous avons commencé par étudier la stabilité de la calotte sphérique seule lors de l'ajout de molécules : c'est l'objet de la publication reproduite dans la section IV.4. Les molécules imposant localement une forme à la bicouche, il apparaît un couplage entre la concentration et la courbure de la vésicule, les caractéristiques du couplage étant contenues dans le paramètre Λ . Nous montrons par une analyse de stabilité linéaire qu'il existe deux comportements différents caractérisés par un nombre sans dimension c . Ce nombre donne le rapport entre le couplage Λ , qui tend à générer de la courbure en concentrant les protéines, et les effets résistants : le coût pour augmenter localement la concentration (α) et l'élasticité de la bicouche (κ). Pour les couplages forts ($c > 1$) et des concentrations suffisantes, l'absorption de molécules déstabilise la forme en calotte sphérique ; dans l'autre régime, pour des couplages faibles ($c < 1$) ou des concentrations suffisamment basses, la calotte sphérique va rester stable. Le comportement de la membrane est caractérisé par un nombre sans dimension c , donnant le rapport entre le couplage, qui tend à générer de

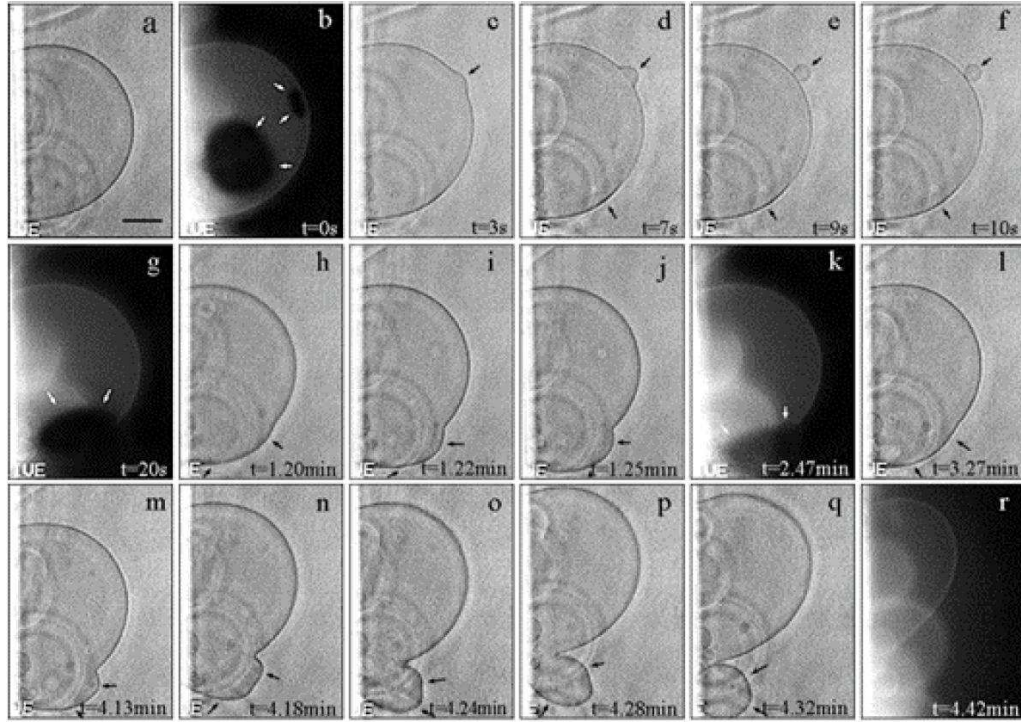


Figure IV.7: Bourgeonnement et fission produit par l'absorption de Lyso-PC sur une vésicule bi-phasique. Les Lyso-PC sont des lipides (PC) dont une des chaînes hydrophobes a été coupée ; ce sont des molécules coniques comme les détergents. L'image (a) montre la vésicule initiale. L'image (b) montre une vue en fluorescence de la vésicule initiale. La phase liquide-désordonnée est marquée par un lipide fluorescent spécifique : les deux domaines liquide-ordonnés apparaissent comme des cercles noirs. Après l'injection de Lyso-PC, le petit domaine se soulève puis est éjecté (images c-g). Il faut injecter plus de Lyso-PC (injections après les images g et l) pour provoquer un soulèvement puis l'éjection du grand domaine. Ce domaine perd sa forme sphérique avant d'être éjecté. La barre représente 20 μm . Image extraite de [124].

la courbure en concentrant les protéines, et les effets résistants : le coût pour augmenter localement la concentration et l'élasticité de la bicouche. Dans la section IV.2, nous présentons l'article sur ce thème ainsi que des résultats supplémentaires éclairant la physique de cette instabilité.

Nous avons ensuite décrit le bourgeonnement et la fission d'une vésicule à deux domaines. Notons qu'il peut y avoir bourgeonnement et fission que les domaines aient ou non une forme de calotte sphérique. Toutefois, nous nous sommes limités au cas d'un couplage faible ($c < 1$) : la forme en calotte sphérique de chaque domaine est alors stable, ce qui simplifie suffisamment le formalisme pour permettre un calcul non-linéaire complet. L'étude de cette instabilité montre une ressemblance entre le bourgeonnement induit par l'absorption de molécules et celui induit par une diminution de la pression osmotique [83]. Dans l'article reproduit dans la section IV.5, nous présentons ce calcul, à la fois pour le bourgeonnement induit par la pression et pour celui induit par l'absorption de molécules. Nous montrons que la forme de la vésicule est contrôlée par le paramètre $\tau = \text{tension de ligne}/\text{pression}$; la fission de la vésicule est alors due à une bifurcation noeud-col : en dessous d'une valeur critique τ_c , il existe deux solutions connectées, une instable et une stable ; au-dessus, il n'existe plus de solution connectée et il y a fission. Dans la vésicule tendue, les effets élastiques sont alors concentrés en un pli au niveau de la jonction ; ils se traduisent par une tension de ligne effective, elle-même fonction de la forme de la vésicule. Lorsque des molécules sont absorbées avec un couplage faible, l'influence des molécules se fait sentir uniquement là où les effets élastiques sont importants, c'est à dire à proximité de l'interface ; ils se traduisent aussi par une tension de ligne effective. Lorsque les molécules sont absorbées sur le feuillet extérieur de la vésicule, cela se traduit par une augmentation de la tension de ligne effective, le système se rapprochant de la bifurcation jusqu'à éventuellement la franchir. La section IV.3 résume l'article sur cette déformation et fournit des résultats supplémentaires.

IV.2 Instabilité due à l'absorption de molécules sur une bicouche en calotte sphérique

Cette section présente la publication reproduite dans la section IV.4, sans la détailler intégralement.

IV.2.a Introduction

Nous considérons ici une vésicule formée de deux domaines sur lesquels viennent s'absorber des protéines. Les protéines sont décrites comme des objets passifs mais forçant une courbure de la membrane [58] ; les protéines peuvent donc être remplacées par des

détergents ou d'autres molécules forçant la courbure sans changer le modèle. Des simulations récentes, basées sur la méthode de Monte-Carlo, montrent que la Phospholipase A₂ vient bien s'absorber sur le feuillet externe de la bicouche et se couple bien à un effet mécanique [137]. Notons que la phospholipase A₂ possède une activité chimique : elle coupe une des queues hydrophobes des phosphatidylcholine ; cet effet revient à insérer des détergents dans la bicouche et est donc aussi décrit par ce modèle. L'énergie de la vésicule est donnée par l'équation (II.10), introduite au chapitre II ; le processus variationnel est détaillé dans l'annexe B et conduit aux équations (6 – 9) de l'article.

Initialement, chaque domaine est décrit par une calotte sphérique, sauf à proximité de l'interface ; ceci est formellement exact lorsque la tension de surface domine les effets élastiques (voir les sections IV.3 et IV.5). La concentration en protéines est initialement homogène dans chaque domaine, bien qu'elle ne soit pas forcément la même dans les deux domaines.

La question qui nous intéresse est de savoir à quelle condition l'absorption de molécules peut déstabiliser la calotte sphérique. Pour cela, nous introduisons les perturbations u du rayon de la vésicule et v de la concentration en protéines. L'annexe B montre comment s'exprime l'énergie de la calotte en fonction des perturbations u et v ; on déduit de cette énergie les équations d'Euler-Lagrange (18 et 19) de l'article. Si il existe une solution d'amplitude non nulle à ces équations, nous sommes en présence d'une bifurcation avec une solution différente de la calotte sphérique.

Pour résoudre les équations d'Euler-Lagrange, une décomposition des perturbations sur la base des fonctions de Legendre, base des fonctions sur la calotte, est adaptée. Les fonctions de Legendre sont caractérisées par un nombre q , l'équivalent d'un nombre d'onde. Notons que, en raison de la taille finie de la calotte, il y a une sélection de modes discrets pour satisfaire les conditions aux limites. Il est alors possible de trouver un critère d'instabilité, fonction de q , qui peut être exprimé à l'aide d'une concentration limite $\Phi(q)$ au delà laquelle le système devient instable : c'est la relation (23) de l'article.

L'instabilité peut présenter deux types de comportement physiques suivant le nombre sans dimension

$$c = \frac{\Lambda^2(\alpha + 2\beta/R^2)}{\kappa\alpha^2}$$

qui donne la force du couplage Λ par rapport à la résistance de la membrane κ et à l'absorption des molécules α (voir figure IV.8). Le paramètre β représente le coût énergétique de formation d'un gradient de concentration.

Dans le cas d'un couplage faible ($c \leq 1$), la concentration doit dépasser la concentration optimale de la membrane ϕ_{eq} pour atteindre le seuil Φ . Le mode instable est toujours celui de plus grande longueur d'onde (plus petit q). Expérimentalement, cette situation est peu probable : les molécules vont finir par se dissoudre dans l'eau environnante plutôt que de

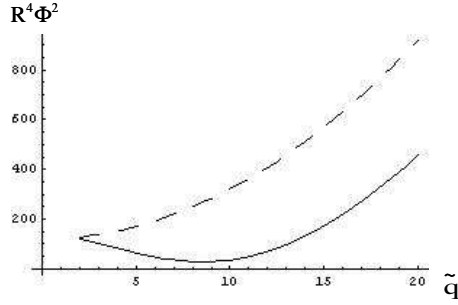


Figure IV.8: Concentration limite adimensionnée au carré en fonction du nombre d'onde $\tilde{q}$ de la perturbation. Pour des concentrations supérieures à la concentration limite, la calotte sphérique devient instable. La courbe en tirets correspond au cas $c \leq 1$, soit un couplage faible. L'instabilité sélectionne toujours le plus petit $\tilde{q}$ possible et la concentration limite est au delà de la tension optimale de la membrane ϕ_{eq} . La courbe continue correspond au cas $c \geq 1$ soit un couplage fort. La concentration limite est abaissée et l'instabilité peut privilégier un autre $\tilde{q}$ que le plus petit.

continuer à s'absorber sur la surface à des concentrations supérieures à ϕ_{eq} . La calotte sphérique devrait alors rester stable, ce qui ne signifie pas que le système formé de deux calottes soit stable : il peut être déstabilisé via les termes de couplages, tels la pression osmotique ou la tension de ligne (voir section IV.5).

Dans le cas d'un couplage fort ($c \geq 1$), la concentration critique Φ présente un minimum pour $q \neq 0$. Ceci a deux conséquences : d'abord, l'instabilité est favorisée car la concentration critique est abaissée ; ensuite, le mode instable n'est pas forcément celui de plus petit q et peut donc présenter plusieurs oscillations. Cette analyse laisse présager un changement de forme de la calotte, comme celui observé sur la figure (IV.7) pour le grand domaine, sans toutefois prédire nécessairement un bourgeonnement ; il faudrait effectuer une analyse de stabilité complètement non-linéaire, ce qui n'est pas possible analytiquement : la forme de la vésicule n'est plus assez simple.

Ces résultats sont indépendants du signe de Λ , ce qui signifie que l'instabilité ne dépend pas du sens de la courbure imposée par les molécules. Le modèle permettrait une analyse quantitative mais les paramètres physiques ne sont pas connus dans les différentes expériences. Toutefois, les deux régimes d'instabilité correspondent aux observations expérimentales : un régime où la calotte sphérique va conserver sa forme et un régime où la calotte est instable, lors de l'absorption de molécules fortement courbées (détergents) à des concentrations élevées.

IV.2.b Résultats complémentaires

IV.2.b.1 Volume variable

Dans l'article, nous avons utilisé la tension de surface Σ comme grandeur physique et fixé le volume de la vésicule pour discuter le comportement lors d'un changement de la concentration ϕ . Cette hypothèse simplificatrice est fréquente dans la physique de la bicouche ; elle peut s'appuyer essentiellement sur deux arguments : soit la vésicule est tendue et donc peu sensible à un changement de volume soit la bicouche est faiblement perméable : le temps qu'il faut pour changer le volume est alors grand comparé aux temps expérimentaux. Une autre hypothèse possible consiste à maintenir la surface de la membrane constante ; cette hypothèse est justifiée car le coût pour augmenter la surface de la membrane est important et cette surface ne varie au mieux que de quelques pourcents (voir chapitre II). Nous pouvons nous demander comment cette hypothèse modifie la stabilité de la calotte : elle ne doit pas changer l'expression du critère d'instabilité mais elle peut changer la réponse de la membrane à un changement de la concentration en molécules.

Les différentes formules de l'article restent inchangées : la tension de surface Σ devient un multiplicateur de Lagrange et le multiplicateur de Lagrange P devient la pression osmotique. Ainsi, la relation (13) de l'article donne Σ en fonction de P :

$$2\Sigma' R_i^2 = P R_i^3 - 2\Lambda_i \phi_i R_i + \alpha \phi_i^2 R_i^2.$$

Le critère d'instabilité (22) de l'article peut être exprimé en fonction de la grandeur physique P :

$$2\Lambda_i^2(q^2 - 2/R_i^2) = (P R_i - 2\Lambda_i \phi_i / R_i + \alpha_i \phi_i^2 - \alpha_i \phi_i^2 + 2\kappa_i q^2) (\alpha_i + \beta_i q^2). \quad (\text{IV.2})$$

Nous en déduisons la concentration critique $\Phi(q)$ pour qu'il y ait une instabilité, en fonction du nombre d'onde q . Nous utilisons le même adimensionnement que dans l'article : l'échelle d'énergie est $k_B T$, celle de longueur est le rayon R de la calotte. La concentration critique adimensionnée $R^2 \Phi$ est alors :

$$R^2 \Phi = \frac{1}{\tilde{\Lambda}} \left[\frac{\tilde{P}}{2} + \tilde{\kappa} \tilde{q}^2 - \frac{\tilde{\Lambda}^2 (\tilde{q}^2 - 2)}{\tilde{\alpha} + \tilde{\beta} (L_c/R)^2 \tilde{q}^2} \right]. \quad (\text{IV.3})$$

La concentration Φ dépend maintenant du signe de $\tilde{\Lambda}$. Notons que le terme entre crochets dans la relation (IV.3) possède les mêmes propriétés que le seuil (23) de l'article. Le comportement du système dépend alors de la face d'absorption des molécules dans la membrane. Lorsque des molécules comme les détergents sont absorbées sur le feuillet externe, nous avons $\Lambda \geq 0$ et nous retrouvons les mêmes comportements que ceux décrits dans l'article, suivant la valeur du nombre sans dimension c dont l'expression est inchangée.

Lorsque des détergents s'absorbent sur le feuillet interne, $\Lambda \leq 0$, ce qui entraîne $\Phi \leq 0$. Le seuil ne peut donc pas être atteint : il faudrait des concentrations négatives. Il ne peut donc pas y avoir d'instabilité de la calotte dans ce cas. Ceci peut s'interpréter physiquement ; l'absorption des molécules sur la face interne tend à réduire localement la courbure de la bicouche, ce qui est opposé aux effets de pression. Localement, il est donc défavorable de provoquer une instabilité, même si il paraît possible d'y gagner à changer la forme globale du système. Nous pouvons imaginer que la forme de la vésicule va changer brutalement dans une transition du premier ordre, non-linéaire. Ceci ne peut pas être trouvé avec une analyse de stabilité linéaire et nécessiterait une résolution numérique complète. A notre connaissance, il n'y a pas d'expériences venant illustrer cette possibilité : les molécules ne sont jamais injectées à l'intérieur de la vésicule.

IV.2.b.2 Limite $\beta = 0$

Nous nous intéressons ici au cas $\beta = 0$, lorsque la formation de gradients ne coûte rien. Nous obtenons alors une simplification du seuil d'instabilité (23) :

$$R^4 \Phi^2 = \frac{2}{\tilde{\alpha}} \left(\tilde{\Sigma}' + \tilde{\kappa} \tilde{q}^2 - \frac{\Lambda^2}{\alpha} (\tilde{q}^2 - 2) \right). \quad (\text{IV.4})$$

Cette formule correspond à celle trouvée par S. Mori et M. Wadati [127] dans le cas d'une sphère homogène. Notons que nous utilisons ici l'expression en fonction de Σ : les conclusions restent les mêmes en utilisant la pression osmotique à la place de la tension de surface.

L'absence du terme de diffusion change le comportement asymptotique du terme en Λ^2 qui ne tend plus vers une valeur finie quand $q \rightarrow \infty$. Pour $c \leq 1$ (couplage faible), le comportement n'est pas modifié par l'absence du terme en β : $\Phi(q)$ est toujours une fonction croissante avec un minimum pour $q = 0$. Pour $c \geq 1$ (couplage fort), le comportement est profondément différent : dans la limite des grands nombres d'onde, la concentration seuil tend vers $-\infty$. Cette situation implique que le système est toujours instable, quelque soit la concentration. Ce résultat peut sembler paradoxal : dès que la concentration en molécules est non nulle, le système devient instable, même si cette concentration est très faible. En fait, ce paradoxe vient du choix du modèle de couplage entre les molécules et la membrane : il s'agit d'un modèle en champ moyen, ce qui suppose que le nombre de molécules est suffisant pour que, à l'échelle d'observation, la distribution de molécules puisse être remplacée par un champ continu ; ceci n'est pas possible pour des concentrations en molécules proches de 0. De la même manière, pour des valeurs de q supérieures à la longueur de résolution du champ ϕ , le modèle n'est plus valable et nécessite une description plus moléculaire.

L'instabilité n'est plus alors pilotée par la concentration en molécules mais uniquement par la force du couplage

$$c = \frac{\Lambda^2}{\kappa\alpha}.$$

Ce comportement correspond à celui trouvé par S. Leibler dans le cas d'une membrane plane [58]. Notons alors que le comportement est indépendant du signe de Λ .

IV.2.c Développements

Les travaux que nous avons effectués concernent l'étude de stabilité linéaire de la calotte sphérique en présence de molécules. Pour obtenir plus d'informations sur l'évolution du système, il faut résoudre le système non-linéaire, ce qui nécessite soit une étude du système faiblement non-linéaire soit une méthode numérique, à priori délicates.

La résolution numérique permettrait de mieux replacer la calotte dans son contexte de vésicule, en prenant en compte les contraintes soit de volume soit de surface, ainsi que les conditions aux limites, au moins à travers un pli. Elle fournirait ainsi la réponse complète du système et la forme adoptée; en particulier, elle permettrait de mieux comprendre comment se couplent l'asymétrie de forme de la calotte avec celle d'absorption des molécules. Nous avons commencé ce type d'étude avec Cyril Dubus sur la sphère complète; nous avons trouvé que l'asymétrie de la bicouche courbée brise la symétrie de la bifurcation, en favorisant l'une des deux directions pour le soulèvement. Toutefois, il ne s'agit pour l'instant que de résultats préliminaires. La comparaison des résultats numériques avec différentes images expérimentales devrait de plus permettre d'estimer les différents paramètres physiques.

IV.3 Bourgeonnement et fission d'une vésicule à deux domaines

Cette section présente la publication reproduite dans la section IV.5, sans la reproduire intégralement.

IV.3.a Introduction

Nous présentons un modèle expliquant la fission d'une vésicule tendue soumise à un choc osmotique ou à l'addition de molécules. Par rapport à l'étude précédente, ce modèle est complètement non-linéaire; il repose sur la stabilité de la forme en calotte sphérique de chaque domaine. Il concerne donc des vésicules tendues avec des couplages faibles ($c < 1$) ou des concentrations nulles pour les molécules absorbées. Il exclut les couplages forts ($c > 1$) car, d'après l'étude précédente, les formes utilisées ne sont pas stables.

Ce modèle est détaillé dans l'article reproduit dans la section IV.5. La forme de la membrane est donnée par les équations d'Euler-Lagrange (5) de l'article, qui minimisent l'énergie (4) de l'article, soit l'énergie (II.10) présentée au chapitre II. Nous faisons l'hypothèse que les surfaces des domaines sont constantes : expérimentalement, la surface d'une vésicule tendue varie au plus de quelques pourcents [138] (voir chapitre II).

La tension de la membrane est due à une pression osmotique, qui domine les effets élastiques sauf dans les zones de forte courbure. Aussi, loin de l'interface, la forme de la vésicule est bien décrite par deux calottes sphériques. Au niveau de l'interface, l'élasticité ne peut plus être négligée (voir la figure IV.9). Nous avons commencé par étudier la limite où l'élasticité est toujours négligeable ($\kappa_i = 0$). La forme de la vésicule est contrôlée par le paramètre

$$\tilde{\sigma} = \frac{\sigma}{PR_0^2},$$

avec R_0 le rayon de la sphère de même surface que la vésicule complète. Pour une valeur donnée de $\tilde{\sigma}$, la vésicule peut avoir deux formes : une forme de basse énergie, observée expérimentalement, et une forme de haute énergie, instable. Ces deux solutions sont géométriquement différentes, en particulier le rayon de l'interface de la forme instable est plus petit que celui de la forme stable (voir figure IV.10). Il existe une valeur critique $\tilde{\sigma}_c$ pour laquelle les deux solutions sont identiques ; pour $\tilde{\sigma} \geq \tilde{\sigma}_c$, il n'existe plus de solution connectée et nous nous attendons à observer la fission avec la séparation des domaines en deux vésicules séparées. Toutefois, il peut rester un pont de lipides entre les deux vésicules : il s'agit d'un effet à l'échelle moléculaire qui n'est pas pris en compte dans notre description de la vésicule. Notons que ce modèle prédit que les petits domaines sont éjectés en premier, ce qui correspond aux observations expérimentales (voir figure IV.7). Dans le cas d'une vésicule détendue, la taille des domaines joue un rôle opposé : elle accroît les effets de la tension de ligne et donc favorise l'éjection par rapport aux effets élastiques indépendants de la taille.

L'élasticité, aussi faible soit elle, interdit l'existence d'une singularité de la courbure au niveau de l'interface. La longueur élastique l_e mesure l'importance le rapport entre les effets élastiques et la tension de la vésicule :

$$l_e = \sqrt{\frac{\kappa}{PR}},$$

dans la phase i . Cette longueur est typiquement de l'ordre de $0,5 \mu m$ pour des rayons R_i de calotte de l'ordre de $10 \mu m$, ce qui justifie de négliger les effets élastiques loin de l'interface. A proximité de l'interface, la membrane forme un pli, qui peut être traité par une approche en couche limite. Cette démarche présente l'avantage de conduire à une équation de forme pour le pli qui peut être résolue analytiquement. L'énergie associée au pli élastique est proportionnelle à la longueur de l'interface et est donc associée à une

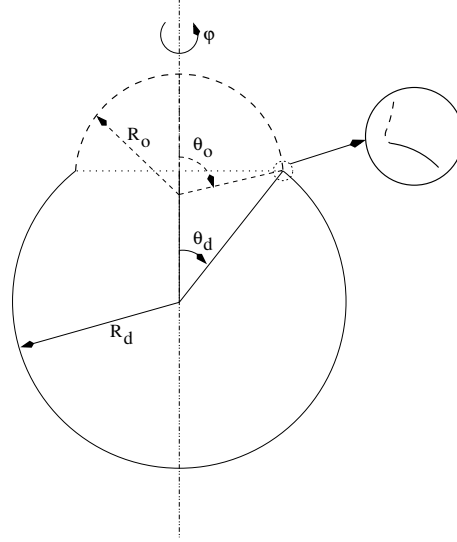


Figure IV.9: Représentation schématique d'une vésicule axisymétrique tendue à deux domaines. Le cercle détaille la forme à proximité de l'interface, où les effets élastiques ne peuvent plus être négligés.

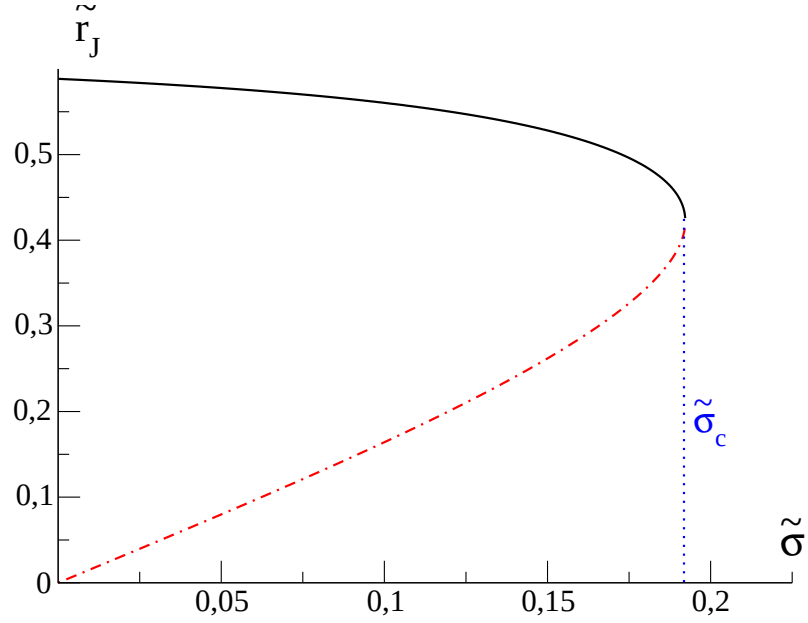


Figure IV.10: Rayon adimensionné $\tilde{r}_J = R_1/R_0 \sin \theta_1 = R_2/R_0 \sin \theta_2$ de l'interface entre les deux domaines en fonction du paramètre de contrôle τ . Le domaine ordonné occupe ici 9,5% de la surface total. La ligne continue correspond à la solution des équations de formes stable, la ligne pointillée à la solution instable. Pour $\tilde{\sigma} \geq \tilde{\sigma}_c$, il n'existe plus de solution connectée des équations de formes.

tension de ligne effective. Cette tension dépend de la forme des calottes et, en particulier, peut être négative, surtout pour des domaines de grande taille. Notons aussi que la prise en compte de l'élasticité dans le système rend les deux phases non équivalentes.

Cette description de la vésicule permet de décrire la fission par changement de volume. Elle peut être étendue au cas où des molécules sont absorbées dans la bicouche. Nous faisons l'hypothèse que l'effet des molécules n'est pas suffisant pour déstabiliser la forme en calotte sphérique des domaines (voir sections IV.2 et IV.4). Le couplage de la concentration à la courbure se fait alors sentir uniquement à proximité de l'interface, exactement comme pour les effets élastiques. Un traitement en couche limite conduit alors à deux équations couplées, les équations (19) de l'article, qui n'ont pas de solution analytique dans le cas général. Une résolution numérique n'est pas envisageable car il y a trop de grandeurs physiques dont les ordres de grandeurs sont inconnus. Nous avons traité différents cas limites. Un cas particulièrement intéressant est celui où la longueur des gradients de concentrations est négligeable devant la longueur élastique l_e ; c'est un cas réaliste car la taille typique des changements de concentration à une interface est de l'ordre de 10nm contre $0,5\mu\text{m}$ pour la longueur élastique. L'effet de détergents dépend alors de leur feuillet d'absorption : si les molécules sont absorbées sur la face externe, elles augmentent la tension de ligne totale, ce qui déstabilise la vésicule, alors qu'elles la réduisent si elles sont absorbées sur la face interne, ce qui inhibe le bourgeoisement.

Nous montrons ainsi une analogie entre l'absorption de détergent et la variation de pression osmotique : sur une membrane tendue, les deux modifient le paramètre de contrôle $\tilde{\sigma}$. La diminution de la pression osmotique entraîne une augmentation de $\tilde{\sigma}$ jusqu'à ce que cette valeur dépasse le paramètre critique $\tilde{\sigma}_c$ où la fission se produit. L'absorption de molécules sur le feuillet externe conduit à une augmentation effective de la tension de ligne et donc du paramètre $\tilde{\sigma}$, ce qui peut conduire à la fission. Notons que notre modèle prédit que le processus de bourgeoisement est réversible : si pour une raison quelconque les molécules quittent la membrane (par exemple parce qu'elles se dissolvent dans le milieu environnant), la vésicule va reprendre sa forme initiale ; une telle réversibilité a été observée pour des vésicules bi-phasiques sur laquelle s'absorbent des protéines Phospholipase A₂ inactivées [125]. Par contre, lorsque $\tilde{\sigma} \geq \tilde{\sigma}_c$, la séparation est irréversible.

IV.3.b Résultats complémentaires

IV.3.b.1 Caténoïde

La bifurcation obtenue pour des vésicules à deux domaines tendues peut être comparée à celle d'un film de savon tendu entre deux anneaux de même rayon (voir figure IV.11) [139, 140]. Nous détaillons ici cette instabilité classique des surfaces minimales.



Figure IV.11: Film de savon tendu entre deux anneaux métalliques. La forme du film minimise la surface en adoptant la forme d'une caténoïde. Image extraite du site www.21stcenturysciencetech.com/

Nous considérons deux anneaux de rayon R séparés d'une distance d entre lesquels est tendu un film de savon. Ce film est uniquement soumis à sa tension de surface mais ses bords sont imposés par les anneaux. La forme du film de savon est donc donnée par la minimisation de la fonctionnelle :

$$F = 2\pi \int_{-d/2}^{d/2} r \sqrt{1 + \dot{r}^2} dz. \quad (\text{IV.5})$$

Ce calcul variationnel a été résolu par Euler (1971) ; la solution des équations d'Euler-Lagrange est donnée par une famille de formes $r(z)$ de paramètre a :

$$\frac{r(z)}{R} = a \cosh \left(\frac{z}{aR} \right), \quad (\text{IV.6})$$

le paramètre a étant donné par la conditions au bord $h(L/2) = R$.

Il existe deux solutions possibles pour toute valeur $l \equiv L/R \leq l_c \equiv 1,325$ (voir figure IV.12) ; pour $l \geq l_c$, il n'y a pas de solution connectée et le film se sépare en deux disques. Pour $l \leq l_c$, la solution de plus petit a possède la surface la plus grande et représente un maximum d'énergie (voir figure IV.13). Le système possède donc trois solutions pour $l \leq l_c$: la solution connectée observée (de grand a), la solution connectée instable (de petit a) et la solution en deux disques séparés. Le passage de la solution stable connectée à la solution séparée est irréversible, les deux disques devenant spatialement séparés. Notons que, comme dans le cas de la vésicule bi-phasique tendue, la rupture se fait pour un rayon minimal $a.R$ non nul.

L'analogie entre les vésicules et la caténoïde pourrait laisser croire que toutes les surfaces minimales présentent des instabilités noeud-col avec changement de topologie. En fait, la situation est plus complexe et dépend de la géométrie du système. ainsi, un film de savon en forme d'hélicoïde présente une instabilité du type ruban lorsqu'on éloigne ses supports. L'hélicoïde fait partie de la même famille de surfaces que la caténoïde ; toutefois, le changement de topologie est une transition fourche du deuxième ordre [141]. Malgré le changement de topologie, cette transition est alors complètement réversible.

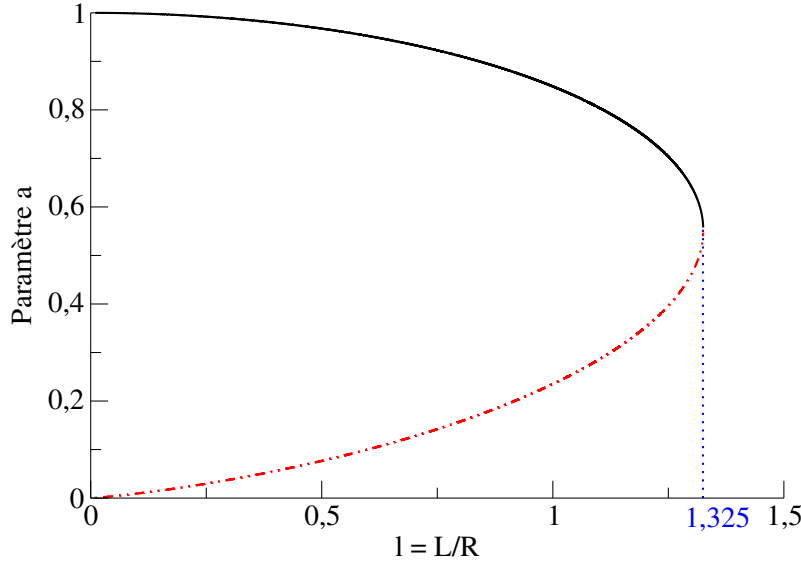


Figure IV.12: Paramètres des caténoïdes (IV.6) satisfaisant la condition $h(L/2) = R$ en fonction de la distance entre les anneaux $l = L/R$. Il existe deux solutions jusqu'à $l_c = 1,325$ puis il n'y a plus de solution connectée. Le paramètre a donne le rayon minimum adimensionné par R de la caténoïde. La courbe continue correspond à la solution observée ; la courbe en tirets est la solution instable.

IV.3.b.2 Volume fixé

Dans le modèle précédent, nous avons supposé que la surface de chaque domaine est constante et que le volume pouvait changer en fonction de la pression osmotique. Fixer le volume de la vésicule et la tension Σ_i de chaque domaine peut sembler une hypothèse simplificatrice intéressante ; toutefois, il s'agit d'une approximation non physique.

En effet, si nous négligeons l'élasticité, la forme de la vésicule est donnée par quatre équations :

- La conservation du volume :

$$V = \frac{4\pi}{3} \left[R_1^3 (2 + \cos(\theta_1)) \sin^4 \left(\frac{\theta_1}{2} \right) + R_2^3 (2 - \cos(\theta_2)) \sin^4 \left(\frac{\theta_2}{2} \right) \right].$$

- La continuité du rayon :

$$R_1 \sin \theta_1 = R_2 \sin \theta_2.$$

- Le rapport des rayons, imposé par la loi de Laplace dans les deux domaines avec le même P :

$$R_1/R_2 = \Sigma_1/\Sigma_2.$$

- L'équilibre des forces radiales à l'interface :

$$\frac{\Sigma_1}{\Sigma_2} R_1 \sin \theta_1 \cos \theta_1 = R_2 \cos \theta_2 \sin \theta_2 - \frac{\sigma}{\Sigma_2}.$$

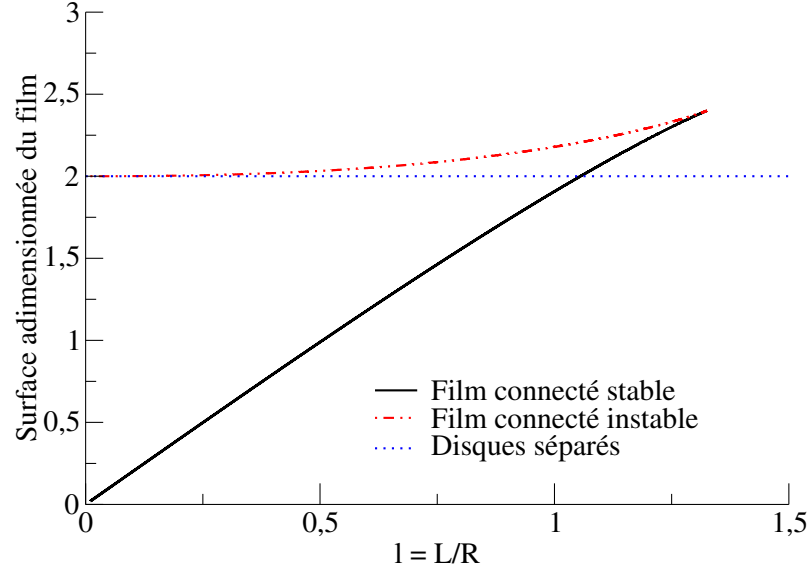


Figure IV.13: Surfaces adimensionnées des caténoïdes (IV.6) satisfaisant la condition $h(L/2) = R$ en fonction de la distance entre les anneaux $l = L/R$. La courbe continue est associée aux grandes valeurs du paramètre a de l'équation (IV.6); la courbe en tirets correspond aux petites valeurs du paramètre de forme a . La ligne pointillée est la surface des deux disques du film séparé.

Il y a maintenant deux paramètres de contrôle : le rapport des tensions de surface, Σ_1/Σ_2 , ainsi que la longueur d'invagination $\xi = \sigma/\Sigma_2$.

Le paramètre ξ est l'équivalent du paramètre de contrôle $\tilde{\sigma}$ dans le modèle à surfaces constantes, alors que le rapport des tensions de surface est l'équivalent de rapport des surfaces. Toutefois, si la valeur de Σ_1/Σ_2 est différente de 1, il n'existe pas de solution physiquement accessible lorsque la tension de ligne σ tend vers 0. En effet, la différence de tension de surface rend les deux domaines non équivalents; aussi la forme sphérique n'est pas solution du problème, à part lorsqu'une des deux phases disparaît.

De plus, le choix d'une tension de surface constante n'est pas en accord avec les conditions expérimentales : il n'y a pas de réservoir de lipides pour fournir la tension; les fluctuations fournissent bien un réservoir, mais il varie très rapidement avec la surface visible de la phase.

IV.3.c Développements

Dans cette étude, nous nous sommes limités au cas d'une vésicule à deux domaines, de surfaces constantes. Nous obtenons ainsi un diagramme de bifurcation capillaire, similaire à celui obtenu pour un film de savon entre deux anneaux. Toutefois, d'autres études sont encore nécessaires pour comprendre toutes les propriétés du système.

Ainsi, nous avons étudié le cas où les surfaces sont fixes et le volume variable. Nous pouvons construire un modèle autorisant les surfaces de chaque domaine à changer, en introduisant une dépendance de la tension de surface en fonction de la surface visible. Cette dépendance, physiquement nécessaire et correspondant à la réalité expérimentale, rend délicate la dérivation des équations d'Euler-Lagrange. Aussi, cette approche a peu de chance de permettre une résolution analytique du problème.

Nous pouvons nous demander ce qui se passe si plusieurs domaines sont présents sur la vésicule. Un cas particulier simple est celui d'une vésicule à trois domaines, par exemple deux liquides-ordonnés et un liquide-désordonné. Nous nous attendons à retrouver le même type d'instabilité capillaire. Toutefois, la situation pourrait être plus riche en raison de l'interaction entre les domaines. En effet, si les deux domaines ordonnés ont la même taille, ils vont être éjectés simultanément lors d'un choc osmotique ; par contre, si l'un des domaines ordonnés est très grand devant l'autre, le petit domaine va être éjecté en premier. Aussi, il pourrait exister une interaction entre des domaines de tailles différentes qui conduirait à leur éjection simultanée si leurs tailles sont proches et à des éjections pour des valeurs différentes du paramètre de contrôle $\tilde{\sigma}$ si les tailles sont très différentes. Dans le cas d'un système à trois domaines, un traitement analytique peut être envisagé en positionnant les deux domaines sur l'axe de symétrie, de part et d'autre de la vésicule. Pour les cas plus complexes où la symétrie ne peut plus être respectée, une méthode numérique est nécessaire.

IV.4 Article "Biphasic vesicle : instability induced by adsorption of molecules"

Biphasic vesicle: instability induced by adsorption of proteins

Jean-Marc Allain, Martine Ben Amar*

*Laboratoire de Physique Statistique, Ecole Normale Supérieure, 24 rue Lhomond,
75231 Paris Cedex 05, France*

Received 6 November 2003

Abstract

The recent discovery of a lateral organization in cell membranes due to small structures called ‘rafts’ has motivated a lot of biological and physico-chemical studies. A new experiment on a model system has shown a spectacular budding process with the expulsion of one or two rafts when one introduces proteins on the membrane. In this paper, we give a physical interpretation of the budding of the raft phase. An approach based on the energy of the system including the presence of proteins is used to derive a shape equation and to study possible instabilities. This model shows two different situations which are strongly dependent on the nature of the proteins: a regime of easy budding when the proteins are strongly coupled to the membrane and a regime of difficult budding.

© 2004 Elsevier B.V. All rights reserved.

PACS: 87.16.Dg; 87.10.+e; 47.20.Ky

Keywords: Raft; Budding; Proteins; Membranes; Vesicles shape; Spherical cap harmonics

1. Introduction

Classical and oversimplified models of the cell reduces the membrane to a bilayer of lipids in a fluid state which is a solvent for the proteins of the membrane [1]. But the cell membrane is a much more complex and inhomogeneous system. The inhomogeneities come from a phase separation between small structures called ‘rafts’

* Corresponding author. Tel.: +33-44-32-34-77; fax: +33-44-32-34-33.
E-mail address: benamar@lps.ens.fr (M. Ben Amar).

[2] and the surrounding liquid phase. These rafts have been discovered a decade ago and remain an important issue of cell biology but also immunology, virology, etc [3]. A lot of biological studies concern the rafts and examine their composition [4], their in vivo size [5], their role in signaling [6] or in lipid traffic [7] for example. The raft is roughly a mixture of cholesterol and sphingolipid but the exact nature of the sphingolipid and its concentration can vary between different rafts. In any case and whatever its composition, the raft has different physical or chemical properties than the rest of the membrane. In this paper, we focus on this specificity which is at the origin of an elastic instability that we want to explain.

Experimentally, the raft in vivo cannot be easily studied and artificial systems like GUV (giant unilamellar vesicle) [8] appear more appropriate. GUV consist in a membrane of lipids with the possibility of a raft inclusion. On these artificial systems, a better control of the experimental parameters can be obtained and explored. For example, they have been used to study the coupled effects of both the membrane composition and the temperature on the nucleation of rafts [9]. Recently, a new experiment on GUV with rafts has shown a spectacular budding process [10] induced by injection of proteins called PLA_2 (phospholipase A_2). Before injection, the GUV membrane is in a stable, nearly spherical state. But, more precisely, high-quality pictures of vesicles reveal two spherical caps, one for each phase: the raft and the fluid phase [11]. These two caps have a radius of the same order of magnitude (about 5 μm , depending on the experimental conditions) and are separated by a discontinuous interface. Few seconds after injection of PLA_2 with a micro-pipette in the vicinity of the raft, one observes a rather strong destabilization of the initial shape: the raft tries to rise. The discontinuity of slope at the interface between the two caps becomes more and more pronounced. This lifting can be strong enough to expel the raft from the vesicle. When two or three rafts are present initially, successive expulsions can be observed. We present here a theoretical treatment showing that the driving force of the deformation is the absorption of proteins which locally deforms the membrane. We neglect chemical reactions since we focus here on the early stages of the instability: the time-scale of the instability is small compared to the characteristic time of chemical effects. We restrict ourselves to the simplest model relevant for the experiment we want to describe. It involves standard physical concepts of membrane mechanics. The initial shape of the system is given by a minimum of the energy of the whole system (that is the inhomogeneous vesicle including proteins). A linear perturbation treatment allows to examine the existence of another solution which may lead to a new minimum of energy. This approach is sufficient to predict the experimental observation of destabilization and to derive a concentration threshold for an elastic instability of the vesicle. The calculation presented in this paper concerns only the first stages of the instability. Intermediate stages require at least a dynamical nonlinear calculation including possible chemical effects of proteins. The final stage can be achieved by a non-linear calculation or, in case of fission, by the energy evaluation of two separated homogeneous spheres following the strategy described in [12].

Models of vesicles have been widely described in previous papers [13–19]. They vary depending on the physical interactions involved taken into account. The backbone of all models is based on the minimization of the average curvature energy of

the bilayer, with the introduction of a possible local membrane asymmetry [13,14]. A large number of shapes have been predicted in the past by this model [16]. They suitably describe experimental results such as the various shapes of red blood cells. Other physical effects can be introduced, such as the difference of area between the two layers of the membrane [20], suggesting a differential compressive stress in the bilayer. These effects are visible under suitable experimental conditions [19]. Here, our scope is to study quantitatively the protein–membrane interaction using a generalization of the Leibler’s model [21] to an inhomogeneous system. It turns out that this model, which describes the proteins as defects on the membrane, leads to a spatially inhomogeneous spontaneous curvature which is shown to be responsible for the destabilization of the whole system. Going back to the microscopic level, we derive a threshold for the protein concentration, which appears as a control parameter. Moreover, depending on the shape of the proteins, we are able to select two different regimes: a protein-stocking regime and a destabilization regime with possible raft-ejection. The idea of a non-homogeneous spontaneous curvature is not new since it has been used for mono-phasic vesicles to explain a possible thermal budding [22]. This does not concern the experiment described in [10] since the temperature is not the relevant control parameter. Another scenario for the budding process of a raft has been proposed by [18]: the increase of line tension by the proteins leads to an apparent slope discontinuity and to a neck. Again, this approach, which is different from ours, is not quantitatively related to the amount of proteins. It is why we suggest a different treatment as an interpretation of the raft ejection.

This paper is organized as follows. Section 2 is devoted to a detailed description of the model defining precisely the elastic energy plus the energy of interaction combined to the constraints. Section 3 determines an obvious solution of the minimization of energy in terms of two joined spherical caps. A linear perturbation is performed which gives the threshold of proteins when a destabilization occurs. In Section 4, the results are analyzed and discussed taking into account known or estimated orders of magnitude of physical parameters.

2. The model

2.1. Membrane description

The energetic model of the membrane is well established nowadays. It can incorporate many different interactions, constraints or restrictions. Here, we focus on a precise experiment and we think the model suitable for this experiment [10]. Nevertheless, it can be modified easily for another experimental set-up.

We consider a slightly stretched vesicle made of amphiphilic molecules difficult to solubilize in water. The raft will be denoted by phase 1, it is usually considered as an ordered liquid. The remaining part is denoted by phase 2 and is considered as a disordered liquid. As the two phases are liquid, we describe them by two similar free energies, each of them having its own set of physical constants. Quantities which remain fixed in the experiment are constraints expressed via Lagrange multipliers in

the free energy. So we define the energy of the bilayer in the phase (*i*):

$$F_{b_i} = \int_{S_i} \left[\frac{\kappa_i}{2} H^2 + \kappa_{G_i} K + \Sigma_i \right] dS \quad (1)$$

with H the mean curvature and K the Gaussian curvature. The square of H is the classical elastic energy [14] when we get rid of the spontaneous curvature. Here, there is no physical reason to introduce a spontaneous curvature, sign of asymmetry between the two layers. The membrane contains enough cholesterol, which has a fast rate of flip-flop and which relaxes the constraints inside the bilayer. As for the Gaussian curvature, when a biphasic system without topological changes is concerned, it gives (Gauss–Bonnet theorem) a mathematical contribution only at the boundary [18]. Σ_i means the surface tension: it is the combination between the stretching energy of the membrane and an entropic effect due to invisible fluctuations [23]. In addition to this energy of the bare membrane, we need to introduce the protein–membrane interactions.

2.2. Protein–membrane interactions

Both phases absorb the proteins, as soon as they are introduced, but probably with a different affinity. These proteins are not soluble in water, so we think that they remain localized on the membrane and neglect possible exchange with the surrounding bath. As a consequence, the number of these molecules remains constant. Moreover, we assume that the proteins cannot cross the interface [24]. As suggested by Leibler [21], the average curvature is coupled to the protein concentration, for two possible reasons. First, this can be due to the conical shape of the proteins which locally make a deformation of the membrane. Second, an osmotic pressure on the membrane results from the part of the protein in the water [25]. Whatever the microscopic effect, the proteins force the membrane to tilt nearby and thus induce a local curvature. We define the energy due to proteins in the phase (*i*):

$$F_{p_i} = \int_{S_i} \left[A_i H \phi + \lambda_i \phi + \left(\frac{\alpha_i}{2} (\phi - \phi_{eq_i})^2 + \frac{\beta_i}{2} (\nabla \phi)^2 \right) \right] dS \quad (2)$$

with ϕ the concentration of proteins on the surface. The coupling constant is A_i . In Eq. (2), λ_i is a Lagrange multiplier which allows to maintain the number of proteins constant in each phase. The model can be easily changed by considering λ_i as the chemical potential of the proteins. In this case, the proteins are free to move everywhere on the membrane, to cross the interfaces or to go in the surrounding water. The last term in Eq. (2) is a Landau's expansion of the energy needed to absorb proteins on the surface nearby the equilibrium concentration ϕ_{eq} . The ϕ gradient indicates a cost in energy to pay for a spatially inhomogeneous concentration. Since the two phases are coupled together to make a unique membrane, let us describe now the interaction between them.

2.3. Two phases in interaction

The total energy of this inhomogeneous system is the sum of these two individual energies for each phase plus at least two coupling terms. First, a more or less sharp

interface exists between the raft and the phospholipidic part of the membrane. The interface is a line, the cost of energy of the transition being given by a line tension σ equivalent to the surface tension in a vapor–liquid mixing. σ includes the Pogorelov energy of the curved fold of the boundary. Second, the surface of the vesicle is lightly porous to the water but not to the ions or big molecules present in the solution. So, the membrane is a semi-permeable surface and an osmotic pressure appears. As a small variation of the composition of the medium surrounding the vesicle induces a large variation of the size of the vesicle, the volume does not change when the proteins are injected, however the membrane will break down or transient pores will appear [26], which is not observed here. So, one needs to introduce a Lagrange's parameter $-P$ to express the constraint on the volume. Physically, P is the difference of osmotic pressure between the two sides of the membrane. Then, the free energy of the bilayer becomes:

$$F_{TOT} = \sum_{i=1,2} (F_{b_i} + F_{p_i}) + \sigma \int_C dl - P \int dV \quad (3)$$

with C the boundary between the two phases. A variational approach is used to find the initial state and to study its stability to small perturbations.

3. Static solution and stability analysis

3.1. Initial state

First, we look for the simplest realistic solution with an homogeneous concentration of proteins in each phase. It can be found by minimizing the energy F_{TOT} . This minimization gives the Euler–Lagrange (E–L) equations plus the boundary conditions in an arbitrary set of coordinates. The surface has initially an axis of symmetry. Thus, the cylindrical coordinates seem to be the best choice. The parameterization of the surface is done by the arc-length s alone (see Fig. 1). The energy becomes

$$F = 2\pi \left[\int_{s_0}^{s_1} \mathcal{L}_1 ds + \int_{s_1}^{s_2} \mathcal{L}_2 ds + \sigma r(s_1) \right] \quad (4)$$

with

$$\begin{aligned} \mathcal{L}_i = & \frac{\kappa_i}{2} \left(\frac{\sin(\psi)^2}{r} + \psi'^2 r + 2\psi' \sin(\psi) \right) + \kappa_{G_i} \sin(\psi) \psi' \\ & - A_i \phi (\sin(\psi) + \psi' r) + \frac{\alpha_i}{2} \phi^2 r + \frac{\beta_i}{2} \phi'^2 r + \Sigma'_i r + \lambda'_i \phi r \\ & - \frac{P}{2} r^2 \sin(\psi) + \gamma (r' - \cos(\psi)) . \end{aligned}$$

To simplify the notations and calculations, new parameters are defined:

$$\Sigma'_i = \Sigma_i + \frac{\alpha_i}{2} \phi_{eq_i}^2 \quad \text{and} \quad \lambda'_i = \lambda_i - \alpha_i \phi_{eq_i} . \quad (5)$$

Minimization with respect to small perturbations of the spatial coordinates (r and ψ) and of the protein concentration ϕ leads to the E–L equations:

$$\psi'' = \frac{\sin(\psi) \cos(\psi)}{r^2} - \frac{Pr}{2\kappa_i} \cos(\psi) - \frac{\psi'}{r} \cos(\psi) + \frac{A_i}{\kappa_i} \phi' + \frac{\gamma}{\kappa_i r} \sin(\psi), \quad (6)$$

$$\begin{aligned} \gamma' = & \frac{\kappa_i}{2} \psi'^2 - \frac{\kappa}{2r^2} \sin(\psi)^2 + \Sigma'_i - Pr \sin(\psi) - A_i \phi \psi' \\ & + \frac{\alpha_i}{2} \phi^2 + \frac{\beta_i}{2} \phi'^2 + \lambda'_i \phi, \end{aligned} \quad (7)$$

$$\phi'' = -\frac{A_i}{\beta_i r} (\sin(\psi) + \psi' r) + \frac{\alpha_i}{\beta_i} \phi - \phi' \frac{\cos(\psi)}{r} + \frac{\lambda'_i}{\beta_i}, \quad (8)$$

$$r' = \cos(\psi). \quad (9)$$

The boundary conditions deduced from Eq. (4) at the junction (defined by s_1) between the two phases and the continuity of the radius r give

$$\begin{aligned} & \kappa_1 \psi'(s_1 - \varepsilon) r(s_1) + (\kappa_1 + \kappa_{G_1}) \sin(\psi(s_1 - \varepsilon)) - A_1 \phi(s_1 - \varepsilon) r(s_1) \\ & - \kappa_2 \psi'(s_1 + \varepsilon) r(s_1) - (\kappa_2 + \kappa_{G_2}) \sin(\psi(s_1 + \varepsilon)) + A_2 \phi(s_1 + \varepsilon) r(s_1) = 0, \end{aligned} \quad (10)$$

$$\gamma(s_1 - \varepsilon) - \gamma(s_1 + \varepsilon) + \sigma = 0, \quad (11)$$

$$\beta_1 \phi'(s_1 - \varepsilon) r(s_1) - \beta_2 \phi'(s_1 + \varepsilon) r(s_1) = 0. \quad (12)$$

The boundary conditions are deduced from the bounds in the variational process. The observation of a shape discontinuity at the boundary between the two phases [11] suggests a solution which exhibits such a discontinuity of the slope at $s = s_1$. The angle ψ between the surface and the radius axis is chosen discontinuous at the macroscopic level but not at the microscopic level due to the Pogorelov energy at the interface (see Fig. 2). This allows a tilt of the surface at the boundary C . The simplest solution, strongly suggested by the experiment, is two spherical caps of radius R_1 and R_2 , one for each phase with a constant concentration ϕ_i (see Fig. 2, for clarity, the deformation of the raft is stronger than the real one in the initial state).

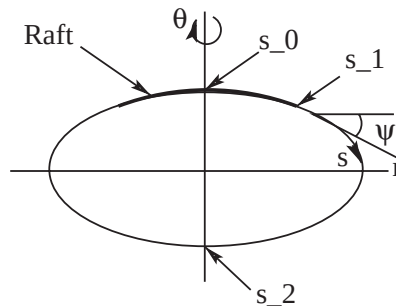


Fig. 1. Parameterization of an axisymmetric vesicle with two phases in cylindrical coordinates.

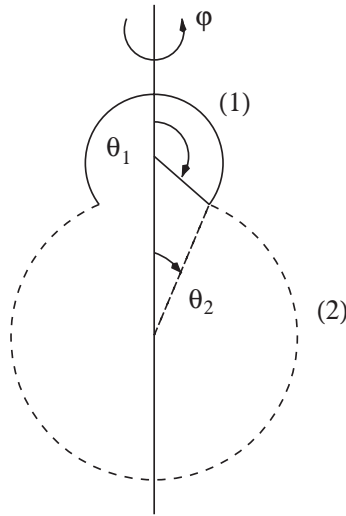


Fig. 2. Parameterization of the vesicle near its initial state. The deformation is larger than the real one in the initial state.

The minimization shows that one must satisfy the following “bulk” conditions for each phase in order to have this solution:

$$\lambda'_i R_i = 2A_i - \alpha_i R_i \phi_i \quad \text{so} \quad R_i \lambda_i = 2A_i, \quad (13)$$

$$2\Sigma'_i R_i^2 - PR_i^3 + 2A_i \phi_i R_i - \alpha_i \phi_i^2 R_i^2 = 0. \quad (14)$$

The boundary conditions give two other relations:

$$\frac{2\kappa_1 + \kappa_{G1}}{R_1^*} - A_1 \phi_1 = \frac{2\kappa_2 + \kappa_{G2}}{R_2^*} - A_2 \phi_2, \quad (15)$$

$$R_2 \cos(\theta_2) - R_1 \cos(\theta_1) = \frac{2\sigma}{PR_1 \sin(\theta_1)}. \quad (16)$$

where θ_1 and θ_2 are the polar angles in each phase at the boundary (see Fig. 2), and R_1^*, R_2^* are the local algebraic radii of curvature at the junction, different from R_1 and R_2 . Note that, for each phase, the couple of equations given by Eqs. (13) and (14) derive the Lagrange parameters like λ_i (equivalent to a chemical potential) and Σ_i (the tension) which are quantities not easy to measure experimentally. On the contrary, Eqs. (15) and (16) give geometrical informations. These informations with the other constraints such as the continuity of the radius and the ratio between area of both phases are enough to fix completely the values of R_1 , R_2 , θ_1 and θ_2 . Both conditions have to be satisfied for all protein concentrations in order to ensure the existence of the initial homogeneous spherical caps, whether they are stable or not. If there is no protein, the conditions (13) and (14) reduce to $\lambda' = 0$ and $2\Sigma'_i R_0^2 = PR_0^3$, which is the classical Laplace equation for an interface with a surface tension. Contrary to the law of capillarity, where the surface tension is a physical parameter dependent on the chemical phases involved, the tension here is not a constant characteristic of the lipids of the vesicle. It is a stress (times a length) which varies with the pressure.

3.2. Linear perturbation analysis

Now, we examine the stability of this solution. Due to the geometry, it turns out that the spherical coordinate system is more appropriate here and make the calculations easier. A perturbation of the spherical cap (i) is described by: $R(\theta; \varphi) = R_i(1 + u(\theta; \varphi))$ with R_i the initial radius; in a similar way, a perturbation of the protein concentration is $\phi = \phi_i(1 + v(\theta; \varphi))$ with ϕ_i the initial and homogeneous concentration of proteins on the surface. We assume that the line tension is not modified by the addition of proteins, at least linearly. One can expand the free energy Eq. (4) to second order in u and v in the phase i :

$$F_i = 2\pi \left[\int_{\theta_{0i}}^{\theta_{1i}} \mathcal{L}_i(u, \nabla u, \Delta u, v, \nabla v) \sin \theta d\theta \right] \text{ with}$$

$$\begin{aligned} \mathcal{L}_i = & 2\kappa_i \left(-\Delta u + \frac{1}{4}\Delta u^2 + u\Delta u + \frac{\nabla u^2}{2} \right) + \Sigma'_i R_i^2 \left(2u + u^2 + \frac{\nabla u^2}{2} \right) \\ & - 2A_i \phi_i R_i \left(u + v - \frac{\Delta u}{2} + \frac{\nabla u^2}{2} + uv - \frac{v\Delta u}{2} \right) - \frac{PR_i^3}{3}(3u + 3u^2) \\ & + \frac{\alpha_i}{2}(\phi_i R_i)^2 \left(2u + 2v + u^2 + 4uv + v^2 + \frac{\nabla u^2}{2} \right) + \frac{\beta_i}{2}\phi_i^2(\nabla v)^2 \\ & + \lambda'_i \phi_i R_i^2 \left(2u + v + u^2 + 2uv + \frac{\nabla u^2}{2} \right). \end{aligned} \quad (17)$$

The total free energy is then a function of u and v , which allows a variational approach to find the E–L equations and the boundary conditions. The E–L equations give shapes which are extrema of the free energy. Two sets of equations are derived: one for the zeroth order in u and v and one for the first order, the energy being calculated up to the second order of the perturbation. The zero-order equations gives the same results as Eqs. (15) and (16). The first-order equations are

$$A_i \phi_i R_i (2u + \Delta u) + \phi_i^2 R_i^2 \left(\alpha_i v - \frac{\beta_i}{R_i^2} \Delta v \right) = 0, \quad (18)$$

$$\begin{aligned} & (-2A_i \phi_i R_i + 2\alpha_i \phi_i^2 R_i^2 + 2\lambda'_i \phi_i R_i^2)v + A_i \phi_i R_i \Delta v \\ & + (2\Sigma'_i R_i^2 + \alpha_i \phi_i^2 R_i^2 + 2\lambda'_i \phi_i R_i^2 - 2PR_i^3)u \\ & + (2\kappa_i - \Sigma'_i R_i^2 + 2A_i R_i \phi_i - \frac{\alpha_i}{2} \phi_i^2 R_i^2 - \lambda'_i \phi_i R_i^2) \Delta u + \kappa_i \Delta \Delta u = 0 \end{aligned} \quad (19)$$

equivalent to

$$A_i \phi_i R_i (2v + \Delta v) + \left(A_i \phi_i R_i - \frac{PR_i^3}{2} \right) (2u + \Delta u) + \kappa_i \Delta (2u + \Delta u) = 0. \quad (20)$$

This coupling imposes boundary conditions which must be treated at the zero-order and the first order. We have already studied the zero-order which gives relations (15) and (16). As usual for linear perturbation analysis, the boundary conditions for the perturbation are homogeneous: for simplicity we choose $u = \Delta u = v = 0$ at the boundary between the two phases. Contrary to first intuition and usual procedures, although Eqs. (18) and (20) are linear, we cannot use the Legendre polynomial basis, due to the specific boundary conditions in this problem. The convenient angular basis in this case turns out to be the spherical cap harmonics, following standard techniques in geophysics [27] (see Appendix A where we recall some mathematical useful relations). These spherical cap harmonics are Legendre functions $P_{x_l}(\cos \theta)$. The regular function at the pole of the cap is of the first kind and since we restrict on axisymmetric perturbations, these Legendre functions are simply hypergeometric function

$${}_2F_1 \left(-x_l, x_l + 1, 1, \frac{1 - \cos \theta}{2} \right) .$$

Notice that x_l is not an integer. In the case where it is, we recover the Legendre polynomial basis. We select the spherical cap harmonics which vanish at the boundary angle ($\theta = \theta_1$ or $\theta = \theta_2$, see Fig. 2). This condition at the boundary gives a discrete infinite set of non-integer $x_l^{(i)}$ values for the phase (i). l is an integer index used to order the allowed values $x_l^{(i)}$ by increasing values. It is also the number of zero of the function $P_{x_l^{(i)}}$ on the cap. These harmonics have the properties to be an orthogonal basis and to be eigenfunctions of the Legendre equation with eigenvalues: $x_l^{(i)}(x_l^{(i)} + 1)$. We define $u(\theta) = \sum_l u_l P_{x_l}(\cos \theta)$ and $v(\theta) = \sum_l v_l P_{x_l}(\cos \theta)$. From the first E–L equation (18), one can deduce the amplitude $v_{i,l}$ the protein concentration from $u_{i,l}$ in the phase (i):

$$v_{i,l} = \frac{A_i [x_l^{(i)}(x_l^{(i)} + 1) - 2]}{\phi_i R_i [\alpha_i + \beta_i (x_l^{(i)} + 1) x_l^{(i)} / R_i^2]} u_{i,l} . \quad (21)$$

We introduce $q^2 = x_l^{(i)}(x_l^{(i)} + 1) / R_i^2$, which is similar to the spatial period of the perturbation. Then, from the second E–L Eq. (19) and after elimination using Eq. (21), we derive

$$A_i^2 (q^2 - 2/R_i^2) = \left(\Sigma'_i - \frac{\alpha_i}{2} \phi_i^2 + \kappa_i q^2 \right) (\alpha_i + \beta_i q^2) . \quad (22)$$

Our result can be compared to previous analysis made in two different asymptotic limits in the homogeneous case. In these cases, the cap is a complete sphere and x_l is an integer. First, for $\beta = 0$, we recover the result of [28] for an homogeneous vesicle without diffusion. Second, when R_i goes to infinity, we recover the result for an homogeneous flat membrane [21].

Notice that, in Eq. (22), the protein concentration has a similar significance as a negative surface tension: one can make the change of variable $\Sigma''_i = \Sigma'_i - \alpha_i \phi_i^2 / 2 = \Sigma_i + \alpha_i (\phi_{eq_i}^2 - \phi_i^2) / 2$. The principal effect of the proteins is to decrease the surface tension which is an obvious sign of instability.

4. Discussion

We will use the protein concentration ϕ_i as our control parameter. Eq. (22) gives for each mode $x_l^{(i)}$ a threshold concentration Φ_i such that for $\phi_i \leq \Phi_i$ the initial state is stable and for $\phi_i \geq \Phi_i$, one of the two phases is unstable, leading to a complete instability. The threshold concentration Φ_i strongly depends on the physical properties of each phase. Then, the two parts of the initial system have no reason to be unstable simultaneously. The deformation of the other phase (not unstable to linear order) will be induced by the non-linear effects not included in this analysis.

Since the thermal energy kT is the only external energy and the typical length of the phase (i) is R_i , one can introduce dimensionless parameters: $\tilde{q} = x_l(x_l + 1)$, $\tilde{\kappa}_i = \kappa_i/kT$, $\tilde{\Sigma}_i' = \Sigma_i'R_i^2/kT$, $\tilde{A}_i = A_i/(kTR_i)$, $\tilde{\alpha}_i = \alpha_i/(R_i^2kT)$ and $\tilde{\beta}_i = \beta_i/(R_i^2L_c^2kT)$ with L_c a characteristic length for the gradient of protein concentration. Then, the protein concentration is replaced by $R_i^4\phi_i^2$ which is proportional to the square of the number of proteins in the phase (i).

Rewriting the threshold (22), we find for the threshold concentration, in dimensionless parameters:

$$R_i^4\Phi_i^2 = \frac{2}{\tilde{\alpha}_i} \left(\tilde{\Sigma}_i' + \tilde{\kappa}_i\tilde{q}^2 - \frac{\tilde{A}_i^2(\tilde{q}^2 - 2)}{\tilde{\alpha}_i + \tilde{\beta}_i(L_c/R_i)^2\tilde{q}^2} \right). \quad (23)$$

From Eq. (23), the search of the smallest threshold concentration gives two different regimes depending on the value of the dimensionless constant:

$$c = \frac{\tilde{A}_i^2 \left(\tilde{\alpha}_i + 2\tilde{\beta}_i \frac{L_c^2}{R_i^2} \right)}{\tilde{\kappa}_i\tilde{\alpha}_i^2} = \frac{A_i^2(\alpha_i + 2\beta_i/R_i^2)}{\kappa_i\alpha_i^2}. \quad (24)$$

This constant describes the strength of the coupling of the protein with the membrane (A_i) to the resistance of the membrane (κ_i) and to the absorption power (α_i). In the weak interaction regime ($c \leq 1$), the protein concentration is an increasing function of $\tilde{q}$ (see Fig. 3). So, the threshold is obtained for the smallest possible $x_l : x_0$. The direction of the deformation (inside or outside the initial cap) would be deduced from a third order calculation or from a numerical simulation. According to the definition of Σ_i' (Eq. (12)), the concentration required to destabilize the membrane is found bigger than the equilibrium concentration. But in this case, one expects that this threshold Φ_i is difficult or impossible to reach since it requests the absorption of a concentration of proteins larger than ϕ_{eqi} : probably, the excess of proteins would prefer to dissolve in the surrounding water then forming aggregates. So, the weak regime of instability is not observable experimentally, our basic state made of two spherical caps is stable and proteins are stocked only.

In the strong interaction regime, the limiting concentration shows a minimum not necessary for the smallest x_l (see Fig. 3). This has two consequences. First, the limiting concentration is less than the equilibrium concentration and it is easier to induce the instability. Second, the first unstable mode could be modified: $\tilde{q} \approx 10$ for the chosen

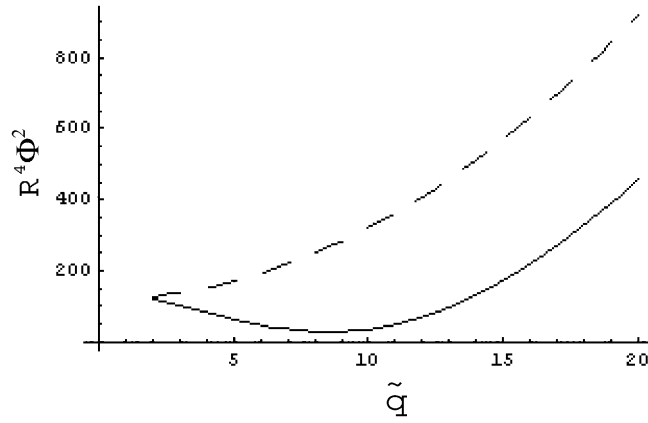


Fig. 3. Threshold concentration versus the reduced mode $\tilde{q}$ for two different values of (23) are taken as $\tilde{\alpha}_i = 1$, $\tilde{\kappa}_i = 1$, $\tilde{\Sigma}_i' = 60$, $\tilde{\beta}_i(L_c/R_i)^2 = 0.01$. The solid line is the case of large tilt due to each protein: $\tilde{A}_i = 1.7$. The dashed curve is the case of a small tilt: $\tilde{A}_i = 0.01$.

numerical values. So, we have something more complex than the simple oblate/prolate (x_0) deformation. This regime is observable and probably corresponds to the observed shape instability. In any case, our basic state cannot be seen in the experiment except as a transient.

The existence of these two regimes, depending on the nature of the proteins, allows two possible and distinct scenarios for the cell: there is no doubt that this property is useful and probably used for biological purpose. The main difficulty of this study is the quantitative determination of the parameters since experimental values are not available even for this minimal model. Let us estimate c . The curvature of the membrane is of order $1/R_i$, its surface is close to R_i^2 . κ is of order $10 kT$ for an unstretched vesicle, so $\tilde{\kappa} \approx 10$. α , the cost of energy needed to increase the concentration of proteins, can be deduced from the energy required to remove a protein from the surface which is about $100 kT$. It changes the concentration of proteins of $1/R_i^2$ so $100 kT = \alpha_i/R_i^2$ and $\tilde{\alpha} \approx 100$. β is deduced from L_c which should be a small fraction of the radius of the sphere. We will take hereafter $L_c \approx R_i/10$. The proteins are moving at the surface of the membrane due to the Brownian motion. So the energy to move one protein by the length L_c is about kT . Then, $\beta_i = kTL_c^2 R_i^2$ and $\tilde{\beta}_i \approx 1$. The value of A_i is more difficult to determine. A_i is the coupling constant between the membrane and the proteins. This is expressed by the spontaneous curvature radius R_P . If R_P is small, the coupling effect is strong and, on the opposite, if R_P is large, A_i is small, which suggests that A_i is proportional to $1/R_P$. But A_i is an energy multiplied by a length. Then, a good order of magnitude for A_i is kTR_i^2/R_P , so $\tilde{A}_i = R_i/R_P$. Finally, we get $c \approx R_P/R_i$. If R_P is smaller than R_i , the system is in the strong coupling regime and in the other case, the interaction between membrane and proteins is weak. When the two phases have approximately the same physical constants [11], the instability occurs first in the largest phase, as shown by Eq. (23) in the previous conditions. Nevertheless, the ejection of one part of the membrane requires a complete nonlinear dynamical treatment which will be derived from this energy formulation.

5. Conclusions

We have proposed a model of instability for an inhomogeneous vesicle which absorbs proteins. This instability is at the origin of a separation into two vesicles, one for each phase as seen experimentally. Our model rests on a “bulk” effect and assumes that the proteins are distributed everywhere on the membrane contrary to the “line tension” model which assumes a high concentration of the proteins at the raft boundary. To validate (or invalidate) our model, an experimental test could be the use of phosphorescent proteins with the same properties. It would be a way to follow the place where the proteins prefer to diffuse and stay on the membrane. Although we ignore the feasibility of such an experiment, it would provide a very useful information.

Acknowledgements

We thank G. Staneva, M. Angelova and K. Koumanov for communicating their results prior to publication. We acknowledge enlightening discussions with J.B. Fournier.

Appendix A. Spherical cap harmonics

The spherical cap harmonics are eigenvalues of the Laplace’s equation in spherical coordinates. The Laplace’s problem can then be rewritten as a Legendre’s equation. The general solution is:

$$U_n^m = f(\phi)L_{x_l}^m(\cos \theta)$$

with θ the colatitude, ϕ the longitude and $L_{x_l}^m$ an associated Legendre function. The eigenvalues associated to this solution are m^2 and $-x_l(x_l + 1)$. So the solutions are symmetric with respect to $x_l = -1/2$. So we can restrict to $x_l \geq -1/2$ in all cases.

Generally speaking, m and x_l can be integer, real or even complex and are determined by the boundary conditions. For a sphere, the solution must be periodic in the ϕ angle. This implies m real. In the particular case of an axisymmetric solution, which is the case in this paper, $m = 0$.

The boundary condition on θ for $\theta = 0$ is a condition of regularity:

$$\frac{\partial U_{x_l}^0}{\partial \theta} = 0 \quad \text{for} \quad m = 0, \quad (\text{A.1})$$

$$U_{x_l}^m = 0 \quad \text{for} \quad m \neq 0. \quad (\text{A.2})$$

It is satisfied by the Legendre functions of the first kind and excludes those of the second kind. Notice that this condition is required both for a complete sphere and for a spherical cap.

In the case of the sphere, the boundary condition $\theta = \pi$ is similar to Eq. (A.1). The values of x_l are then integer and the solutions are the classical associated Legendre polynomials.

Table 1

Values of y_l for $m = 0$ for the 7 first values of l

l	0	1	2	3	4	5	6
$\theta_0 = \pi/6$	4.08	10.04	16.03	22.02	28.01	34.01	40.01
$\theta_0 = 5\pi/6$	0.35	1.57	2.78	3.98	5.19	6.39	7.59

For a spherical cap whose ends are given by $\theta = \pm\theta_0$, the boundary conditions at θ_0 are given by standard physical requirements. These boundary conditions can be satisfied by using two kinds of solutions such that either:

$$\frac{\partial U_{x_l}^m}{\partial \theta} = 0 \quad \text{for} \quad \theta = \pm\theta_0 \quad (\text{A.3})$$

or

$$U_{x_l}^m = 0 \quad \text{for} \quad \theta = \pm\theta_0 \quad (\text{A.4})$$

These conditions are satisfied by Legendre functions $P_{x_l}^m(\cos \theta)$ with x_l not necessary integer. No function can satisfy simultaneously the conditions (A.3) and (A.4) and there is two sets of x_l which depend on the m value. We call $z_l(m)$ the values of x_l such as (A.3) is satisfied and $y_l(m)$ the values of x_l such as (A.4) is satisfied.

Functions in one set are orthogonal to each other but are not orthogonal to those of the other set. It is easy to show that:

$$\begin{aligned} \int_0^{\theta_0} P_{y_{l_1}(m)}^m(\cos \theta) P_{y_{l_2}(m)}^m(\cos \theta) \sin \theta \, d\theta &= 0 \quad \text{for} \quad l_1 \neq l_2, \\ \int_0^{\theta_0} P_{z_{l_1}(m)}^m(\cos \theta) P_{z_{l_2}(m)}^m(\cos \theta) \sin \theta \, d\theta &= 0 \quad \text{for} \quad l_1 \neq l_2, \\ \int_0^{\theta_0} P_{y_{l_1}(m)}^m(\cos \theta) P_{z_{l_2}(m)}^m(\cos \theta) \sin \theta \, d\theta \\ &= - \frac{\sin \theta_0 P_{y_{l_1}(m)}^m(\cos \theta) \{ [P_{z_{l_2}(m)}^m(\cos \theta)] / d\theta \}}{(y_{l_1} - z_{l_2})(y_{l_1} + z_{l_2} + 1)}. \end{aligned}$$

If the physics requires the boundary condition (A.3) or (A.4), the set of solutions y_l or z_l is enough to form a basis of solution of the problem. In the other case, one have to combine both of them and the resolution of the complete problem becomes more harder. In the case of this paper, we focus on the case of axisymmetric solutions ($m = 0$). The boundary conditions are given by (A.4), so the good set of parameters are the $y_l(0)$. Table 1 presents the first values of y_l , calculated for two angles θ_0 ($\pi/6$ and $5\pi/6$), chosen as example. Fig. 4 shows the three first P_{y_l} for $\theta_0 = \pi/6$. Fig. 5 shows the three first P_{y_l} for $\theta_0 = 5\pi/6$. Fig. 6 shows the deformation of the spherical cap in the case of a perturbation by the three first P_{y_l} for $\theta_0 = \pi/6$.

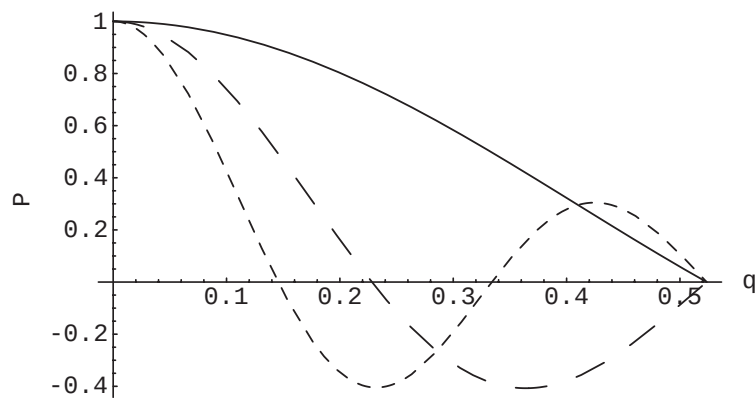


Fig. 4. Legendre functions P_{y_l} versus the angle θ for $\theta_0 = \pi/6$ and for $l = 0$ (solid curve), $l = 1$ (large dashing) and $l = 2$ (small dashing).

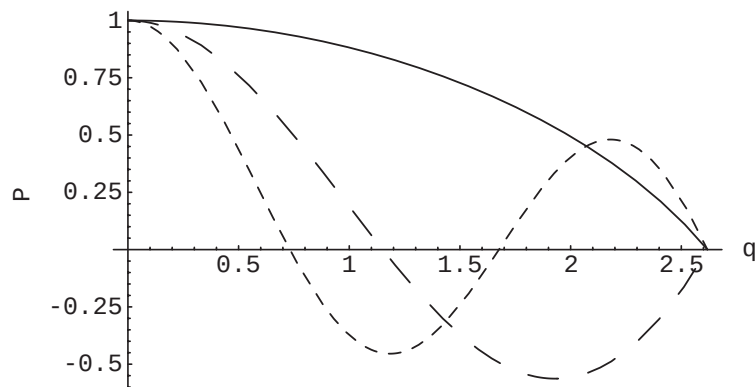


Fig. 5. Legendre functions P_{y_l} versus the angle θ for $\theta_0 = 5\pi/6$ and for $l = 0$ (solid curve), $l = 1$ (large dashing) and $l = 2$ (small dashing).

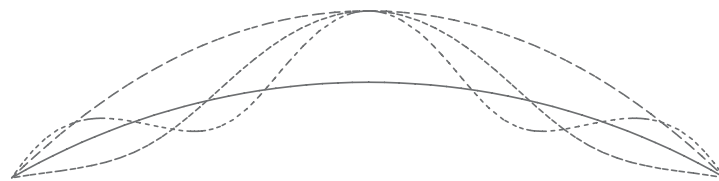


Fig. 6. Deformations of a spherical cap of radius 1 and half-angle $\pi/6$. The deformations are due to Legendre functions P_{y_l} . For clarity, the maximum amplitude of the deformation is fixed to 0.1. This value is too large in principle for the linear analysis. The solid curve is the initial state. The largest dashing is the case $l = 0$. The intermediate dashing is the case $l = 1$. The smallest dashing is the case $l = 2$.

References

- [1] S.J. Singer, G.L. Nicolson, *Science* 175 (1972) 720.
- [2] D.A. Brown, J. Rose, *Cell* 68 (1992) 533.
- [3] K. Simons, E. Ikonen, *Nature* 387 (1997) 569;
D.A. Brown, E. London, *J. Biol. Chem.* 275 (23) (2000) 17221;
G. van Meer, *Science* 296 (2002) 855.

- [4] T.-Y. Wang, J.R. Silvius, *Biophys. J.* 84 (1) (2003) 367.
- [5] C. Dietrich, et al., *Biophys. J.* 82 (1) (2002) 274.
- [6] W.L. Smith, A.H. Merrill, *J. Biol. Chem.* 277 (29) (2002) 25841.
- [7] G. Van Meer, Q. Lisman, *J. Biol. Chem.* 277 (29) (2002) 25855.
- [8] C. Dietrich, et al., *Biophys. J.* 80 (3) (2001) 1417.
- [9] S.L. Veatch, S.L. Keller, *Phys. Rev. Lett.* 89 (26) (2002) 268101.
- [10] G. Staneva, M. Angelova, K. Koumanov, *J. Chem. Phys. Lipids*, to be published.
- [11] T. Baumgart, S.T. Hess, W.W. Webb, *Nature* 425 (2003) 821–825.
- [12] C.-M. Chen, P.G. Higgs, F.C. MacKintosh, *Phys. Rev. Lett.* 79 (1997) 1579.
- [13] P.B. Canham, *J. Theor. Biol.* 26 (1970) 61.
- [14] W. Helfrich, *Z. Naturforsch., Teil C* 28 (1973) 693.
- [15] L. Miao, B. Fourcade, M. Rao, M. Wortis, *Phys. Rev. A* 43 (12) (1991) 6843.
- [16] U. Seifert, K. Berndl, R. Lipowsky, *Phys. Rev. A* 44 (2) (1991) 1182–1202.
- [17] M. Jaric, U. Seifert, W. Wintz, M. Wortis, *Phys. Rev. E* 52 (6) (1995) 6623.
- [18] F. Jülicher, R. Lipowsky, *Phys. Rev. E* 53 (3) (1996) 2670.
- [19] H.-G. Döbereiner, E. Evans, M. Kraus, U. Seifert, M. Wortis, *Phys. Rev. E* 55 (4) (1997) 4458.
- [20] U. Seifert, *Adv. Phys.* 46 (1) (1997) 13.
- [21] S. Leibler, *J. Phys.* 47 (1986) 507.
- [22] U. Seifert, *Phys. Rev. Lett.* 70 (9) (1993) 1335.
- [23] J.-B. Fournier, A. Adjari, L. Peliti, *Phys. Rev. Lett.* 86 (21) (2001) 4970.
- [24] F. Daumas, N. Destainville, C. Millot, A. Lopez, D. Dean, L. Salomé, *Biophys. J.* 84 (1) (2003) 356.
- [25] T. Bickel, C. Marques, *Phys. Rev. E* 62 (1) (2000) 1124.
- [26] F. Brochard, P.G. De Gennes, O. Sandre, *Physica A* 278 (1–2) (2000) 32.
- [27] G.V. Haines, *J. Geophys. Res.* 90 (1985) 2583;
W.R. Smythe, *Static and Dynamic Electricity*, 2nd Edition, McGraw-Hill, New York, 1950;
A.E. Love, *A Treatise on the Mathematical Theory of Elasticity*, Dover, New York, 1944.
- [28] S. Mori, M. Wadati, *J. Phys. Soc. Jpn.* 62 (10) (1993) 3557.

IV.5 Article "Budding and Fission of Multiphase Vesicle"

Budding and Fission of a Multiphase Vesicle

Jean-Marc Allain

Laboratoire de Physique Statistique,
Ecole Normale Supérieure, Paris, France

Martine Ben Amar¹

Laboratoire de Physique Statistique,
Ecole Normale Supérieure, Paris, France

¹Corresponding author. Address: Laboratoire de Physique Statistique, Ecole Normale Supérieure, 24 rue Lhomond, Paris, 75231 Cedex, France, Tel.:(33)-1-44-32-34-77, Fax: (33)-1-44-32-34-33

Abstract

We present a model of bi-phasic vesicles in the limit of large surface tension. In this regime, the vesicle is completely stretched and well described by two spherical caps with a fold, which concentrates the membrane stress. The conservation laws and geometric constraints restrict the space of possible shapes to a pair of solutions labeled by a parameter $\tilde{\sigma}$ given by *line tension/pressure*. For a given value of $\tilde{\sigma}$, the two solutions differ by the length of the interface between domains. For a critical value, $\tilde{\sigma}_c$, the two vesicle shapes become identical and no solution exists above this critical value. This model sheds new light on two proposed mechanisms (osmotic shocks and molecule absorption) to explain the budding and the fission in recent experiments.

Key words: Budding; Fission; Bifurcation; Membrane; Raft; Vesicle

Introduction

The cell membrane is a bilayer made out of a mixture of lipid species. The membrane can be either the outer boundary of the cell or an interface separating different compartments inside the cell. This soft structure has many biological properties and also realizes intracellular traffic: a membrane vesicle buds from one compartment, travels through the cytosol and fuses with another compartment. Despite the fluidity of the lipid bilayer, the cellular membrane presents a lateral inhomogeneity due the formation of dynamical microdomains, called rafts (1). These microdomains have been shown to be rich in cholesterol and sphingolipid (2). *In vivo*, the rafts have not been directly observed but their size has been estimated to be between 20 and 700 nm (3). A central question in membrane biology and biophysics is to understand how this spatial organization is used by the cell, in particular to favor interactions with proteins. Due to their size and specific composition, it has been argued that rafts play a role in protein docking, signaling, intracellular traffic (4) or virus budding (3).

Recently, a model system of Giant Unilamellar Vesicles (GUV) including sphingomyelin-cholesterol domains was developed (5). These domains, which are supposed to reproduce raft composition, are the result of a phase separation of the lipid species (6). They are more structured than the surrounding classical liquid bilayer but remain in a liquid state. For this reason, they are called "liquid-ordered" domains whereas the classical membrane is called "liquid-disordered". A large number of studies have focused on the thermodynamic of liquid-ordered phases, in particular the effect of temperature or composition changes on domain formation (6, 7). Multi-phase vesicles are elegant and efficient tools to study the mechanical properties of microdomains. They can be used to understand how rafts bud and make daughter vesicles for intracellular traffic, but also how detergent addition can isolate rafts from the cell membrane. Recent experiments have shown that liquid-ordered domains can be separated from the initial vesicle by using tubular deformations (8), osmotic shocks (9) (G. Staneva, personal communication) or absorption of external molecules like proteins or detergents (10, 11). Here, we develop a macroscopic theory for the last two situations. Our model describes the budding preceeding the fission where the liquid-ordered domain lifts up from the liquid-disordered vesicle.

Budding and fission have already attracted many theoretical works for vesicles made by a mixture of lipids, segregated into two phases or not (12–

18). The models vary depending on the physical interactions involved but they are all based on the minimization of the bilayer energy. For a vesicle with one phase, the budding is induced by molecules whose shape is different from the main lipids of the membrane: if the molecules prefer a curved bilayer, they will favor the formation of a bud. These models rest on a continuous approach and are well adapted to describe the absorption of external molecules (19, 20) or a mixture of lipids (12, 21). Even when the concentration of molecules is strongly inhomogeneous, this approach does not describe a true phase separation. For a bi-phasic vesicle, a line tension exists between the two phases, trying to reduce the interface length, and favoring the budding (22). Previous studies have mainly focus on two cases: a constant surface with a volume free to adjust (13, 23) and a constant surface with a fixed volume (13, 24). In both cases, the shape of the vesicle is controlled by the geometric constraints and by the invagination length ζ , the ratio between the bending rigidity and the line tension. If the volume is free to change, a discontinuous budding transition has been predicted then the line tension increases, favoring the budding of larger domains (23). On the contrary, for a fixed volume, the transition is continuous, the larger domains remaining the first to be ejected (13).

We focus our attention on multi-phase stretched vesicles, a situation often encountered in experiments. In this case, osmotic pressure effects dominate and stretch the bilayer. Thus, the vesicles can be described by two spherical caps with an elastic junction. Our model is also suitable for a vesicle with a fixed volume, as soon as the two-spherical-cap description remains valid but the conclusions are then different; this case has been already treated numerically by F. Jülicher and R. Lipowsky (13). The variational procedure with surface constraints allows to find two solutions for any ratio $\tilde{\sigma} = \text{line tension}/\text{pressure}$ less than a critical value $\tilde{\sigma}_c$. The stable solution is the one observed experimentally. An osmotic shock increases the control parameter $\tilde{\sigma}$ and induces a budding, which may lead the system to a complete fission if $\tilde{\sigma}$ reaches the critical value. The case of detergents is slightly different since it requires an additive energy for molecular absorption in the membrane. As a large number of different detergents can be used to achieve the budding (11), we restrict on a common characteristic: the conical shape. Therefore, when detergent molecules are added in the membrane, they locally deform the bilayer. According to Leibler's model (19), the deformation due to these molecules is taken into account via an elastic contribution simultaneously proportional to the average curvature and the molecule concentration.

Stretched bilayers favor homogeneous concentration of molecules except at the interface between domains. We show that chemical inhomogeneities contribute to an effective line tension, not necessarily positive. Depending on the concentration, this effective line tension can induce a budding and a possible fission into two independent vesicles.

This paper is organized as follows. The next section is devoted to a detailed description of the model and defines the energies involved in the physics of the vesicle, such as the stretching of the bilayer, the bending of the vesicle or the absorption of molecules. A section on the vesicle shape finds analytically the shape of a stretched multi-domains vesicle below a critical parameter and above predicts a topological bifurcation. This explains the fission induced by a change of osmotic pressure. The last section extends this treatment to the absorption of molecules.

Membrane description.

Inhomogeneous lipid bilayer.

We consider an inhomogeneous vesicle made of two lipid phases: a 'liquid-ordered' (l_o) and a 'liquid-disordered' (l_d). Both phases are in the liquid state but the (l_o) domain is more structured than the (l_d) phase for the following reasons: there exists specific interactions between molecules (25) and/or a possible optimization of biphilic space packing (26). Steady morphologies and their out-of-plane deformations are commonly described by the Canham and Helfrich's model with energy for each phase i given by:

$$F_m^i = \int_S \left[2\kappa_i H^2 + \kappa_G^{(i)} K + \Sigma_i \right] dS \quad (1)$$

H and K are respectively the mean and Gaussian curvature. The elastic bending rigidity κ_i and Gaussian rigidity $\kappa_G^{(i)}$ are expected to be higher in the l_o phase. Typical values can be found for example in (27): $\kappa_{l_d} \simeq 20k_bT$ and $\kappa_{l_o} \simeq 80k_bT$. Values of Gaussian moduli are notoriously more difficult to measure but a recent study mentions values of order $\kappa_G^{(i)} = -0.83\kappa_i$ (28). Although F_m^i is a surface integral, the Gaussian contribution to the energy is indeed a contour integral calculated at the interface between the two domains, according to the Gauss-Bonnet theorem. The most general Canham and Helfrich's model also includes a spontaneous curvature, allowing a dif-

ference between the two leaflets. In general, for multi-phases vesicles, the lipid bilayer is symmetric, with no spontaneous curvature (29). Introducing the spontaneous curvature does not change the results of this paper so, for simplicity, we assume a symmetric bilayer.

The last contribution in Eq.1 is related to the possible extension of the membrane. For a stretched vesicle, this contribution is large compared to the elastic energy. Moreover, stretching the surface of the vesicle for more than 3% forms pores in the bilayer (27), not observed in the fission experiments. Therefore, the membrane surface can be considered as constant. This is taken into account by introducing the Lagrange multiplier Σ_i .

The total energy of the two-domain vesicle includes the energy (Eq. 1) of each phase plus two coupling terms. First, a sharp interface of vanishing thickness exists between the l_o and l_d phases. Any increase of its length requires an energy proportional to a line tension σ . Second, the vesicle membrane is lightly permeable to the water but not to the ions or large molecules present in the surrounding water. This induces an osmotic pressure P . The energy of the coupling terms is:

$$F_c = \sigma \int_C dl - \int_V P dV \quad (2)$$

The osmotic pressure normally varies with the enclosed volume. For a tense membrane, it is possible to assume the osmotic pressure to be constant (see Appendix A). Using a variable osmotic pressure will complicate the calculations without modifying the main results of this paper.

Proteins or detergent-membrane interactions

External molecules such as proteins or detergents can be absorbed in both phases but with different efficiencies. We choose a Landau's approach with an optimal homogeneous concentration ϕ_{eq} . Departure from this value or inhomogeneity of concentration ϕ has a cost in energy, quadratic to leading order and measured by two positive constants in each phase: α_i and β_i . If the proteins are soluble or not in the surrounding medium, we can either set the number of these molecules in each phase or set the chemical potential μ_i of the phase i . We choose to fix the chemical potential μ_i but this has no real consequence on the results since it only modifies the definition of μ_i .

Therefore the free chemical energy of absorption for each phase is:

$$F_p^i = \int_{S_i} \left(\frac{\alpha_i}{2} (\phi - \phi_{eq_i})^2 + \frac{\beta_i}{2} (\nabla \phi)^2 + \mu_i \phi \right) dS + \int_{S_i} \Lambda_i H \phi dS \quad (3)$$

The last integral in Eq.3 represents the local distortion of the membrane induced by the absorbed molecules (19, 30). It is proportional to the mean curvature of the membrane with a weight depending on the local concentration ϕ , as suggested by S. Leibler (19), Λ_i being a coupling constant.

The energy (Eq.3) is valid only for passive molecules (no chemical activity), their physical characteristics being included in the parameters μ_i , α_i , β_i and Λ_i . Values of these parameters can be derived from molecular dynamic simulations or simply estimated by simple physical arguments. Typical values of the interaction energy between two molecules soluble in the surrounding water is kT (it is more for not soluble molecules). Hence the chemical potential of detergents is about nkT with n the number of molecules inside the bilayer. For a flat membrane of surface S , the optimal concentration ϕ_o is related to the parameter α by $\mu = \alpha \phi_o = \alpha n / S$. Therefore, $\alpha \approx SkT$. In our case, we get $\alpha \approx R^2 kT$. The size l_c of a step in concentration is given by the relation $\beta = \alpha l_c^2$. Then, $\beta \approx l_c^2 R^2 kT$, the chemical length being typically 10 nm.

The estimate of the coupling constant Λ is more difficult. Many studies have focused on the microscopic deformations of the curvature by molecules (see for example (31–34)) but, to our knowledge, there is no obvious link between the microscopic and macroscopic descriptions, except for one molecule (35). We propose the following argument for a naive estimate of Λ . Its dimension is an energy multiplied by a length. The typical energy associated with the deformation of the bilayer is κ . Each molecule imposes a conical deformation to the bilayer (φ being the angle of the cone). For a conical molecule, this angle is related to its shape; for a molecule with a chain in the surrounding water, the angle is function of the free displacements of the chain (30). The induced curvature increases with φ . Hence, the parameter Λ can be estimated as $\Lambda \approx \pm \kappa \varphi R_m$ with R_m a typical length. For a conical molecule, R_m is the lateral size of the molecule and for a molecule with a mobile hydrophilic chain, R_m is the radius of gyration of the chain.

The sign of the coupling constant is given directly by the deformation of the bilayer. This sign depends on the definition of the mean curvature. We choose the convention that a spherical vesicle has a positive mean curvature.

Then, positive values of Λ imply that the molecules tend to decrease the local vesicle radius. For example, this is obtained for conical molecules absorbed on the external leaflet, when the molecule hydrophilic part is larger than the hydrophobic one. We restrict to the case where the adsorption takes place on one side only. When the two layers are concerned, our theoretical framework can be easily extended by the introduction of two concentration fields.

Finally, the total free energy of the system is given by:

$$F_{TOT} = F_m^o + F_m^d + F_p^o + F_p^d + F_c \quad (4)$$

The standard variational procedure to find extrema of this energy produces the so-called Euler-Lagrange equations.

Euler-Lagrange equations.

Minimization of the free energy F_{TOT} gives the stable static solutions for the membrane. Looking for axisymmetric shapes, we choose the cylindrical coordinates and we parameterize the surface by the arc-length s . The vesicle shape is given by $r(s)$ and $\psi(s)$ (see Fig. 1). The Euler-Lagrange equations associated with F_{TOT} are (36):

$$\psi'' = \frac{\sin(\psi) \cos(\psi)}{r^2} - \frac{\psi'}{r} \cos(\psi) - \frac{Pr}{2\kappa_i} \cos(\psi) + \frac{\gamma}{\kappa_i r} \sin(\psi) + \frac{\Lambda_i}{\kappa_i} \phi' \quad (5a)$$

$$\begin{aligned} \gamma' = & \frac{\kappa_i}{2} \psi'^2 - \frac{\kappa}{2r^2} \sin(\psi)^2 + \tilde{\Sigma}_i - Pr \sin(\psi) - \Lambda_i \phi \psi' + \frac{\alpha_i}{2} \phi^2 \\ & + \frac{\beta_i}{2} \phi'^2 + \tilde{\mu}_i \phi \end{aligned} \quad (5b)$$

$$\phi'' = -\phi' \frac{\cos(\psi)}{r} - \frac{\Lambda_i}{\beta_i} \left(\frac{\sin(\psi)}{r} + \psi' \right) + \frac{\alpha_i}{\beta_i} \phi + \frac{\tilde{\mu}_i}{\beta_i} \quad (5c)$$

$$r' = \cos(\psi). \quad (5d)$$

with γ a local Lagrange multiplier used to impose the geometric constraint between r' and $\cos(\psi)$ in the minimization process. To simplify the notations, we introduced the following parameters: $\tilde{\Sigma}_i = \Sigma_i + \alpha_i/2\phi_{eq_i}^2$ and $\tilde{\mu}_i = \mu_i - \alpha_i\phi_{eq_i}$. Assuming $(\phi = 0)$ gives the classical equations of an axisymmetric vesicle (13, 36). These equations have to be solved with the correct boundary conditions at the border between the two domains, these conditions being the results of the variational procedure. Assuming continuity of both the radius

r , the angle ψ and the molecule concentration ϕ , one finds

$$\kappa_1 \psi'(s_J - \epsilon) r(s_J) + (\kappa_1 + \kappa_{G_1}) \sin(\psi(s_J)) - \Lambda_1 \phi(s_J) r(s_J) \quad (6a)$$

$$- \kappa_2 \psi'(s_J + \epsilon) r(s_J) - (\kappa_2 + \kappa_{G_2}) \sin(\psi(s_J)) + \Lambda_2 \phi(s_J) r(s_J) = 0,$$

$$\gamma(s_J - \epsilon) - \gamma(s_J + \epsilon) + \sigma = 0 \quad (6b)$$

$$\beta_1 \phi'(s_J - \epsilon) - \beta_2 \phi'(s_J + \epsilon) = 0. \quad (6c)$$

where s_J is the arc-length at the junction, label 1 denotes the phase for $s \leq s_J$ and label 2 the phase for $s \geq s_J$.

Since the equations of the shape and the boundary conditions are highly non-linear, there is no exact solutions for arbitrary values of the physical parameters. However further analytical progress can be obtained in the limit of large pressure (stretched membrane). Remarkably, this treatment only requires simple analytical algebra and allows to explain experimental features such as the complete budding of the ordered phase as it has been observed by different groups using either osmotic shocks (9), proteins (10) or detergent molecules (11)

Analytical treatment of the membrane shape.

We first consider a membrane without addition of extra molecules. An obvious solution of the Euler-Lagrange equations can be easily found if we discard the elasticity. Our purpose is then to use this simple solution as zeroth order and correct it for small but not vanishing values of the bending rigidity by using boundary layer analysis. We consider also the inclusion of passive molecules and show that at least for weak coupling between curvature and concentration, a similar strategy applies.

The constraint on the total area S_{TOT} allows to define a length scale R_0 by $4\pi R_0^2 = S_{TOT}$ and an energy scale with the osmotic pressure: PR_0^3 . Hereafter, we will use dimensionless parameters. For example, we have:

$$\tilde{s} = \frac{s}{R_0}, \tilde{R} = \frac{R}{R_0}, \tilde{\kappa} = \frac{\kappa}{PR_0^3} \text{ or } \tilde{\sigma} = \frac{\sigma}{PR_0^2}$$

The exact zero-order model: the capillary solution.

After electro-formation, GUV vesicles are usually stretched and the osmotic pressure dominates the elastic energy. The two-spherical caps, solution of the Euler-Lagrange equations with $\kappa_i = 0$, are defined by a set of four geometrical parameters: the radii of the two caps R_1, R_2 (or $\tilde{R}_1, \tilde{R}_2$) and the two angles at the boundary θ_1 and θ_2 (see Fig. 2). The Euler-Lagrange equations (Eq.5) give the values of the two Lagrange multipliers $\tilde{\Sigma}_i$ and $\tilde{\gamma}_i$, without direct information on the vesicle shape:

$$2\tilde{\Sigma}_i = \tilde{R}_i, \quad (7a)$$

$$\tilde{\gamma}_i(s) = \frac{\tilde{R}_i^2}{2} \sin \psi \cos \psi. \quad (7b)$$

the angle ψ being proportional to the arc-length $\tilde{s}$. The shape is fixed only by the boundary conditions and by the constraints on the fraction f occupied by the domain 1:

$$\tilde{R}_1 \sin \theta_1 = \tilde{R}_2 \sin \theta_2 \quad (8a)$$

$$\tilde{R}_1^2 \sin \theta_1 \cos \theta_1 = \tilde{R}_2^2 \sin \theta_2 \cos \theta_2 - 2\tilde{\sigma} \quad (8b)$$

$$2\pi \tilde{R}_1^2 (1 - \cos \theta_1) = f \quad (8c)$$

$$2\pi \tilde{R}_2^2 (1 + \cos \theta_2) = 1 - f \quad (8d)$$

Two parameters control the shape of the vesicle: the reduced line tension $\tilde{\sigma} = \sigma/PR_0^2$ and the fraction f . Experimentally, it is easier to change the reduced line tension, by an osmotic shock for example. We will see that also addition of molecules may modify $\tilde{\sigma}$. Notice that the angle ψ is not continuous at the interface. This is possible if elasticity is ignored.

This approach assumes a stretched vesicle, with a constant osmotic pressure. For a flappy vesicle, at fixed volume, we can apply an analogous analysis providing that both domains remain nearly spherical which is seldom the case (12). So, in this case, numerical approaches are more suited.

The set of equations (Eq.8) has either two solutions or no solution depending on the value of $\tilde{\sigma}$ at fixed f . As an example, consider the vesicles prepared by electroswellling (37), which makes usually tense membranes but without control on the final osmotic pressure. Referring to the figure (1b) in Baumgart et al.'s work (9), reproduced here in figure 3, we calculate $R_0 = 10.7 \mu m$, $f = 9.5\%$ and $\tilde{\sigma} = 0.18$, from estimated values of R_1, R_2 ,

θ_1 and θ_2 . Using the value of the line tension measured by Baumgart et al. (37) ($\sigma = 7.10^{-13} \text{N}$), we get $P = 3.10^{-2} \text{Pa}$. The reduced bending rigidity is then $\tilde{\kappa} \approx 0.01$ which shows that elasticity can be neglected in a first step.

Solving Eq.8 for the experimental values of $\tilde{\sigma}$ and f gives two possible solutions: $\tilde{R}_1 = 0.5$, $\tilde{R}_2 = 0.98$, $\theta_1 = 1.34$ and $\theta_2 = 0.514$, the measured values (Fig. 4(a)) but also $\tilde{R}_1 = 0.37$, $\tilde{R}_2 = 0.97$, $\theta_1 = 1.34$ and $\theta_2 = 0.514$ for the second solution (Fig. 4(b)). In order to explain why the first solution is preferred in the experiment, we calculate the dimensionless energy reduced to: $\tilde{F}_{TOT} = -V/R_0^3 + 2\pi\tilde{\sigma}\tilde{R}_1 \sin \theta_1$. It gives respectively (-3.64) compared to (-3.59), which is consistent with experimental observations since only stable vesicles (with the lowest energy) can be observed.

A systematic study of the pair of solutions for arbitrary values of $\tilde{\sigma}$ is straightforward and the results are presented in figure 5. Figure 5a is a classical bifurcation diagram when a pair of solutions exists but only one is stable. In this problem, $\tilde{\sigma}$ is the control parameter and the energy $\tilde{F}_{TOT}$ is the order parameter. These two solutions differ geometrically, the unstable solution presenting a smaller neck at the junction compared to the stable one (obvious if $\tilde{\sigma} = 0$) (see Fig 5b). As $\tilde{\sigma}$ increases, the two solutions become geometrically closer up to a finite value of $\tilde{\sigma}_c$. Above the critical value ($\tilde{\sigma} \geq \tilde{\sigma}_c$), there is no connected solution to the Euler-Lagrange equations but a couple of disjoining spheres remains a plausible solution. This critical value $\tilde{\sigma}_c$ is determined by Eq.8b which gives the equilibrium of the forces in the radial direction (axis r). The term in $\tilde{\sigma}$ is due to the line tension and its effect pinches the vesicle. The two other terms (in $\tilde{R}_1^2$ and $\tilde{R}_2^2$) are related to the stretching of the domains and are bounded. The critical value $\tilde{\sigma}_c$ corresponds to the maximal force on the vesicle. For higher line tensions (or smaller pressures), it is no longer possible to compensate the stretching by the line tension and the system splits into two independent vesicles.

The transition is a dynamical process and have similarities with the breaking of a soap film between two rings (the catenoid instability) (38). Nevertheless, complete fission requires a microscopic reorganization, such as hemifission (39) which occurs at small scales and is out of reach of the present treatment. It is why we cannot predict if the two daughter vesicles remain connected by a small filament of lipids or prefer to separate.

The shape of the vesicle is also controlled by the fraction f of the domain 1. Variations of the critical parameter $\tilde{\sigma}_c$ with the fraction f leads to a phase diagram for the connected vesicle (see Fig. 6). The diagram is symmetric with respect to $f = 1/2$ since in absence of elasticity the two domains

are equivalent. Small domains are less stable than large ones for a stretched vesicle. A physical explanation can be found by considering flat domains on a flat surface. If the radius of the domain is r , the pinching energy (due to the line tension) is approximatively σr and the resistance energy (due to the pressure) is approximatively Pr^3 . The balance of both energies gives $\sigma/P \approx r^2$. Therefore, it is harder to destabilize a large domain than a small one. Theoretical studies on flappy vesicles with fixed volume show that large domains are ejected before the small ones (13), contrary to the case studied here which concerns stretched vesicles at constant osmotic pressure. Controlling the osmotic pressure for weakly stretched vesicles could lead to a better understanding of all intermediate cases between these two limits.

Localization of the elastic deformation.

We study now the robustness of the model when elasticity is taken into account. Comparing the bending energy (Eq.1) to the osmotic pressure energy (Eq.2) one finds that elastic effects can be neglected if $\kappa_i \ll PR_i^3$ in each phase. However, the zero-order model gives a slope discontinuity at the interface between the two domains, responsible for a singularity in the curvature. As soon as the bending modulus is not exactly zero, this discontinuity produces an infinite elastic energy density, localized near the junction, in contradiction with the weakness of elasticity. We are faced with a classical boundary layer model, as found for example in the crumpling of an elastic plate (40) or the folding of an elastic shell (41). For small but not zero κ_i values, the elasticity of the membrane prevents the discontinuities near the junction by smoothing out the vesicle profile locally (see Fig. 2) on a characteristic distance of order the elastic length l_e in each phase:

$$l_e = \sqrt{\frac{\kappa_i}{PR_i}}.$$

Experimental determinations of the osmotic pressure give values higher than 10^{-2}Pa (9, 37, 42). Using typical values for giant vesicles ($\kappa \approx 10^{-19}\text{J}$, $R \approx 10\mu\text{m}$), we get $l_e \leq 1\mu\text{m}$, which is small compared to $R_i \simeq 10\mu\text{m}$. We can model our system as two spherical caps slightly distorted at the junction on a distance of order l_e : far away from the fold, the spherical solution (denoted by S) is a good approximation but it has to be corrected by a boundary layer (denoted by B) of size $\tilde{l}_e = l_e/R_i$ near the interface. We

decompose ψ , r and γ into

$$\psi = \psi_S + \psi_B(\tilde{l}) \quad ; \quad r = r_S + \tilde{l}_e r_B(\tilde{l}) \quad ; \quad \gamma = \gamma_S + \tilde{l}_e \gamma_B(\tilde{l}). \quad (9)$$

with $\psi_S = \theta_1$ or $\psi_S = \theta_2$ and the new arclength parameter $\tilde{l} = (\tilde{s} - \tilde{s}_J)/\tilde{l}_e$. The quantities ψ_B , r_B and γ_B must vanish far away from the junction.

The leading order of Eq.5 gives

$$\ddot{\psi}_B = \sin \psi_B. \quad (10)$$

This is the pendulum equation, which has explicit analytical solutions (see appendix B). The shape in the boundary layer does not depend on the Gaussian modulus κ_G . This modulus appears in the boundary condition Eq.6a and has the same order of magnitude as the bending modulus κ . In the general case, its contribution can be important on the membrane shape (8, 37) but, for a stretched vesicle, it disappears (see Eq.20 of Appendix B). Taking into account the possible spontaneous curvature of the membrane does not modify the pendulum equation.

From Eq.4 and 10, we derive the elastic energy in each phase. This energy is localized at the junction and is proportional to the interface length, in the same way as a line tension:

$$\begin{aligned} \sigma_{cusp_i} = & \sqrt{\kappa_i P R_i} \left\{ 2 \left[1 - \cos \left(\frac{\psi_J - \theta_i}{2} \right) \right] \right. \\ & \left. + \sin \theta_i \left[\sin \theta_i - \sin \left(\frac{\psi_J + \theta_i}{2} \right) \right] \right\}. \end{aligned} \quad (11)$$

The angle ψ_J is the angle ψ at the interface. It is fixed by the boundary conditions (Eq.6a) and depends on the ratio between bending rigidities (see appendix B). Using Baumgart et al.'s work (37), we determine $\kappa_o/\kappa_d \approx 4$, in agreement with ab initio numerical simulations which give $\kappa_o/\kappa_d = 5.0 \pm 1.56$ (37).

The effective line tension, including the elastic contributions modifies our control parameter

$$\bar{\sigma} = \frac{(\sigma + \sigma_{cusp})}{P R_0^2}.$$

The bifurcation diagram for a given fraction is the same as previously and, in particular, the value of the critical parameter $\tilde{\sigma}_c$ is the same with and

without elasticity. The elastic contribution σ_{cusp} is a non trivial function of the physical constants (P , κ_o and κ_d) and geometrical constants like the angles θ . Note that the effective line tension σ_{cusp} is not necessarily positive, contrary to σ but it remains small for weak membrane elasticity. If the elastic contribution σ_{cusp} is positive, it slightly favors the budding of the domains.

A variation of the control parameter $\bar{\sigma}$ modifies the angles θ_1 , θ_2 and ψ_J and then the elastic line tension σ_{cusp} . Figure 7 shows the values of the reduced line tension of the fold ($\tilde{\sigma}_{cusp} = \sigma_{cusp}/PR_0^2$) versus the reduced total line tension $\bar{\sigma}$. The solid line is $\tilde{\sigma}_{cusp}$ for the low energy solution. The dashed line is $\tilde{\sigma}_{cusp}$ for the high energy solution. The line tension of the fold must be smaller than the total line tension $\sigma + \sigma_{cusp}$ since the line tension σ due to the interface is positive. Therefore, some shapes are no longer physically allowed for the unstable solution. Figure 8 shows the energies of the vesicle versus the control parameter $\bar{\sigma}$ for the allowed solutions.

Elastic line tension is in general smaller than the physical line tension σ (see Fig.8). However, it may have a noticeable effect on the shape of the vesicle when the control parameter approaches the critical value $\tilde{\sigma}_c$: the interface length changes abruptly with the control parameter $\bar{\sigma}$ in this region. The elasticity also breaks the symmetry $f : (1 - f)$ in the diagram 9. Figure 9 shows the elastic line tension versus the fraction f of the domain 1. Note that the elastic line tension is negative for large domains, meaning that the elasticity resists to the pinching.

In the following, we treat the absorption of external molecules with the same approach.

Budding by molecule insertion

When specific molecules such as conical-shaped molecules or proteins (PLA₂) are introduced in the outer bilayer, they succeed to eject a domain which is transformed into an independent vesicle (see Fig.10). This instability looks like the observation made with a variation of the osmotic pressure and suggests a similar treatment.

When the molecules are distributed uniformly, the two-cap model remains a solution of the Euler-Lagrange equations. However, in a previous paper we have shown that the two-cap solutions may be unstable either above a critical homogeneous concentration given by $\bar{\phi}_{c_i} = PR_i^2/\Lambda_i$ or for very strong coupling $\Lambda_i^2/\kappa_i\alpha_i \gg 1$ (36). This instability characterizes each phase indi-

vidually which may exhibit a rippled shape, more complex than a spherical cap (10, 36). The existence of this instability does not mean that the ejection process is inhibited but it cannot be treated by a simple analytical treatment. Therefore, we consider the opposite limit with stable spherical caps. This implies that the concentration far away from the interface is homogeneous and smaller than $\bar{\phi}_{c_i}$, the ratio between the stretching effect (the osmotic pressure) and the coupling constant Λ_i . For concentrations higher than $\bar{\phi}_{c_i}$, the coupling effect due to the molecules is stronger than the vesicle tension. Our choice is justified by the fact that at each step of the fission the domains remain spherical.

Eq.5 connects the concentration of molecules to the chemical potential (μ_i) and modifies the area Lagrange multiplier Σ_i :

$$\mu_i = 2\frac{\Lambda_i}{R_i} - \alpha_i(\phi_i - \phi_{eq_i}) \quad (12a)$$

$$2\Sigma_i R_i^2 = P R_i^3 - 2\Lambda_i \phi_i R_i + \alpha(\phi_i^2 - \phi_{eq_i}^2) R_i^2 \quad (12b)$$

$$\gamma_i = \frac{P R_i^2}{2} \sin \psi \cos \psi \quad (12c)$$

In the following, we extend the analytical treatment to the absorption of molecules and we give an interpretation of the experimental observations.

Fold description

The interface is the place where strong chemical gradients of molecule distribution are found with typical lengthscale given by

$$l_c = \sqrt{\frac{\beta_i}{\alpha_i}}$$

which must be compared to the vesicle lengthscale R_i . Typical values of the chemical length l_c are 10 nm and the concentration gradients are localized at the fold ($l_c \ll R_i$). We can use a boundary layer method, in the same spirit as the treatment of the elasticity.

For distances larger than l_c , the concentration of molecules is constant and reaches the value $\bar{\phi}_i$ that we choose as unit in each phase: so $\tilde{\phi}_i = \phi_i / \bar{\phi}_i$. In this description, the concentration does not have to be constant in the boundary layer, which is the main difference with the spontaneous curvature approach. Far away from the interface, the spherical solution (denoted by S)

remains a solution but a boundary layer (denoted by B) is necessary in the close vicinity of the interface. We use again the decomposition for the case of the elastic fold (Eq.9), with $\tilde{\phi} = 1 + \tilde{\phi}_B$. Three dimensionless parameters describe the fold: the chemical length $\tilde{l}_c$, the ratio $\tilde{\lambda}_e$ between the curvature due to the molecules and the stretching of the vesicle and the ratio $\tilde{\lambda}_c$ between the curvature due to the molecules and the cost of absorption:

$$\tilde{l}_c = \sqrt{\frac{\beta}{\alpha R_i^2}} \frac{1}{\tilde{l}_e}, \quad \tilde{\lambda}_e = \frac{\Lambda_i \bar{\phi}_i}{P R_i^2} \frac{1}{\tilde{l}_e} \quad \text{et} \quad \tilde{\lambda}_c = \frac{\Lambda_i}{\alpha \bar{\phi}_i R_i} \frac{1}{\tilde{l}_e}. \quad (13)$$

Remember that the stability of each spherical cap requires $\tilde{\lambda}_e \leq 1$ and $\tilde{\lambda}_e \tilde{\lambda}_c \leq 1$ (36). Expanding the shape equations (Eq.5) to leading order gives:

$$\psi_B'' = \sin \psi_B + \tilde{\lambda}_e \tilde{\phi}_B', \quad (14a)$$

$$\tilde{l}_c^2 \tilde{\phi}_B'' = \tilde{\phi}_B - \tilde{\lambda}_c \psi_B'. \quad (14b)$$

The fold energy is given by the leading orders of Eq.4 and is proportional to r_J , the interface length. Therefore, it defines a new effective line tension σ_{cusp} . This line tension is partly due to the difference of concentration of absorbed molecules between the two domains but it is also due to the coupling of the molecules with the curvature. Therefore, this contribution can be positive or negative, depending on the chemical species.

The two-spherical cap zeroth order solution remains valid and the uniform insertion of molecules in the vesicle modifies only the Lagrange multipliers which have no direct physical content, despite the modification of the energy level of the system. Therefore, we conclude that the bifurcation diagram remains unchanged with the same threshold value found previously although the numerical values of the energy are modified. For $\bar{\sigma} \leq \tilde{\sigma}_c$, two ideal solutions still exist, the stable one being observed experimentally. Only gradients which appear at the interface modify the cusp shapes and we need to evaluate them if they are responsible for a change in the line tension value.

The equations (Eq.14) have no explicit solution but some interesting limits can be considered. We focus here on three independent limits: $\tilde{\lambda}_e \ll 1$, $\tilde{\lambda}_c \ll 1$ and $\tilde{l}_c \ll 1$, the last one corresponding to the experimental case. First case ($\tilde{\lambda}_e \ll 1$): the elastic coupling length is small. This limit decouples Eq.14a at zero order, giving exactly the same solution as the case without molecule. Eq.14b allows to calculate the molecule distribution but

as the terms in $\tilde{\lambda}_e$ can be neglected in the energy, the effect of the molecules is negligible. The elastic line tension is not modified by molecule addition. Second case ($\tilde{\lambda}_c \ll 1$): the weak chemical coupling length. This limit decouples Eq.14b, leading to $\tilde{\phi}_B = \tilde{\phi}_{B_0} \exp(\pm \tilde{l}/\tilde{l}_c)$ with $\tilde{\phi}_{B_0}$ the molecule excess at the interface, given by the boundary conditions (Eq.6). In physical units and taking into account both sides of the fold, we get for the increase of the line tension:

$$\delta\sigma_{cusp} = \frac{\sqrt{\alpha_1\beta_1\alpha_2\beta_2}}{2(\sqrt{\alpha_1\beta_1} + \sqrt{\alpha_2\beta_2})}(\bar{\phi}_2 - \bar{\phi}_1)^2. \quad (15)$$

The molecule absorption increases the effective line tension, which may induce the fission. This effect is only due to chemical gradients near the interface. It increases with the number of molecules added to the system.

Third case ($\tilde{l}_c \ll 1$): the case of a small chemical length. The molecule concentration has two very different lengthscales: l_c and l_e . The chemical length l_c contributes to the junction between the two domains and can be treated as a boundary layer. However, the associated energy is proportional to l_c and is then negligible. For size larger than l_c , Eq.14 becomes:

$$\tilde{\phi}_B = \tilde{\lambda}_c \psi'_B, \quad (16a)$$

$$(1 - \tilde{\lambda}_c \tilde{\lambda}_e) \psi''_B = \sin \psi_B. \quad (16b)$$

The effective line tension is then given by

$$\sigma_{cusp} = \Lambda_1 \phi_1 (\theta_1 - \psi_{cusp}) + \Lambda_2 \phi_2 (\psi_{cusp} - \theta_2) + \sqrt{1 - \tilde{\lambda}_e \tilde{\lambda}_c} \sigma_{el}. \quad (17)$$

with σ_{el} the elastic line tension calculated without molecules. The multiplying factor $\sqrt{1 - \tilde{\lambda}_e \tilde{\lambda}_c}$ is independent of the molecule concentration but decreases the contribution of the elastic fold when absorbed molecules are present. Remember that in our framework $\tilde{\lambda}_e \tilde{\lambda}_c$ is always smaller than 1 since the cost associated with the concentration gradients β are neglected (36). The two first terms are proportional to the concentration of added molecules. They are positive when conical molecules are introduced in the outer monolayer of the membrane (positive Λ), which is the case found in the experiments. However, if the molecules are added in the inner monolayer, it becomes negative and budding and pinching are inhibited. In conclusion, the net effect of molecule insertion is a decrease of the line tension at low concentration, then a net increase as the concentration increases if the molecules

are inserted from the outer monolayer.

Budding and fission processes

The absorption of molecules does not change the zeroth order shape equations of the stretched vesicle in the weak coupling regime. It modifies the shape of the fold near the interface giving a new contribution to the effective line tension. If the absorption takes place in the external leaflet, it contributes to an increase of the line tension. This increase puts the system closer to the bifurcation point controlled by the parameter $\bar{\sigma} = (\sigma + \sigma_{cusp})/P$ and induces a budding of the smaller phase: as $\bar{\sigma}$ increases, the neck radius decreases (see Fig. 5b) and the small domain seems to lift up. If the concentration is high enough so that $\bar{\sigma} > \tilde{\sigma}_c$, the budding is automatically followed by a fission process, making two separated vesicles, one for each phase. If the concentration is not high enough, the lifting will stop before the change of topology. In the meantime, it is possible that the vesicle loses some of its molecules and recovers its initial configuration. This reversibility is impossible when fission is complete for two reasons: first, the system relaxes the Gaussian elastic energy and two daughter vesicles may be energetically favored, second due to thermal fluctuations, the vesicles move away from each other and the coalescence process is unlikely. The fact that the fission occurs proves that the time scale for fission is much smaller than the possible rearrangement of molecules between the leaflets

Figure 10 reproduces experimental results from Staneva et al. (10), showing fission of a liquid-ordered domain induced by Phospholipase A₂ protein addition. The vesicle is obtained by electro-formation (the electrode is visible on the left of the pictures). It is made with a 45:45:10 mol/mol mixture of phosphatidylcholine (PC), sphingomyelin (SM) and cholesterol (Chol). The vesicles show one liquid-ordered domain made visible by fluorescence microscopy (not reproduced here): a small fraction (10%) of the PC is replaced by an analogous fluorescent lipid which is excluded from the l_o phase. So l_o appears as a dark disk. The proteins are injected in the neighbourhood of the vesicle by a micropipette (visible on the right of the first picture). Phospholipase A₂ transforms the PC lipids into LysoPC, a conical molecule, by cutting one of the two hydrophobic tails. Fission occurs about 10 seconds after protein injection.

Similar fission processes have been observed when detergents like LysoPC, Triton X100 or Brij 98 are added in significant quantities near a similar

vesicle (11). However, in this case, the fission is not always complete: the daughter vesicles may remain connected by a small lipid filament, as also observed in (14). This is not in contradiction with our model since the fission process requires to split the lipid bilayers at the molecular level (39). The fission process prefers small domains, as predicted by our model. If the concentration in detergents is not high enough or if the Phospholipase A₂ is not activated, the liquid-ordered domains bud without complete fission. It is also possible to observe a relaxation of the vesicle, which recovers its initial shape.

Conclusion

Liquid-ordered domains are supposed to be implicated in the cellular processes, such as penetration of virus or active transport. Various recent experiments on model systems show that liquid-ordered domains can be ejected specifically from a tense vesicle, either by an osmotic shock or by the absorption of molecules. Extrapolating these results to real cells necessitates the determination of the important physical effects for the fission.

Our approach here consists in using the tension of the vesicle as a ground for a common interpretation of fission by osmotic shock or molecule absorption. Tense vesicles have a very simple shape: a spherical cap for each domain, connected each other by a sharp cusp. Theoretically, a simple analytical description of the vesicle shape can be found, controlled by two parameters only: the fraction of the liquid-ordered domain and the reduced line tension σ/P . Elastic effects, as described through the Helfrich's energy, are taken into account. They show themselves in the cusp near the interface and only contribute as a correction to the line tension. For a given pair of control parameters (the fraction and line tension), two connected solutions exist: one has the lowest energy and can be observed experimentally, the other being not observable.

Experimentally, one can modify the reduced line tension by acting on the osmotic pressure: a decrease of the osmotic pressure will increase the reduced line tension. For vanishing line tension, the observable solution is nearly spherical. As the line tension increases, the liquid-ordered domain buds, until a critical value of the reduced line tension. At this value, stable and unstable solutions are identical and, above, no connected solution exists. This explains the experimental fission (9). A controlled change of the osmotic

pressure will allow to test this model: the budding remains reversible until a critical value.

The relative size of the domain is also studied. It mainly modifies the critical value of the line tension for the fission: small domains are easier to eject than large ones. This prediction is opposite to the other limiting case of a flappy vesicle, controlled by its elasticity and line tension (22). Clearly, a more complete study, both theoretical and experimental, of the interplay between tension and elasticity on fission is needed to understand the mechanical properties of liquid-ordered domains. This approach relies on the control of the osmotic pressure in the model system, which is still at an early age for multi-domains vesicles. However, it is well-known that *in vivo* systems are controlled by a mixing of lateral tension and elasticity.

The simple description of tense vesicles allows to model the fission by the absorption of molecules. The experiments at the origin of this work used mainly detergents (11) but also proteins like PLA₂ (10). This model assumes that the absorbed molecules force the bilayer to curve due to their conical shape or to an entropic pressure. However, the effects of external molecules on a lipid bilayer are generally complex: detergents can solubilize the bilayer, proteins are chemically active and can transform the lipids of the bilayer. A more complete analysis has to account for the specificities of each molecule. However, our simple approach reproduces the different features of the observed budding.

Coupling between curvature and concentration of external molecules on a tense membrane can lead to two different kinds of instabilities. The strong coupling concerns mostly the stability of the spherical shape: the presence of molecules is strong enough to overcome the tension of the bilayer and the domain gets a rippled shape (36). The other instability is the budding and fission, which can be observed for spherical but also rippled domains. Here, we restrict on weak coupling and the domains remain spherical allowing an analytical treatment. The concentration of molecules couples with the vesicle shape in the cusp and can be described as an effective line tension. The budding and fission processes are then explained by the same first order transition than for a change of osmotic pressure. In particular, the small domains are ejected in first, as observed experimentally (11).

The dependence of the line tension with the concentration is calculated explicitly. For conical detergents, an increase of concentration gives an increase of the line tension (with a budding) if the molecules are absorbed on the external leaflet of the bilayer, as done experimentally but can give a de-

crease if the molecules are absorbed on the internal leaflet. However, more quantitative results require a quantitative determination of the coupling constant. If the microscopic details of the coupling between external molecules and the bilayer have been studied, the transition to a mesoscopic theory has not been done yet. Quantitative values of the coupling constants could help to determine the importance of the curvature forcing in the cellular fission.

A Osmotic pressure

Ions or large molecules cannot cross the lipid bilayer. The number of ions or big molecules enclosed in the vesicle is fixed, as soon as no pore are created. However, the bilayer remains permeable to the water molecules, meaning that the enclosed volume can change with an energy cost.

When the interactions between the ions or the big molecules are assumed negligible, it is possible to describe such molecules as a perfect gas. The energy associated with the osmotic pressure (15):

$$F_V(V) = R_g T \left[n \ln \frac{V}{V_0} - c_0 (V - V_0) \right] \quad (18)$$

where c_0 is the external concentration of these osmotically active molecules, n the number of these molecules confined within the vesicle and V the volume of the vesicle. The volume $V_0 = n/c_0$ is the volume for which the osmotic pressure vanishes.

When the enclosed volume V is close to the volume V_0 , we can assume $V/V_0 - 1 \ll 1$ and the energy (Eq.18) is approximatively:

$$F_V(V) \approx \frac{R_g T c_0 V_0}{2} \left(\frac{V}{V_0} - 1 \right)^2.$$

Typical values for the concentration is $c_0 \approx 10^{-4} \text{ mol/L}$, for the enclosed volume $V \approx 10^{-15} \text{ m}^3$, which give an energy of about 10^{-13} J , huge compared to the bending energy of the vesicle κ . Therefore, the bending energy is not enough to modify the enclosed volume for a flappy vesicle. It is the classical assumption of the studies of equilibrium shapes in the case of fluctuating vesicles.

If the enclosed volume V is large compared to the volume V_0 , the energy

(Eq.18) becomes:

$$F_V(V) \approx -R_g T c_0 V$$

We can then assume that the bilayer is stretched by a constant osmotic pressure

$$\Pi = R_g T c_0 \approx 100 Pa,$$

which is of order of experimental values (42). Note that the energy associated with the osmotic pressure is large compared to the bending energy. This also means that the bending energy is not high enough to change the enclosed volume of a tense vesicle.

B Analytical treatment without molecules

We present here the analytical treatment for the boundary layer in the case of a stretched vesicle without molecules. The shape of the vesicle near the interface is given by the pendulum equation (Eq.10):

$$\ddot{\psi}_B = \sin(\psi_B).$$

Remember that we use the arclength parameter $\tilde{l} = (s - s_J)/l_e$, which the dimensionless arclength from the interface. We multiply the pendulum equation by $\dot{\psi}_B$ and integrate:

$$\frac{1}{2} \dot{\psi}_B^2 = -\cos \psi_B + 1.$$

The constant 1 appears because the angle ψ_B and its derivatives must vanish far away from the junction. The angle ψ_B is then given by the differential equation:

$$\dot{\psi}_B = \pm 2 \sin \left(\frac{\psi_B}{2} \right), \quad (19)$$

which can be integrated into

$$\tan \frac{\psi_B}{4} = \tan \frac{\psi_{0i}}{4} \exp \pm \tilde{l}.$$

The condition of vanishing angle far away from the junction implies that the sign plus is for the domain 1 ($\tilde{l} \leq 0$) and the sign minus is for the domain 2 ($\tilde{l} \geq 0$). The angle ψ_0 is the contribution of ψ_B to the angle at the interface

$$\psi_J = \theta_i + \psi_{0_i}.$$

An expression of the angle ψ_{0_i} is given by the boundary condition (Eq.6a). As usual for the boundary layers, we kept only the terms of higher degree in $1/\tilde{l}$. With the dimensionless arclength $\tilde{l}$, the boundary condition becomes:

$$\sqrt{\kappa_1 R_1} \psi'_B(-\epsilon) = \sqrt{\kappa_2 R_2} \psi'_B(\epsilon). \quad (20)$$

Using the differential equation Eq.19 and the relation at the interface $\psi_B(0) = \psi_{0_i} = \psi_J - \theta_i$, the expression becomes:

$$\sqrt{\kappa_1 R_1} \sin\left(\frac{\psi_J - \theta_1}{2}\right) + \sqrt{\kappa_2 R_2} \sin\left(\frac{\psi_J - \theta_2}{2}\right) = 0.$$

The angles θ_1 , θ_2 and ψ_J , as the radii R_1 and R_2 , can be measured experimentally (37) and can be used to determine the ratio κ_1/κ_2 .

Acknowledgements

We would like to thank M. Angelova, P. Bassereau, T. Baumgart and G. Staneva for various discussions on experimental aspects and A. Goriely for critical reading.

References

1. Simons, K., and E. Ikonen. 1997. Functional rafts in cell membranes. *Nature* 387:569–572.
2. Brown, D. A., and E. London. 2000. Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts. *J. Biol. Chem.* 275:17221–17224.
3. Chazal, N., and D. Gerlier. 2003. Virus entry, assembly, budding, and membrane rafts. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67:226–237.
4. van Meer, G., and H. Sprong. 2004. Membrane lipids and vesicular traffic. *Curr. Opin. Cell Biol.* 16:373–378.

5. Dietrich, C., L. A. Bagatolli, Z. N. Volovyk, N. L. Thompson, M. Levi, K. Jacobson, and E. Gratton. 2001. Lipid rafts reconstituted in model membranes. *Biophys. J.* 80:1417–1428.
6. 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.
7. de Almeida, R., A. Fedorov, and M. Prieto. 2003. Sphingomyelin/phosphatidylcholine/cholesterol phase diagram: Boundaries and composition of lipid rafts. *Biophys. J.* 85:2406–2416.
8. Allain, J.-M., C. Storm, A. Roux, M. Ben Amar, and J.-F. Joanny. 2004. Fission of a multiphase membrane tube. *Phys. Rev. Lett.* 93:158104.
9. 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.
10. Staneva, G., M. Angelova, and K. Koumanov. 2004. Phospholipase a(2) promotes raft budding and fission from giant liposomes. *Chem. Phys. Lipids* 129:53–62.
11. Staneva, G., M. Seigneuret, K. Koumanov, G. Trugnan, and M. Angelova. 2005. Detergents induce raft-like domains budding and fission from giant unilamellar heterogeneous vesicles - a direct microscopy observation. *Chem. Phys. Lipids* 136:55–66.
12. Seifert, U. 1993. Curvature-induced lateral phase segregation in two-component vesicles. *Phys. Rev. Lett.* 70:1335–1338.
13. Jülicher, F., and R. Lipowsky. 1996. Shape transformations of vesicles with intramembrane domains. *Phys. Rev. E* 53:2670–2683.
14. Tanaka, T., R. Sano, Y. Yamashita, and M. Yamazaki. 2004. Shape changes and vesicle fission of giant unilamellar vesicles of liquid-ordered phase membrane induced by lysophosphatidylcholine. *Langmuir* 20:9526–9534.
15. Seifert, U. 1997. Configurations of fluid membranes and vesicles. *Adv. in Phys.* 46:13–137.

16. Döbereiner, H., E. Evans, M. Kraus, U. Seifert, and M. Wortis. 1997. Mapping vesicle shapes into the phase diagram: A comparison of experiment and theory. *Phys. Rev. E* 55:4458–4474.
17. Kohyama, T., D. Kroll, and G. Gompper. 2003. Budding of crystalline domains in fluid membranes. *Phys. Rev. E* 68:061905.
18. Sens, P. 2004. Dynamics of nonequilibrium membrane bud formation. *Phys. Rev. Lett.* 93:108103.
19. Leibler, S. 1986. Curvature instability in membranes. *J. Phys. (France)* 47:507–516.
20. Mori, S., and M. Wadati. 1993. Curvature instability induced by diffusing particles. *J. Phys. Soc. Jpn* 62:3557–3564.
21. Kralj-Iglic, V., V. Heinrich, S. Svetina, and B. Zeks. 1999. Free energy of closed membrane with anisotropic inclusions. *Eur. Phys. J. B* 10:5–8.
22. Lipowsky, R. 1992. Budding of membranes induced by intramembrane domains. *J. Phys. II France* 2:1825–1840.
23. Jülicher, F., and R. Lipowsky. 1993. Domain-induced budding of vesicles. *Phys. Rev. Lett.* 70:2964–2967.
24. Yamamoto, S., and S. Hyodo. 2003. Budding and fission dynamics of two-component vesicles. *J. Chem. Phys.* 118:7937–7943.
25. Li, X.-M., M. M. Momsen, J. M. Smaby, H. L. Brockman, and R. E. Brown. 2001. Cholesterol decreases the interfacial elasticity and detergent solubility of sphingomyelins. *Biochemistry* 40:5954–5963.
26. Holopainen, J. M., A. J. Metso, J.-P. Mattila, A. Jutila, and P. K. J. Kinnunen. 2004. Evidence for the lack of a specific interaction between cholesterol and sphingomyelin. *Biophys. J.* 86:1510–1520.
27. Lipowsky, R., and E. Sackmann. 1995. Structure and Dynamics of Membranes, Handbook of Biological Physics. Elsevier, North-Holland.
28. Siegel, D., and M. Kozlov. 2004. The gaussian curvature elastic modulus of n-monomethylated dioleoylphosphatidylethanolamine: Relevance to membrane fusion and lipid phase behavior. *Biophys. J.* 87:366–374.

29. Devaux, P., and R. Morris. 2004. Transmembrane asymmetry and lateral domains in biological membranes. *Traffic* 5:241–246.
30. Bickel, T., C. Jeppesen, and C. Marques. 2001. Local entropic effects of polymers grafted to soft interfaces. *Eur. Phys. J. E* 4:33–43.
31. Weikl, T., M. Kozlov, and W. Helfrich. 1998. Interaction of conical membrane inclusions: Effect of lateral tension. *Phys. Rev. E* 57:6988–6995.
32. Lipowsky, R., H.-G. Döbereiner, C. Hiergeist, and V. Indrani. 1998. Membrane curvature induced by polymers and colloids. *Physica A* 249:536–543.
33. Kim, Y., and W. Sung. 1999. Vesicular budding induced by a long and flexible polymer. *Europhys. Lett.* 47:292–297.
34. Evans, A., M. Turner, and P. Sens. 2003. Interactions between proteins bound to biomembranes. *Phys. Rev. E* 67:041907.
35. Bartolo, D., and J. Fournier. 2003. Elastic interaction between "hard" or "soft" pointwise inclusions on biological membranes. *Eur. Phys. J. E* 11:141–146.
36. Allain, J.-M., and M. Ben Amar. 2004. Biphasic vesicle: instability induced by adsorption of proteins. *Physica A* 337:531–545.
37. Baumgart, T., S. Das, W. W. Webb, and J. T. Jenkins. 2005. Membrane elasticity in giant vesicles with fluid phase coexistence. *Biophys. J.* 89:1067–1080.
38. Chen, Y.-J., and P. H. Steen. 1997. Dynamics of inviscid capillary breakup: Collapse and pinchoff of a film bridge. *J. Fluid Mech.* 341:245–267.
39. Kozlovsky, Y., and M. M. Kozlov. 2003. Membrane fission: Model for intermediate structures. *Biophys. J.* 85:85–96.
40. Ben Amar, M., and Y. Pomeau. 1997. Crumpled paper. *P. Roy. Soc. Lond. A Mat.* 453:729–755.

41. Pogorelov, A. 1988. Bending of surfaces and stability of shells. Volume 72, Translations of mathematical monographs.
42. Leduc, C., O. Camps, K. B. Zeldovich, A. Roux, P. Jolimaitre, L. Bourel-Bonnet, B. Goud, J.-F. Joanny, P. Bassereau, and J. Prost. 2004. Cooperative extraction of membrane nanotubes by molecular motors. *PNAS* 101:17096.

Figure Legends

Figure 1.

General parameterization of an axisymmetric vesicle in cylindrical coordinates. The dashed curve is the membrane. The parameterization is done by the arc-length s . The shape of the membrane is given by $r(s)$ and $\psi(s)$. The two domains have the same parameterization.

Figure 2.

Schematic representation of a axisymmetric vesicle, including the four parameters R_1 , R_2 , θ_1 and θ_2 used in the vesicle description. The circle details the fold near the interface, where the elastic properties can no longer be neglected.

Figure 3.

Black and white version of figure 1b from Baumgart et al.'s work (9). The picture is a two-photon microscopy image, showing equatorial section of GUVs with two coexisting domains. The l_o domain appears in grey here and the l_d in dark. Scale bar, 5 μm . Reproduced from (9) with the authorizations of the authors and editor.

Figure 4.

The two solutions of the E.-L. equations (Eq.8) for $\tilde{\sigma} = 0.18$. The two pictures have the same scale. (a) Experimental solution (9), with $\tilde{R}_1 = 0.5$, $\tilde{R}_2 = 1$, $\theta_1 = 1.3$ and $\theta_2 = 0.51$. The associated dimensionless energy is $\tilde{F}_{TOT} = -3.64$. (b) Calculated solution with $\tilde{R}_1 = 0.37$, $\tilde{R}_2 = 0.94$, $\theta_1 = 2.0$ and $\theta_2 = 0.36$. The dimensionless energy of vesicle (b) is $\tilde{F}_{TOT} = -3.59$, meaning that the solution is experimentally unstable.

Figure 5.

Dimensionless energies $\tilde{F}_{TOT}$ (figure a) and interface radius $\tilde{r}_J$ (figure b) of the solutions of the E.L. equations (Eq.8) versus the control parameter $\tilde{\sigma} = \sigma/PR_0^2$. The calculation has been done for a fraction of liquid-ordered phase of 9.5%. In both figures, the solid line corresponds to the stable solution,

experimentally observable, the dashed line to the unstable solution and the dotted line to $\tilde{\sigma} = \tilde{\sigma}_c$, the critical value of the control parameter. For $\tilde{\sigma} \geq \tilde{\sigma}_c$, there is no longer a solution. Four pictures of vesicles showing the shape transformation with the dimensionless line tension have been added.

Figure 6.

Values of the critical control parameter $\tilde{\sigma}_c$ versus the fraction f of the upper domain (label 1). The reduced areas of the domains are given by $A_1 = f$ and $A_2 = (1 - f)$. The dashed line shows the fraction 0.5.

Figure 7.

Reduced fold line tension $\tilde{\sigma}_{cusp}$ versus the reduced total line tension $\bar{\sigma}$ for the two possible solutions of Eq.8. The solid line corresponds to the stable solution, the dashed line to the unstable solution. The fold line tension has been calculated using Eq.11. The parameters are $P = 10^{-2}Pa$, $\kappa_1 = 10^{-19}J$ and $\kappa_2 = 4.10^{-19}J$. The dotted line separates the possible solutions from the impossible one. For $\tilde{\sigma}_{cusp}$ above this line, the line tension associated to the fold is greater than the total line tension, requiring a negative line tension at the junction between the two domains, which is impossible.

Figure 8.

Dimensionless energies $\tilde{F}_{TOT}$ of the solutions of the E.L. equations (Eq.8) versus the control parameter $\bar{\sigma}$ including the effect of the elastic fold. The parameters are $f = 9.5\%$, $P = 10^{-2}Pa$, $\kappa_1 = 10^{-19}J$ and $\kappa_2 = 4.10^{-19}J$. The solid line corresponds to the stable solution, the dashed line to the unstable solution, the dotted line to $\bar{\sigma} = \tilde{\sigma}_c$, the critical value of the control parameter. For $\bar{\sigma} \geq \tilde{\sigma}_c$, there is no longer a solution.

Figure 9.

Reduced fold line tension $\tilde{\sigma}_{cusp}$ for the critical value of the total line tension $\bar{\sigma} = \tilde{\sigma}_c$, versus the fraction f of the liquid-ordered domain. The calculation has been done with $P = 10^{-2}Pa$, $\kappa_1 = 10^{-19}J$ and $\kappa_2 = 4.10^{-19}J$. The dashed line shows the fraction 0.5 and the dotted line $\tilde{\sigma}_{cusp} = 0$. The l_o and l_d domains (resp. label 2 and 1) do not have the same effect since the

elastic moduli are not equal. Contrary to a true line tension, this effective line tension can be negative for f near 0.5.

Figure 10.

Ejection of a liquid-ordered domain induced by proteins Phospholipase A₂. The domain is visible on fluorescence microscopy (not reproduced here). The proteins are injected by micropipette (picture a). The liquid-ordered domain buds (pictures b and c) before the fission (picture d). Reproduced from (10) with the authorization of the editor. Bar: 20 μm .

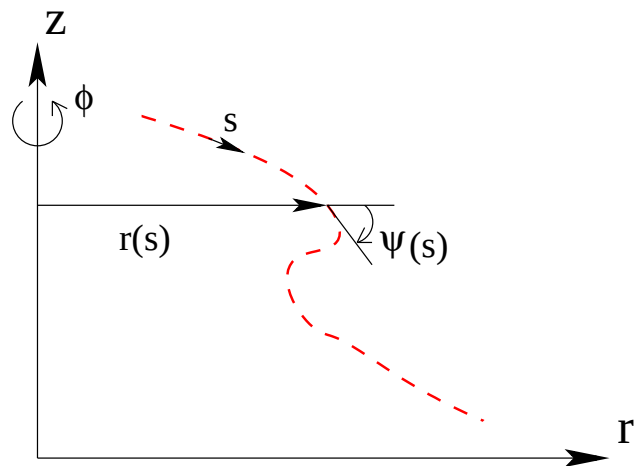


Figure 1:

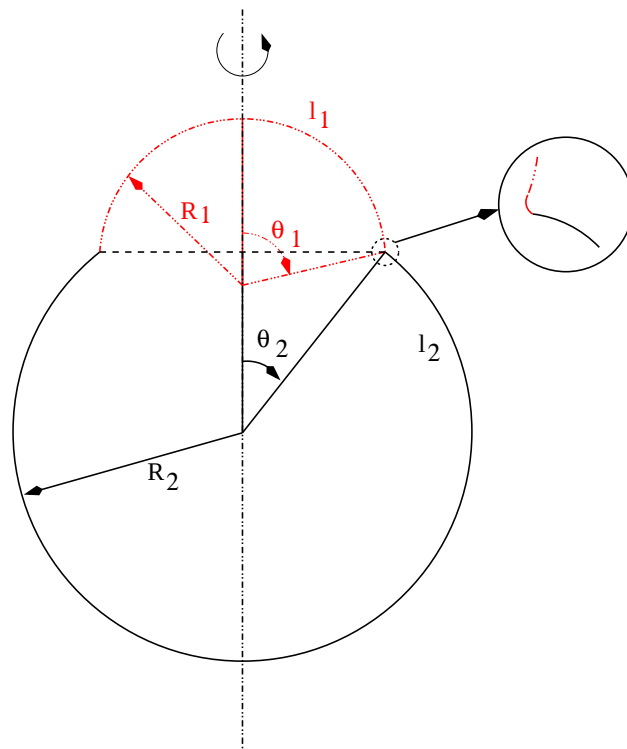


Figure 2:

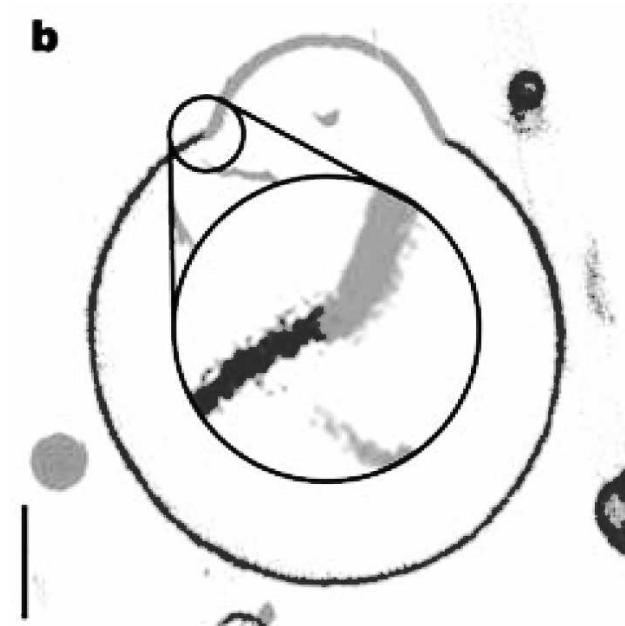


Figure 3:

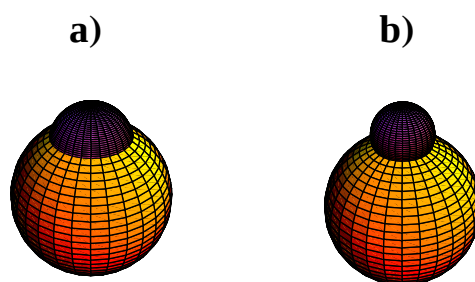


Figure 4:

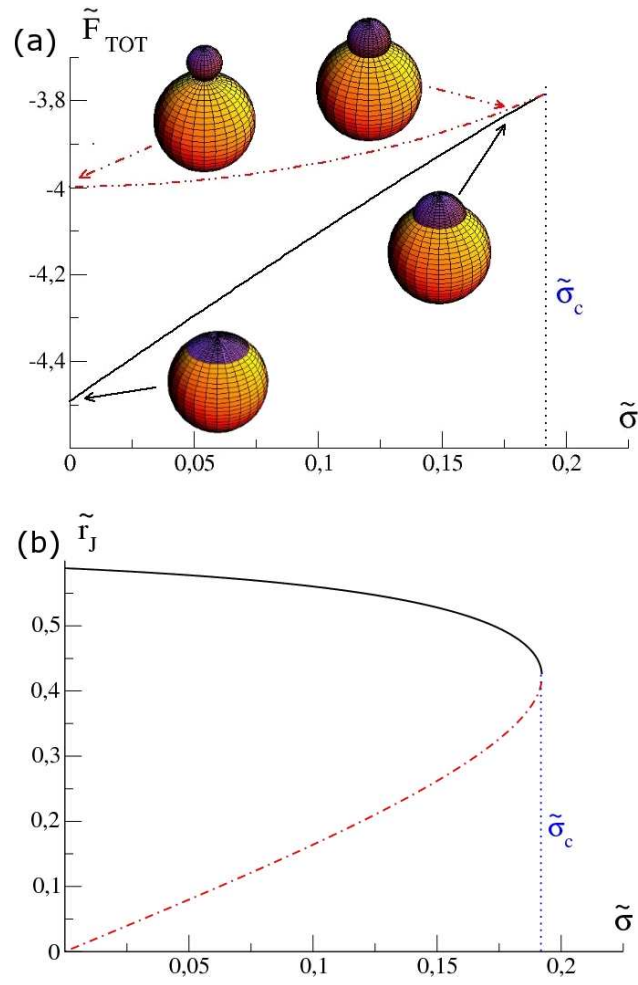


Figure 5:

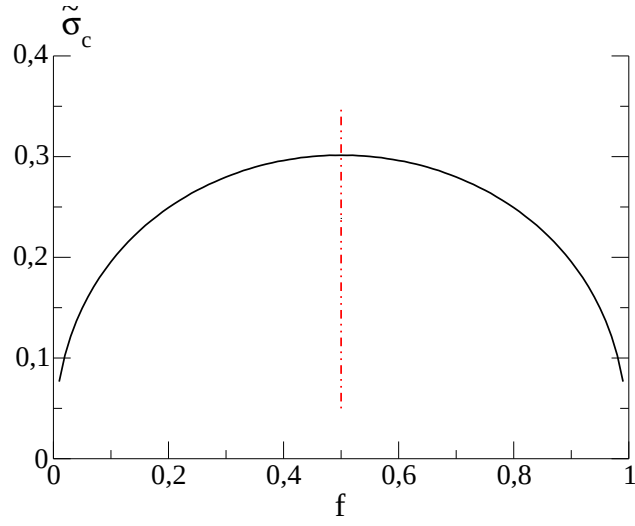


Figure 6:

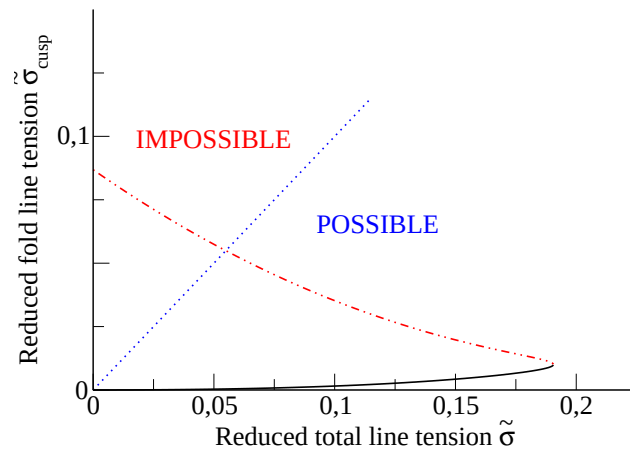


Figure 7:

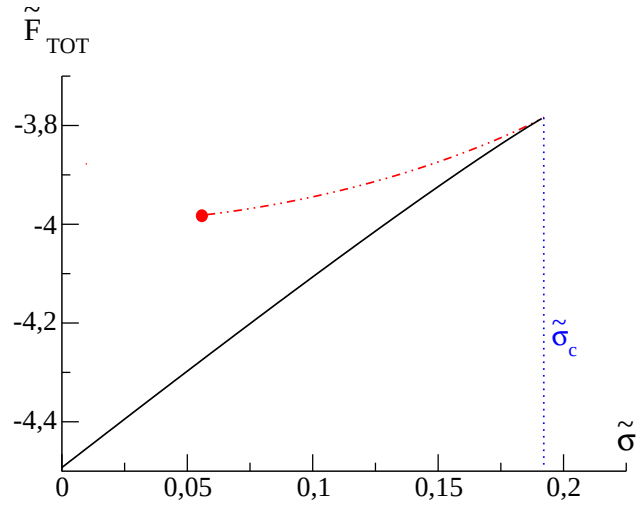


Figure 8:

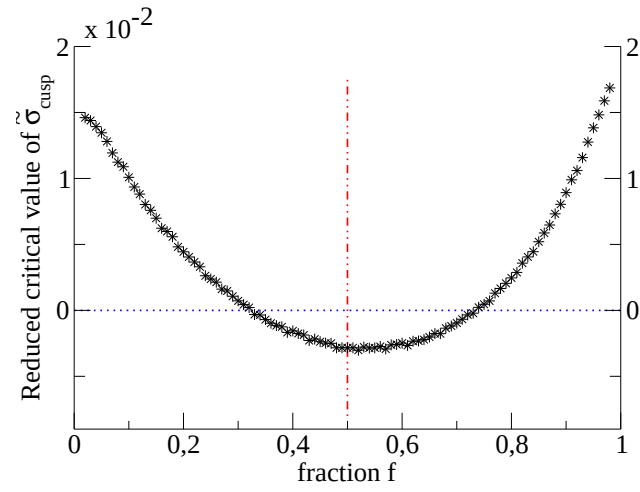


Figure 9:

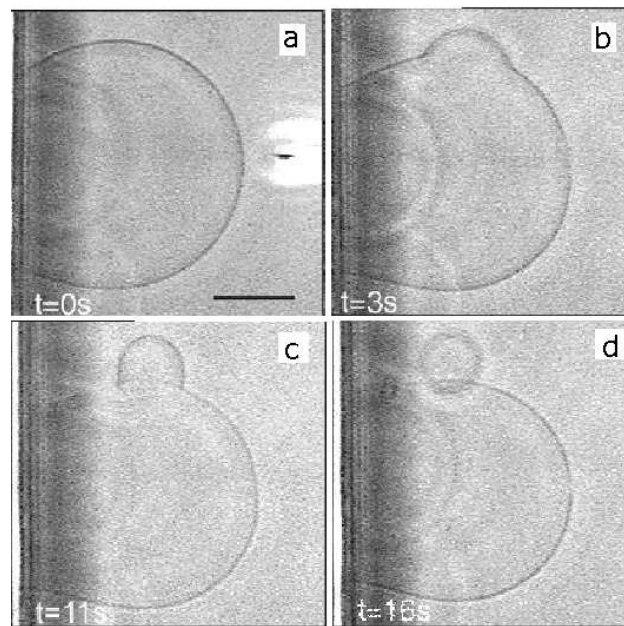


Figure 10:

Chapitre V

Instabilité hydrodynamique d'un domaine lipidique

Dans ce chapitre, nous nous intéressons aux propriétés hydrodynamiques de la bicouche. Nous modélisons une instabilité de contour d'un domaine liquide-ordonné plan au milieu d'une phase plane liquide-désordonnée. Cette étude permet de mieux comprendre les spécificités du fluide bidimensionnel formé par la bicouche de lipides.

V.1 Présentation

Dans les chapitres précédents, nous nous sommes intéressés aux changements de forme d'une vésicule à deux phases et plus particulièrement à l'éjection d'un domaine. Ces instabilités fournissent une nouvelle approche pour sonder l'élasticité et la tension de surface dans une vésicule et ainsi permettre de mieux comprendre les utilisations possibles des domaines membranaires dans la cellule. Les vésicules bi-phasiques fournissent aussi un nouveau moyen d'étudier les propriétés hydrodynamiques de la bicouche.

En tant que fluide, la bicouche de lipides présente la spécificité d'être bidimensionnelle, les lipides étant confinés par leurs queues hydrophobes. Le mouvement des lipides peut être suivi à l'aide d'une sonde, comme une protéine [142–144], un lipide fluorescent [145–147] ou une bille absorbée sur la membrane [148]. Toutefois, la présence de l'eau à proximité affecte le mouvement de la sonde, pouvant même le contrôler [8]. C'est l'aspect bidimensionnel du fluide placé dans un réservoir d'eau qui rend difficile l'étude de son hydrodynamique.

Le système de choix pour l'étude des fluides bidimensionnels n'est pas les vésicules mais les films de Langmuir-Blodgett ; il s'agit de films de molécules amphiphiles à l'interface entre un milieu hydrophile et un milieu hydrophobe, comme une interface eau-air. Ces films présentent l'avantage d'être plus faciles à manipuler que les vésicules. Aussi, la majorité des études sur les fluides bidimensionnels a porté sur les films de Langmuir-Blodgett [149–151].

Pour la même raison, la plupart des modèles ont été développés avec la géométrie de ces films [152–155]. Toutefois, les résultats obtenus sur les films peuvent facilement être transposés au cas des vésicules, et réciproquement.

Une expérience récente, réalisée au CHU Saint-Antoine dans l'équipe du professeur M. Angelova, dans le laboratoire du professeur G. Trugnan, a montré qu'il était possible de diminuer la surface d'un domaine liquide-ordonné dans une vésicule bi-phasique en prélevant des molécules de cholestérol (voir figure V.1) [156, 157]. Le système expérimental est semblable à celui présenté au chapitre IV pour l'injection de molécules à proximité de la vésicule : la vésicule est formée sur une électrode et comporte initialement un (ou plusieurs) domaine liquide-ordonné ; le cholestérol de la vésicule est prélevé par des protéines HDL (Lipoprotéines de haute densité) injectées à proximité de la vésicule à l'aide d'une micro-pipette. Ces protéines sont extraites du sang humain, dans lequel elles servent à transporter le cholestérol des cellules vers le foie (c'est ce qui est appelé le 'bon' cholestérol). Toutefois, une protéine ne peut prélever qu'une quantité limitée de cholestérol sur la surface : la protéine est progressivement recouverte par le cholestérol. Aussi, suivant l'état des protéines, le taux de succion du cholestérol change. Deux situations sont alors possibles. Pour des taux de succion faibles, soit des quantités de HDL injectées faibles ($200\mu\text{L}$ à $1,9\text{g/L}$), la surface du domaine diminue et sa forme reste circulaire (voir figure V.1) [156, 157] ; lorsque le taux de succion est plus important (soit des quantités de HDL plus importantes, $350\mu\text{L}$ à $1,9\text{g/L}$), la surface du domaine diminue encore mais le domaine perd sa forme circulaire : le contour devient sinueux (voir figure V.2) [157]. La même instabilité pourrait être observée lorsque des virus (comme celui de la diarrhée) sont mis en présence de la vésicule, mais les résultats restent pour l'instant trop incertains.

La phase liquide-ordonnée est plus visqueuse que la phase liquide-désordonnée ; aussi, nous sommes en présence de l'instabilité de contour d'une phase visqueuse chassée par une phase moins visqueuse. Il existe une instabilité équivalente pour les fluides classiques confinés entre deux plaques : l'instabilité de Saffman-Taylor, qui se produit lorsque l'on tente de pousser un fluide visqueux confiné (comme de l'huile) par un fluide moins visqueux (comme de l'eau) (voir figure V.3) [158] ou lorsqu'on pompe un fluide visqueux confiné entouré par un fluide moins visqueux [159]. La principale différence entre l'instabilité de Saffman-Taylor et celle observée sur une vésicule est la dimension du fluide : bien que les deux soient formellement décrites par des équations à deux dimensions, la bicouche de lipides est un fluide réellement à deux dimensions alors que l'instabilité de Saffman-Taylor se produit pour un fluide à trois dimensions mais confiné entre deux plaques proches.

Nous nous sommes attachés à utiliser un formalisme adapté aux fluides bidimensionnels. Ce formalisme a été présenté au chapitre II et est essentiellement dû à Saffman [80] ; nous avons montré que, dans le cas particulier des fluides bidimensionnels, l'équation de

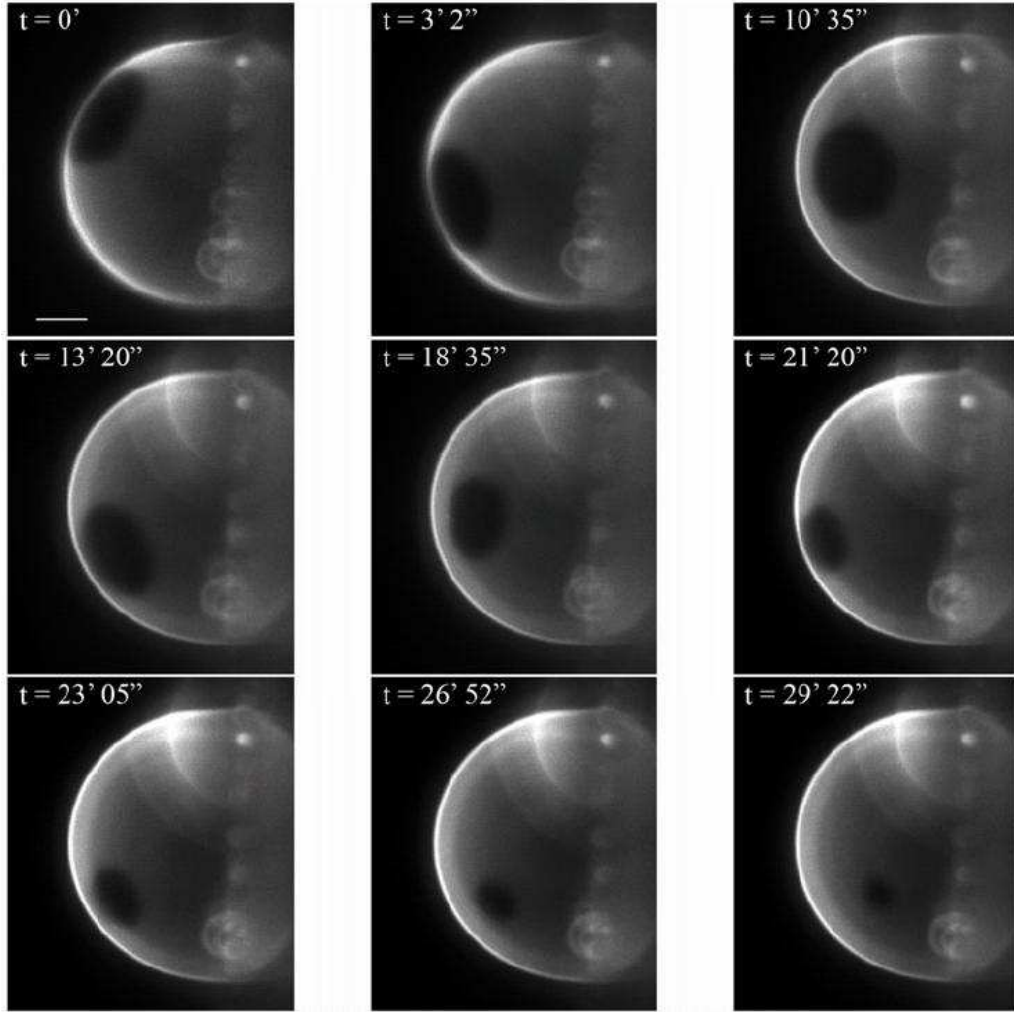


Figure V.1: Images en fluorescence d'un domaine liquide-ordonné après l'injection de protéines HDL ($200\mu\text{L}$ à $1,9\text{g/L}$) au voisinage. Le domaine liquide-ordonné apparaît comme un cercle noir sur la surface brillante de la vésicule. Sa surface diminue au cours du temps. La barre représente $20\mu\text{m}$. Images extraites de [157].

Stokes reliant le champ de pression aux mouvements du fluide visqueux est la même pour un fluide compressible ou non (voir annexe C). Nous présentons d'abord le modèle de Saffman-Taylor, pour un fluide tridimensionnel, afin de retrouver les critères de stabilité. Ensuite, nous utilisons le formalisme des fluides bidimensionnels pour trouver un critère d'instabilité de la forme circulaire initiale, pour un modèle simple négligeant la présence de l'eau environnante. Nous terminons en mettant en place un formalisme tenant compte de l'eau environnant la bicouche et nous vérifions aussi la validité du modèle dans la limite où l'eau est négligeable.

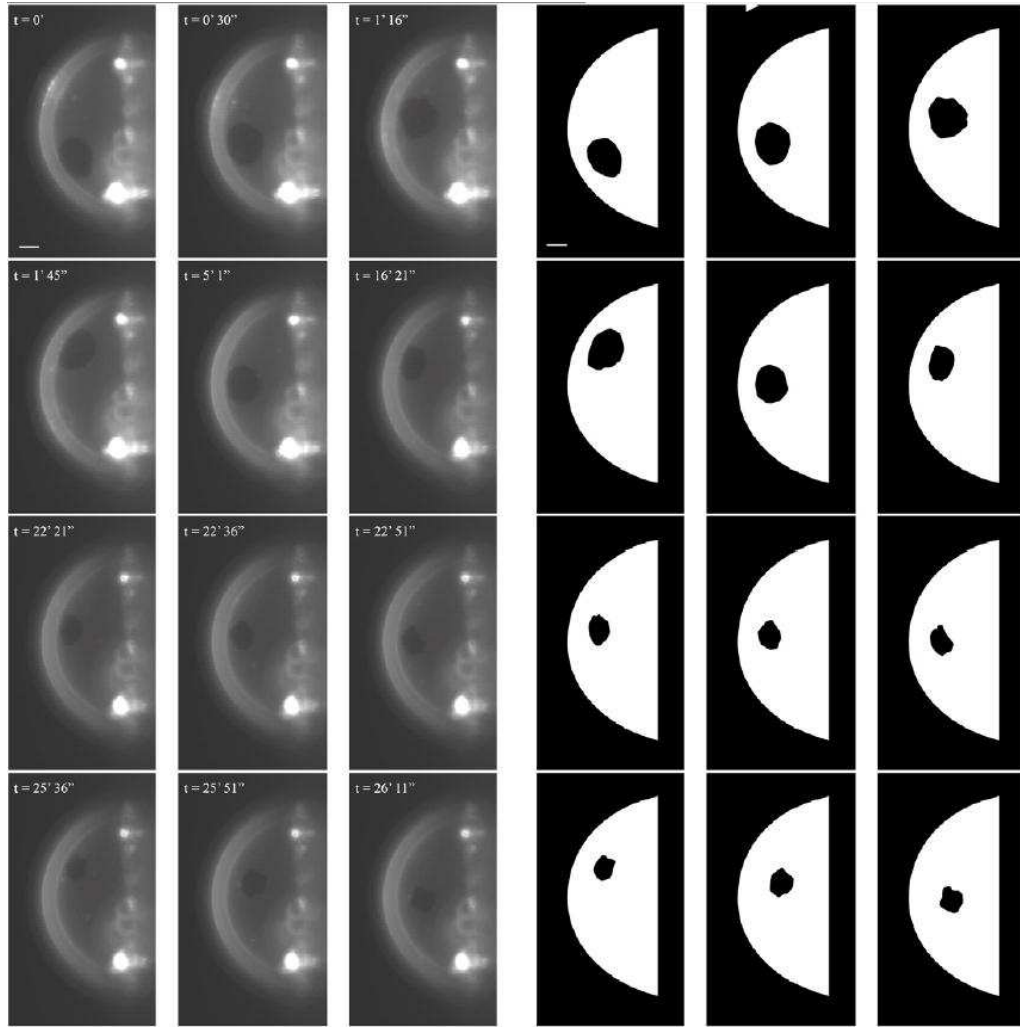


Figure V.2: Images en fluorescence d'un domaine liquide-ordonné après l'injection de protéines HDL ($350\mu\text{L}$ à $1,9\text{g/L}$) au voisinage. Le domaine liquide-ordonné apparaît comme un cercle noir sur la surface brillante de la vésicule. Sa surface diminue au cours du temps et, dans le même temps, il apparaît une instabilité du contour. La barre représente $20\mu\text{m}$. Images extraites de [157].

V.2 Equations hydrodynamiques

Le système complet est formé de trois phases : les deux domaines membranaires, liquide-ordonné et liquide-désordonné, ainsi que l'eau environnante. Dans la suite, nous utiliserons l'indice o pour la phase liquide-ordonnée, l'indice d pour la phase liquide-désordonnée et l'indice w pour l'eau environnante.

Nous faisons l'hypothèse que la membrane est plane ; ceci est bien adapté pour le cas d'une vésicule présentant un domaine de petite taille devant le rayon de la vésicule. Les coordonnées cylindriques sont alors adaptées.

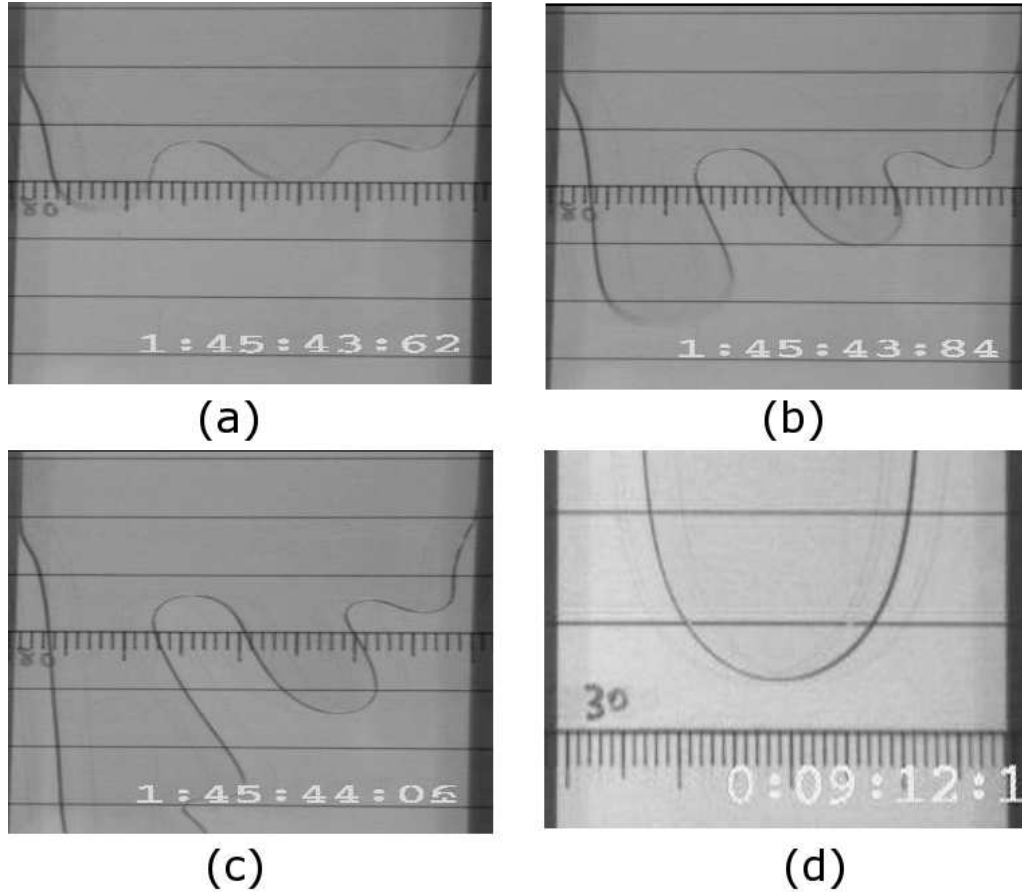


Figure V.3: Evolution de l'interface entre deux fluides confinés dans une cellule de Hele-Shaw. Au premier stade de l'instabilité (figure a), il se forme des bosses avec une longueur d'onde l_c . La croissance de ces bosses (figures b et c) conduit à la formation de doigts. La compétition entre ces doigts conduit à la sélection d'un doigt unique (figure d). Images fournies par Christophe Chevalier.

V.2.a Hydrodynamique

Domaine liquide-désordonné

La bicouche étant très difficile à étirer dans son plan (voir chapitre II), elle peut être décrite comme un fluide incompressible. Ceci se traduit, en l'absence du phénomène de succion, par la conservation de la masse :

$$\text{div}_2 \vec{v}_d = 0, \quad (\text{V.1})$$

où div_2 représente la divergence à deux dimensions.

Les mouvements des lipides étant lents (quelques micromètres à la seconde) et le fluide plus visqueux que l'eau, nous pouvons négliger les effets inertiels. Les contraintes dans la

bicouche sont alors données par l'équation de Stokes tenant compte de l'eau environnante (voir chapitre II) :

$$\vec{\nabla}P = \mu_d \Delta \vec{v}_d - 2\delta \frac{\mu_w}{h} \partial_z \vec{v}_w(z=0), \quad (\text{V.2})$$

avec $\partial_z \vec{v}_w(z=0)$ la dérivée par rapport à la direction z de la vitesse de l'eau considérée au niveau de la membrane; notons qu'il s'agit d'une vitesse horizontale : il n'y a pas de mouvement vertical de la bicouche. Le paramètre h est l'épaisseur de la bicouche et δ est une fonction assurant la symétrie de la friction due à l'eau sur la membrane : pour $z < 0$, $\delta = 1$ et pour $z > 0$, $\delta = -1$. Cette approximation due à Saffman permet de traiter la membrane comme une surface de discontinuité, tout en prenant en compte les conditions aux limites entre couches de fluides différents.

Domaine liquide-ordonné

Le domaine liquide-ordonné diffère du domaine liquide-désordonné par ses paramètres physiques, comme la viscosité, et par un enrichissement plus important en cholestérol. C'est aussi dans ce domaine que les protéines HDL prélèvent le cholestérol, ce qui entraîne une disparition de matière. Le bilan de masse devient alors

$$\text{div}_2 \vec{v}_o = -q, \quad (\text{V.3})$$

où q est le taux de succion local dans le domaine. Dans la suite, nous ferons l'hypothèse que q ne dépend que de la distance au centre du domaine afin de préserver la symétrie. Nous ferons aussi l'hypothèse que le taux de succion est nul au bord du domaine, pour éviter les singularités à l'interface.

Le champ de pression dans la phase liquide-ordonnée est donné par l'équation de Stokes adaptée à un fluide bidimensionnel entouré d'eau. Cette équation est la même que le fluide soit compressible ou non (voir annexe C), aussi nous retrouvons la relation (V.2) :

$$\vec{\nabla}P = \mu_o \Delta \vec{v}_o - 2\delta \frac{\mu_w}{h} \partial_z \vec{v}_w(z=0). \quad (\text{V.4})$$

Nous faisons l'hypothèse que l'épaisseur h de la bicouche est la même dans les deux phases. Bien que ce ne soit pas parfaitement exact, cela simplifie les notations sans changer les conclusions du calcul.

Eau environnante

L'eau environnant la membrane est un liquide classique, à trois dimensions et incompressible. En raison des faibles vitesses impliquées, son comportement est bien décrit par

l'équation de Stokes. L'hydrodynamique de l'eau environnante est donc donnée par les équations usuelles :

$$\operatorname{div} \vec{v}_w = 0, \quad (\text{V.5})$$

$$\vec{\nabla} P = \mu_w \Delta \vec{v}_w. \quad (\text{V.6})$$

La résolution de ces équations nécessite de connaître les conditions de raccord reliant les différentes parties du système : entre les deux domaines et entre les domaines et l'eau.

V.2.b Conditions de raccord

Les conditions aux limites entre deux fluides visqueux sont [79] :

- la continuité de la vitesse normale
- la continuité de la vitesse tangentielle
- la continuité de la contrainte tangentielle
- le saut de contraintes normales donné par la loi de Laplace.

A l'interface entre les deux domaines, il faut assurer ces quatre conditions. Notons de plus que la vitesse doit s'annuler à l'infini dans le domaine liquide-désordonné : il n'y a pas de mouvement d'ensemble. De plus, la pression est définie à une constante près, aussi nous choisissons de la prendre nulle à l'infini.

Entre la membrane et l'eau environnante, il faut assurer uniquement la continuité de la vitesse tangentielle. La vitesse normale dans l'eau doit être nulle : la position de la membrane est fixée en $z = 0$, ce qui empêche les mouvements verticaux du fluide. La bicouche étant décrite par un fluide bidimensionnel, il n'est pas possible d'écrire directement la contrainte tangentielle avec l'eau ; cette condition est prise en compte par le terme de Saffman en $\partial_z \vec{v}_w(z = 0)$ dans l'équation de Stokes [80]. La géométrie du système entraîne que la loi de Laplace est automatiquement satisfaite à l'interface entre la bicouche et l'eau.

Nous considérons un problème symétrique, aussi les deux parties de l'eau en $z > 0$ et $z < 0$ doivent être identiques sous la transformation $z \rightarrow -z$. De plus, les mouvements de l'eau doivent s'atténuer à des distances infinies de la membrane dans la direction z .

V.3 Modèle de Saffman-Taylor

Nous commençons par présenter le traitement de l'instabilité de Saffman-Taylor dans la même géométrie. Il s'agit d'un disque de liquide visqueux (noté par l'indice o), de rayon R_0 diminuant avec le temps, entouré par un liquide moins visqueux (noté par l'indice d), les deux fluides étant confinés entre deux plaques proches, séparées d'une épaisseur h . Notre objectif est de pouvoir comparer le comportement d'un fluide bidimensionnel avec

celui d'un fluide confiné. Notons que, dans ce modèle, il n'y a pas d'eau environnante : les fluides sont confinés par des plaques fixes.

L'écoulement est décrit par deux équations : le bilan de masse et l'équation de Darcy, qui moyenne la vitesse de l'écoulement sur la verticale. Nous faisons l'hypothèse que la succion a lieu uniquement dans le disque visqueux. Le bilan de masse se traduit donc par :

$$\operatorname{div}_2 \vec{v}_o = -q \text{ pour } \rho \leq R_0, \quad (\text{V.7a})$$

$$\operatorname{div}_2 \vec{v}_d = 0 \text{ pour } \rho \geq R_0. \quad (\text{V.7b})$$

$$(\text{V.7c})$$

avec q le taux de succion. L'équation de Darcy relie la pression à la vitesse dans chaque phase :

$$\vec{\nabla} P = -K_i \vec{v}, \quad (\text{V.8})$$

avec K_i la mobilité, reliée à la viscosité du milieu par la relation :

$$K_i = \frac{12\mu_i}{h^2},$$

Les conditions à l'interface entre les deux fluides sont la continuité de la vitesse normale et la loi de Laplace, donnant le saut de pression.

V.3.a Solution axisymétrique

Pour pouvoir déterminer la stabilité d'une interface circulaire, il faut commencer par décrire le mouvement du fluide dans le cas axisymétrique. Nous définissons la succion instantanée Q par :

$$Q = \int_0^{R_0} q(r) r dr. \quad (\text{V.9})$$

qui est l'intégrale (à 2π près) du taux de succion q sur la surface du fluide visqueux.

La divergence à deux dimensions d'une vitesse axisymétrique est donnée par la relation :

$$\operatorname{div}_2 \vec{V} = \left(\frac{\partial}{\partial \rho} + \frac{1}{\rho} \right) V^r,$$

où V^r est la composante radiale de la vitesse. Les vitesses sont donc reliées au taux de succion :

$$\vec{V}_o(\rho) = -\frac{1}{\rho} \int_0^\rho q(r) r dr \vec{e}_r \quad \text{et} \quad \vec{V}_d(\rho) = -\frac{Q}{\rho} \vec{e}_r. \quad (\text{V.10})$$

La vitesse de l'interface, $\dot{R}_0 = V_d(R_0)$, est donc reliée à la succion instantanée par la relation $R_0 \dot{R}_0 = -Q$. La pression dans chaque phase i est donnée par la loi de Darcy :

$$\frac{dP}{d\rho} = -K_i V_i^r.$$

La pression est définie à une constante près ; aussi, nous faisons l'hypothèse que la pression est nulle à l'infini dans la phase peu visqueuse. La pression s'exprime donc :

$$P_o = K_o \int_0^\rho \frac{1}{r} \int_0^r q(x) x dx dr + C_o \text{ pour } \rho \leq R_0 \quad (\text{V.11a})$$

$$P_d = K_d Q \ln \left(\frac{\rho}{R_0} \right) \text{ pour } \rho \geq R_0. \quad (\text{V.11b})$$

La constante C_o est donnée par la loi de Laplace. La solution axisymétrique est alors complètement connue en tout point.

V.3.b Analyse de stabilité

Nous introduisons maintenant une perturbation de l'interface : nous voulons déterminer si cette perturbation va croître ou non au cours du temps. Nous faisons l'hypothèse que le taux de succion q reste isotrope, pour éviter un effet de forçage.

Nous introduisons une perturbation du contour due aux modes libres de l'interface

$$R = R_0(1 + \epsilon_n \cos n\theta),$$

avec ϵ_n un infiniment petit, fonction du temps. Notons ici que les modes $n = 0$ et $n = 1$ ne sont pas physiquement autorisés : ils correspondent respectivement à un changement de rayon et à la translation du domaine. Dans la suite, nous adopterons la notation suivante : une grandeur A se décompose en $A = \bar{A} + a$, avec $\bar{A}$ la solution axisymétrique et a l'effet de la perturbation due aux modes libres au premier ordre en ϵ_n .

L'effet de la succion est axisymétrique et pris en compte dans la solution axisymétrique ; aussi, nous n'avons pas à en tenir compte pour les modes libres, dont l'hydrodynamique est alors décrite par les équations :

$$\text{div}_2 \vec{v}_i = 0, \quad (\text{V.12a})$$

$$\vec{\nabla} p = -K_i \vec{v}, \quad (\text{V.12b})$$

quelque soit la phase i . La divergence de la loi de Darcy (V.12b) montre que la pression p doit satisfaire une équation de Laplace $\Delta p = 0$. En imposant que la pression est nulle à l'infini et ne diverge pas sur l'axe de symétrie, nous obtenons une expression de la pression p dans les deux phases :

$$p_o(\rho, \theta) = \pi_o \frac{\rho^n}{R_0^n} \cos n\theta \quad \text{pour } \rho \leq R_0, \quad (\text{V.13a})$$

$$p_d(\rho, \theta) = \pi_d \frac{R_0^n}{\rho^n} \cos n\theta \quad \text{pour } \rho \geq R_0, \quad (\text{V.13b})$$

avec π_o et π_d deux constantes du même ordre que ϵ_n . La loi de Darcy (V.12b) permet d'exprimer la vitesse v dans chaque phase :

$$v_{o,\rho}(\rho, \theta) = -\frac{\pi_o n}{K_o R_0} \frac{\rho^{n-1}}{R_0^{n-1}} \cos n\theta, \quad (\text{V.14a})$$

$$v_{o,\theta}(\rho, \theta) = \frac{\pi_o n}{K_o R_0} \frac{\rho^{n-1}}{R_0^{n-1}} \sin n\theta, \quad (\text{V.14b})$$

$$v_{d,\rho}(\rho, \theta) = \frac{\pi_d n}{K_d R_0} \frac{R_0^{n+1}}{\rho^{n+1}} \cos n\theta, \quad (\text{V.14c})$$

$$v_{d,\theta}(\rho, \theta) = \frac{\pi_d n}{K_d R_0} \frac{R_0^{n+1}}{\rho^{n+1}} \sin n\theta. \quad (\text{V.14d})$$

Les conditions à l'interface entre les deux fluides relient les vitesses et les pressions réelles, c'est à dire la somme de la solution axisymétrique et de la perturbation, de chaque phase. Il faut aussi prendre en compte le changement de la position de l'interface. L'expression d'une fonction A sans singularité au niveau de l'interface est donnée par :

$$A(R_0) = \bar{A}(R_0) + \epsilon_n R_0 \frac{\partial \bar{A}}{\partial \rho}(R_0) \cos n\theta + a(R_0).$$

En supposant que le taux de succion est nul à l'interface, la continuité de la vitesse normale entraîne l'égalité :

$$\frac{\pi_o}{K_o} = -\frac{\pi_d}{K_d}.$$

Le saut de pression à l'interface fournit la deuxième condition à l'interface :

$$\pi_o + \epsilon_n K_o \frac{Q}{R_0^2} - \pi_d - \epsilon_n K_d \frac{Q}{R_0^2} = \frac{\gamma}{R_0} (n^2 - 1),$$

avec γ la tension de l'interface. Notons que γ est une tension de surface dans la bicouche, qui est reliée à la tension de ligne σ utilisée dans les chapitres précédents à travers $\gamma = \sigma/h$. Nous déduisons de ces relations l'expression des constantes π_o et π_d en fonction de la perturbation ϵ_n :

$$\pi_o = \epsilon_n \frac{\mu_o}{\mu_o + \mu_d} \left(\frac{\gamma}{R_0} (n^2 - 1) - \frac{Q}{h^2} (\mu_o - \mu_d) \right), \quad (\text{V.15a})$$

$$\pi_d = -\epsilon_n \frac{\mu_d}{\mu_o + \mu_d} \left(\frac{\gamma}{R_0} (n^2 - 1) - \frac{Q}{h^2} (\mu_o - \mu_d) \right). \quad (\text{V.15b})$$

Nous connaissons maintenant complètement la solution perturbée en fonction de l'amplitude de la perturbation. Pour savoir si des modes libres croissent ou non, nous regardons le taux de croissance, qui donne l'évolution de ϵ_n en fonction du temps. Pour calculer ce taux de croissance, nous utilisons le fait que la vitesse de croissance de la perturbation peut s'écrire de deux manière différentes, soit par $\dot{R} - \dot{R}_0$ (avec le point désignant une dérivée

temporelle), soit par $V_{d,\rho,d} - \bar{V}_{d,\rho}$, au niveau de l'interface. Nous avons $\dot{R} - \dot{R}_0 = V_{d,\rho} - \bar{V}_{d,\rho}$ au bord, avec

$$\begin{aligned}\dot{R} - \dot{R}_0 &= R_0 \cos n\theta \left(\dot{\epsilon}_n - \frac{Q}{R_0^2} \epsilon_n \right) \quad \text{et} \\ V_{d,\rho} - \bar{V}_{d,\rho} &= R_0 \cos n\theta \frac{Q}{R_0^2} \epsilon_n + v_{d,\rho}.\end{aligned}$$

La vitesse $v_{d,\rho}$ est la composante radiale des modes libres. Notons qu'ici nous avons considéré les vitesses dans la phase liquide-désordonnée mais que le résultat est le même si nous considérons la phase liquide-ordonnée. Nous obtenons alors le taux de croissance de la perturbation :

$$\Omega_n = \frac{\dot{\epsilon}_n}{\epsilon_n} = \frac{2Q}{R_0^2} - \gamma \frac{h^2}{R_0^3} \frac{n(n^2 - 1)}{12(\mu_o + \mu_d)} + n \frac{Q}{R_0^2} \frac{\mu_o - \mu_d}{\mu_o + \mu_d}. \quad (\text{V.16})$$

Cette relation fournit un critère d'instabilité : si il existe une perturbation ayant un Ω_n positif, son amplitude est une fonction croissante du temps et la forme circulaire de l'interface est instable. Le moteur de l'instabilité est le contraste de viscosité : le dernier terme est positif si le fluide au centre est plus visqueux que le fluide environnant. La tension de l'interface γ résiste à la déstabilisation de l'interface : faire croître une perturbation demande d'augmenter la longueur de l'interface. Notons que le premier terme dans l'expression de Ω_n est un terme moteur indépendant du contraste de viscosité, lié à la géométrie du système. Toutefois, ce terme n'est généralement pas pris en compte dans l'instabilité de Saffman-Taylor car le système sélectionne des n grands.

Pour sélectionner n , nous disposons de deux critères : soit l'extrémum de dissipation soit le mode le plus rapide (c'est à dire de plus grand Ω_n). Ces deux critères donnent le même résultat si n est grand et nous obtenons :

$$n_{ST} \approx \sqrt{\frac{4QR_0(\mu_o - \mu_d)}{\gamma h^2}}$$

Nous connaissons au moins un ordre de grandeur des différents paramètres physiques, aussi nous pouvons évaluer n_{ST} pour le modèle de Saffman-Taylor. L'épaisseur h de la bicouche est de l'ordre de 5 nm et le rayon R_0 du domaine est de 20 μm sur les images (V.1). La tension de ligne de l'interface σ est de l'ordre de $5 \cdot 10^{-13} N$, donc la tension de surface associée est $\gamma \approx 10^{-4} N/m$. A partir des expériences, nous pouvons déterminer un ordre de grandeur de la succion en mesurant le rayon du domaine ordonné au cours du temps. Nous obtenons ainsi Q/R_0^2 de l'ordre de $2 \cdot 10^{-3} s^{-1}$ dans les expériences avec une instabilité du contour. La viscosité de la bicouche est très mal connue : suivant les mesures, elle varie entre 0,1 Pa.s et 1000 Pa.s. Aussi, le nombre de doigts varie entre $n_{ST} \approx 50$, ce qui est trop grand d'un ordre de grandeur et $n_{ST} \approx 5000$ qui est beaucoup trop grand.

V.4 Modèle simple : bicouche sans eau environnante

Nous considérons maintenant le cas de la bicouche comme un fluide bidimensionnel. Nous commençons par la limite $\mu_w = 0$, lorsque la présence de l'eau environnante peut être négligée. Cette approche nous permet de comprendre les spécificités de l'hydrodynamique de la bicouche, en plus de fournir un cas limite pour l'étude du modèle complet.

Pour déterminer un critère d'instabilité de la forme circulaire, nous procédons comme pour le modèle de Saffman-Taylor : nous commençons par déterminer les propriétés de la forme circulaire, avant d'introduire une perturbation, et nous examinons si elle croît ou si elle s'atténue au cours du temps.

V.4.a Solution axisymétrique

Nous nous restreignons aux solutions axisymétriques dans la limite $\mu_w = 0$. Dans ce cas, il n'y a pas besoin de tenir compte de l'eau environnante pour obtenir la réponse de la bicouche, contrairement au modèle complet. Comme précédemment, nous notons le rayon du domaine liquide-ordonné R_0 (c'est une fonction implicite du temps) et nous définissons la suction instantanée par :

$$Q = \int_0^{R_0} q(\rho) \rho d\rho. \quad (\text{V.17})$$

La divergence à deux dimensions pour une vitesse axisymétrique s'écrit exactement comme dans le modèle de Saffman-Taylor ; aussi, les vitesses dans les deux domaines sont reliées au taux de suction par les mêmes relations (V.10) que précédemment :

$$\begin{aligned} \vec{V}_o(\rho) &= -\frac{1}{\rho} \int_0^\rho q(r) r dr \vec{e}_r, \\ \vec{V}_d(\rho) &= -\frac{Q}{\rho} \vec{e}_r. \end{aligned}$$

Le modèle diffère dans l'expression de la pression, donnée par l'équation de Stokes au lieu de l'équation de Darcy. Ici, les équations de Stokes (V.2) et (V.4) ne dépendent pas de l'eau environnante et deviennent :

$$\vec{\nabla} P = \mu_i \Delta \vec{V}_i$$

dans chaque phase i . Pour une solution purement radiale, le laplacien vectoriel peut s'exprimer en fonction de la divergence :

$$\Delta \vec{v} = \vec{\nabla} \text{div}_2 \vec{v}.$$

Aussi, les relations de Stokes peuvent se réécrire en fonction du taux de suction local q :

$$\vec{\nabla} P = -\mu_i \vec{\nabla} q(\rho).$$

En adoptant la convention que la pression s'annule à l'infini dans la phase liquide-désordonnée, nous obtenons une expression de la pression en tout point :

$$P_o(\rho) = -\mu_o q(\rho) + C_0 \quad \text{pour } \rho \leq R_0, \quad (\text{V.18})$$

$$P_d(\rho) = 0 \quad \text{pour } \rho \geq R_0. \quad (\text{V.19})$$

La constante C_0 est donnée par la loi de Laplace, qui exprime le saut de contraintes normales en fonction de la tension de surface ($\gamma = \sigma/h$) de l'interface. Dans un fluide bidimensionnel, la contrainte normale s'exprime :

$$\tau_{\rho\rho} = -p + 2\mu \frac{\partial V^\rho}{\partial \rho} - \mu \operatorname{div}_2 \vec{V}. \quad (\text{V.20})$$

Nous supposons que le taux de suction s'annule au niveau de l'interface ($q(R_0) = 0$), pour éviter l'apparition de singularité. Aussi, la contrainte normale au niveau de l'interface est $\tau_{\rho\rho} = -C_o - 2\mu_o V_o/R_0$ pour la phase liquide-ordonnée et $\tau_{\rho\rho} = -2\mu_d V_d/R_0$ pour la phase liquide-désordonnée. La loi de Laplace s'écrit alors comme :

$$C_o + 2\mu_o \frac{V_o(R_0)}{R_0} - 2\mu_d \frac{V_d(R_0)}{R_0} = \frac{\gamma}{R_0}.$$

La continuité des vitesses imposant $V_d(R_0) = V_o(R_0) = -Q/R_0$, nous obtenons la constante C_o :

$$C_o = \frac{\gamma}{R_0} + 2(\mu_o - \mu_d) \frac{Q}{R_0^2}. \quad (\text{V.21})$$

L'écoulement pour un domaine liquide-ordonné circulaire est donc connu partout à partir de la connaissance du taux de suction. Nous utilisons alors une analyse de stabilité linéaire pour déterminer si la forme circulaire est stable ou non vis à vis d'une perturbation du contour.

V.4.b Analyse de stabilité

Nous nous intéressons à la stabilité du contour du domaine liquide-ordonné pendant la suction. Nous faisons l'hypothèse que le taux de suction q est isotrope, c'est à dire indépendant de θ . Nous pouvons espérer une instabilité en raison du flux hydrodynamique, dans la même idée que l'instabilité de Saffman-Taylor dans une cellule de Hele-Shaw.

Nous utilisons la même démarche que précédemment : nous introduisons une perturbation du contour due aux modes libres de l'interface :

$$R = R_0(1 + \epsilon_n \cos n\theta), \quad (\text{V.22})$$

avec ϵ_n un infiniment petit dépendant du temps. Comme précédemment, nous adoptons la convention de notation suivante : une grandeur A se décompose $A = \bar{A} + a$, avec $\bar{A}$ la

composante d'ordre zéro (axisymétrique) et a l'effet de la perturbation, au premier ordre en ϵ_n .

Nous faisons encore l'hypothèse que la succion demeure axisymétrique ; aussi, quelque soit le domaine, l'hydrodynamique de la perturbation est donnée par les équations :

$$\operatorname{div}_2 \vec{v} = 0, \quad (\text{V.23})$$

$$\vec{\nabla} p = \mu \Delta \vec{v}. \quad (\text{V.24})$$

Ceci implique que la perturbation sur la pression doit être solution d'une équation de Laplace. En imposant que la pression est nulle à l'infini et ne diverge pas en $\rho = 0$, la pression s'exprime comme dans le modèle de Saffman-Taylor :

$$p_o(\rho, \theta) = \pi_o \frac{\rho^n}{R_0^n} \cos n\theta, \quad (\text{V.25a})$$

$$p_d(\rho, \theta) = \pi_d \frac{R_0^n}{\rho^n} \cos n\theta \quad (\text{V.25b})$$

avec π_o et π_d deux constantes du même ordre que ϵ_n . L'équation de Stokes conduit à une expression de la perturbation de la vitesse :

$$v_{o,\rho} = \cos n\theta \frac{R_0}{\mu_o} \left[\pi_o \frac{n}{4(n+1)} \frac{\rho^{n+1}}{R_0^{n+1}} + a_o \frac{\rho^{n-1}}{R_0^{n-1}} \right], \quad (\text{V.26a})$$

$$v_{o,\theta} = -\sin n\theta \frac{R_0}{\mu_o} \left[\pi_o \frac{n+2}{4(n+1)} \frac{\rho^{n+1}}{R_0^{n+1}} + a_o \frac{\rho^{n-1}}{R_0^{n-1}} \right], \quad (\text{V.26b})$$

$$v_{d,\rho} = -\cos n\theta \frac{R_0}{\mu_d} \left[\pi_d \frac{n}{4(1-n)} \frac{R_0^{n-1}}{\rho^{n-1}} + a_d \frac{R_0^{n+1}}{\rho^{n+1}} \right], \quad (\text{V.26c})$$

$$v_{d,\theta} = \sin n\theta \frac{R_0}{\mu_d} \left[\pi_d \frac{2-n}{4(1-n)} \frac{R_0^{n-1}}{\rho^{n-1}} - a_d \frac{R_0^{n+1}}{\rho^{n+1}} \right]. \quad (\text{V.26d})$$

Les conditions aux limites doivent être satisfaites par le système complet (la solution d'ordre zéro plus la perturbation) et pas uniquement par la perturbation. Aussi, il faut prendre en compte la déformation de l'interface dans l'expression des grandeurs au bord. De plus, il faut aussi introduire dans les conditions aux limites le fait que, comme le contour n'étant plus circulaire, les vecteurs normaux et tangents ne sont plus ceux de la base classique ($\vec{e}_r$, $\vec{e}_\theta$). En raison de la symétrie de la solution circulaire, cet effet n'est important que pour la continuité des contraintes normales ; en tenant compte de la perturbation du contour sur la définition de la normale et de la tangente, la contrainte de cisaillement S s'écrit :

$$S = \tau_{\rho\theta} + \epsilon_n n \sin(n\theta) (\tau_{\theta\theta} - \tau_{\rho\rho}), \quad (\text{V.27})$$

au premier ordre dans la perturbation, avec τ le tenseur des contraintes dans la bicouche. Les contributions $\tau_{\rho\rho}$ et $\tau_{\theta\theta}$ sont dues à la solution symétrique.

Pour éviter les singularités à l'interface, nous faisons l'hypothèse que le taux de succion local est nul à proximité de l'interface. Bien que délicat, le calcul est alors direct et nous obtenons pour les quatre conditions aux limites :

- Continuité de la vitesse normale :

$$\frac{\pi_o}{\mu_o} \frac{n}{4(n+1)} + \frac{a_o}{\mu_o} = -\frac{\pi_d}{\mu_d} \frac{n}{4(1-n)} - \frac{a_d}{\mu_d}. \quad (\text{V.28})$$

- Continuité de la vitesse tangentielle :

$$-\frac{\pi_o}{\mu_o} \frac{n+2}{4(n+1)} - \frac{a_o}{\mu_o} = \frac{\pi_d}{\mu_d} \frac{2-n}{4(1-n)} - \frac{a_d}{\mu_d}. \quad (\text{V.29})$$

- Continuité de la contrainte tangentielle :

$$\frac{n}{2}\pi_o + 2a_o(n-1) - \frac{n}{2}\pi_d + 2a_d(n+1) = 4n\epsilon_n(\mu_d - \mu_o) \frac{Q}{R_0^2}. \quad (\text{V.30})$$

- Loi de Laplace :

$$\begin{aligned} \pi_o \left(1 - \frac{n}{2}\right) - \pi_d \left(1 + \frac{n}{2}\right) - 2a_o(n-1) + 2a_d(n+1) = \\ \epsilon_n \left\{ \gamma \frac{n^2 - 1}{R_0} + 4(\mu_d - \mu_o) \frac{Q}{R_0^2} \right\}. \end{aligned} \quad (\text{V.31})$$

Ces quatre relations forment un système linéaire à partir duquel il est possible d'exprimer les quatre constantes π_o , a_o , π_d et a_d en fonction de l'amplitude de la perturbation ϵ_n et des paramètres physiques du système :

$$\pi_o = \epsilon_n \frac{\mu_o}{\mu_o + \mu_d} \left[4(n+1)(\mu_d - \mu_o) \frac{Q}{R_0^2} + \gamma \frac{n^2 - 1}{R_0} \right], \quad (\text{V.32a})$$

$$a_o = -\epsilon_n \frac{\mu_o}{\mu_o + \mu_d} \left[n(\mu_d - \mu_o) \frac{Q}{R_0^2} + \gamma \frac{n^2 + n}{4R_0} \right], \quad (\text{V.32b})$$

$$\pi_d = \epsilon_n \frac{\mu_d}{\mu_o + \mu_d} \left[4(n-1)(\mu_d - \mu_o) \frac{Q}{R_0^2} - \gamma \frac{n^2 - 1}{R_0} \right], \quad (\text{V.32c})$$

$$a_d = \epsilon_n \frac{\mu_d}{\mu_o + \mu_d} \left[n(\mu_d - \mu_o) \frac{Q}{R_0^2} + \gamma \frac{n(n-1)}{4R_0} \right]. \quad (\text{V.32d})$$

Pour savoir si la perturbation va croître ou non, nous regardons le taux de croissance de la perturbation, c'est à dire la manière dont évolue ϵ_n en fonction du temps. Le principe du calcul est le même que dans le modèle de Saffman-Taylor : nous utilisons la relation $\dot{R} - \dot{R}_0 = V_{d,\rho} - \bar{V}_{d,\rho}$ à l'interface. Le taux de croissance est alors :

$$\Omega_n = \frac{\dot{\epsilon}_n}{\epsilon_n} = \frac{2Q}{R_0^2} + \frac{1}{R_0 \epsilon_n \cos n\theta} v_{d,\rho}(R_0), \quad (\text{V.33})$$

avec $v_{d,\rho}$ la composante radiale des modes libres. Nous obtenons alors le taux de croissance de la perturbation Ω_n pour un fluide bidimensionnel sans eau environnante :

$$\Omega_n = \frac{\dot{\epsilon}_n}{\epsilon_n} = \frac{2Q}{R_0^2} - \frac{n}{2} \frac{\gamma}{(\mu_o + \mu_d)R_0}. \quad (\text{V.34})$$

Le contour du domaine liquide-ordonné est donc instable lorsque la succion instantanée dans le domaine est suffisant pour avoir $\Omega_2 \geq 0$. Notons que la relation (V.34) n'est pas valable pour $n = 0$ et $n = 1$, le premier correspondant à un contour circulaire et le second à une translation d'ensemble. Contrairement à l'instabilité de Saffman-Taylor, le contraste de viscosité n'apparaît pas ; le moteur de l'instabilité est le terme en $2Q/R_0^2$ dû à la succion, la tension de ligne ayant toujours un effet stabilisant. Ce terme moteur est dû à la géométrie cylindrique du système et disparaît si on considère la succion d'un demi-plan infini.

La relation de dispersion indique quels sont les modes libres qui croissent mais n'indique pas la longueur d'onde sélectionnée. Ceci peut être obtenu en cherchant l'extrémum de la dissipation du système. Pour un fluide incompressible, la dissipation visqueuse E_d dans la phase i est donnée par l'intégrale sur la surface S de la phase :

$$E_d = \mu_i h \int_S (\sigma_{\rho\rho}^2 + \sigma_{\theta\theta}^2 + 2\sigma_{\rho\theta}^2) dS$$

avec σ le tenseur des contraintes visqueuses, divisé par la viscosité. Notons que notre système n'est pas rigoureusement incompressible dans la phase liquide-ordonnée, sauf dans le cas où la succion est ponctuelle, au centre du domaine liquide-ordonné. Nous nous plaçons ici dans ce cas pour simplifier les calculs. En prenant en compte la contribution de la solution axisymétrique due au changement de position de l'interface, nous obtenons :

$$E_d = \left(Cte + n \frac{h\pi}{\mu_o + \mu_d} \left[\gamma^2 (n^2 - 1) - 16 \frac{Q^2}{R_0^2} (\mu_d - \mu_o)^2 \right] \right) \epsilon_n^2,$$

avec Cte un terme indépendant du nombre n d'oscillations. L'extremum de la dissipation est alors un minimum et sélectionne le nombre d'oscillation n_S :

$$n_S = \sqrt{\frac{1}{3} \left(1 + 16 \frac{Q^2}{\gamma^2 R_0^2} (\mu_d - \mu_o)^2 \right)}. \quad (V.35)$$

Le nombre sélectionné n'est donc pas forcément $n = 2$, contrairement à ce que pourrait laisser penser le taux de croissance. Le nombre n_S augmente quand la succion augmente mais diminue quand la tension de surface augmente, ce qui est conforme à l'intuition physique.

Le nombre de doigts sélectionné dans le modèle de Stokes est relié à celui sélectionné dans le modèle de Saffman-Taylor par la relation :

$$n_{ST}^2 = (3n_S^2 - 1) \cdot \left(\frac{R_0}{h} \right)^2.$$

Ceci permet de mieux comprendre pourquoi les fluides bidimensionnels sont nettement plus stables que ceux obtenus en cellule de Hele-Shaw : le rapport d'aspect R_0/h est toujours très grand pour une cellule de Hele-Shaw. Pour les plus petites viscosités mesurées ($\mu_i \approx$

$0,1 \text{ Pa.s}$), le terme en Q^2 dans l'équation (V.35) est toujours très petit devant 1. Le nombre de doigts vaut alors $n_S \approx 0,6$ mais ne dépend pas de l'intensité de la succion ; il n'est donc pas possible d'obtenir un nombre de doigts supérieur à 2 simplement en changeant la succion d'un facteur 2 ou 3 comme dans les expériences. Des valeurs aussi basses de viscosité ne correspondent donc pas aux observations expérimentales, dans la limite où l'eau environnante est négligeable. Pour les plus grandes viscosités ($\mu_i \approx 1000 \text{ Pa.s}$), nous obtenons $n_S \approx 1$; ici, la succion contribue de manière non négligeable et conduit à un ordre de grandeur correct, bien que la valeur soit encore trop petite. Pour mieux pouvoir conclure, il faudrait avoir une valeur plus précise de la viscosité dans la membrane mais aussi mieux prendre en compte l'influence de l'eau environnante. Notons que, en supposant que Q soit fixe, les petits domaines sont plus instables que les grands, pour un fluide bidimensionnel, contrairement au modèle de Saffman-Taylor.

V.5 Modèle complet

Nous considérons maintenant le système complet : une bicouche entourée par un milieu aqueux infini, de viscosité μ_w . A priori, l'eau est moins visqueuse que les domaines lipidiques et nous attendons $\mu_w < \mu_d < \mu_o$. L'eau environnante exerce une force de friction sur les lipides, qui apparaît via le terme de Saffman dans les équations de Stokes pour la bicouche. L'importance de l'eau environnante sur l'hydrodynamique de la bicouche peut être mesurée dans le domaine i par le nombre sans dimension

$$N = \frac{\mu_w}{\mu_i} \frac{\lambda}{h} \quad (\text{V.36})$$

avec λ la taille typique des variations de vitesses et h l'épaisseur de la bicouche, soit typiquement 4nm. Un ordre de grandeur de λ va être donné par la seule longueur caractéristique du domaine liquide-ordonné, son rayon, entre $1 \mu\text{m}$ et $10 \mu\text{m}$; aussi, le rapport des tailles est de l'ordre de mille. Suivant la méthode de mesure, la viscosité de la membrane change de plusieurs ordres de grandeurs (voir chapitre II). Pour des mesures basées sur des sondes liées à la membrane (diffusion de protéines) [8], le rapport des viscosités est de l'ordre de 1/100, ce qui donne $N \approx 10$; pour des extrapolations à partir du temps de fermeture d'un pore [77], $\mu_w/\mu_i \approx 10^{-6}$, ce qui donne $N \approx 10^{-3}$. Aussi, il n'est pas possible a priori de prédire si l'effet de l'eau environnante peut être négligé ou non.

Comme dans le modèle simple, l'étude de stabilité se fait en deux temps : nous déterminons d'abord la solution d'ordre zéro, dont le contour est circulaire ; nous introduisons ensuite une perturbation du contour, dont nous regardons si l'amplitude croît avec le temps ou non. En raison des difficultés de calcul, nous avons pour l'instant établi le formalisme général, que nous avons validé en retrouvant les conclusions du modèle simple dans la limite sans eau environnante.

V.5.a Solution axisymétrique

La principale difficulté dans le cas général est la détermination des solutions dans l'eau car la vitesse comporte des composantes suivant $\vec{e}_r$ et $\vec{e}_z$. Une fois le formalisme mis en place pour l'eau, nous pourrions décrire le mouvement des lipides dans la membrane.

Mouvement de l'eau environnante

Le comportement de l'eau est décrite par l'équation d'incompressibilité ainsi que l'équation de Stokes. De plus, il faut assurer la continuité de la vitesse tangentielle à l'interface avec la bicouche.

Pour résoudre l'équation de Stokes, nous utilisons la décomposition standard :

$$\vec{v}_w = \vec{\nabla}\Phi + \vec{\nabla} \wedge \vec{A} = \vec{v}_1 + \vec{v}_2, \quad (\text{V.37})$$

où Φ est un potentiel scalaire et $\vec{A}$ un potentiel vecteur de divergence nulle. L'équation de Stokes impose que le champ de vorticité

$$\vec{\Omega} = \vec{\nabla} \wedge \vec{v}_w = \Omega \vec{e}_\theta = -\Delta \vec{A}$$

satisfasse $\Delta \vec{\Omega} = 0$. En utilisant la transformation de Hankel, il vient :

$$\Omega(\rho, z) = \delta \int_0^\infty \tilde{\Omega}(k) J_1(k\rho) \exp(\delta k z) dk, \quad (\text{V.38})$$

avec $\delta = -1$ pour $z \geq 0$ et $\delta = +1$ pour les z négatifs ; J_1 est la fonction de Bessel d'ordre 1. Notons que Ω est discontinu en $z = 0$, ce qui est permis car la membrane est une surface de discontinuité.

Le potentiel vectoriel $\vec{A}$ satisfait $\Delta \vec{A} = -\Omega \vec{e}_\theta$; aussi, nous avons $\vec{A} = A \vec{e}_\theta$ et

$$A(\rho, z) = \delta \int_0^\infty \frac{\tilde{\Omega}(k)}{k^2} \tilde{A} \exp(\delta k z) dk. \quad (\text{V.39})$$

La fonction $\tilde{A}(k)$ est solution d'une équation différentielle ordinaire du second ordre :

$$\tilde{A}(k) = -k\rho J_2(k\rho)/2.$$

Ceci nous permet d'obtenir l'expression de $\vec{v}_2 = \vec{\nabla} \wedge \vec{A}$:

$$V_{2,\rho} = \frac{\rho}{2} \int_0^\infty \tilde{\Omega}(k) J_2(k\rho) \exp(\delta k z) dk, \quad (\text{V.40a})$$

$$V_{2,z} = -\delta \frac{\rho}{2} \int_0^\infty \tilde{\Omega}(k) J_1(k\rho) \exp(\delta k z) dk. \quad (\text{V.40b})$$

Le potentiel scalaire Φ est déduit de la conservation de la masse, ce qui implique $\Delta \phi = 0$ et nous obtenons :

$$\Phi(\rho, z) = \int_0^\infty \tilde{\Phi}(k) J_0(k\rho) \exp(\delta k z) dk. \quad (\text{V.41})$$

Les potentiels scalaire et vectoriel sont reliés au taux de succion local $q(\rho)$ dans la membrane par la continuité de la vitesse tangentielle en $z = 0$. Ceci implique $\vec{v}_w = \vec{v}_i$ pour $z = 0$ dans la phase i , ce qui entraîne

$$\partial_z v_w^z = q(\rho). \quad (\text{V.42})$$

La transformée de Hankel d'une fonction quelconque de ρ , telle $q(\rho)$, s'exprime à partir de la fonction de Bessel J_0 par :

$$q(\rho) = \int_0^\infty \tilde{q}(k) J_0(k\rho) dk \quad \text{avec} \quad \tilde{q}(k) = k \int_0^\infty q(\rho) J_0(k\rho) \rho d\rho. \quad (\text{V.43})$$

La continuité de la vitesse tangentielle et l'annulation de la vitesse normale en $z = 0$ nous conduisent alors aux relations

$$\tilde{\Omega}(k) = -2\tilde{q}(k), \quad (\text{V.44a})$$

$$\tilde{\Phi}(k) = \frac{\partial_k \tilde{\Omega}}{2k}. \quad (\text{V.44b})$$

Mouvement dans la bicouche

L'hydrodynamique de la bicouche est donnée par le bilan de masse et l'équation de Stokes adaptée pour un fluide bidimensionnel, dans chaque phase. Le mouvement de l'eau environnante n'intervient que dans l'équation de Stokes. Aussi, la prise en compte de l'eau dans le modèle ne modifie pas le champ de vitesse dans la bicouche ; les équations (V.10) donnent donc toujours la vitesse des lipides :

$$\begin{aligned} \vec{V}_o(\rho) &= -\frac{1}{\rho} \int_0^\rho q(r) r dr \vec{e}_r, \\ \vec{V}_d(\rho) &= -\frac{Q}{\rho}. \end{aligned}$$

L'expression de la vitesse dans l'eau impose d'utiliser la transformation de Hankel pour résoudre l'équation de Stokes dans la bicouche. Comme dans les modèles précédents, l'axisymétrie de la vitesse conduit à $\Delta \vec{v}_o = -q'(\rho) \vec{e}_r$ et $\Delta \vec{v}_d = 0$. Aussi, les pressions dans les domaines sont :

$$\tilde{P}_o(k) = \left[-\mu_o - \frac{4}{kh} \mu_w \right] \tilde{q}(k) + C_o J_1(kR_0), \quad (\text{V.45a})$$

$$\tilde{P}_d(k) = -\frac{4}{kh} \mu_w \tilde{q}(k), \quad (\text{V.45b})$$

la constante C_o étant donnée par la loi de Laplace.

Par rapport au modèle simple (sans eau environnante), il n'y a qu'un terme supplémentaire, dû à l'eau, dans l'équation de Stokes. Comme la contribution de l'eau est continue à

l'interface, ce terme ne change pas le saut de contrainte. La constante C_o est donc toujours donnée par la relation (V.21) :

$$C_o = \frac{\gamma}{R_0} + 2(\mu_o - \mu_d) \frac{Q}{R_0^2}.$$

La solution circulaire est alors complètement connue à partir du taux de succion. Il est possible d'utiliser une analyse de stabilité linéaire pour déterminer si la forme circulaire est stable ou non vis à vis d'une perturbation.

V.5.b Analyse de stabilité

Le principe est le même que pour les modèles précédents : nous introduisons une perturbation du contour du domaine liquide-ordonné, sous la forme d'un mode libre, et nous déterminons si ce mode a une amplitude croissante ou non au cours du temps. La perturbation due aux modes libres de l'interface s'exprime

$$R = R_0(1 + \epsilon_n \cos n\theta), \quad (\text{V.46})$$

avec ϵ_n un infiniment petit dépendant du temps. Nous adoptons la même notation que dans les analyses de stabilité linéaire précédentes : une grandeur A se décompose $A = \bar{A} + a$, avec $\bar{A}$ la composante d'ordre zéro (axisymétrique) et a l'effet de la perturbation, au premier ordre en ϵ_n .

Modes libres dans l'eau

Nous commençons par déterminer les perturbations des grandeurs hydrodynamiques dans l'eau environnante. Comme dans le cas axisymétrique, nous utilisons la transformation de Hankel pour exprimer ces perturbations.

Le champ de vitesse doit satisfaire la condition d'incompressibilité, ce qui nous donne :

$$v_{w,\rho} = \cos n\theta \int_0^\infty \left\{ a(k)J_{n-1}(k\rho) + b(k)J_{n+1}(k\rho) - \frac{\delta}{2}kz(a(k) - b(k))(J_{n+1}(k\rho) - J_{n-1}(k\rho)) \right\} \exp(\delta kz) dk, \quad (\text{V.47a})$$

$$v_{w,\theta} = \sin n\theta \int_0^\infty \left\{ -a(k)J_{n-1}(k\rho) + b(k)J_{n+1}(k\rho) - \frac{\delta}{2}kz(a(k) - b(k))(J_{n+1}(k\rho) + J_{n-1}(k\rho)) \right\} \exp(\delta kz) dk, \quad (\text{V.47b})$$

$$v_{w,z} = \cos n\theta \int_0^\infty kz[a(k) - b(k)]J_n(k\rho) \exp(\delta kz) dk, \quad (\text{V.47c})$$

avec $a(k)$ et $b(k)$ des termes du même ordre que ϵ_n . Notons que la vitesse normale à la bicouche est bien nulle en $z = 0$. La perturbation sur la pression se déduit de la vitesse

par l'équation de Stokes :

$$p = 2\mu_w \cos n\theta \int_0^\infty k [a(k) - b(k)] J_n(k\rho) \exp(\delta kz) dk. \quad (\text{V.48})$$

Modes libres dans la bicouche

Les composantes de la vitesse dans la bicouche sont celles de la vitesse dans l'eau en $z = 0$ pour assurer les conditions de raccord. La contrainte d'incompressibilité de la bicouche impose :

$$a(k) = b(k). \quad (\text{V.49})$$

Cette condition entraîne une simplification des expressions des perturbations de la vitesse et de la pression dans l'eau :

$$v_{w,\rho} = \cos n\theta \int_0^\infty [J_{n-1}(k\rho) + J_{n+1}(k\rho)] a(k) \exp(\delta kz) dk, \quad (\text{V.50a})$$

$$v_{w,\theta} = \sin n\theta \int_0^\infty [J_{n+1}(k\rho) - J_{n-1}(k\rho)] a(k) \exp(\delta kz) dk, \quad (\text{V.50b})$$

$$v_{w,z} = 0, \quad (\text{V.50c})$$

$$p_w = 0. \quad (\text{V.50d})$$

La perturbation de la vitesse dans l'eau est donc parallèle à la bicouche et complètement donnée par la fonction $a(k)$; nous en déduisons l'expression de la perturbation de la vitesse dans la bicouche :

$$v_\rho = \cos n\theta \int_0^\infty [J_{n-1}(k\rho) + J_{n+1}(k\rho)] a(k) dk, \quad (\text{V.51a})$$

$$v_\theta = \sin n\theta \int_0^\infty [J_{n+1}(k\rho) - J_{n-1}(k\rho)] a(k) dk, \quad (\text{V.51b})$$

ainsi que la force de friction de l'eau sur la bicouche :

$$f_\rho = -\frac{2\mu_w}{h} \cos n\theta \int_0^\infty k a(k) [J_{n-1}(k\rho) + J_{n+1}(k\rho)] dk, \quad (\text{V.52a})$$

$$f_\theta = -\frac{2\mu_w}{h} \sin n\theta \int_0^\infty k a(k) [J_{n+1}(k\rho) - J_{n-1}(k\rho)] dk. \quad (\text{V.52b})$$

Pour obtenir l'expression de $a(k)$ en fonction de ϵ_n , il faut maintenant écrire plus spécifiquement les équations de l'hydrodynamique pour la bicouche.

Comme dans les modèles précédents, nous nous intéressons aux modes libres du contour, qui doivent donc satisfaire la condition de divergence nulle quelque soit le domaine, sans tenir compte du taux de succion local. Aussi, en prenant la divergence de l'équation de Stokes dans la bicouche, il vient que la perturbation de la pression dans la bicouche doit

satisfaire une équation laplacienne $\Delta p = 0$; la perturbation du champ de pression est donnée par les équations V.13 :

$$p_o(\rho, \theta) = \pi_o \frac{\rho^n}{R_0^n} \cos n\theta, \quad (\text{V.53a})$$

$$p_d(\rho, \theta) = \pi_d \frac{R_0^n}{\rho^n} \cos n\theta, \quad (\text{V.53b})$$

avec π_o et π_d des infiniments petits du même ordre que ϵ_n . L'équation de Stokes, écrite dans chaque phase, permet alors de relier la fonction $a(k)$ aux deux constantes π_o et π_d , à travers l'équation duale :

$$\begin{cases} \int_0^\infty a(k) \left[\frac{2\mu_w}{h} + \mu_o k \right] J_n(k\rho) dk = -\frac{1}{2} \frac{\rho^n}{R_0^n} \pi_o & \text{pour } \rho \leq R_0 \\ \int_0^\infty a(k) \left[\frac{2\mu_w}{h} + \mu_d k \right] J_n(k\rho) dk = \frac{1}{2} \frac{R_0^n}{\rho^n} \pi_d & \text{pour } \rho \geq R_0. \end{cases} \quad (\text{V.54})$$

Malheureusement, il n'y a pas de solution analytique générale à cette équation, essentiellement parce que les termes de friction ne dépendent pas de k alors que les termes visqueux de la membrane en dépendent. Pour faciliter la résolution de cette équation, nous pouvons la mettre sous la forme d'une équation intégrale. Pour cela, nous décomposons $a(k)$ en $a(k) = a_1(k) + a_2(k)$, avec $a_2(k)$ une fonction construite pour satisfaire (V.54) pour $\rho \geq R_0$. Ceci impose :

$$a_2(k) = \frac{1}{2} \frac{\pi_d R_0}{\mu_d k + 2\mu_w/h} J_{n-1}(kR_0). \quad (\text{V.55})$$

Pour que la fonction $a(k)$ satisfasse l'équation duale pour $\rho \geq R_0$, il faut que sa composante $a_1(k)$ ait une intégrale nulle. Cette condition est toujours satisfaite si $a_1(k)$ est de la forme :

$$a_1(k) = \int_0^{R_0} \Phi(x) \frac{J_{n+1}(kx)}{\mu_d k + 2\mu_w/h} dx, \quad (\text{V.56})$$

avec Φ une fonction déterminée par l'équation intégrale :

$$\begin{aligned} \int_0^{R_0} \Phi(x) \left[\int_0^\infty \frac{\mu_o k + \frac{2\mu_w}{h}}{\mu_d k + \frac{2\mu_w}{h}} J_{n+1}(kx) J_n(k\rho) dk \right] dx = -\frac{\pi_o}{2} \frac{\rho^n}{R_0^n} \\ - \frac{\pi_d}{2} R_0 \int_0^\infty \frac{\mu_o k + \frac{2\mu_w}{h}}{\mu_d k + \frac{2\mu_w}{h}} J_{n-1}(kR_0) J_n(k\rho) dk \quad \text{pour } \rho \leq R_0. \end{aligned} \quad (\text{V.57})$$

Nous n'avons pas trouvé de solution analytique à cette équation intégrale mais cette forme permet d'envisager une résolution numérique. Nous avons d'abord validé le formalisme dans le cas limite où l'eau est négligeable.

V.5.c Cas limite : friction négligeable

L'importance de l'eau environnante sur l'hydrodynamique de la membrane est mesurée par le nombre sans dimension

$$N = \frac{\mu_w}{\mu_i} \frac{\lambda}{h} \quad (\text{V.58})$$

avec λ la taille typique des variations de vitesses. Ici, nous nous plaçons dans la limite $N \rightarrow 0$. Dans ce cas, nous pouvons négliger les termes en $2\mu_w/h$ dans l'équation duale, dont nous pouvons alors trouver une solution :

$$a(k) = -\frac{\pi_o R_0}{2k\mu_o} J_{n+1}(kR_0) + \frac{\pi_d R_0}{2k\mu_d} J_{n-1}(kR_0). \quad (\text{V.59})$$

Pour pouvoir exprimer l'ensemble des grandeurs hydrodynamiques en fonction de l'amplitude de la perturbation ϵ_n , il faut écrire les conditions aux bords entre le domaine liquide-ordonné et le domaine liquide-désordonné. Notons que la construction des vitesses dans la bicouche à partir de la vitesse dans l'eau impose automatiquement la continuité des vitesses normale et tangentielle à l'interface entre les deux domaines : la vitesse dans l'eau est continue car le milieu aqueux est continu. Il reste à satisfaire la continuité du cisaillement et la loi de Laplace.

Comme dans le modèle simple, il faut prendre en compte la déformation de l'interface et les contributions des solutions axisymétrique dans le cisaillement (V.27) ; la condition de continuité du cisaillement impose alors :

$$\frac{\pi_o}{2\mu_o} + \frac{\pi_d}{2\mu_d} = 4\epsilon_n \frac{Q}{R_0^2} \frac{\mu_d - \mu_o}{\mu_d + \mu_o}. \quad (\text{V.60})$$

La loi de Laplace donne le saut de la contrainte normale au niveau de l'interface en fonction de la tension de ligne γ . L'eau environnante étant un milieu continu, les effets qu'elle exerce sur la membrane sont aussi continus ; ainsi, seuls les termes dus aux flux des lipides dans la bicouche doivent être pris en compte. Nous obtenons la relation :

$$\frac{\pi_o}{2\mu_o}(\mu_o + \mu_d) - \frac{\pi_d}{2\mu_d}(\mu_o + \mu_d) = \epsilon_n \left\{ \frac{n^2 - 1}{R_0} \gamma + 4(\mu_d - \mu_o) \frac{Q}{R_0^2} \right\}. \quad (\text{V.61})$$

Les conditions (V.60) et (V.61) relient π_o et π_d à ϵ_n et conduisent aux relations

$$\pi_o = \epsilon_n \frac{\mu_o}{\mu_o + \mu_d} \left[4(n+1)(\mu_d - \mu_o) \frac{Q}{R_0^2} + \gamma \frac{n^2 - 1}{R_0} \right], \quad (\text{V.62a})$$

$$\pi_d = \epsilon_n \frac{\mu_d}{\mu_o + \mu_d} \left[4(n-1)(\mu_d - \mu_o) \frac{Q}{R_0^2} - \gamma \frac{n^2 - 1}{R_0} \right]. \quad (\text{V.62b})$$

Nous retrouvons ainsi les valeurs calculées dans le modèle simple (V.32). La suite du calcul est alors identique et conduit aux mêmes conclusions.

V.6 Cas général

Jusqu'à présent, nous nous sommes restreints à l'analyse du cas limite sans eau environnante pour décrire le comportement du système. L'étude de cas plus généraux est analytiquement difficile car l'équation duale (V.54) n'a pas de solution générale. Pour

poursuivre le calcul analytique plus loin, il faut envisager d'exploiter d'autres cas limites, comme $N \gg 1$, mais pour lesquels le formalisme est lourd.

Une partie des difficultés de résolution est due au fait que l'effet de la viscosité de l'eau environnante dépend de la longueur d'onde considérée. Il existe dans les films de savon un problème similaire, lorsque l'air environnant affecte l'hydrodynamique du film, qui est résolu en utilisant une viscosité effective. Ceci pourrait être une approche alternative permettant une résolution analytique dans le cas général.

Il est aussi envisageable de résoudre numériquement l'équation intégrale pour différentes valeurs des viscosités des deux domaines. Ceci nous donnerait le taux de croissance de la perturbation en fonction des viscosités de la membrane. Ainsi, nous pourrions savoir s'il apparaît une sélection du nombre de doigts différente du cas sans eau environnante et, dans ce cas, suivant quels critères physiques.

Une autre question intéressante, compte tenu des images expérimentales, est l'évolution du système une fois l'instabilité déclenchée. En effet, dans l'instabilité de Saffman-Taylor, les oscillations grandissent jusqu'à former des doigts de taille importante. Lors de la succion d'une vésicule, cela ne semble pas être le cas : la perturbation du bord semble se stabiliser à une amplitude finie. Pour savoir s'il s'agit d'un effet lié aux conditions expérimentales ou d'une conséquence de la physique de ces systèmes, il faudrait résoudre les équations hydrodynamiques dans le cas général et non uniquement pour des perturbations faibles.

V.7 Résumé

Notre avons modélisé l'expérience de succion d'une vésicule présentant un domaine liquide-ordonné. La similitude de principe entre l'instabilité observée du domaine liquide-ordonné et celle de Saffman-Taylor pouvait laisser penser que les deux instabilités auraient les mêmes origines physiques. En fait, notre étude de stabilité linéaire montre un comportement très différent, qui illustre la spécificité des fluides bidimensionnels par rapport à un fluide classique, même confiné, en particulier parce que le contraste de viscosité n'intervient pas pour l'apparition de l'instabilité.

Nous nous sommes intéressés au changement de comportement avec l'importance de la friction de l'eau sur l'hydrodynamique des lipides. Nous nous sommes limités au cas particulier d'un couplage avec le milieu environnant inexistant. Il apparaît alors une instabilité d'origine géométrique, qui favorise les modes de petit nombre d'onde. Une étude plus complète de l'influence des différents contrastes de viscosité devrait nous renseigner sur le processus de sélection du nombre de doigts.

Conclusion générale

Cette thèse nous a permis de mieux comprendre l'influence de la présence de domaines sur les différents aspects – objet élastique, plaque tendue ou film fluide – des membranes lipidiques. Nous avons modélisé, analytiquement ou numériquement, différentes expériences portant sur des membranes incluant deux domaines, un dans une phase liquide-ordonnée et l'autre dans une phase liquide-désordonnée. Chacune de ces expériences montre une instabilité de la forme de la vésicule, associée à l'un des aspects de la membrane bi-phasique.

Les propriétés de la bicouche homogène sont liées à sa structure : elle est formée par deux feuillets de lipides, qui sont des molécules amphiphiles cylindriques, orientées perpendiculairement au plan de la bicouche. Cette organisation permet de protéger au maximum le cœur hydrophobe de l'eau environnante mais, comme dans les cristaux liquides, elle entraîne une réponse mécanique très anisotrope. Ainsi, si la contrainte s'exerce dans le plan de la bicouche, cette dernière se comporte comme un fluide, alors qu'une réponse solide est associée à une contrainte en dehors du plan de la bicouche. Cette réponse solide combine à la fois le comportement élastique de la bicouche avec une tension de surface d'origine entropique, due à la souplesse de cette dernière. Lorsque la vésicule est formée de plusieurs domaines fluides, leurs propriétés sont les mêmes que celle d'une bicouche homogène, avec un jeu de constantes physiques pour chaque domaine ; de plus, il existe des couplages entre les deux domaines : la pression osmotique à travers la bicouche va être la même quelque soit le domaine et l'interface entre deux domaines a un coût, qui s'exprime à travers une tension de ligne. A partir de ce formalisme, décrit au chapitre II, nous avons modélisé plusieurs instabilités d'une vésicule à deux domaines.

La première instabilité, décrite au chapitre III, concerne la fission d'un tube de membrane. Expérimentalement, il est possible d'extraire un tube de membrane à partir d'une vésicule. Les expériences montrent que si une séparation de phase est induite sur un tube déjà formé, ce dernier se rompt au niveau de la jonction entre les deux phases en des temps typiques d'une seconde. Ce temps est grand devant les temps de nucléation des domaines et devant les temps hydrodynamiques, le tube est à l'équilibre et la rupture se fait par un processus activé. La détermination d'une grandeur comparable aux expériences, le temps de fission, nécessite au préalable de connaître la forme du tube à l'équilibre et l'état transi-

tionnel de rupture. La forme de la jonction à l'équilibre est donnée complètement par trois paramètres physiques : le rapport des modules de flambage des domaines, la différence de leurs modules de Gauss et la tension de l'interface. Nous pouvons ainsi calculer la forme de la jonction pour toute valeur des paramètres physiques. L'intermédiaire de rupture est donné par le tube complètement pincé. En comparant l'énergie de ces deux états, nous obtenons des temps de rupture proches de l'ordre de 500 ms ; compte tenu des approximations, ce résultat est en bon accord avec les temps expérimentaux. Cette instabilité se produit spontanément et est complètement due aux propriétés mécaniques de la bicouche, en particulier à son élasticité et à la tension de l'interface.

D'autres instabilités peuvent être induites par des changements dans l'environnement de la vésicule. Ainsi, l'absorption de molécules, comme des détergents, dans la bicouche peut provoquer des changements de forme. Nous nous sommes intéressés à ces instabilités dans le chapitre IV, dans le cas d'une vésicule tendue par une pression osmotique. Lorsqu'il n'y a pas de molécules absorbées, chaque domaine a alors une forme de calotte sphérique. Expérimentalement, deux instabilités peuvent se développer, éventuellement en même temps : une instabilité concernant plus spécifiquement un des domaines, conduisant à la perte de la forme en calotte sphérique, et une instabilité d'ensemble avec un rétrécissement de l'interface puis une fission. Les molécules pouvant être des détergents, nous les avons décrits comme des objets chimiquement passifs mais imposant localement une courbure à la membrane, suivant le modèle de S. Leibler. La forme en calotte sphérique des domaines permet dans ce cas un traitement analytique des instabilités. Une analyse de stabilité linéaire de la forme en calotte de chaque domaine montre qu'il existe deux régimes, fonction de la nature des molécules absorbées : si le couplage entre la concentration et la courbure est suffisant, l'effet des molécules devient suffisant pour vaincre l'élasticité de la bicouche, et la forme en calotte sphérique devient instable ; dans le cas inverse, le domaine va rester stable et la vésicule va pouvoir continuer à être décrite par deux calottes sphériques. Dans ce cas, la forme simple de la vésicule nous permet de décrire l'instabilité de fission malgré les non-linéarités. L'absorption des molécules provoque une augmentation effective de la tension de ligne, ce qui entraîne une diminution de la longueur de l'interface. Au delà d'une valeur critique de la tension de ligne, il n'existe plus de solution connectée, bien que l'interface ait encore une longueur non nulle. Le système se sépare alors en deux vésicules distinctes. Cette instabilité peut aussi être obtenue sans rajouter de molécules mais simplement en diminuant la pression osmotique qui tend la vésicule. Notons que cette instabilité peut exister aussi lorsque la calotte sphérique est instable mais la forme trop complexe du système empêche un traitement analytique. Ces différentes instabilités illustrent l'influence de la tension de la membrane, couplée à la tension de l'interface et à l'effet de sollicitations extérieures.

La dernière instabilité que nous avons traitée (au chapitre V) concerne l'aspect hydrodynamique de la bicouche. Elle se produit lorsqu'un domaine de petite taille, liquide-ordonné, est pompé, par exemple par des molécules du milieu environnant. La diminution de la taille du domaine liquide-ordonné entraîne une mise en mouvement des lipides dans la bicouche. La bicouche est alors décrite comme un fluide bidimensionnel avec une force de traction de l'eau environnante. Le traitement complet de cette instabilité est difficile en raison de la lourdeur du formalisme. Nous avons étudié le cas limite d'une faible traction ; nous trouvons alors une instabilité due à la géométrie du système.

Notre exploration de la physique des vésicules bi-phasiques a permis une meilleure compréhension du couplage entre deux domaines, à travers par exemple la tension de l'interface ou la tension de la vésicule. Elle laisse cependant de nombreuses questions ouvertes. Nous en évoquons maintenant quelques unes, sans ordre d'importance. Ainsi, nous avons considéré uniquement l'influence d'une vésicule avec deux domaines, un par phase ; il est possible de considérer l'effet de la présence de trois domaines, afin de mieux comprendre comment les interface interagissent. Par ailleurs, nous avons modélisé uniquement des expériences sur des vésicules géantes ; en utilisant un modèle plus proche des conditions de la cellule, il devrait être possible de tester des hypothèses plus réalistes sur le fonctionnement des 'rafts'.

Annexes

Annexe A

Elements de géométrie différentielle

Dans cette annexe, nous présentons les bases de géométrie différentielle nécessaires pour calculer les courbures moyenne et de Gauss, quelque soit la paramétrisation, ainsi que leur signification géométrique. Nous illustrons la méthode avec le calcul des courbures moyenne et de Gauss dans le cas de la perturbation d'une vésicule en forme de calotte sphérique, qui est utilisé au chapitre IV.

A.1 Eléments de géométrie différentielle

Une surface est représentée par la fonction vectorielle (à trois dimensions) $\vec{R}(s_1, s_2)$ paramétrée par deux coordonnées internes s_1 et s_2 . La surface possède deux vecteurs tangents $\vec{r}_{,1}$ et $\vec{r}_{,2}$ définis comme les dérivées premières de $\vec{R}$ par rapport aux coordonnées internes :

$$\vec{r}_{,i} = \partial_i \vec{R}(s_1, s_2), \quad (\text{A.1})$$

où $i = 1, 2$. Nous adoptons dans cette section la notation d'Einstein : nous faisons une sommation sur les indices répétés deux fois.

Si la condition $\vec{r}_{,1} \wedge \vec{r}_{,2} \neq 0$ est satisfaite, la surface est bien définie et nous pouvons construire le vecteur normal à la surface $\vec{n}$:

$$\vec{n} = \frac{\vec{r}_{,1} \wedge \vec{r}_{,2}}{\|\vec{r}_{,1} \wedge \vec{r}_{,2}\|}. \quad (\text{A.2})$$

Les vecteurs tangents et le vecteur normal définissent alors une base de l'espace. La distance ds entre deux points voisins de la surface est donnée par la relation :

$$ds^2 = \vec{r}_{,i} \cdot \vec{r}_{,j} ds_i ds_j. \quad (\text{A.3})$$

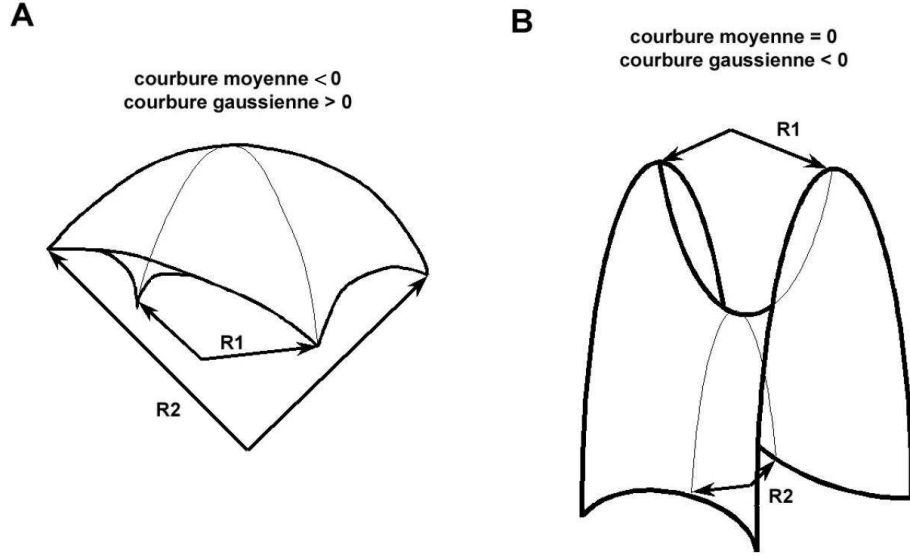


Figure A.1: Deux formes de membranes illustrant les notions de courbures moyenne et de Gauss. (A) surface de courbure moyenne négative (dans notre convention) et de courbure de Gauss positive. (B) surface de courbure moyenne nulle et de courbure de Gauss négative. Image extraite de [29].

Le tenseur de la métrique est habituellement défini par $\bar{g}_{ij} = \vec{r}_{,i} \cdot \vec{r}_{,j}$, l'élément d'aire de la surface étant défini par $g = \det \bar{g}_{ij}$. Le tenseur de courbure est alors le produit scalaire du vecteur normal et des dérivées premières des vecteurs tangents

$$h_{ij} = \left(\partial_i \partial_j \vec{R} \right) \cdot \vec{n}. \quad (\text{A.4})$$

Les courbures moyenne H et de Gauss K sont définies comme les invariants du déterminant $h^i_j = g^{ik} h_{kj}$ (où g^{ij} sont les éléments de la matrice inverse du tenseur de la métrique). H est la trace de la matrice h^i_j et K son déterminant :

$$H = -\frac{1}{2} h^i_i \quad \text{et} \quad K = \det h^i_j. \quad (\text{A.5})$$

Nous avons choisi de mettre un signe moins devant la courbure moyenne. Il s'agit d'une convention qui n'influe en rien les conclusions physiques des calculs. Nous avons fait ce choix pour avoir, lors de l'étude de l'absorption de molécules sur la vésicule, une constante de couplage Λ positive pour des détergents s'absorbant sur le feuillet externe.

Les courbures moyenne et de Gauss peuvent s'exprimer en fonction des rayons de courbures principaux, R_1 et R_2 , définis comme les rayons de deux cercles ausculteurs de la surface perpendiculaire (voir figure A.1) :

$$H = -\frac{1}{2} \left(\frac{1}{R_1} + \frac{1}{R_2} \right) \quad \text{et} \quad K = \frac{1}{R_1 R_2}. \quad (\text{A.6})$$

Cette approche permet de mieux comprendre les effets associés à ces deux grandeurs et, dans certains cas simples, de déterminer facilement la courbure moyenne et la courbure de Gauss.

A.2 Calotte sphérique

Nous considérons ici le cas d'une vésicule en forme de calotte sphérique, perturbée radialement, sur laquelle sont absorbées des molécules. Il s'agit d'un calcul utilisé dans le problème de la section IV.2 : nous voulons savoir si la forme en calotte sphérique est stable ou si l'effet des molécules est suffisant pour permettre le développement d'une perturbation. Pour cela, nous avons exprimé les équations d'Euler-Lagrange en fonction de la perturbation, afin de savoir si une solution non nulle peut être autorisée énergétiquement. En préalable à cette démarche, il est nécessaire de déterminer la courbure moyenne en fonction de la perturbation.

A.2.a Calcul des courbures

La forme initiale en calotte sphérique rend judicieux l'utilisation des coordonnées sphériques ; nous avons représenté sur la figure A.2 le système de coordonnées pour éviter les confusions de notation entre les angles θ et ϕ . La forme de la surface est alors donnée par le vecteur $\vec{R}$:

$$\vec{R} = R_0(1 + u)\vec{e}_r,$$

avec u une perturbation fonction de la position angulaire sur la vésicule.

Nous adopterons dans la suite la convention de notation suivante pour les dérivées de la fonction u :

$$u_i = \frac{\partial u}{\partial i} \quad \text{et} \quad u_{ij} = \frac{\partial^2 u}{\partial i \partial j}.$$

L'obtention des vecteurs tangents à la surface nécessite de prendre en compte les variations de la base ($\vec{e}_r$, $\vec{e}_\theta$ et $\vec{e}_\phi$) avec la position :

$$\begin{aligned} \frac{d\vec{e}_r}{dr} &= \vec{0}; & \frac{d\vec{e}_\theta}{dr} &= \vec{0}; & \frac{d\vec{e}_\phi}{dr} &= \vec{0}; \\ \frac{d\vec{e}_r}{d\theta} &= \vec{e}_\theta; & \frac{d\vec{e}_\theta}{d\theta} &= -\vec{e}_r; & \frac{d\vec{e}_\phi}{d\theta} &= \vec{0}; \\ \frac{d\vec{e}_r}{d\phi} &= \sin \theta \vec{e}_\phi; & \frac{d\vec{e}_\theta}{d\phi} &= \cos \theta \vec{e}_\phi & \text{et} & \frac{d\vec{e}_\phi}{d\phi} = -\cos \theta \vec{e}_\theta - \sin \theta \vec{e}_r. \end{aligned}$$

Nous obtenons ainsi les vecteurs tangents $\vec{R}_\theta$ et $\vec{R}_\phi$:

$$\vec{R}_\theta = R_0 \begin{pmatrix} u_\theta \\ 1 + u \\ 0 \end{pmatrix} \quad \text{et} \quad \vec{R}_\phi = R_0 \begin{pmatrix} u_\phi \\ 0 \\ \sin \theta (1 + u) \end{pmatrix},$$

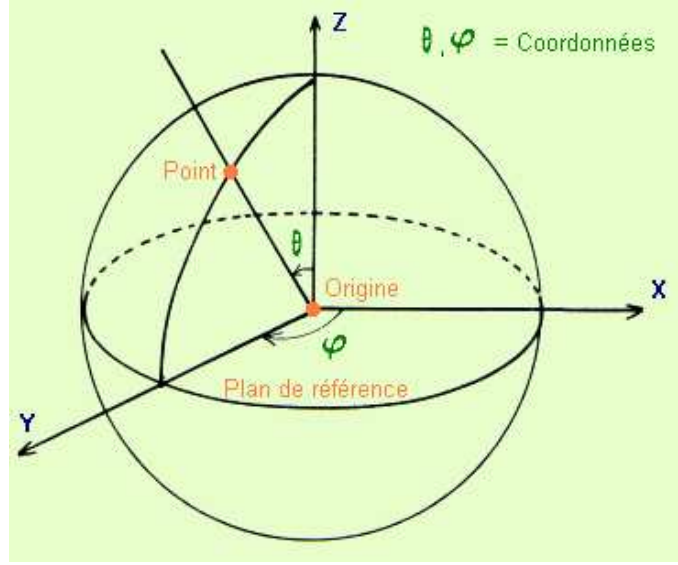


Figure A.2: Système de coordonnées sphériques paramétrant la calotte : l'angle θ est l'angle avec le pôle nord, tandis que l'angle ϕ est l'angle dans le plan équatorial. Image extraite de www.cosmovisions.com/CTreperages.htm.

ce qui permet de construire le tenseur de la métrique $\bar{g}$:

$$g_{ij} = R_0^2 \begin{pmatrix} (1+u)^2 + (u_\theta)^2 & u_\theta u_\phi \\ u_\theta u_\phi & \sin^2 \theta (1+u)^2 + (u_\phi)^2 \end{pmatrix}.$$

Le déterminant de ce tenseur est le carré de l'élément d'aire de la vésicule :

$$ds^2 = g = R_0^4 \sin^2 \theta \left[(1+u)^4 + (1+u)^2 (u_\theta)^2 + \frac{(1+u)^2}{\sin^2 \theta} (u_\phi)^2 \right].$$

Nous déduisons de ces résultats l'expression de la normale $\vec{n}$ à la surface en tout point :

$$\vec{n} = \frac{R_0}{\sqrt{g}} \begin{pmatrix} (1+u)^2 \sin \theta \\ -(1+u) \sin \theta u_\theta \\ -(1+u) u_\phi \end{pmatrix}.$$

Les dérivées des vecteurs tangents par rapport aux deux paramètres de la surface sont :

$$\begin{aligned} \vec{R}_{\theta\theta} &= R_0 (u_{\theta\theta} - (1+u) ; 2u_\theta ; 0), \\ \vec{R}_{\phi\theta} &= R_0 (u_{\phi\theta} ; u_\phi ; \sin \theta u_\theta + \cos \theta (1+u)), \\ \vec{R}_{\theta\phi} &= R_0 (u_{\phi\theta} ; u_\phi ; \sin \theta u_\theta + \cos \theta (1+u)) = \vec{R}_{\phi\theta} \text{ et} \\ \vec{R}_{\phi\phi} &= R_0 (u_{\phi\phi} - \sin^2 \theta (1+u) ; -\cos \theta \sin \theta (1+u) ; 2 \sin \theta u_\phi). \end{aligned}$$

En combinant ces vecteurs avec le vecteur normal, nous obtenons les composantes du tenseur de courbure h_{ij} :

$$\begin{aligned} h_{\theta\theta} &= \frac{R_0^3}{\sqrt{g}} \left[(1+u)^2 \sin \theta u_{\theta\theta} - (1+u)^3 \sin \theta - 2(1+u) \sin \theta u_\theta^2 \right], \\ h_{\phi\theta} &= h_{\theta\phi} = \frac{R_0^3}{\sqrt{g}} \left[(1+u)^2 \sin \theta u_{\theta\phi} - 2(1+u) \sin \theta u_\theta u_\phi - (1+u)^2 \cos \theta u_\phi \right] \text{ et} \\ h_{\phi\phi} &= \frac{R_0^3}{\sqrt{g}} \left[(1+u)^2 \sin \theta u_{\phi\phi} - (1+u)^3 \sin^3 \theta + (1+u)^2 \cos \theta \sin^2 \theta u_\theta \right. \\ &\quad \left. - 2(1+u) \sin \theta u_\phi^2 \right]. \end{aligned}$$

Jusque là, nous n'avons pas fait d'approximation et il serait possible d'exprimer les courbures dans le cas le plus général possible en coordonnées sphériques. Toutefois, c'est une expression très lourde. Pour l'étude de la stabilité d'une calotte sphérique au chapitre IV, nous nous contentons d'utiliser le développement à l'ordre 2 de l'énergie : nous voulons obtenir des équations de forme linéaires dans la perturbation. Par ailleurs, nous faisons aussi l'hypothèse que le système est axisymétrique, ce qui supprime la dépendance en ϕ .

Ceci conduit à une large simplification des équations, les différentes composantes du tenseur de courbure h_i^j devenant alors :

$$\begin{aligned} h^\theta_\theta &= \frac{1}{R_0} \left[-1 + u + u_{\theta\theta} - u^2 - \frac{1}{2} u_\theta^2 - 2uu_{\theta\theta} \right], \\ h^\theta_\phi &= h^\phi_\theta = 0 \text{ et} \\ h^\phi_\phi &= \frac{1}{R_0} \left[-1 + u + \frac{u_\theta}{\tan \theta} - u^2 + \frac{1}{2} u_\theta^2 - 2u \frac{u_\theta}{\tan \theta} \right]. \end{aligned}$$

De ce tenseur, nous pouvons déduire l'expression des courbures moyenne et de Gauss. Afin de simplifier les notations, nous utilisons une notation en fonction du laplacien de u , dont l'expression est :

$$\Delta u = \frac{1}{\tan \theta} u_\theta + u_{\theta\theta}$$

Les courbures moyenne et de Gauss sont alors données par :

$$H = -\frac{2}{R_0} \left(1 - u - \frac{1}{2} \Delta u + u^2 + u \Delta u \right) \text{ et} \quad (\text{A.7})$$

$$K = \frac{1}{R_0^2} \left(1 - 2u - \Delta u + 3u^2 + 3u \Delta u + \frac{u_\theta u_{\theta\theta}}{\tan \theta} \right). \quad (\text{A.8})$$

Notons que K ne peut pas s'exprimer uniquement en fonction du laplacien. Ceci ne pose pas de problème pour un calcul de la stabilité de la calotte car les équations d'Euler-Lagrange ne font pas intervenir la courbure de Gauss.

A.2.b Equations d'Euler-Lagrange

La méthode variationnelle conduisant aux équations d'Euler-Lagrange est détaillée dans l'annexe B.

La courbure moyenne H et l'élément de surface $\sqrt{g}$ sont nécessaires pour exprimer l'énergie du système (II.2) ou (B.12) en fonction de la perturbation u du rayon. Pour obtenir complètement l'énergie de la perturbation, il faut aussi tenir compte de la perturbation sur le volume en fonction de u ainsi que des effets de la perturbation v de la concentration en molécules.

Le volume de la calotte sphérique peut être exprimé à en fonction de son rayon et de l'angle au sommet θ_s :

$$V = \frac{4}{3}\pi R_0^3 \int_0^{\theta_s} (1+u)^3 d\theta - \frac{\pi}{3} R^3 \cos(\theta_s) \sin(\theta_s)^2.$$

Le premier terme est une intégrale sur l'ensemble de la calotte et représente le volume de l'élément de sphère compris entre la calotte et le centre de la vésicule ; le deuxième terme représente le volume du cône excédentaire pris en compte dans le premier terme ; il ne dépend pas de la perturbation tant que celle-ci n'affecte pas le rayon au bord de la calotte. Cette hypothèse est réaliste : la calotte est connectée à une calotte voisine, aussi il faut assurer la relation $R_1 \sin \theta_1 = R_2 \sin \theta_2$ même lors d'une perturbation. Le deuxième terme dans l'expression du volume peut alors ne pas être pris en compte : c'est une constante pour la perturbation. L'expression du volume à minimiser est alors au deuxième ordre dans la perturbation :

$$V = \frac{4}{3}\pi R_0^3 \int_0^{\theta_s} (3u + 3u^2) d\theta.$$

Le développement de l'énergie en fonction de la perturbation v de la concentration en molécules ne présente pas de difficultés majeures. Nous obtenons alors l'énergie à minimiser (l'équation (17) de l'article reproduit dans la section IV.4). La dérivation des équations d'Euler-Lagrange ne pose pas non plus de problème, en prenant en compte le fait que la fonctionnelle implique des dérivées secondes (voir annexe B), ce qui conduit aux équations (18, 19 et 20) du même article.

Annexe B

Calcul variationnel

Dans cette annexe, nous donnons les éléments de calcul variationnel nécessaires pour obtenir les équations d'Euler-Lagrange à partir de l'énergie de la membrane. Nous nous sommes largement appuyés sur le livre de Gelfand et Fomin [160] qui présente la théorie du calcul variationnel. Nous illustrons la méthode sur le cas d'une vésicule axisymétrique à deux domaines, pour obtenir les équations d'Euler-Lagrange ainsi que les conditions aux raccords utilisées aux chapitres III et IV.

B.1 Éléments de calcul variationnel

Le calcul variationnel est l'étude des fonctionnelles. Une fonctionnelle est une correspondance qui associe un nombre réel à chaque fonction d'une classe. Un exemple de fonctionnelle est :

$$F[y] = \int_a^b y \sqrt{1 + y'^2} dx, \quad (\text{B.1})$$

où y est une fonction de x . Une fonctionnelle peut être vue comme une fonction dont la variable est une fonction ; aussi, l'étude des fonctionnelles présente des points communs avec l'étude des fonctions mais elle n'a pas encore de techniques aussi générales. La branche principale de l'étude des fonctionnelles est le calcul variationnel, qui concerne la recherche des extrema des fonctionnelles.

B.1.a Equations d'Euler-Lagrange

Les équations d'Euler-Lagrange donnent la condition à satisfaire pour qu'une fonctionnelle soit extrémale, au moins localement. Si nous considérons la fonctionnelle

$$J[y] = \int_a^b F(x, y, y') dx,$$

avec y une fonction de x , il est possible de considérer l'effet d'un petit incrément $h(x)$ à la fonction y sur la fonctionnelle :

$$\Delta J = J[y + h] - J[h] = \int_a^b [F(x, y + h, y' + h') - F(x, y, y')] dx.$$

En utilisant le théorème de Taylor et en se limitant au premier ordre en h et dans ses dérivées, il vient :

$$\delta J = \int_a^b [F_y(x, y, y')h + F_{y'}(x, y, y')h'] dx,$$

où les indices représentent des dérivées partielles par rapport aux arguments correspondant. Une intégration par partie conduit à :

$$\delta J = \int_a^b \left[F_y(x, y, y') - \frac{d}{dx} F_{y'}(x, y, y') \right] h dx + \text{termes de bords},$$

avec des termes de bords qui vont conduire aux conditions aux bords. La condition pour que la fonctionnelle soit extrémale est $\delta J = 0$ quelle que soit la fonction h (satisfaisant les conditions de bord). Cette condition mène alors aux équations d'Euler-Lagrange :

$$F_y - \frac{d}{dx} F_{y'} = 0. \quad (\text{B.2})$$

La fonctionnelle précédente ne dépend que d'une variable et que de sa première dérivée. En prolongeant l'analogie avec les fonctions, il est possible de trouver les équations d'Euler-Lagrange dans le cas général.

Pour une fonctionnelle dépendant de plusieurs variables $J[y_1, y_2, \dots, y_n]$, il vient n équations d'Euler-Lagrange similaires au cas à une seule variable :

$$\forall i \quad F_{y_i} - \frac{d}{dx} F_{y'_i} = 0. \quad (\text{B.3})$$

Pour une fonctionnelle dépendant des dérivées d'ordre supérieurs, le principe du calcul est le même mais plusieurs intégrations par partie sont nécessaires pour obtenir l'équation d'Euler-Lagrange :

$$F_y - \frac{d}{dx} F_{y'} + \frac{d^2}{dx^2} F_{y''} - \dots + (-1)^n \frac{d^n}{dx^n} F_{y^{(n)}} = 0. \quad (\text{B.4})$$

B.1.b Multiplicateurs de Lagrange

Le problème associé aux multiplicateurs de Lagrange est celui de trouver l'extremum d'une fonctionnelle tout en assurant une contrainte sur le système. Cette contrainte peut être définie aussi soit par une fonctionnelle, par exemple lorsque nous imposons à une surface d'être constante, soit par une égalité locale, comme dans le cas d'une relation entre deux variables.

Dans le cas où la contrainte s'exprime par une fonctionnelle K , le problème est de rendre extrémale la fonctionnelle :

$$J[y] = \int_a^b F(x, y, y') dx,$$

avec les conditions aux limites adaptées, tout en assurant que la fonctionnelle :

$$K[y] = \int_a^b G(x, y, y') dx$$

prend la valeur l . Ceci est possible à satisfaire en rendant extrémale la fonctionnelle :

$$\int_a^b (F + \lambda G) dx, \tag{B.5}$$

avec λ une constante donnée par le processus variationnel. En effet, l'équation d'Euler-Lagrange devient alors :

$$F_y - \frac{d}{dx} F_{y'} + \lambda \left(G_y - \frac{d}{dx} G_{y'} \right) = 0.$$

Cette équation contient deux constantes arbitraires en plus de la constante λ , ce qui permet de satisfaire en même temps les conditions aux limites et la contrainte supplémentaire. Notons toutefois qu'il existe des cas marginaux où ce raisonnement n'est pas valable : il ne faut pas que la fonction y extrémise en même temps $J[y]$ et $K[y]$.

Dans le cas où la contrainte s'exprime par une fonction, le problème est de rendre extrémale la fonctionnelle

$$J[y] = \int_a^b F(x, y, y') dx,$$

avec les conditions aux limites adaptées, pour l'ensemble des fonctions satisfaisant une condition

$$g(x, y, y') = 0.$$

Ce problème ressemble fortement au précédent. Sa résolution est aussi similaire : la fonctionnelle dont on cherche l'extremum est alors

$$\int_a^b (F + \lambda(x)g(x, y)) dx, \tag{B.6}$$

où $\lambda(x)$ est maintenant une fonction, donnée par une équation d'Euler-Lagrange.

Nous avons pris ici comme illustration le cas d'une fonctionnelle d'une seule fonction ne dépendant que de la fonction et de sa dérivée première, mais les résultats peuvent être généralisés sans problème au cas d'une fonctionnelle de plusieurs fonctions dépendant de dérivées d'ordre supérieur.

B.1.c Conditions aux limites

Le calcul variationnel permet de déterminer, en plus des équations d'Euler-Lagrange, les conditions aux limites devant être satisfaites par les solutions. Plusieurs situations sont possibles, aussi nous essayerons ici de traiter le cas le plus général. Nous considérerons encore la fonctionnelle :

$$J[y] = \int_{x_0}^{x_1} F(x, y, y') dx$$

pour simplifier les notations. Les résultats se généralisent sans problème au cas d'une fonctionnelle dépendant de plusieurs fonctions ou de dérivées d'ordre supérieures.

Nous ne ferons pas d'hypothèse sur les positions des bords x_0 et x_1 ni sur la valeur de y en ces points ; par contre, nous supposerons que la fonction y est lisse. Si nous rajoutons un incrément $h(x)$ à la fonction $y(x)$, l'incrément de la fonctionnelle est :

$$\begin{aligned} \Delta J &= J[y+h] - J[y] = \int_{x_0+\delta x_0}^{x_1+\delta x_1} F(x, y+h, y'+h') dx - \int_{x_0}^{x_1} F(x, y, y') dx, \\ &= \int_{x_0}^{x_1} [F(x, y+h, y'+h') - F(x, y, y')] dx \\ &\quad + \int_{x_1}^{x_1+\delta x_1} F(x, y+h, y'+h') dx - \int_{x_0}^{x_0+\delta x_0} F(x, y+h, y'+h') dx. \end{aligned}$$

En utilisant le théorème de Taylor et en se limitant à l'ordre 1 dans l'incrément $h(x)$, il vient :

$$\Delta J \simeq \int_{x_0}^{x_1} \left[F_y - \frac{d}{dx} F_{y'} \right] h(x) dx + F(x_1) \delta x_1 + F_{y'} h|_{x_1} - F(x_0) \delta x_0 - F_{y'} h|_{x_0}.$$

Au premier ordre en h , nous avons les relations suivantes :

$$\begin{aligned} h(x_0) &\simeq \delta y(x_0) - y'(x_0) \delta x_0 \text{ et} \\ h(x_1) &\simeq \delta y(x_1) - y'(x_1) \delta x_1, \end{aligned}$$

ce qui conduit à la relation :

$$\Delta J \simeq \int_{x_0}^{x_1} \left[F_y - \frac{d}{dx} F_{y'} \right] h(x) dx + F_{y'} \delta y \Big|_{x=x_0}^{x=x_1} + (F - F_{y'} y') \delta x \Big|_{x=x_0}^{x=x_1}, \quad (\text{B.7})$$

où $\delta x|_{x=x_i} = \delta x_i$ et $\delta y|_{x=x_i} = \delta y_i$ pour $i = 0$ ou $i = 1$.

Cette relation montre que pour qu'une fonctionnelle soit extrémale, il faut que la fonction y et la position des bords satisfassent les équations d'Euler-Lagrange, puis que la fonction y satisfasse les termes de bords

$$F_{y'} \delta y \Big|_{x=x_0}^{x=x_1} + (F - F_{y'} y') \delta x \Big|_{x=x_0}^{x=x_1} = 0,$$

qui donnent donc les conditions aux limites adaptées au problème. Ces équations sont aussi satisfaites lorsque le système est contraint. Ainsi, si la position des extrémités de la courbe est imposée (comme pour une barre encastree par exemple), on a $\delta x_i = \delta y_i = 0$ et les conditions de bords sont automatiquement satisfaites.

B.1.d Quelques simplifications

Nous présentons ici quelques cas où la forme de la fonctionnelle permet une simplification de la résolution.

Intégrale ne dépendant pas de la fonction y

La fonctionnelle ne contient pas y de manière explicite et est de la forme :

$$\int_a^b F(x, y') dx.$$

Les équations d'Euler-Lagrange se simplifient :

$$F_{y'} = C,$$

avec C est une constante donnée par les conditions aux bords. Cette équation ne contient pas explicitement y et peut être résolue pour y' :

$$y' = f(x, C). \quad (\text{B.8})$$

La fonction y est alors obtenue par une intégration.

Intégrale ne dépendant pas des dérivées de y

L'équation d'Euler-Lagrange est alors $F_y(x, y) = 0$. Il ne s'agit alors plus d'une équation différentielle mais d'une équation 'classique', dont les solutions sont les courbes $y(x)$. Dans les cas traités dans cette thèse, cette simplification s'applique par exemple aux multiplicateurs de Lagrange locaux $\gamma(s)$.

Intégrale ne dépendant pas de x

La fonctionnelle est alors de la forme :

$$J[y] = \int_a^b F(y, y') dx$$

et ne dépend pas explicitement de la paramétrisation choisie, à part éventuellement au bord. L'équation d'Euler-Lagrange peut se réécrire :

$$F_y - \frac{d}{dx} F_{y'} = F_y - F_{y'y} y' - F_{y'y'} y'' = 0.$$

En multipliant cette relation par y' , nous obtenons :

$$F_y y' - F_{y'y} y'^2 - F_{y'y'} y' y'' = \frac{d}{dx} (F - y' F_{y'}) = 0.$$

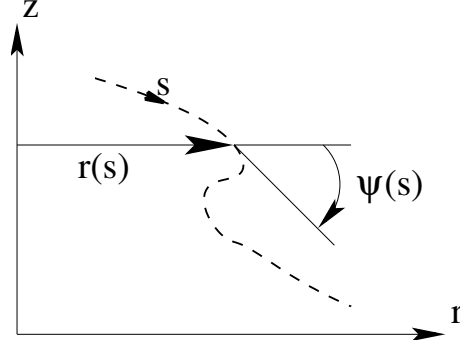


Figure B.1: Paramétrisation d'une vésicule axisymétrique en coordonnées cylindriques. La ligne pointillée est la bicouche, paramétrée par son abscisse curviligne s . La forme de la vésicule est donnée par $r(s)$ et $\psi(s)$. Les deux domaines ont la même paramétrisation.

Ceci conduit à une intégrale première :

$$F - y'F_{y'} = C \quad (\text{B.9})$$

où C est une constante. La fonction $F - y'F_{y'}$ est appelée l'hamiltonien $\mathcal{H}$ du système. La conservation de l'hamiltonien est utilisée dans le chapitre III pour simplifier les équations de forme des tubes.

B.2 Vésicule axisymétrique

Nous présentons ici le processus variationnel pour une vésicule axisymétrique à deux domaines sur lesquels sont absorbées des molécules. L'énergie de ce système est présentée au chapitre II :

$$F = \sum_{i=1,2} F_i + \sigma \int_{\mathcal{C}} dl - P \int_{\mathcal{V}} dV \quad (\text{B.10})$$

$$\text{avec } F_i = \int_S \left\{ \frac{\kappa_i}{2} (H^2 - H_0^2) + \kappa_G^i K + \Sigma_i + \Lambda_i H \phi + \left[\frac{\alpha_i}{2} (\phi - \phi_{eq_i})^2 - \mu_i \phi + \frac{\beta_i}{2} (\nabla \phi)^2 \right] \right\} dS.$$

L'expression des équations de forme varie suivant la paramétrisation choisie, même si les conclusions en sont indépendantes. Pour une vésicule axisymétrique, un seul paramètre est suffisant pour décrire la forme de la surface : nous utilisons l'abscisse curviligne s (voir figure B.1). Les coordonnées cylindriques $(r(s), z(s))$ sont bien adaptées à ce type de géométrie, en introduisant l'angle $\psi(s)$ entre la tangente à la surface et l'axe (Or) (voir figure B.1), qui permet d'obtenir une expression simple de la courbure. Les courbures

moyennes et de Gauss sont alors données par :

$$H = -\frac{1}{2} \left(\psi' + \frac{\sin \psi}{r} \right) \text{ et} \quad (\text{B.11a})$$

$$K = \frac{\sin \psi}{r} \psi', \quad (\text{B.11b})$$

où le signe ' désigne la dérivée par rapport à s . Le signe $-$ sur la courbure moyenne est une convention sans influence sur les conclusions physiques ; elle est introduite pour que l'absorption de molécules coniques (comme les détergents) sur le feuillet externe soit associée à $\Lambda \geq 0$ (voir annexe A).

La contrainte géométrique locale $r' = \cos \psi$ nécessite d'introduire un multiplicateur de Lagrange local $\gamma(s)$. La contrainte $z' = -\sin \psi$ n'a pas besoin d'être prise en compte car l'énergie à minimiser ne dépend pas explicitement de la variable z : comme nous l'avons vu dans la section précédente, la fonction $z(s)$ peut être obtenue directement à partir des autres fonctions. L'énergie s'écrit alors :

$$\begin{aligned} F_{libre} &= 2\pi \left[\int_{s_0}^{s_1} \mathcal{L}_1 ds + \int_{s_1}^{s_2} \mathcal{L}_2 ds + \sigma r(s_J) \right] \\ \text{avec } \mathcal{L}_i &= \frac{\kappa_i}{2} \left(\frac{\sin(\psi)^2}{r} + \psi'^2 r + 2\psi' \sin(\psi) \right) + \kappa_G^i \sin(\psi) \psi' \\ &\quad - \Lambda_i (\sin(\psi) + \psi' r) \phi + \frac{\alpha_i}{2} \phi^2 r + \frac{\beta_i}{2} \phi'^2 r + \tilde{\Sigma}_i r + \tilde{\mu}_i \phi r \\ &\quad - \frac{P}{2} r^2 \sin(\psi) + \gamma(s) (r' - \cos(\psi)). \end{aligned} \quad (\text{B.12})$$

Pour simplifier les notations, de nouveaux paramètres ont été introduits :

$$\tilde{\Sigma}_i = \Sigma_i + \frac{\alpha_i}{2} \phi_{eqi}^2 \quad \text{et} \quad \tilde{\mu}_i = \mu_i - \alpha_i \phi_{eqi}.$$

L'énergie libre doit être minimum par rapport à une perturbation de chacune des fonctions, ici ψ , r , γ et ϕ :

$$\delta F_{libre} = \delta F_1 + \delta F_2 + 2\pi \sigma \delta r(s_1) \quad (\text{B.13})$$

avec

$$\begin{aligned} \delta F_i &= 2\pi \int_{s_{inf}^i}^{s_{sup}^i} \left\{ \left[\frac{\partial \mathcal{L}_i}{\partial \psi} - \frac{d}{ds} \frac{\partial \mathcal{L}_i}{\partial \psi'} \right] \delta \psi + \left[\frac{\partial \mathcal{L}_i}{\partial r} - \frac{d}{ds} \frac{\partial \mathcal{L}_i}{\partial r'} \right] \delta r \right. \\ &\quad \left. + \left[\frac{\partial \mathcal{L}_i}{\partial \phi} - \frac{d}{ds} \frac{\partial \mathcal{L}_i}{\partial \phi'} \right] \delta \phi + \frac{\partial \mathcal{L}_i}{\partial \gamma} \delta \gamma \right\} ds \\ &\quad + \frac{\partial \mathcal{L}_i}{\partial \psi'} \delta \psi \Big|_{s_{inf}^i}^{s_{sup}^i} + \frac{\partial \mathcal{L}_i}{\partial r'} \delta r \Big|_{s_{inf}^i}^{s_{sup}^i} + \frac{\partial \mathcal{L}_i}{\partial \phi'} \delta \phi \Big|_{s_{inf}^i}^{s_{sup}^i}. \end{aligned}$$

Ceci conduit à quatre équations d'Euler-Lagrange :

$$\frac{\partial \mathcal{L}_i}{\partial \psi} - \frac{d}{ds} \frac{\partial \mathcal{L}_i}{\partial \psi'} = 0, \quad (\text{B.14a})$$

$$\frac{\partial \mathcal{L}_i}{\partial r} - \frac{d}{ds} \frac{\partial \mathcal{L}_i}{\partial r'} = 0, \quad (\text{B.14b})$$

$$\frac{\partial \mathcal{L}_i}{\partial \phi} - \frac{d}{ds} \frac{\partial \mathcal{L}_i}{\partial \phi'} = 0 \text{ et} \quad (\text{B.14c})$$

$$\frac{\partial \mathcal{L}_i}{\partial \gamma} = 0. \quad (\text{B.14d})$$

En dérivant l'énergie (B.12) suivant les équations (B.14), nous obtenons les équations d'Euler-Lagrange :

$$\psi'' = \frac{\sin(\psi) \cos(\psi)}{r^2} - \frac{Pr}{2\kappa_i} \cos(\psi) - \frac{\psi'}{r} \cos(\psi) + \frac{\Lambda_i}{\kappa_i} \phi' + \frac{\gamma}{\kappa_i r} \sin(\psi), \quad (\text{B.15a})$$

$$\begin{aligned} \gamma' &= \frac{\kappa_i}{2} \psi'^2 - \frac{\kappa}{2r^2} \sin(\psi)^2 + \tilde{\Sigma}_i - Pr \sin(\psi) - \Lambda_i \phi \psi' \\ &\quad + \frac{\alpha_i}{2} \phi^2 + \frac{\beta_i}{2} \phi'^2 + \tilde{\mu}_i \phi, \end{aligned} \quad (\text{B.15b})$$

$$\phi'' = -\frac{\Lambda_i}{\beta_i r} (\sin(\psi) + \psi' r) + \frac{\alpha_i}{\beta_i} \phi - \phi' \frac{\cos(\psi)}{r} + \frac{\tilde{\mu}_i}{\beta_i} \text{ et} \quad (\text{B.15c})$$

$$r' = \cos(\psi). \quad (\text{B.15d})$$

A l'interface entre les deux domaines, nous n'imposons pas de contraintes sur les fonctions ψ , r et ϕ , en dehors de leur continuité. Aussi, pour que la solution trouvée soit un extremum de l'énergie, il faut qu'elle annule les termes de bords de l'équation (B.13), ce qui donne les conditions de raccord :

$$\frac{\partial \mathcal{L}_1}{\partial \psi'} = \frac{\partial \mathcal{L}_2}{\partial \psi'}, \quad (\text{B.16a})$$

$$\frac{\partial \mathcal{L}_1}{\partial r'} = \frac{\partial \mathcal{L}_2}{\partial r'} - \sigma, \quad (\text{B.16b})$$

$$\frac{\partial \mathcal{L}_1}{\partial \phi'} = \frac{\partial \mathcal{L}_2}{\partial \phi'}, \quad (\text{B.16c})$$

$$(\text{B.16d})$$

avec le domaine 1 associé avant l'interface ($s \leq s_J$) et le domaine 2 après. En introduisant l'énergie (B.12) conduit aux conditions aux limites :

$$\kappa_1 \psi'(s_J - \epsilon) r(s_J) + (\kappa_1 + \kappa_{G_1}) \sin(\psi(s_J)) - \Lambda_1 \phi(s_J) r(s_J) \quad (\text{B.17a})$$

$$- \kappa_2 \psi'(s_J + \epsilon) r(s_J) - (\kappa_2 + \kappa_{G_2}) \sin(\psi(s_J)) + \Lambda_2 \phi(s_J) r(s_J) = 0,$$

$$\gamma(s_J - \epsilon) - \gamma(s_J + \epsilon) + \sigma = 0, \quad (\text{B.17b})$$

$$\beta_1 \phi'(s_J - \epsilon) - \beta_2 \phi'(s_J + \epsilon) = 0. \quad (\text{B.17c})$$

avec ϵ un infiniment petit. Ces conditions aux limites supposent la continuité des fonctions r et ψ , ce qui signifie que la membrane ne présente pas de trou ni de discontinuités à l'interface.

Dans les chapitres III et IV, ce sont des variations sur les équations (B.15) et les conditions aux limites (B.17) qui sont utilisées pour étudier la forme des tubes et les équations de formes de la vésicule axisymétrique. Dans le chapitre IV, nous utilisons aussi une paramétrisation adaptée à l'étude de la stabilité des calottes sphériques.

Annexe C

Fluides bi-dimensionnels : équation de Stokes

Dans cette annexe, nous présentons le calcul de l'équation de Stokes pour un fluide bi-dimensionnel compressible, dans l'approximation de Stokes. Nous ferons le calcul en coordonnées cartésiennes (x_1 et x_2), le résultat étant indépendant du système de coordonnées. Dans la suite, nous utiliserons la notation d'Einstein, les indices répétés étant sommés.

Le mouvement d'un fluide est décrit à travers l'équivalent de la relation fondamentale de la mécanique, l'équation d'Euler :

$$\frac{\partial}{\partial t} \rho v_i = - \frac{\partial \Pi_{ik}}{\partial x_k}, \quad (\text{C.1})$$

où Π_{ik} est le tenseur densité du flux d'impulsion [79]. Ce tenseur peut être décomposé deux termes :

$$\Pi_{ik} = -\sigma_{ik} + \rho v_i v_k = p \delta_{ik} + \rho v_i v_k - \sigma'_{ik},$$

avec p la pression thermodynamique et σ' un terme lié à la viscosité du fluide, entraînant un transfert irréversible d'impulsion. Le tenseur σ_{ik} est appelé tenseur des contraintes, alors que le tenseur σ'_{ik} est appelé tenseur des contraintes visqueuses. Notons que, pour des petits nombres de Reynolds, la contribution $v_i v_k$ peut être négligée : elle représente la composante due à l'inertie.

La relation entre la contrainte et les déformations est l'équation constitutive du fluide. Des considérations physiques simples permettent de trouver la forme générale de cette relation [79]. Le frottement interne dans un fluide n'apparaît que lorsque les différentes portions du fluide s'écoulent à des vitesses différentes, ce qui entraîne un déplacement des différents éléments les uns par rapport aux autres. En supposant que les gradients ne sont pas trop importants, on peut se limiter aux dérivées de premier ordre de la vitesse pour

exprimer le transport d'impulsion et σ'_{ik} . Des considérations de symétrie entraînent que la contrainte σ'_{ik} doit dépendre uniquement du terme symétrique e_{ik} :

$$e_{ij} = \frac{1}{2} \left(\frac{\partial v_i}{\partial x_j} + \frac{\partial v_j}{\partial x_i} \right).$$

L'équation constitutive à la base des équations de Navier-Stokes et de Stokes est donc :

$$\sigma'_{ij} = K_{ijmn} e_{mn}. \quad (\text{C.2})$$

Il est possible de simplifier l'expression du tenseur K_{ijmn} en utilisant les symétries et l'isotropie du fluide, jusqu'à ce qu'il ne dépende plus que de deux coefficients :

$$\sigma'_{ij} = 2\mu e_{ij} + \lambda \delta_{ij} e_{mm}, \quad (\text{C.3})$$

avec δ_{ij} désignant l'opérateur valant 0 si $i \neq j$ et 1 si $i = j$. Notons que e_{mm} est égale à $e_{11} + e_{22}$ soit la divergence à deux dimensions $\vec{\nabla}_2 \vec{v}$, non nulle pour un fluide compressible.

L'hypothèse de Stokes permet de trouver un lien entre les deux coefficients μ et λ , en utilisant un raisonnement sur la pression [161]. Le tenseur des contraintes est donné par σ_{ij} :

$$\sigma_{ij} = -p\delta_{ij} + \sigma'_{ij}.$$

En additionnant les termes diagonaux de ce tenseur, il vient $\sigma_{ii} = \sigma_{11} + \sigma_{22}$ et

$$p = -\frac{1}{2} \sigma_{ii} + (\mu + \lambda) e_{mm}.$$

On peut alors définir la pression moyenne dans le système $\bar{p} = 1/2 \tau_{ii}$. Ceci entraîne la relation :

$$p - \bar{p} = (\mu + \lambda) \vec{\nabla}_2 \vec{v}.$$

Pour un fluide incompressible, la pression moyenne est égale à la pression thermodynamique. Aussi, la pression d'un fluide incompressible est déterminée à une constante près. La relation constitutive (C.3) d'un fluide incompressible devient alors :

$$\sigma_{ij} = -p\delta_{ij} + 2\mu e_{ij}, \quad (\text{C.4})$$

où p doit être compris comme la pression moyenne.

Pour un fluide compressible, la pression thermodynamique peut être définie complètement : p et $\bar{p}$ peuvent être différents. En fait, pour un fluide usuel, la différence n'est pas observable [161]. Aussi, il est généralement approprié de faire l'hypothèse de Stokes : $p = \bar{p}$, soit pour un fluide bidimensionnel :

$$\mu + \lambda = 0. \quad (\text{C.5})$$

Ceci entraîne que la relation constitutive (C.3) d'un fluide bidimensionnel compressible est

$$\sigma_{ij} = -p\delta_{ij} + 2\mu e_{ij} - \mu(\vec{\nabla} \cdot \vec{v})\delta_{ij}$$

En supposant que la viscosité est constante dans tout le fluide, l'équation de Stokes se dérive de la contrainte σ_{ij} et de l'équation (C.1) :

$$\frac{p}{x_i} = \frac{\partial}{\partial x_k} \left[\mu \left(\frac{\partial v_i}{\partial x_k} + \frac{\partial v_k}{\partial x_i} \right) - \mu \frac{\partial v_l}{\partial x_l} \delta_{ij} \right], \quad (\text{C.6})$$

ce qui peut s'exprimer de manière concise sous la forme :

$$\vec{\nabla} p = \mu \Delta \vec{v}. \quad (\text{C.7})$$

Dans ce calcul, nous n'avons pas supposé le fluide incompressible mais nous retrouvons l'équation de Stokes classique des fluides incompressibles. Il s'agit d'une spécificité des fluides bidimensionnels ; ainsi, pour un fluide tri-dimensionnel, la relation (C.5) conduit à $\lambda = -2/3\mu$ et à l'apparition d'un terme dépendant de la divergence de l'équation de Stokes [161].

Bibliographie

- [1] ALBERTS B, JOHNSON A, LEWIS J, RAFF M, ROBERTS K & WALTER P : *Molecular Biology of the Cell - Fourth Edition*. Garland Science, 2002.
- [2] TSAFRIR I, SAGI D, ARZI T, GUEDEAU-BOUDEVILLE MA, FRETTE V, KANDEL D & STAVANS J : Pearling instabilities of membranes tubes with anchored polymers. *Phys. Rev. Lett.* **86**, 1138–1141, 2001.
- [3] SANTANGELO CD & PINCUS P : Coiling instabilities of multilamellar tubes. *Phys. Rev. E* **66**, 061501, 2002.
- [4] BICKEL T : *Interaction polymères-membranes : une approche locale*. Thèse de doctorat, Université Strabourg I, 2001.
- [5] GIRARD P : *Membranes hors d'équilibre : échanges et transport actif*. Thèse de doctorat, Université Paris 7 - Denis Diderot, 2004.
- [6] BAR-ZIV R & MOSES E : Instability and "pearling" states produced in tubular membranes by competition of curvature and tension. *Phys. Rev. Lett.* **73**, 1392–1395, 1994.
- [7] MICHALET X & BENSIMON D : Observation of stable shapes and conformal diffusion in genus 2 vesicles. *Science* **269**, 666–668, 1995.
- [8] LIPOWSKY R & SACKMANN E : *Structure and Dynamics of Membranes, Handbook of Biological Physics*. Elsevier, North-Holland, 1995.
- [9] WINTZ W, DÖBEREINER H & SEIFERT U : Starfish vesicles. *Europhys. Lett.* **33**, 403–408, 1996.
- [10] DÖBEREINER H, EVANS E, KRAUS M, SEIFERT U & WORTIS M : Mapping vesicle shapes into the phase diagram : A comparison of experiment and theory. *Phys. Rev. E* **55**, 4458–4474, 1997.
- [11] FOURNIER J, AJDARI A & PELITI L : Effective-area elasticity and tension of micro-manipulated membranes. *Phys. Rev. Lett.* **86**, 4970–4973, 2001.
- [12] EVANS E & RAXICZ W : Entropy-driven tension and bending elasticity in condensed-fluid membranes. *Phys. Rev. Lett.* **64**, 2094–2097, 1990.

- [13] FA N, MARQUES CM, MENDES E & SCHRÖDER AP : Rheology of giant vesicles : A micropipette study. *Phys. Rev. Lett.* **92**, 108103, 2004.
- [14] HELFRICH W : Steric interaction of fluid membranes in multilayer systems. *Z. Naturforsch. Teil A* **33**, 305–315, 1978.
- [15] DOMMERSNES PG & FOURNIER JB : Casimir and mean-field interactions between membrane inclusions subject to external torques. *Europhys. Lett.* **46**, 256–261, 1999.
- [16] HELFRICH W & WEIKL TR : Two direct methods to calculate fluctuation forces between rigid objects embedded in fluid membranes. *Euro. Phys. J. E* **5**, 423–439, 2001.
- [17] LORIN A, FLORE C, THOMAS A & BRASSEUR R : Les liposomes : description, fabrication et applications. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* **8**, 163–176, 2004.
- [18] MARTIN B, SAINLOS M, AISSAOUI A, OUDRHIRI N, HAUCHECORNE M, VIGNERON JP, LEHN JM & LEHN P : The design of cationic lipids for gene delivery. *Curr. Pharm. Design* **11**, 375–394, 2005.
- [19] ROUX A, CAPPELLO G, CARTAUD J, PROST J, GOUD B & BASSEREAU P : A minimal system allowing tubulation with molecular motors pulling on giant liposomes. *PNAS* **99**, 5394–5399, 2002.
- [20] BIAIS N : communication personnelle .
- [21] NOIREAUX V & LIBCHABER A : A vesicle bioreactor as a step toward an artificial cell assembly. *PNAS* **101**, 17669–17674, 2004.
- [22] CHIU DT, WILSON CF, RYTTSSEN F, STROMBERG A, FARRE C, KARLSSON A, NORDHOLM S, GAGGAR A, MODI BP, MOSCHO A, GARZA-LOPEZ RA, ORWAR O & ZARE RN : Chemical transformations in individual ultrasmall biomimetic containers. *Science* **283**, 1892–1895, 1999.
- [23] HELFRICH MR, MANGENEY-SLAVIN LK, LONG MS, DJOKO KY & KEATING CD : Aqueous phase separation in giant vesicles. *J Am Chem Soc* **124**, 13374–13375, 2002.
- [24] KULIN S, KISHORE R, HELMERSON K & LOCASCIO L : Optical manipulation and fusion of liposomes as microreactors. *Langmuir* **19**, 8206–8210, 2003.
- [25] KARLSSON M, SOTT K, DAVIDSON M, CANS AS, LINDERHOLM P, CHIU D & ORWAR O : Formation of geometrically complex lipid nanotube-vesicle networks of higher-order topologies. *PNAS* **99**, 11573–11578, 2002.
- [26] KARLSSON R, KARLSSON A & ORWAR O : Formation and transport of nanotube-integrated vesicles in a lipid bilayer network. *J. Phys. Chem. B* **107**, 11201–11207, 2003.

- [27] EVANS E, RITCHIE K & MERKEL R : Sensitive force technique to probe molecular adhesion and structural linkages at biological interfaces. *Biophys. J.* **68**, 2580–2587, 1995.
- [28] SINGER SJ & NICOLSON GL : the fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* **175**, 720–, 1972.
- [29] ROUX A : *Tubes de membrane dans le trafic intracellulaire : aspects physiques et biologiques*. Thèse de doctorat, Université Paris 7 - Denis Diderot, 2004.
- [30] VEATCH SL & KELLER SL : Separation of liquid phases in giant vesicles of ternary mixtures of phospholipids and cholesterol. *Biophys. J.* **85**, 3074–3083, 2003.
- [31] KORLACH J, SCHWILLE P, WEBB WW & FEIGENSON GW : Characterization of lipid bilayer phases by confocal microscopy and fluorescence correlation spectroscopy. *PNAS* **96**, 8461–8466, 1999.
- [32] PARASASSI T, LOIERO M, RAIMONDI M, RAVAGNAN G & GRATTON E : Absence of lipid gel-phase domains in 7 mammalian-cell lines and in four primary-cell types. *Biochim. Biophys. Acta* **1153**, 143–154, 1993.
- [33] GIOCONDI MC & GRIMELLEC CL : Temperature dependence of the surface topography in dimyristoylphosphatidylcholine/distearoylphosphatidylcholine multibilayers. *Biophys. J.* **86**, 2218–2230, 2004.
- [34] DIETRICH C, BAGATOLLI LA, VOLOVYK ZN, THOMPSON NL, LEVI M, JACOBSON K & GRATTON E : Lipid rafts reconstituted in model membranes. *Biophys. J.* **80**, 1417–1428, 2001.
- [35] DEVAUX P & MORRIS R : Transmembrane asymmetry and lateral domains in biological membranes. *Traffic* **5**, 241–246, 2004.
- [36] DE ALMEIDA R, FEDOROV A & PRIETO M : Sphingomyelin/ phosphatidylcholine/ cholesterol phase diagram : Boundaries and composition of lipid rafts. *Biophys. J.* **85**, 2406–2416, 2003.
- [37] VEATCH SL & KELLER SL : Miscibility phase diagrams of giant vesicles containing sphingomyelin. *Phys. Rev. Lett.* **94**, 148101, 2005.
- [38] PIKE LJ : Lipid rafts : heterogeneity on the high seas. *Biochem. J.* **378**, 281–292, 2004.
- [39] BROWN DA & LONDON E : Structure and function of sphingolipid- and- cholesterol-rich membrane rafts. *J. Biol. Chem.* **275**, 17221–17224, 2000.
- [40] SIMONS K & IKONEN E : How cells handle cholesterol. *Science* **290**, 1721–1726, 2000.

- [41] CANHAM P : Minimum energy of bending as a possible explanation of biconcave shape of human red blood cell. *J. Theor. Biol* **26**, 61–81, 2001.
- [42] HELFRICH W : Elastic properties of lipid bilayers : Theory and possible experiments. *Z. Naturforsch A* **33**, 305–315, 1973.
- [43] EVANS E & NEEDHAM D : Physical properties of surfactant bilayer membranes : thermal transitions, elasticity, rigidity, cohesion, and colloidal interactions. *J. Phys. Chem.* **91**, 4219–4228, 1987.
- [44] FARGE E : Increased vesicle endocytosis due to an increase in the plasma membrane phosphatidylserine concentration. *Biophys. J.* **69**, 2501–2506, 1995.
- [45] FARGE E, OJCIUS D, SUBTIL A & DAUTRY-VARSAT A : Enhancement of endocytosis due to aminophospholipid transport across the plasma membrane of living cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **276**, C725–C733, 1999.
- [46] SIEGEL D & KOZLOV M : The gaussian curvature elastic modulus of n-monomethylated dioleoylphosphatidylethanolamine : Relevance to membrane fusion and lipid phase behavior. *Biophys. J.* **87**, 366–374, 2004.
- [47] SIEGEL DP : The modified stalk mechanism of lamellar/inverted phase transitions and its implications for membrane fusion. *Biophys. J.* **76**, 291–313, 1999.
- [48] CUVELIER D, DERÉNYI I, BASSEREAU P & NASSOY P : Coalescence of membrane tethers : Experiments, theory, and applications. *Biophys. J.* **88**, 2714–2726, 2005.
- [49] HELFRICH W & SERVUSS R : Undulations, steric interaction and cohesion of fluid membranes. *Nuovo Cimento D* **3**, 137–151, 1984.
- [50] KARATEKIN E, SANDRE O, GUITOUNI H, BORCHI N, PUECH P & BROCHARD-WYART F : Cascades of transient pores in giant vesicles : Line tension and transport. *Biophys. J.* **84**, 1734–1749, 2003.
- [51] SANDRE O, MOREAUX L & BORCHARD-WYART F : Dynamics of transient pores in stretched vesicles. *PNAS* **96**, 10591–10596, 1999.
- [52] SEIFERT U, BERNDL K & LIPOWSKY R : Shape transformations of vesicles - phase-diagram for spontaneous-curvature and bilayer-coupling models. *Phys. Rev. A* **44**, 1182–1202, 1991.
- [53] BLOOR M & WILSON M : Method for efficient shape parametrization of fluid membranes and vesicles. *Phys. Rev. E* **61**, 4218–4229, 2000.
- [54] CUVELIER D & NASSOY P : Hidden dynamics of vesicle adhesion induced by specific stickers. *Phys. Rev. Lett.* **93**, 228101, 2004.

- [55] KAS J & SACKMANN E : Shape transitions and shape stability of giant phospholipid-vesicles in pure water induced by area-to-volume changes. *Biophys. J.* **60**, 825–844, 1991.
- [56] SEIFERT U : Configurations of fluid membranes and vesicles. *Adv. in Phys.* **46**, 13–137, 1997.
- [57] MIAO L, SEIFERT U, WORTIS M & DÖBEREINER H : Budding transitions of fluid-bilayer vesicles - the effect of area-difference elasticity. *Phys. Rev. E* **49**, 5389–5407, 1994.
- [58] LEIBLER S : Curvature instability in membranes. *J. Phys. (France)* **47**, 507–516, 1986.
- [59] SVETINA S & ZEKS B : Bilayer couple hypothesis of red-cell shape transformations and osmotic hemolysis. *Biomed. Biochim. Acta* **42**, S86–S90, 1983.
- [60] SVETINA S & ZEKS B : Membrane bending energy and shape determination of phospholipid-vesicles and red blood-cells. *Eur. biophys. J.* **17**, 101–111, 1989.
- [61] WIESE W, HARBICH W & HELFRICH W : Budding of lipid bilayer vesicles and flat membranes. *J. Phys. : condens. matter* **4**, 1467–1657, 1992.
- [62] BOZIC B, SVETINA S, ZEKS B & WAUGH R : Role of lamellar membrane-structure in tether formation from bilayer vesicles. *Biophys. J.* **61**, 963–973, 1992.
- [63] FARGE E & DEVAUX P : Shape changes of giant liposomes induced by an asymmetric transmembrane distribution of phospholipids. *Biophys. J.* **61**, 347–357, 1992.
- [64] BICKEL T, MARQUES C & JEPPESEN C : Pressure patches for membranes : The induced pinch of a grafted polymer. *Phys. Rev. E* **62**, 1124–1127, 2000.
- [65] BICKEL T, JEPPESEN C & MARQUES C : Local entropic effects of polymers grafted to soft interfaces. *Eur. Phys. J. E* **4**, 33–43, 2001.
- [66] CHEN C, HIGGS P & MACKINTOSH F : Theory of fission for two-component lipid vesicles. *Phys. Rev. Lett.* **79**, 1579–1582, 1997.
- [67] FOURNIER JB : Nontopological saddle-splay and curvature instabilities from anisotropic membrane inclusions. *Phys. Rev. Lett.* **76**, 4436–4439, 1996.
- [68] WEIKL T, KOZLOV M & HELFRICH W : Interaction of conical membrane inclusions : Effect of lateral tension. *Phys. Rev. E* **57**, 6988–6995, 1998.
- [69] LIPOWSKY R, DÖBEREINER HG, HIERGEIST C & INDRANI V : Membrane curvature induced by polymers and colloids. *Physica A* **249**, 536–543, 1998.
- [70] KIM Y & SUNG W : Vesicular budding induced by a long and flexible polymer. *Europhys. Lett.* **47**, 292–297, 1999.

- [71] FOURNIER JB : Microscopic membrane elasticity and interactions among membrane inclusions : interplay between the shape, dilation, tilt and tilt-difference modes. *Eur. Phys. J. B* **11**, 261–272, 1999.
- [72] NIELSEN C & ANDERSEN O : Inclusion-induced bilayer deformations : Effects of monolayer equilibrium curvature. *Biophys. J.* **79**, 2853–2604, 2000.
- [73] EVANS A, TURNER M & SENS P : Interactions between proteins bound to biomembranes. *Phys. Rev. E* **67**, 041907, 2003.
- [74] BARTOLO D & FOURNIER J : Elastic interaction between "hard" or "soft" pointwise inclusions on biological membranes. *Eur. Phys. J. E* **11**, 141–146, 2003.
- [75] DANOV K, DIMOVA R & POULIGNY B : Viscous drag of a solid sphere straddling a spherical or flat surface. *Phys. fluids* **12**, 2711–2722, 2000.
- [76] HOCHMUTH RM & EVANS EA : Extensional flow of erythrocyte membrane from cell body to elastic tether. ii. experiment. *Biophys. J.* **39**, 71–81, 1982.
- [77] BROCHARD-WYART F, DE GENNES P & SANDRE O : Transient pores in stretched vesicles : role of leak-out. *Physica A* **278**, 32–51, 2000.
- [78] GOV N, ZILMAN A & SAFRAN S : Hydrodynamics of confined membranes. *Phys. Rev. E* **70**, 011104, 2004.
- [79] LANDAU L & LIFCHITZ E : *Physique théorique : mécanique des fluides, 3eme edition*. Ellipses, 1994.
- [80] SAFFMAN P : Brownian motion in thin sheets of viscous fluid. *J. Fluid Mech.* **73**, 593–602, 1976.
- [81] LIPOWSKY R : Budding of membranes induced by intramembrane domains. *J. Phys. II France* **2**, 1825–1840, 1992.
- [82] KUZMIN PI, AKIMOV SA, CHIZMADZHEV YA, ZIMMERBERG J & COHEN FS : Line tension and interaction energies of membrane rafts calculated from lipid splay and tilt. *Biophys. J.* **88**, 1120–1133, 2005.
- [83] BAUMGART T, HESS ST & WEBB WW : Imaging coexisting fluid domains in biomembrane models coupling curvature and line tension. *Nature* **425**, 821–824, 2003.
- [84] BAUMGART T, DAS S, WEBB WW & JENKINS JT : Membrane elasticity in giant vesicles with fluid phase coexistence. *Biophys. J.* submitted.
- [85] ALLAIN JM & BEN-AMAR M : Budding and fission of a multiphase vesicle. *Biophys. J.* submitted.
- [86] EVANS E, BOWMAN H, LEUNG A, NEEDHAM D & TIRRELL D : Biomembrane templates for nanoscale conduits and networks. *Science* **273**, 933–935, 1996.

- [87] POWERS TR, HUBER G & GOLDSTEIN RE : Fluid-membrane tethers : Minimal surfaces and elastic boundary layers. *Phys. Rev. E* **65**, 041901, 2002.
- [88] FYGENSON DK, MARKO JF & LIBCHABER A : Mechanics of microtubule-based membrane extension. *Phys. Rev. Lett.* **79**, 4497–4500, 1997.
- [89] KOSTER G, CACCIUTO A, DERÉNYI I, FREENKEL D & DOGTEROM M : Force barriers for membrane tube formation. *Phys. Rev. Lett.* **94**, 068101, 2005.
- [90] FARSAID K & CAMILLI PD : Mechanisms of membrane deformation. *Curr. Opin. Cell Biol.* **15**, 372–381, 2003.
- [91] KIRCHHAUSEN T : Three ways to make a vesicle. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **1**, 187–198, 2000.
- [92] HIRSCHBERG K, MILLER CM, ELLENBERG J, PRESLEY JF, SIGGIA ED, PHAIR RD & LIPPINCOTT-SCHWARTZ J : Kinetic analysis of secretory protein traffic and characterization of golgi to plasma membrane transport intermediates in living cells. *J. Cell Biol.* **143**, 1485–1503, 1998.
- [93] WHITE J, JOHANNES L, MALLARD F, GIROD A, GRILL S, REINSCH S, KELLER P, TZSCHASCHEL B, ECHARD A, GOUD B & STELZER EHK : Rab6 coordinates a novel golgi to er retrograde transport pathway in live cells. *J. Cell Biol.* **147**, 743–760, 1999.
- [94] RUSTOM A, SAFFRICH R, MARKOVIC I, WALTHER P & GERDES HH : Nanotubular highways for intercellular organelle transport. *Science* **303**, 1007–1010, 2004.
- [95] KOSTER G, VANDUIJIN M, HOF S & DOGTEROM M : Membrane tube formation from giant vesicles by dynamic association of motor proteins. *PNAS* **100**, 15583–15588, 2003.
- [96] LEDUC C, CAMPÀS O, ZELDOVICH KB, ROUX A, JOLIMAITRE P, BOUREL-BONNET L, GOUD B, JOANNY JF, BASSEREAU P & PROST J : Cooperative extraction of membrane nanotubes by molecular motors. *PNAS* **101**, 17096, 2004.
- [97] ALLAIN JM, STORM C, ROUX A, BEN-AMAR M & JOANNY JF : Fission of a multiphase membrane tube. *Phys. Rev. Lett.* **93**, 158104, 2004.
- [98] FOURNIER JB & GALATOLA P : Tubular vesicles and effective fourth-order membrane elastic theories. *Europhys. Lett.* **39**, 225–230, 1997.
- [99] BOZIC B, HEINRICH V, SVETINA S & ZEKS B : Shapes of nearly cylindrical, axisymmetric bilayer membranes. *Eur. Phys. J. E* **6**, 91–98, 2001.
- [100] SHIBUYA A, SAITO Y & HYUGA H : Morphology of axisymmetric vesicles with encapsulated filaments and impurities. *J. Phys. Soc. Jap.* **71**, 1780–1788, 2002.

- [101] SMITH AS, SACKMANN E & SEIFERT U : Pulling tethers from adhered vesicles. *Phys. Rev. Lett.* **92**, 208101, 2004.
- [102] EMSELLEM V, CARDOSO O & TABELING P : Vesicle deformation by microtubules : a phase diagram. *Phys. Rev. E* **58**, 4807–4810, 1998.
- [103] FROLOV VA, LIZUNOV VA, DUNINA-BARKOVSKAYA AY, SAMSONOV AV & ZIMMERBERG J : Shape bistability of a membrane neck : a toggle switch to control vesicle content release. *PNAS* **100**, 8698–8703, 2003.
- [104] ROSSIER O, CUVELIER D, BORCHI N, PUECH PH, DERÉNYI I, BUGUIN A, NASSOY P & BROCAHRD-WYART F : Giant vesicles under flows : Extrusion and retraction of tubes. *Langmuir* **19**, 575–584, 2003.
- [105] BOZIC B, SVETINA S & ZEKS B : Theoretical analysis of the formation of membrane microtubes on axially strained vesicles. *Phys. Rev. E* **55**, 5834–5842, 1997.
- [106] HEINRICH V, BOZIC B, SVETINA S & ZEKS B : Vesicle deformation by an axial load : From elongated shapes to tethered vesicles. *Biophys. J.* **76**, 2056–2071, 1999.
- [107] DERÉNYI I, JÜLICHER F & PROST J : Formation and interaction of membrane tubes. *Phys. Rev. Lett.* **88**, 238101, 2002.
- [108] BUKMAN DJ, YAO JH & WORTIS M : Stability of cylindrical vesicles under axial tension. *Phys. Rev. E* **54**, 5463–5468, 1996.
- [109] GOLDSTEIN RE, NELSON P, POWERS T & SEIFERT U : Front propagation in the pearling instability of tubular vesicles. *J. Phys. II (France)* **6**, 767–796, 1996.
- [110] MÉNAGER C, MEYER M, CABUIL V, CEBERS A, BACRI JC & PERZYNSKI R : Magnetic phospholipid tubes connected to magnetoliposomes : pearling instability induced by a magnetic field. *Eur. Phys. J. E* **7**, 325–337, 2002.
- [111] HEINRICH V & WAUGH RE : A piconewton force transducer and its application to measurement of the bending stiffness of phospholipid membranes. *Ann. Biomed. Eng.* **24**, 595–605, 1996.
- [112] UPADHYAYA A & SHEETZ M : Tension in tubulovesicular networks of golgi and endoplasmic reticulum membranes. *Biophys. J.* **86**, 2923–2928, 2004.
- [113] BORCHI N, ROSSIER O & BROCHARD-WYART F : Hydrodynamic extrusion of tubes from giant vesicles. *Europhys. Lett.* **64**, 837–843, 2003.
- [114] ELBAUM M, FYGENSON DK & LIBCHABER A : Buckling microtubules in vesicles. *Phys. Rev. Lett.* **76**, 4078–4081, 1996.
- [115] KOZLOVSKY Y & KOZLOV MM : Membrane fission : Model for intermediate structures. *Biophys. J.* **85**, 85–96, 2003.

- [116] TANAKA T, SANO R, YAMASHITA Y & YAMAZAKI M : Shape changes and vesicle fission of giant unilamellar vesicles of liquid-ordered phase membrane induced by lysophosphatidylcholine. *Langmuir* **20**, 9526–9534, 2004.
- [117] POMEAU Y : Brisure spontanée de cristaux bidimensionnels courbes. *CR ACAD SCI II B-MEC* **314**, 553–556, 1992.
- [118] ROUX A : communication personnelle .
- [119] KAS J, SACKMANN E, PODGORNIK R, SVETINA S & ZEKS B : Thermally induced budding of phospholipid-vesicles - a discontinuous process. *J. Phys. II (France)* **3**, 631–645, 1993.
- [120] PETROV PG, LEE JB & DÖBEREINER HG : Coupling chemical reactions to membrane curvature : A photochemical morphology switch. *Europhys. Lett.* **48**, 435–441, 1999.
- [121] LEE JB, PETROV PG & DÖBEREINER HG : Curvature of zwitterionic membranes in transverse ph gradients. *Langmuir* **15**, 8543–8546, 1999.
- [122] NOMURA F, NAGATA M, INABA T, HIRAMATSU H, HOTANI H & TAKIGUCHI K : Capabilities of liposomes for topological transformation. *PNAS* **98**, 2340–2345, 2001.
- [123] YAMASHITA Y, MASUM SM, TANAKA T & YAMAZAKI M : Shape changes of giant unilamellar vesicles of phosphatidylcholine induced by a de novo designed peptide interacting with their membrane interface. *Langmuir* **18**, 9638–9641, 2001.
- [124] STANEVA G, KOUMANOV K, TRUGNANT G & ANGELOVA M : Detergents induce raft-like domains fission from giant unilammellar heterogeneous vesicles. a direct microscopy observation. *Chem. Phys. Lipids* soumis.
- [125] STANEVA G, ANGELOVA M & KOUMANOV K : Phospholipase a(2) promotes raft budding and fission from giant liposomes. *Chem. Phys. Lipids* **129**, 53–62, 2004.
- [126] STANEVA G : communication personnelle .
- [127] MORI S & WADATI M : Curvature instability induced by diffusing particles. *J. Phys. Soc. Jpn* **62**, 3557–3564, 1993.
- [128] SEIFERT U : Curvature-induced lateral phase segregation in two-component vesicles. *Phys. Rev. Lett.* **70**, 1335–1338, 1993.
- [129] KRALJ-IGLIC V, HEINRICH V, SVETINA S & ZEKS B : Free energy of closed membrane with anisotropic inclusions. *Eur. Phys. J. B* **10**, 5–8, 1999.
- [130] JÜLICHER F & LIPOWSKY R : Domain-induced budding of vesicles. *Phys. Rev. Lett.* **70**, 2964–2967, 1993.
- [131] JÜLICHER F & LIPOWSKY R : Shape transformations of vesicles with intramembrane domains. *Phys. Rev. E* **53**, 2670–2683, 1996.

- [132] TANIGUCHI T : Shape deformation and phase separation dynamics of two-component vesicles. *Phys. Rev. Lett.* **76**, 4444–4447, 1996.
- [133] KUMAR PS, GOMPPER G & LIPOWSKY R : Budding dynamics of multicomponent membranes. *Phys. Rev. Lett.* **86**, 3911–3914, 2001.
- [134] LARADJI M & KUMAR PS : Dynamics of domain growth in self-assembled fluid vesicles. *Phys. Rev. Lett.* **93**, 198105, 2004.
- [135] YAMAMOTO S & HYODO S : Budding and fission dynamics of two-component vesicles. *J. Chem. Phys.* **118**, 7937–7943, 2003.
- [136] ANGELOVA M : communication personnelle .
- [137] WEISS M : communication personnelle .
- [138] RAWICZ W, OLBRICH K, MCINTOSH T, NEEDHAM D & EVANS E : Effect of chain length and unsaturation on elasticity of lipid bilayers. *Biophys. J.* **79**, 328–339, 2000.
- [139] CHEN YJ & STEEN PH : Dynamics of inviscid capillary breakup : Collapse and pinchoff of a film bridge. *J. Fluid Mech.* **341**, 245–267, 1997.
- [140] BOUDAUD A : *Membranes élastiques et capillaires : instabilités, singularités et auto-adaptation*. Thèse de doctorat, Université Paris 6, 2001.
- [141] BOUDAUD A, PATRICIO P & BEN-AMAR M : The helicoid versus the catenoid : geometrically induced bifurcations. *Phys. Rev. Lett.* **83**, 3836–3839, 1999.
- [142] DIETRICH C, YANG B, FUJIWARA T, KUSUMI A & JACOBSON K : Relationship of lipid rafts to transient confinement zones detected by single particle tracking. *Biophys. J.* **82**, 274–284, 2002.
- [143] KAHYA N, SCHERFELD D, BACIA K, POOLMAN B & SCHWILLE P : Probing lipid mobility of raft-exhibiting model membranes by fluorescence correlation spectroscopy. *J. Biol. Chem.* **278**, 28109–28115, 2003.
- [144] KENWORTHY AK, NICHOLS BJ, REMMERT CL, HENDRIX GL, KUMAR M, ZIMMERBERG J & LIPPINCOTT-SCHWARTZ J : Dynamics of putative raft-associated proteins at the cell surface. *J. Cell Biol.* **165**, 735–746, 2004.
- [145] VRLJIC M, NISHIMURA SY, BRASSELET S, MOERNER WE & MCCONNELL H : Translational diffusion of individual class ii mhc membrane proteins in cells. *Biophys. J.* **83**, 2681–2692, 2002.
- [146] BÖCKMANN RA, HAC A, HEIMBURG T & GRUBMÜLLER H : Effect of sodium chloride on a lipid bilayer. *Biophys. J.* **85**, 1647–1655, 2003.
- [147] HAC AE, SEEGER HM, FIDORRA M & HEIMBURG T : Diffusion in two-component lipid membranes - a fluorescence correlation spectroscopy and monte carlo simulation study. *Biophys. J.* **88**, 317–333, 2005.

- [148] DIMOVA R, DANOV K, POULIGNY B & IVANOV IB : Drag of a solid particle in a thin film or at an interface : influence of surface viscosity and elasticity. *J. Colloid Interf. Sci.* **226**, 35–43, 2002.
- [149] STONE HA & MCCONNELL HM : Hydrodynamics of quantized shape transitions of lipid domains. *Proc. R. Soc. Lond. A* **448**, 97–111, 1995.
- [150] FORSTNER MB, MARTIN DS, MNAVAR A & KÄS JA : Simultaneous single-particle tracking and visualization of domain structure on lipid monolayers. *Langmuir* **19**, 4876–4879, 2003.
- [151] SICKERT M & RONDELEZ F : Shear viscosity of langmuir monolayers in the low-density limit. *Phys. Rev. Lett.* **90**, 126104, 2003.
- [152] STONE HA & MCCONNELL HM : Lipid domain instabilities in monolayers overlying sublayers of finite depth. *J. Phys. Chem.* **99**, 13505–13508, 1995.
- [153] STONE HA : Fluid motion of monomolecular films in a channel flow geometry. *Phys. fluids* **7**, 2931–2937, 1995.
- [154] STONE HA & AJDARI A : Hydrodynamics of particles embedded in a flat surfactant layer overlying a subphase of finite depth. *J. Fluid Mech.* **369**, 151–173, 1998.
- [155] LUBENSKY DK & GOLDSTEIN RE : Hydrodynamics of monolayer domains at the air-water interface. *Phys. Fluids* **8**, 843–854, 1996.
- [156] PUFF N, LAMAZIÈRE A, SEIGNEURET M, TRUGNAN G & ANGELOVA MI : Hdls induce raft domain vanishing in heterogeneous giant vesicles. *Chem. Phys. Lipids* **133**, 195–202, 2005.
- [157] LAMAZIERE A : Interactions entre les lipoprotéines de haute densité et les vésicules géantes 'pro-raft'. *Rapport de stage, DEA Matière condensée* 2004.
- [158] SAFFMAN PG & TAYLOR G : The penetration of a fluid into a porous medium or hele-shaw cell containing a more viscous liquid. *Proc. R. Soc. Lond. A* **245**, 312–, 1958.
- [159] CUMMINGS LJ & KING JR : Hele-shaw flow with a point sink : generic solution breakdown. *Euro. Jnl. Applied Math.* **15**, 1–37, 2004.
- [160] GELFAND IM & FOMIN SV : *Calculus of variations*. Prentice-Hall inc, Englewood Cliffs, New Jersey, 1963.
- [161] KUNDU PK & COHEN IM : *Fluid Mechanics, second edition*. Acadmic press, 2002.