



HAL
open science

Etude d'un système biomimétique simple : diffusion brownienne et mobilité électrophorétique d'une protéine membranaire modèle insérée dans une bicouche lipidique supportée

Frédéric Harb

► **To cite this version:**

Frédéric Harb. Etude d'un système biomimétique simple : diffusion brownienne et mobilité électrophorétique d'une protéine membranaire modèle insérée dans une bicouche lipidique supportée. Biophysique [physics.bio-ph]. Aix-Marseille Université, 2012. Français. NNT : . tel-00790343

HAL Id: tel-00790343

<https://theses.hal.science/tel-00790343>

Submitted on 20 Feb 2013

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.

Aix-Marseille Université

Numéro d'ordre :

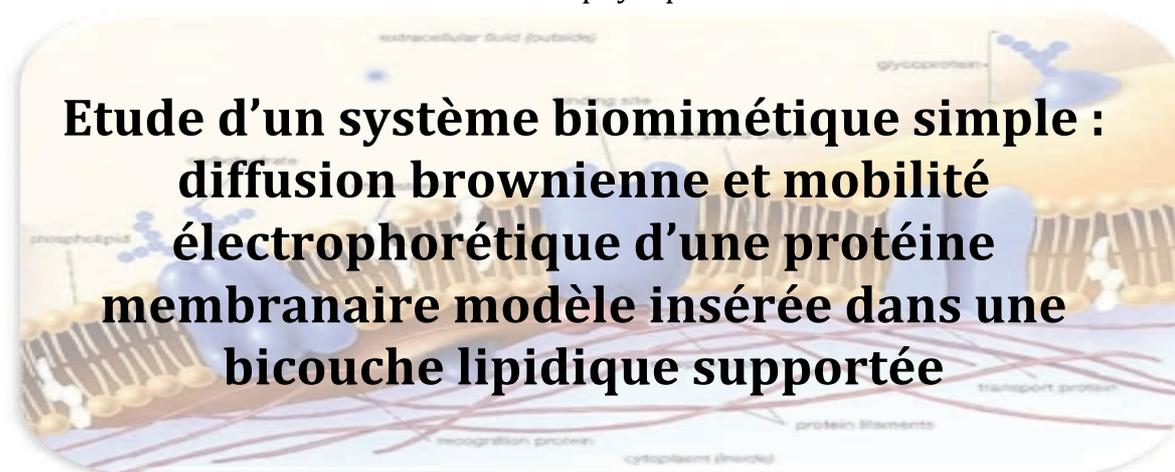
THÈSE

pour obtenir le grade de :

Docteur d'Aix-Marseille Université

Ecole Doctorale de Physique et science de la matière

Mention Biophysique



**Etude d'un système biomimétique simple :
diffusion brownienne et mobilité
électrophorétique d'une protéine
membranaire modèle insérée dans une
bicouche lipidique supportée**

présentée par :

Frédéric HARB

à soutenir le 27 Novembre 2012 devant la commission d'examen composée de :

Rapporteurs : Mme. CHARLAIX Elisabeth – LIPHY – UMR 5588 - GRENOBLE
M. PINCET Frédéric – LPS – UMR 8550 - PARIS

Examineurs : Mme. GIUDICI-ORTICONI Marie-Thérèse – BIP – UMR 7281
MARSEILLE
Mme. SFARGHIU Ana-Maria – LaMCoS – UMR 5259 – LYON
M. RIEU Jean-Paul – LPMCN – UMR 5586 – LYON

Directeur de thèse : M. TINLAND Bernard – CiNaM - UMR 7325 - MARSEILLE

préparée au Centre Interdisciplinaire de Nanosciences de Marseille CiNaM-CNRS
(UMR 7325) Campus de Luminy, Case 913, 13288 Marseille Cedex 9

REMERCIEMENTS

A l'issue de la rédaction de ce manuscrit, je suis convaincu que la thèse est loin d'être un travail solitaire. En effet, je n'aurais jamais pu réaliser ce travail sans le soutien d'un grand nombre de personnes, dont la générosité, la bonne humeur et l'intérêt manifestés à l'égard de ma recherche m'ont permis de progresser dans cette phase délicate de "l'apprenti-chercheur"

En premier lieu, je tiens à remercier mon directeur de thèse, Monsieur TINLAND Bernard, pour la confiance qu'il m'a accordé en acceptant d'encadrer ce travail doctoral, pour ses multiples conseils et pour toutes les heures qu'il a consacrées à diriger cette recherche. J'aimerais également lui dire à quel point j'ai apprécié sa grande disponibilité et son respect sans faille des délais serrés de relecture des documents que je lui ai adressés. Enfin, j'ai été extrêmement sensible à ses qualités humaines d'écoute et de compréhension tout au long de ce travail doctoral. Je souhaite à tous les futurs doctorants d'avoir un encadrant de cette envergure ! Ces quelques lignes sont peu de choses par rapport à tout ce qu'il m'a apporté.

Mes remerciements s'adressent ensuite à Monsieur HENRY Claude qui m'a accueilli pendant trois ans au sein de son laboratoire.

Je tiens à remercier Professeur CHARLAIX Elisabeth et Docteur PINCET Frédéric d'avoir accepté d'être les rapporteurs et de juger ce travail.

Je remercie Docteur GIUDICI-ORTICONI Marie-Thérèse pour avoir accepté de présider le Jury ainsi qu'examiner ce travail. Je remercie Docteur

SFARGHIU Ana-Maria et Professeur RIEU Jean-Paul d'avoir accepté de participer à ce jury et d'examiner ce travail.

Ce travail n'aurait pas pu aboutir sans l'aide de nombreuses personnes. J'ai une pensée particulière à Madame GILLOT Nathalie pour toutes les discussions matinales qu'on s'est partagé au cours de ces trois ans. Merci à Monsieur BINDZI Philippe pour son humour et son aide. Merci à Monsieur VEESLER Stéphane de m'avoir permis d'utiliser la machine de DSC. Merci à Madame SIMON Anne pour les images AFM et à Monsieur RIEU Jean-Paul pour avoir permis l'accès à son AFM. Et merci enfin à Monsieur TREGLIA Guy pour les discussions scientifiques qui m'ont permis de mieux comprendre certains résultats.

J'ai pu travailler dans un cadre particulièrement agréable, grâce à l'ensemble des personnes au CINaM. Que me pardonnent celles que j'oublie ici, mais je pense particulièrement à RODRIGUEZ RUIZ Isaac, O'MAHONY Marcus, DUFRESNE Alice, HOFF Brice, CASTEL Bertille, PERRIN Jonathan, COLBERT Mehdi, ALWAN Monzer, MINH DAU Tuan, LEONI Thomas, ZRIR Mohamad, LOPES Aurélie, ASSAUD Loïc, et HERESANU Vasile. Merci à vous tous pour votre bonne humeur, pour toutes ces séances de rire et de sourires, et pour toutes ces discussions autour d'un café où, comme il se doit, nous avons refait le monde...

Un grand Merci à Madame RICOLLEAU Angèle et Madame LEREU Aude pour leurs conseils et leurs temps qu'elles ont consacrés afin de rendre la présentation de ce travail plus didactique et plus pédagogique.

Ces remerciements ne seraient pas complets sans une pensée pour mes amis à Paris (spécialement BELKHIRYA Karima et Bassem et PETITPREZ

Amélie), au LIBAN et au Foyer Franco-Libanais à Marseille. Merci de m'avoir aidé et encouragé, et pour m'avoir changé les idées quand j'en avais besoin.

Il y a une personne de très grande importance dans ma vie, qui m'accompagne et qui me soutient tout le temps par la force et l'énergie qui lui sont disponibles. Il s'agit de EL HELOU Rita, ma merveilleuse, splendide copine, dont je ne pourrai mesurer l'apport dans l'accomplissement de ce travail. Dans tout ce que j'ai pu souffrir et obtenir, elle a été l'autre moi. Je te remercie infiniment mon amour.

Mes remerciements s'adressent enfin à ma famille qui m'a toujours épaulé dans ce travail. Ils ont toujours cru en moi et j'espère être toujours à leur hauteur. Un remerciement spécial pour mon père, qui sans lui, je n'aurai jamais eu l'opportunité de continuer mes études en France et effectuer cette thèse.

A RITA,

*Pour tout ce que tu m'as offert
pendant ces 3 ans, je t'en remercie.*

Je t'aime mon coeur

SOMMAIRE

Introduction Générale

Revue Bibliographique

Chapitre I : La membrane biologique, composition et fonction

1 La Membrane Biologique	3
1.1 Des membranes biologiques aux membranes artificielles	3
1.1.1 <i>Composition et structure des membranes biologiques</i>	3
1.1.1.1 <i>Composition chimique</i>	3
1.1.1.2 <i>Dynamique et fluidité</i>	5
1.1.2 <i>Les différents modèles de membranes artificielles</i>	6
1.1.3 <i>Tension de surface dans les membranes</i>	11
1.1.4 <i>Transition de phase dans les membranes</i>	12
1.2 Les bicouches lipidiques supportées, un système modèle	14
1.2.1 <i>Fusion des vésicules</i>	14
1.2.2 <i>La balance de Langmuir</i>	16
1.3 Dynamique des systèmes étudiés	18
1.3.1 <i>Techniques de mesure utilisées</i>	18
1.3.2 <i>Dynamique des vésicules libres et des bicouches lipidiques</i>	20
1.3.3 <i>Diffusion transversale</i>	21
1.4 Transitions de phase dans les bicouches lipidiques supportées	22
1.4.1 <i>Bicouches formées par fusion des vésicules</i>	22
1.4.2 <i>Bicouches formées par la technique de Langmuir-Blodgett ou Langmuir-Schaeffer</i>	23
1.4.3 <i>Transition principale dans les membranes libres</i>	24
1.4.4 <i>Effet de la proximité du support : couplage entre les deux feuilletts</i>	26
1.5 Conclusion	27

2	Les protéines membranaires.....	28
2.1	Introduction.....	28
2.2	Rôles des protéines dans les membranes biologiques.....	33
2.2.1	<i>Rôle de barrière sélective.....</i>	<i>33</i>
2.2.2	<i>Rôle de support de charges électriques.....</i>	<i>33</i>
2.2.3	<i>Support de réactions enzymatiques.....</i>	<i>34</i>
2.2.4	<i>Réception et transfert de messages spécifiques.....</i>	<i>34</i>
2.3	Une protéine modèle : l'alpha-hémolysine.....	35
2.4	Diffusion Brownienne et Mobilité électrophorétique des protéines membranaires.....	37
2.5	Conclusion.....	39
3	Références.....	40

Chapitre II : Matériels et Méthodes

3.1	Structure des phospholipides utilisés.....	46
3.2	Préparation des échantillons.....	48
3.2.1	<i>Balance de Langmuir.....</i>	<i>48</i>
3.2.1.1	<i>Principe.....</i>	<i>48</i>
3.2.1.2	<i>Transfert de Langmuir-Blodgett.....</i>	<i>51</i>
3.2.1.3	<i>Transfert de Langmuir-Schaeffer.....</i>	<i>52</i>
3.2.2	<i>Préparation des multi-bicouches.....</i>	<i>53</i>
3.2.3	<i>Supports.....</i>	<i>54</i>
3.3	La technique de FRAPP.....	55
3.3.1	<i>Principe.....</i>	<i>55</i>
3.3.2	<i>Dispositif expérimental.....</i>	<i>56</i>
3.3.3	<i>Mesures en température.....</i>	<i>63</i>
3.3.4	<i>Qualité des mesures effectuées.....</i>	<i>64</i>
3.4	Signaux et analyses.....	64
3.5	La technique de DSC.....	65
3.5.1	<i>Principe.....</i>	<i>66</i>
3.5.2	<i>Mesures qualitatives.....</i>	<i>68</i>

3.5.3	<i>Mode Opérateur</i>	68
3.5.3.1	Echantillonnage.....	68
3.5.3.2	Réglages.....	69
3.6	Marquage de l'Alpha-hémolysine	70
3.7	Insertion de la protéine dans la bicouche lipidique supportée	70
3.8	Prises des images	71
3.9	Montage électrophorèse	71
3.10	Microscopie à Force Atomique	73
3.11	Références	74

Résultats et Discussion

Partie A : Les Bicouches Lipidiques Supportées

Chapitre III : Rôle de l'interaction bicouche-support sur la formation de la phase 'Ripple' dans une bicouche lipidique supportée unilamellaire

1	Résumé	78
2	Généralités sur la phase <i>Ripple</i>	78
3	Résultats	83
3.1	Coefficient de diffusion sur le verre	83
3.2	Coefficient de diffusion sur le mica	84
3.3	Coefficient de diffusion des lipides d'une DDB de DPPC sur le mica	84
4	Discussion	85
5	Conclusion	89
6	Références	90

Chapitre IV : Effet de la force ionique : dynamique des phosphatidylcholines et énergie d'interaction bicouche/support

1	Introduction.....	95
2	Résultats et discussion.....	96
2.1	Taux de transfert.....	96
2.2	Coefficient de diffusion.....	97
2.3	Bicouche DPPC/mica.....	100
2.4	Bicouche DPPC/verre.....	101
2.5	Double bicouche DPPC/mica.....	101
2.6	Bicouche DPPC/mica en présence de CaCl ₂	103
2.7	Expériences avec le DMPC.....	103
2.8	Estimation de l'énergie d'activation bicouche/support à partir des courbes de diffusion.....	104
3	Conclusion.....	111
4	Références.....	112

Partie B : Protéine Membranaire

Chapitre V : Nouveau régime de diffusion dans une bicouche lipidique d'une protéine membranaire modèle

1	Résumé.....	115
2	Introduction.....	115
3	Résultats et discussion.....	118
3.1	Caractérisation de notre système.....	118
3.2	Diffusion de la protéine dans la Bicouche.....	125
3.3	Insertion de l' α -Hl dans la phase <i>Ripple</i>	129
4	Conclusion.....	130
5	Références.....	131

Chapitre VI : Micro-électrophorèse 2D des protéines membranaires dans des n-bicouches lipidiques supportées

1	Introduction.....	137
2	Résultats et discussion.....	138
2.1	Etudes sur différents systèmes SLB/DDB/DMB.....	138
2.1.1	<i>Contrôle du système par les coefficients de diffusion.....</i>	<i>138</i>
2.1.2	<i>Mobilité électrophorétique (μ) sur BLS.....</i>	<i>139</i>
2.1.3	<i>Mobilité électrophorétique sur DDB de DPPC : n=2.....</i>	<i>139</i>
2.1.4	<i>Mobilité électrophorétique sur DMB d'EggPC et de DMPC : n \approx 500.....</i>	<i>141</i>
2.2	Mobilité électrophorétique de l'α-HL en fonction de la charge (\approx de pH).....	142
2.3	Mobilité électrophorétique des complexes d'α-HL.....	145
3	Conclusion.....	146
4	Références.....	147
	 Conclusion Générale.....	 149
	 Annexes.....	 151

Introduction générale

Vers la fin du 20^{ème} siècle, une évolution scientifique importante a concerné le décryptage du *génom*e et plus spécifiquement le séquençage et la cartographie des gènes. Le nouveau défi est maintenant celui du *protéome*, c'est-à-dire l'analyse qualitative et quantitative des protéines exprimées par une cellule. C'est une tâche encore plus ambitieuse dans la mesure où le *protéome* évolue dans le temps en fonction de son environnement. Dans une cellule de mammifère, il y aurait jusqu'à 10^5 protéines dont 30 000 (soit environ 30%) seraient des protéines membranaires. Celles-ci sont fortement impliquées dans des processus cellulaires importants tels que l'adhésion des cellules, le transport d'ions et de métabolites, l'endocytose, etc... Or à ce jour, une centaine de structures seulement sont connues.

Une façon d'étudier ces mécanismes cellulaires est de s'intéresser à la dynamique de ces protéines membranaires. C'est la mesure de coefficients de diffusion des différents objets (lipides, protéines) qui a constitué la donnée principale d'investigation dans ce travail.

Au delà, l'idée a été de progresser vers une séparation électrophorétique des protéines membranaires dans un milieu qui leur conviendrait, type bicouche lipidique, au lieu d'être obligé de les « solubiliser » dans des mélanges complexes de détergents sophistiqués, risquant en permanence leur dénaturation et donc la perte de leur structure 3D. On voit d'ailleurs la complexité des électrophorégrammes de protéines solubles et l'on peut imaginer que certaines protéines membranaires, déjà sous-représentées du fait du problème de leur solubilité, peuvent aisément se retrouver confondues, superposées, par exemple, avec d'autres spots de protéine soluble.

Pour avancer vers la mise au point d'une séparation électrophorétique des protéines membranaires, nous avons préparé un système « biomimétique » modèle comprenant une ou plusieurs membranes de phospholipides (DMPC, DPPC, EggPC...) supportées sur du verre ou du mica et contenant une protéine modèle, l' α -hémolysine, insérée sous forme d'un pore heptamérique ou d'un dimère ou d'un trimère d'heptamères.

A travers une abondante littérature, rappelée dans le chapitre I, on constate que certaines connaissances comme la variation de température de transition gel-fluide d'une bicouche à une autre, l'existence de la phase dite "*ripple*" restent en discussion. De plus, l'étude de la dynamique (diffusion, mobilité) de protéines membranaires est très peu développée et les

nombreuses expériences faites avec l' α -Hémolysine sont des études qui s'intéressent soit au mécanisme de la formation des pores via l'AFM, soit à la translocation d'ADN simple brin via un montage type électrophysiologie.

Le chapitre II décrit les Matériels et Méthodes mis en œuvre dans ce travail. En utilisant des outils adaptés et optimisés, ce travail a permis d'établir un corpus de données les plus précises et les plus rigoureuses possible concernant le comportement dynamique des phospholipides et de la protéine. Pour cela, nous nous sommes attachés à la préparation d'échantillons les mieux définis possibles afin de donner du sens aux mesures.

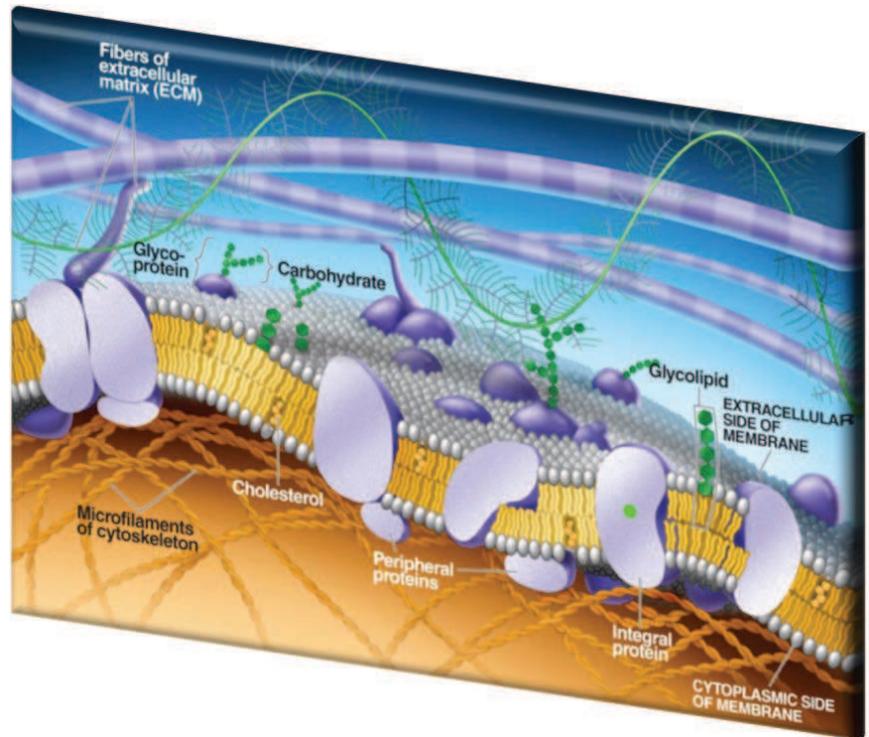
De ce fait, dans un premier temps, nous nous sommes concentrés sur l'étude des phospholipides composant la membrane. Le chapitre III traite de la possibilité ou non pour une bicouche supportée unilamellaire de former une phase ondulée ou *ripple* alors qu'elle est au voisinage du support. Le chapitre IV clôt la partie sur la bicouche seule par l'étude du comportement des membranes en fonction de leurs interactions avec le support, en variant notamment la force ionique et la longueur des chaînes, et en mesurant la conséquence de ces variations sur la diffusion des phospholipides. Nous tentons, par une corrélation des résultats FRAPP/DSC, d'estimer la valeur des interactions bicouche/support dans les différentes situations.

Dans le chapitre V est exposée l'étude du comportement diffusif (ou non) de la protéine modèle insérée dans la bicouche, notamment en fonction de la taille de l'objet formé. Le chapitre VI présente les résultats obtenus lors de l'application d'un champ électrique parallèle à la membrane, dans différents systèmes (nombre de bicouches, nature du lipide,...)

*Revue
Bibliographique*



Chapitre I: La membrane biologique, composition et fonction



“Genes contain the information to build the cell, proteins catalyze the necessary chemical reactions, but phospholipids act as the marshals, holding the biochemical machinery together and helping to maintain the right chemical environment”

Caroline Pond

1 La Membrane Biologique :

1.1 Des membranes biologiques aux membranes artificielles

Les membranes biologiques représentent un élément fondamental de l'organisation cellulaire. Elles assurent l'individualité cellulaire et sont responsables de la compartimentation de l'espace cytoplasmique en organites fonctionnellement spécialisés ainsi que des échanges contrôlés entre l'intérieur de la cellule et le milieu extra cellulaire.

Ces membranes sont loin d'être des enveloppes inertes. Le modèle de 'mosaïque fluide' a été introduit dès 1972 par Singer et Nicolson ¹. Ce modèle décrit les membranes biologiques comme étant constituées d'une double couche de phospholipides, dans laquelle les chaînes hydrophobes se font face, traversées par des protéines membranaires. Les lipides y sont en perpétuel mouvement de diffusion latérale, via le mouvement brownien ², et les protéines membranaires se déplacent également, mais plus lentement que les lipides qui les entourent.

Grâce au développement de nouvelles techniques telles que les pièges optiques ou la spectroscopie de corrélation de fluorescence, de récentes études ^{3,4} ont montré une grande complexité de l'organisation dynamique des membranes, les lipides (et les protéines) ne diffusent pas aussi librement que le proposait le modèle originel mais s'organisent en domaines lipoprotéiques temporaires. L'existence de micro-domaines et de phases diverses au sein même des membranes a révélé toute leur complexité et la nécessité d'utiliser des modèles moins élaborés pour en comprendre le fonctionnement.

1.1.1 Composition et structure des membranes biologiques

1.1.1.1 *Composition chimique*

La membrane biologique présente deux rôles qui semblent incompatibles : isoler une entité vivante de son environnement et communiquer sélectivement avec cet environnement en échangeant matière et informations. La membrane est indispensable au déroulement des processus biologiques car elle maintient les compositions différentes des milieux intra et extracellulaires, ainsi que les gradients de concentration. Elle forme ainsi une frontière dont la traversée est hautement contrôlée.

La membrane biologique présente une structure fondamentale⁵ constituée d'une bicouche lipidique, d'épaisseur moyenne 7,5 nm, dans laquelle sont insérés des édifices macromoléculaires de nature protéique et/ou glycoprotéique. Ces différents éléments ne sont pas liés par covalence, mais par différents types de liaisons faibles (interactions hydrophobes, forces de van der Waals, interactions électrostatiques, ponts hydrogène.)

L'ensemble de la membrane est donc fluide, d'où le nom de 'mosaïque fluide' proposée par Singer et Nicolson en 1972¹. Cependant des études récentes suggèrent que certains lipides spécifiques peuvent former des domaines plus condensés nommés 'rafts' (radeaux) dans les membranes plasmiques⁵⁻⁸. Enfin, la membrane est asymétrique : la composition des feuillettes externe et interne est très différente, aussi bien au niveau des lipides que des protéines, et diffère selon les comportements et les cellules.

On répertorie trois familles de lipides dans les membranes : les glycérophospholipides (ou phospholipides), les sphingolipides et les stérols.

Parmi tous les constituants de la membrane⁹⁻¹¹, les phospholipides sont, de loin, les plus répandus et peuvent être considérés comme les éléments de base des bicouches. Ils sont composés d'une tête polaire hydrophile (surface moyenne de 50 Å²) et d'une queue apolaire hydrophobe, constituée de deux chaînes carbonées identiques ou non, de longueur variable (10 à 20 atomes de carbones), et pouvant comporter des insaturations. La longueur moyenne de ces chaînes est de l'ordre de 2-3 nm. Suivant le lipide, la tête peut être ionique (charge positive ou négative), zwitterionique (deux charges opposées) ou neutre. Ils sont également classés selon la structure de leur squelette carboné (nombre de carbones, présence d'insaturations).

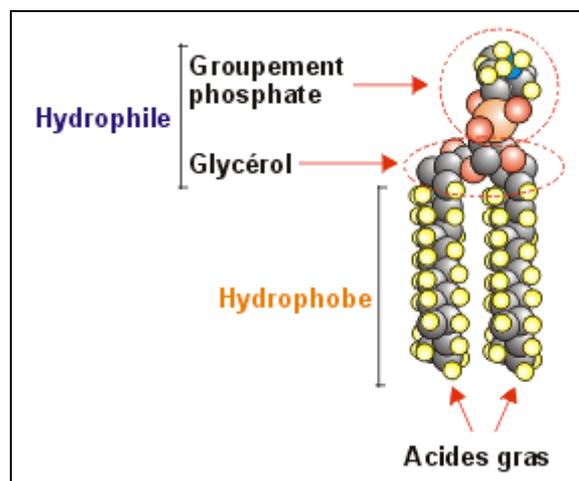


Figure 1: Structure d'un phospholipide

L'exemple le plus classique, et sur lequel nous avons porté notre attention, est la phosphatidylcholine (**Figure 1**). Cette molécule est un ester bâti sur le glycérol (trialcool). Elle comporte deux chaînes aliphatiques, issues des acides gras engagés dans l'estérification de deux groupements alcool du glycérol. Le troisième groupement alcool est estérifié par l'acide phosphorique (sous forme d'un groupement phosphate, ionisé, donc chargé, au pH cellulaire). L'ensemble forme un groupement phosphatidyl. Ce dernier est ici lié à la choline, groupement chargé positivement. C'est donc un phospholipide zwitterionique. Comme le groupement phosphate est chargé négativement au pH cellulaire, l'ensemble de la molécule est neutre.

Suivant la nature de la tête polaire, on retrouve les phospholipides suivants (**Tableau 1**):

Tête polaire	Nom classique	Symbole
-H	Acide phosphatidique	PA
$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_3^+$	Phosphatidyléthanolamine	PE
$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$	Phosphatidylcholine	PC
$ \begin{array}{c} \text{CHOH-CHOOH} \\ \diagup \quad \diagdown \\ -\text{CH} \quad \text{CHOH} \\ \diagdown \quad \diagup \\ \text{CHOH-CHOOH} \end{array} $	Phosphatidylinositol	PI
$-\text{CH}_2\text{CH}(\text{COO})\text{NH}_3^+$	Phosphatidylsérine	PS
$-\text{CH}_2\text{CHOH-CH}_2\text{OH}$	phosphatidylglycérol	PG

Tableau 1: Nomenclature des phospholipides suivant la tête polaire

1.1.1.2 Dynamique et fluidité

Dans le vivant, les deux feuillets constitutifs des membranes sont asymétriques et il a été montré qu'il existait des échanges de lipides entre ces deux hémimembranes.

La phase lipidique des membranes biologiques est fluide dans les conditions physiologiques et permet donc le déplacement des constituants. Les lipides peuvent se déplacer soit par une simple rotation sur eux-mêmes, soit par diffusion latérale dans le feuillet dont ils font partie, soit beaucoup plus rarement, en changement de feuillet (*principe du flip-flop*). Une enzyme, la flipase, est en générale requise pour permettre le changement de feuillet.

L'amplitude de ces mouvements dépend à la fois de la température et de la concentration lipidique elle-même. La fluidité est facilitée par une augmentation de la température et par la présence d'insaturations dans les queues hydrophobes des phospholipides, et ralentie par la présence de chaînes saturées ainsi qu'une forte proportion de cholestérol. En effet, la présence

d'insaturations induit un encombrement stérique plus volumineux de la chaîne carbonée. Cette géométrie engendre un désordre plus important dans l'agencement des lipides dans la bicouche, ce qui se traduit finalement par une plus grande fluidité de celle-ci.

Les mouvements dans le plan de la membrane concernent les protéines et les lipides. Ils sont rendus possibles par l'agitation moléculaire, et, surtout, par le fait que les interactions entre molécules de la membrane sont des interactions faibles. Tous les facteurs modifiant les interactions faibles entre constituants de la membrane pourront influencer sa fluidité. La mobilité des phospholipides est donc un facteur important qui conditionne de nombreuses fonctions biologiques.

La grande variété de lipides et de protéines au sein d'une même cellule en fait un système complexe fortement inhomogène. Les membranes sont ainsi caractérisées par des hétérogénéités de distribution et d'état de phase.

La nature des protéines membranaires insérées dans la membrane varie en fonction du type cellulaire et de la localisation subcellulaire. Certaines de ces protéines se lient seulement à la surface tandis que d'autres sont transmembranaires : une région est insérée dans la membrane, le reste dépasse d'un côté ou des deux côtés de la membrane. Les domaines protéiques du côté extracellulaire sont liés à la signalisation entre les cellules. Les domaines enfouis dans la membrane forment des canaux et de pores, qui permettent le transport des molécules ou d'ions à travers la membrane. Les domaines du côté cytosolique ont un large éventail de fonctions qui vont de l'ancrage des protéines du cytosquelette au déclenchement des voies de signalisation intracellulaires.

La complexité des membranes biologiques et leurs interactions avec les composants intra et extracellulaires rendent les investigations directes difficiles. Les nombreux modèles de membranes artificielles développées ont joué un rôle important dans la compréhension de leurs caractéristiques chimiques et fonctionnelles.

1.1.2 Les différents modèles de membranes artificielles

Les bicouches lipidiques ont souvent été étudiées comme modèle de système à deux dimensions dans le domaine de la matière molle. A cause de leur analogie structurale avec les membranes biologiques, elles sont de plus en plus utilisées en biophysique, par exemple pour étudier les interactions membrane/membrane ou membrane/protéine. Elles sont aussi un milieu logiquement pressenti pour des applications biotechnologiques de type bio-senseur. Le fait de les adsorber sur un support rend leur étude plus facile mais implique de prendre en

compte les modifications de comportement induites par les interactions support/bicouche. Ces interactions sont potentiellement intéressantes puisqu'elles peuvent permettre à la fois d'exacerber l'influence de certains paramètres pour en mieux comprendre l'effet et à la fois de choisir certaines conditions afin de sélectionner une (des) propriété(s) particulières en vue d'une application donnée.

De la caractéristique amphiphile commune à tous les lipides membranaires découle la cohésion des membranes cellulaires : les lipides s'agrègent de façon à confiner leurs chaînes hydrophobes tout en laissant exposées leurs têtes polaires au contact du milieu aqueux intra ou extracellulaire.

Les lipides peuvent donc, dans certaines conditions, s'organiser en structures sphériques, monocouches (les micelles), si leur molécule comprend une seule molécule d'acide gras. La morphologie des phases formées dépend de plusieurs paramètres dont la concentration, la température, mais aussi la forme géométrique des molécules. Ainsi, les glycérophospholipides comportent deux queues hydrophobes et forment des bicouches planes ou sphériques.

Cependant, les interactions des lipides amphiphiles en milieu aqueux conduisent à un auto-assemblage supramoléculaire spontané des lipides en structures diverses. Les chaînes d'acides gras sont au centre pour minimiser leur contact avec l'eau, les parties polaires sont en périphérie, en contact avec l'eau. Cette auto-organisation est guidée par des forces principales : d'une part l'effet hydrophobe, qui tend à associer les chaînes carbonées et d'autre part les répulsions entre les têtes polaires, d'origine stérique et/ou électrostatique. Le rapport entre ces forces en compétition détermine l'aire par tête optimale a_0 des molécules. *J.Israelachvili*¹² a montré que la structure adoptée ne dépend alors que du paramètre suivant :

$$\chi = \frac{v}{a_0 \times l_c} \quad (v : \text{volume de la partie hydrophobe, } l_c : \text{la longueur de la (des chaîne(s) carbonée(s))})$$

La **Figure 2** montre les différents types d'organisation possible des molécules amphiphiles en solution qui ont toutes en commun la mise en contact des parties hydrophiles avec l'eau et le masquage des parties hydrophobes.

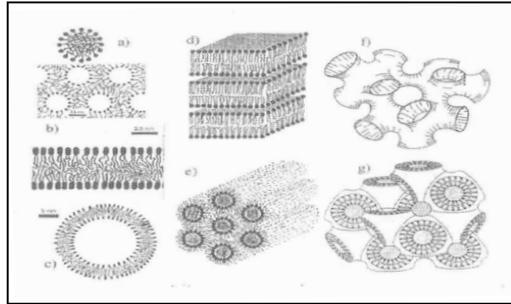


Figure 2: a) micelles et micelles inverse, b) bicouche, c) liposome, d) phase lamellaire, e) phase hexagonale inverse (micelles cylindriques inverses), f) phase éponge, g) phase cubique inverse bicontinue.^{13,14}

Deux types de systèmes sont principalement utilisés : les liposomes (ou vésicules) et les bicouches planes (**Figure 3**) :

- a) Les liposomes sont des vésicules sphériques de quelques dizaines de milliers de nanomètres de diamètre. Ces vésicules sont composées d'une ou plusieurs bicouches lipidiques qui permettent de séparer un milieu intravésiculaire d'un milieu extérieur. On distingue deux grandes catégories de vésicules¹⁵ (**Figure 4**) : les vésicules multilamellaires (MLV) qui ont une paroi formée d'un grand nombre de bicouches empilées, et les vésicules unilamellaires (UV) qui sont formées d'une seule et unique bicouche refermée sur elle-même. Ces dernières sont classifiées en fonction de leur taille : les SUV (Small Unilamellar Vesicles) de diamètre < 200 nm ; les LUV (Large Unilamellar Vesicles) de 200 à 1000 nm ; alors que les GUV (Giant Unilamellar Vesicles) ont une taille supérieure au μm , pouvant aller jusqu'à quelques dixièmes de mm.
- b) Les bicouches lipidiques, supportées ou auto-supportée (suspendues entre 2 points), sont des systèmes biomimétiques à deux dimensions facilement accessibles à des techniques de caractérisation de surface du fait de leur localisation dans l'espace¹⁶⁻¹⁸. L'épaisseur de la bicouche varie entre 4 et 7 nm suivant les lipides qui la constituent. Depuis les travaux de McConnel et coll.¹⁹, les membranes supportées ont été de plus en plus utilisées pour étudier les processus membranaires d'adhésion et d'interaction cellulaire²⁰⁻²² et pour le développement de nouvelles surfaces biofonctionnalisées.

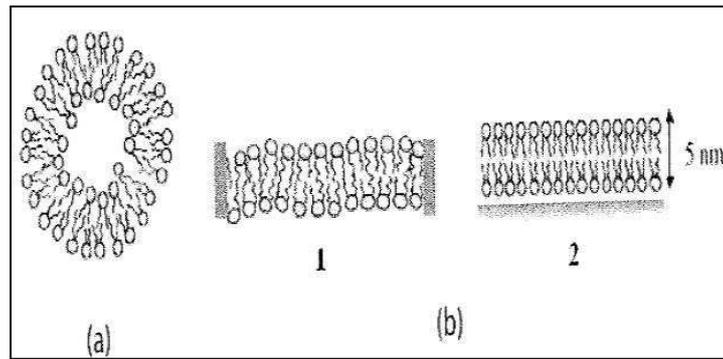


Figure 3: Principaux systèmes modèles pour étudier la bicouche lipidique :
 (a) liposome (ou vésicule) et (b) bicouches planes [*1-bicouche auto-supportée ; 2-bicouche supporté*]

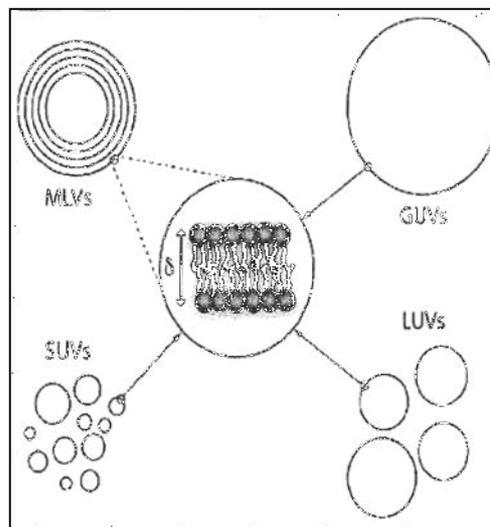


Figure 4 : Les différents types de vésicules ($\delta \sim 5\text{nm}$)

La fusion des vésicules est une manière simple de former des membranes supportées. Les vésicules diffusent en solution et viennent s'adsorber à la surface du support. Leur déformation due aux interactions entre les vésicules et le support induit leur éclatement et la création de domaines à la surface du support (**Figure 5**). Ces interactions sont liées à la nature du support (charge, structure, rugosité) et à la nature des vésicules lipidiques (composition, charge, taille et état physique) aussi bien qu'à l'environnement aqueux dans lequel ils se trouvent (pH et force ionique).

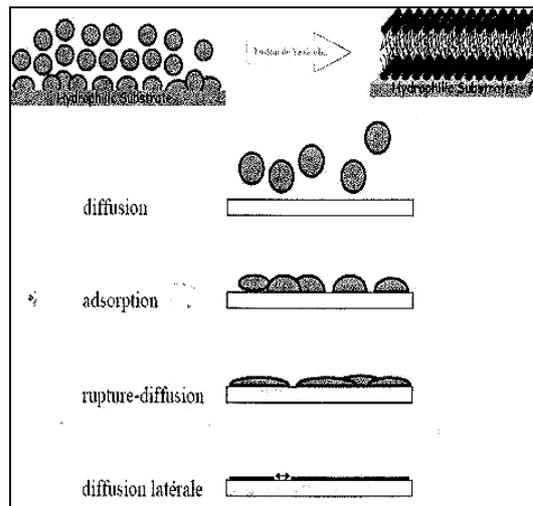


Figure 5 : Représentation du processus de fusion de vésicules sur un support solide²³

La deuxième méthode qui permet la fabrication contrôlée de bicouches supportées est l'utilisation de la balance à film de Langmuir. En 1920, Irving Langmuir introduit la technique du transfert d'une monocouche de molécules amphiphiles sur un support solide en remontant lentement le support hydrophile à travers la monocouche à l'interface eau-air. En effet, l'adsorption de molécules amphiphiles à la surface de l'eau donne naissance à un film monomoléculaire, qui a pour effet d'abaisser la tension de surface et de stabiliser l'interface (Figure 6).

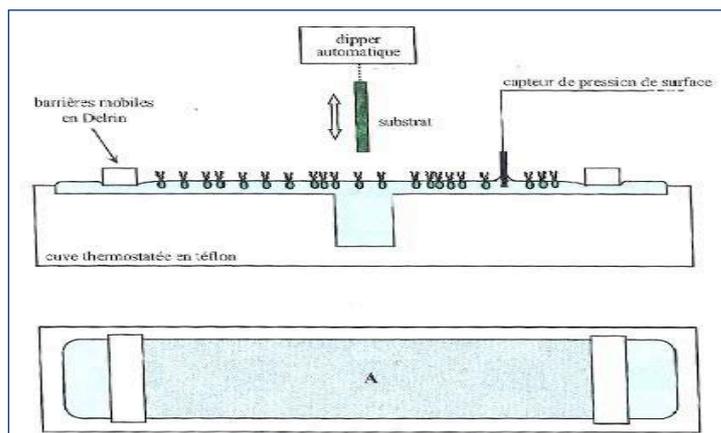


Figure 6: Illustration de la Balance à film de Langmuir (KSV Minitrough). Les molécules tensio-actives occupent une aire A délimitée par des barrières mobiles.

Au début des années 30, Katharine Blodgett réussira le transfert de monocouches successives sur des supports en verre. L'avantage de cette méthode de déposition est de permettre le

contrôle de l'organisation et de l'arrangement du film à l'échelle moléculaire, donnant aussi accès à l'étude de sa structure et de ses transitions de phases.

1.1.3 Tension de surface dans les membranes

A l'intérieur d'une phase condensée, les interactions entre atomes ou molécules sont des interactions à courte portée. Une molécule placée dans une phase volumique interagit avec tous ses voisins avec une énergie de cohésion négative. Par contre, les molécules au voisinage de la surface n'interagiront pas de la même façon avec les molécules situées de l'autre côté de la surface et auront donc une énergie différente. Le système va donc chercher à minimiser son énergie interfaciale. Ainsi un lipide libre, à l'équilibre, adoptera la forme d'une sphère.

Pour augmenter l'aire du système, il faut lui fournir de l'énergie. Cette énergie vient des liaisons moléculaires ou atomiques qu'il a fallu briser pour amener des molécules du volume vers la surface. Pour accroître l'aire du système (membrane par exemple) de dA , le travail à fournir au système s'exprime :

$$\delta W = \gamma_0 dA$$

où γ_0 désigne la tension de surface (en N/m) et correspond à une force de rappel par unité de longueur. On peut également dire qu'elle est une mesure de l'énergie de cohésion à une interface. L'unité employée est le milliNewton par mètre (mN/m) mais on peut parfois l'exprimer en dyne par centimètre (dyn/cm).

Les liquides polaires comme l'eau ont des interactions moléculaires très fortes et donc une tension de surface élevée. On comprend donc aisément que tout facteur diminuant ces fortes interactions aura pour conséquence de diminuer la tension de surface. C'est le cas des molécules amphiphiles qui s'organisent spontanément à l'interface eau-air, ce qui amène parfois à les appeler tensioactifs ou surfactants.

Théoriquement, une membrane 'au repos' a donc une tension de surface nulle alors qu'une monocouche n'est à l'équilibre que si on lui applique une pression de surface externe²⁴. Il a d'ailleurs été montré qu'une monocouche de Langmuir de DMPC (1,2-Dimyristoil-sn-Glycéro-3-Phosphocoline) comprimée à 31,5 mN/m était dans un état équivalent à celui d'une bicouche composée du même phospholipide (sa pression effective étant de 30.5 mN/m, le petit écart provenant du couplage monocouche-monocouche à l'intérieur de la bicouche)²⁵.

De même, Blume²⁶ a établi une comparaison des caractéristiques des deux systèmes sur les transitions de phase gel/fluide et fluide-condensé/fluide-expansé. Il ressort de son étude que le

comportement de la bicouche est fortement similaire à celui de la monocouche respective comprimée à 30 mN/m.

1.1.4 Transition de phase dans les membranes

Lors de la reconstitution de membranes phospholipidiques *in vitro*, les différents états thermodynamiques des membranes ont pu être mis en évidence. En fonction de la température, on distingue plusieurs phases^{27,28} (Figure 7) :

- une phase cristalline L_c , à très basse température. Les molécules sont dans un état ordonné. La diffusion transversale des lipides y est quasi inexistante.
- une phase gel L_β . Les interactions de Van der Waals entre les chaînes d'acides gras sont optimisées et la diffusion translationnelle est très faible.
- Une phase fluide L_α à plus haute température. La structure est bidimensionnellement fluide, le niveau d'entropie des chaînes d'acides gras et de diffusion translationnelle est élevé²⁹.

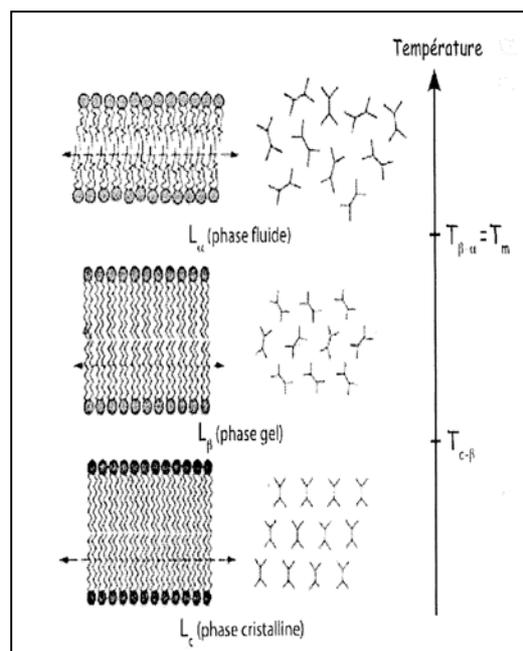


Figure 7: Représentation des différentes phases d'une bicouche lipidique.

La température de transition entre la phase gel L_β et la phase fluide L_α est appelée température de transition principale gel-fluide (notée T_m pour melting Temperature). Elle est définie comme étant la température pour laquelle les variations d'enthalpie contrebalancent le gain d'entropie généré principalement par le désordre des chaînes ($\Delta H = T_m \times \Delta S$). Elle rend compte de la quantité d'énergie qu'il a fallu fournir pour rompre la haute cohésion moléculaire caractéristique d'un système membranaire dans un état ordonné. Cette cohésion

est assurée par des liaisons de faible énergie tant au niveau des chaînes hydrophobes (liaisons de Van de Waals) que des parties polaires (liaisons hydrogènes, attractions électrostatiques).

La transition principale est une transition du premier ordre et est associée à la transition des chaînes carbonées d'un état *trans* (par rapport à la liaison C-C). La configuration *trans* va créer une structure plus étendue par rapport à la liaison *cis* qui formera un coude.

La température de transition T_m varie en fonction de la longueur et du degré d'insaturation des chaînes d'acide gras, ainsi que la nature du groupement polaire. Pour les lipides ayant une même tête polaire, T_m augmente avec la longueur des chaînes (le nombre de carbones) car les interactions de Van der Waals augmentent. La variation de T_m en fonction de la longueur de chaîne augmente avec le même incrément pour les phosphatidylcholines et les phosphatidyléthanolamines, montrant bien que la transition en température est principalement déterminée par la cohésion des chaînes hydrocarbonées. La présence d'insaturations, qui défavorise les interactions entre chaînes, va au contraire abaisser T_m . Pour les mélanges de lipides miscibles, la température de transition du système sera intermédiaire entre celles des lipides purs³⁰.

Certains lipides possèdent une phase intermédiaire entre les phases gel et fluide, nommée phase *ripple* P_β ^{31,32}. Cette prétransition est liée à la formation d'ondulations périodiques à la surface membranaire.

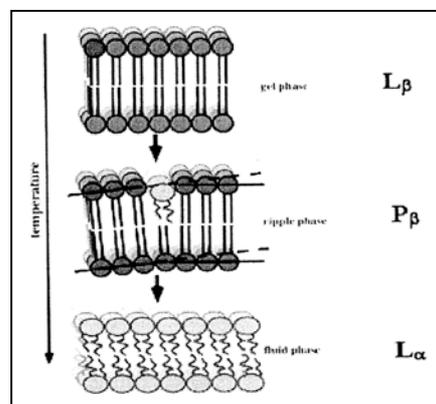


Figure 8: Représentation de la phase *ripple*, d'après Heimbourg et coll.³².

Cette phase *ripple* a été observée sur des bicouches libres mais jamais sur des bicouches supportées. Cette phase et son existence seront détaillées dans le chapitre III.

1.2 Les bicouches phospholipidiques supportées, un système modèle : comment les fabriquer ?

1.2.1 Fusion des vésicules

Une des manières les plus simples et rapides pour former des membranes supportées est l'adsorption des vésicules phospholipidiques sur une surface et consécutivement leur transformation en bicouche plane. Pour que la fusion se produise, il faut que l'interaction entre les lipides soit la plus faible possible, ce qui signifie qu'ils doivent se trouver à l'état fluide. Expérimentalement, cela se traduit par le fait que la température à laquelle se fait la fusion doit être supérieure à la température de transition principale gel/fluide du lipide considéré. De nombreuses études théoriques et expérimentales ont permis de comprendre et donc de mieux contrôler la cinétique et les propriétés de formation des bicouches supportées³³⁻³⁷.

Plusieurs processus peuvent se produire lorsqu'un liposome rencontre une surface^{36,38,39}. Adsorbés à la surface, les liposomes se déforment et lorsque cette déformation est suffisante, ils peuvent se rompre et se transformer en bicouche lipidique ayant la forme d'un disque. Parallèlement, les vésicules voisines peuvent interagir entre elles et fusionner avant de se rompre sous forme de domaines (disques lipidiques). Ces domaines coalescent et peuvent induire la fusion d'autres vésicules adsorbées. Le type de comportement observé, adhésion des vésicules intactes ou éclatement sur la surface, dépend de l'énergie d'interaction entre les lipides et le support. La contribution de ces interactions est liée à la nature du support (charge, structure, rugosité) et aux vésicules lipidiques (composition, charge, taille, état physique) aussi bien qu'à l'environnement aqueux dans lequel ils se trouvent (pH et force ionique).

La cinétique et le mécanisme de formation des bicouches lipidiques supportées par fusion de vésicules a été étudié en utilisant des techniques telles que la microbalance à cristal de quartz (QCM-D)⁴⁰, la résonance de plasmons de surface⁴¹, la réflectivité de neutrons⁴², la microscopie à force atomique^{36,37}, la spectroscopie de corrélation de fluorescence et l'ellipsométrie⁴³.

Keller et coll.^{40,44} ont tenté d'élucider le mécanisme d'interaction entre les liposomes et des supports solides par le biais de l'utilisation de la microbalance à cristal de quartz (QCM-D) qui permet de suivre en temps réel l'adsorption, la fusion et la rupture des vésicules sur différents types de surfaces. Des liposomes cationiques (DOTAP) exposés à une surface de silice (chargée négativement) s'adsorbent puis se rompent individuellement jusqu'à ce que le support soit entièrement recouvert d'une bicouche. A l'inverse, des liposomes chargés

négativement (DOPS) ne s'adsorbent pas. En revanche, pour des liposomes ayant charge moyenne neutre, un taux de couverture critique est nécessaire avant d'amorcer la transformation des liposomes adsorbés en bicouche continue. A l'issue de leurs investigations, ils ont conclu que les vésicules s'adsorbaient irréversiblement sur du SiO₂, Si₃N₄, TiO₂, Pt oxydé et Au oxydé, mais que le passage des vésicules à la bicouche ne se faisait pas que pour les deux premières surfaces après avoir atteint un taux de couverture critique, alors que dans les autres cas, les vésicules restaient intacts mais déformées.

Les différentes étapes de ce processus sont expliquées et résumées dans la **Figure 9**. Premièrement, les vésicules en solution diffusent à la surface du support. L'adsorption des vésicules à la surface se fait jusqu'à atteindre une concentration critique et la déformation, due aux interactions stériques entre les vésicules, induit l'augmentation de la tension latérale dans la membrane⁴⁵. Pour une tension latérale largement élevée, la formation d'un pore va induire une diminution de l'énergie de la vésicule et le rayon du pore va s'agrandir afin que la tension diminue suffisamment ce qui induit l'équilibre de la vésicule.

En effet, l'énergie d'un pore est donnée par :

$$F_{\text{pore}} = 2\pi L \sum_e - \pi L^2 \sum$$

avec : L : rayon du pore
 \sum_e : tension de ligne due aux effets hydrophobes
 \sum : tension latérale dans la membrane

L'équilibre est atteint lorsque $dF_{\text{pore}} / dL = 0$ d'où $\sum = \sum_e / L$

Cette équation (en bleu) traduit bien que l'augmentation de L induit une diminution de \sum .

Les domaines de vésicules éclatées vont ensuite diffuser à la surface pour donner une bicouche quasi sans défauts :

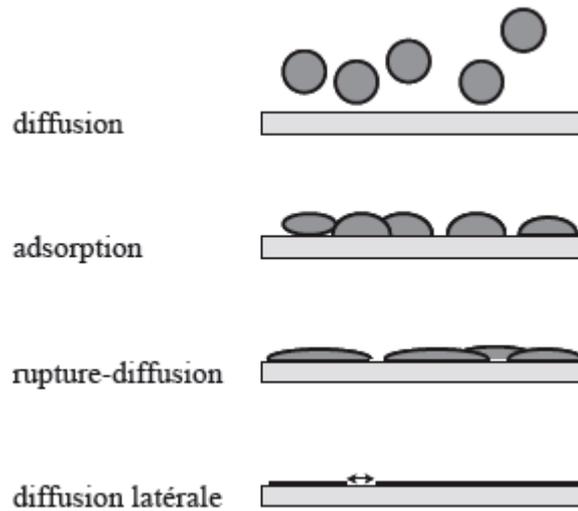


Figure 9: Représentation du processus de fusion des vésicules sur un support solide. D'après Stroumpouli et coll²³

Lors du processus de fusion, la surface interne de la vésicule devient la monocouche proximale de la bicouche supportée.

La fusion des vésicules est une technique flexible permettant des dépôts aussi bien sur des surfaces planes que texturées.

1.2.2 La balance de Langmuir

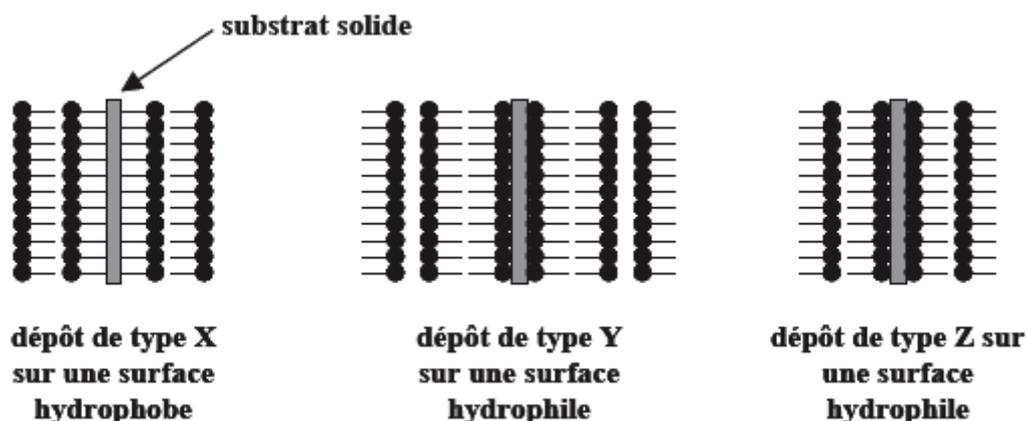
Les films de Langmuir-Blodgett sont constitués de couches de Langmuir monomoléculaires empilées les unes sur les autres à la surface d'un support solide.

C'est en 1920 qu'Irving Langmuir introduit la technique du transfert d'une monocouche de molécules amphiphiles sur un support solide en descendant lentement le support hydrophile à travers la monocouche à l'interface air-eau. Ce n'est que quelques années plus tard, au début des années 30, que Katharine Blodgett avait réussi le transfert de monocouches successives sur des supports en verre. La technique utilisée à cette époque n'a pas trop changé, des améliorations au niveau technique ont certes été apportées, mais le principe est resté le même.

Les mesures de pression de surface en fonction de l'aire moléculaire à température constante (isothermes de compression) peuvent être considérées comme étant l'équivalent à deux dimensions des isothermes pression-volume. Couplée à des techniques telles que la microscopie à angle de Brewster (BAM) et la diffraction de rayons X, plusieurs informations

sur la structure des phases bidimensionnelles aussi bien que les transitions de phase ont pu être mises à jour^{46,47}.

Plusieurs types de dépôts peuvent se faire mais cela dépend de la nature du support et des molécules tensioactives :



Cette méthode présente l'avantage du contrôle de l'organisation et de l'arrangement du film à l'échelle moléculaire, entraînant ainsi l'accès à l'étude de la structure et des transitions de phase.

Cette méthode apparemment simple, le dépôt de monocouche et/ou de multicouches par cette technique nécessite plusieurs conditions. Les facteurs en question relèvent des interactions lipide-support, englobant les caractéristiques de la monocouche (sa composition, le nombre de phases...et tous les autres aspects définissant son équilibre), du support (nature chimique, rugosité) et de la sous-phase aqueuse (température, présence de sels).

Le transfert de la première monocouche reste une opération réussie dans presque tous les cas alors que le transfert de la seconde relève d'un 'challenge'. Obsorn et coll.⁴⁸ ont étudié les transferts de phospholipides sur du silicium, et plus particulièrement le transfert de deux monocouches de type Y. Ils ont montré que le dépôt d'une seconde monocouche n'était possible que dans une certaine gamme de pression (en général supérieure à 42 mN/m), alors que pour des pressions inférieures, la seconde couche est partiellement formée où la première déjà déposée est ré-entraînée à la surface.

De plus, pendant le transfert, la charge de surface du support peut conduire à un phénomène de condensation de la monocouche dans un autre état que celui où elle était à la surface de la cuve^{49,50}.

Cette technique est bien adaptée pour élaborer des films constitués de plusieurs couches bien organisées, de nature différente, en particulier avec les acides gras. Cependant, elle présente quelques inconvénients :

- il est difficile de déposer des monocouches qui ne se trouvent pas en phase «condensée », les films devant présenter une rigidité suffisante.
- les films très « rigides » subissent des contraintes importantes (notamment de cisaillement) qui peuvent modifier leur structure lors des transferts.

D'autres techniques sont alors exploitables suivant les systèmes que l'on souhaite obtenir, notamment la technique de Langmuir-Schaeffer (dépôt avec le support à l'horizontale) ou bien les films auto-assemblés, ces derniers donnant des films plus résistants avec une meilleure stabilité thermique. Cependant, ils présentent une organisation moléculaire plus difficilement modulable que les films obtenus par la technique de Langmuir-Blodgett.

1.3 Dynamique des systèmes étudiés

1.3.1 Techniques de mesure utilisées

L'étude de la diffusion utilise couramment des montages de microscopie optique, le plus souvent de fluorescence, mais d'autres méthodes ont été développées :

- la résonance magnétique nucléaire utilisant des gradients de champ pulsés (NMR : Nuclear Magnetic Resonance)^{51,52}
- la diffraction de neutrons (technique intéressante et lourde)^{53,54}
- le retour de fluorescence après photoblanchiment (FRAP : Fluorescence Recovery After Photobleaching) permet de mesurer la diffusion translationnelle des molécules⁵⁵. Elle peut être mise en oeuvre *via* un simple faisceau laser (FRAP spot⁵⁶⁻⁵⁸) ou par formation d'un réseau d'interférences lumineuses dont la largeur peut être variée (FRAP_{patternedP})⁵⁶⁻⁵⁹. Les principes de cette dernière seront développés dans la partie expérimentale.
- la spectroscopie de corrélation de fluorescence (FCS : Fluorescence Correlation Spectroscopy)^{60,61}. C'est une méthode d'étude des fluctuations de fluorescence produites par un petit nombre de molécules entrant et sortant d'un volume d'observation d'une fraction de femtolitre, défini par un faisceau laser focalisé. Le temps de diffusion τ_d d'une espèce moléculaire est déduit de la fonction d'auto-

corrélation temporelle $g(\tau) = [I(t)I(t+\tau)] / [I(t)^2]$, où $I(t)$ est l'intensité de fluorescence. Dans le cas simple d'une diffusion brownienne libre, $g(\tau) = 1 + [1/N*(1/1 + \tau/\tau_d)]$, où N est le nombre moyen de molécules dans la surface d'observation. τ_d est relié au rayon transversal w du faisceau laser focalisé et à la constante de diffusion D par $\tau_d = w^2/(4D)$.

- le suivi de particules uniques (SPT : Single Particle Tracking, ou SMT : Single Molecule Tracking). Cette technique relativement récente permet le suivi du déplacement de molécules individuelles par vidéomicroscopie couplée à l'analyse d'images. Les sondes utilisées sont soit des particules submicrométriques (particules de latex, nanocristaux ou colloïdes d'or, couplés à la molécule d'intérêt par un anticorps), et on parle alors de suivi de particule unique ou SPT^{4,62}, soit des molécules fluorescentes (suivi de molécule unique ou SMT^{61,63}). La résolution spatiale est de l'ordre du nanomètre et la résolution temporelle, généralement imposée par la cadence vidéo, peut atteindre la centaine d'Hertz (Hz). A partir des trajectoires des molécules, le calcul du déplacement quadratique moyen de la position en fonction du temps permet de déterminer les modes de diffusion.

La méthode de FRAP réalise une mesure moyenne sur un grand nombre de molécules. La FCS effectue une mesure moyenne sur un petit nombre de molécules et nécessite de ce fait un certain nombre de répétitions pour obtenir une valeur finale significative. Les SPT et SMT permettent une caractérisation plus fine des sous-populations. A contrario, ces trois dernières techniques autorisent la mise en évidence de phénomènes qui auraient pu être masqués par l'effet de moyenne de la FRAP. Dans certaines situations ce sont donc des techniques complémentaires.

Bien que ces techniques soient sensibles pour des échelles de temps différentes, les coefficients de diffusion obtenus varient considérablement (FRAP et FCS : $D = 4.10^{-8}$ cm²/s alors que par diffraction de neutrons $D = 10^{-7}$ à 4.10^{-6} cm²/s). Un tel écart provient des différents modes de diffusion. Pour des échelles de temps très courtes, on considère que la diffusion est dominée par un mouvement de confinement dans un volume libre défini par les lipides voisins les plus proches alors que la diffusion de l'ordre de la milliseconde ressemble à du mouvement Brownien dans un fluide visqueux.

1.3.2 Dynamique des vésicules libres et des bicouches lipidiques supportées

Les molécules de lipides peuvent diffuser librement dans la bicouche lipidique (**Figure 10**).

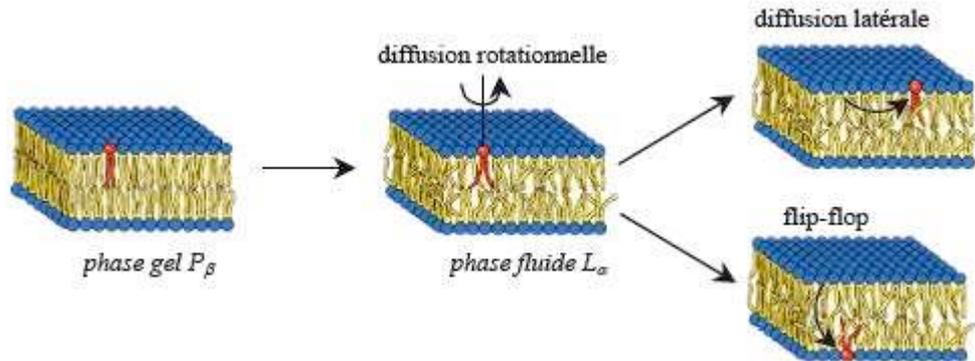


Figure 10: Représentation schématique de la dynamique des lipides au sein des membranes.

De nombreux travaux^{60,64} ont rapporté que les coefficients de diffusion des lipides marqués dans les GUV (l'avantage des GUV est que leur membrane est libre) et dans les bicouches lipidiques supportées par les techniques de FRAP et de FCS étaient comparables. Plus récemment, une étude par FCS⁶⁵ a montré que la diffusion dans les GUV était deux fois plus rapide que dans les bicouches lipidiques supportées dans les mêmes conditions (force ionique, pression osmotique).

Forstnerb et coll.⁶⁶ ont étudié par SPT la diffusion brownienne des monocouches de Langmuir en phase fluide. Ils ont pu calculer un coefficient de diffusion moyen de l'ordre de $1.1 \pm 0.2 \times 10^{-8} \text{ cm}^2/\text{s}$ pour des monocouches comprimées de 5 à 35 mN/m.

Malgré la présence d'un film d'eau entre la bicouche et le support qui permet de conserver une certaine fluidité, les conséquences de la proximité du support sur la diffusion et la réorganisation des molécules restent activement discutées^{52,67}.

Quelques exemples sont fournis dans le **Tableau 2**.

lipides	système	T °C	D × 10 ⁸ (cm ² /s)
POPC (T _m = 5°C)	multicouches	20	3.4 ± 0.3
DLPC (T _m = -2°C)	multicouches	20	4.6 ± 0.3
DPPC (T _m = 41°C)	MLV	< T _m	0.4 × 10 ⁻²
DPPC	MLV	> T _m	1
DMPC (T _m = 24°C)	MLV	< T _m	1 × 10 ⁻²
DMPC	MLV	> T _m	1.6
DMPC	bicouche sur silicium	20	0.66
DMPC	bicouche sur silicium	30	3.7

Tableau 2 : Exemples de coefficients de diffusion latérale mesurés dans différents systèmes en utilisant le FRAP en spot.

1.3.3 Diffusion transversale

La diffusion transversale est associée au passage d'un lipide d'une monocouche à l'autre. Cette diffusion transversale est également appelée « flip-flop » (**Figure 10**). C'est un processus lent et peu fréquent car il implique de faire passer la tête polaire d'une molécule lipidique à l'intérieur de la zone hydrophobe constituée par les queues des autres molécules. Le temps associé à ce processus est généralement admis comme étant de l'ordre de l'heure voire du jour suivant la nature du phospholipide (les phospholipides ayant au moins une chaîne insaturée ont un temps de flip-flop plus rapide)⁶⁸. Dans les membranes biologiques, le passage d'un feuillet à l'autre a effectivement lieu et est en général associé à des protéines membranaires telles que les flipases⁶⁹.

En utilisant la spectroscopie vibrationnelle par génération des fréquences sommes (SFVS), Liu et coll.⁷⁰ ont mesuré directement les temps de diffusion transverse dans des bicouches phospholipidiques supportées. Les demi-temps de flip-flop vont d'environ 8.4 à 1.3 minutes entre 12.1 et 20.4 °C respectivement pour le DMPC, et de 59.8 à 9.2 minutes entre 30.5 et 36.6 °C pour le DPPC, ceci pour des bicouches déposées à une pression de surface de 30 mN/m, et en dessous de leur transition de phase. Il est communément admis que la tension de surface dans une membrane fluide varie entre 30 et 35 mN/m²⁴. La tension de surface pouvant affecter la dynamique du flip-flop, Liu et coll., suggèrent que la dynamique du flip-flop sera augmentée d'un facteur 1.3 pour une tension de surface réduite de 10 mN/m. Ce qui appelle à penser que cette dynamique est plus lente pour des pressions de dépôts supérieures. Ils ont également montré que l'addition de marqueurs altèrerait significativement ces taux d'échange.

La cinétique du flip-flop est également fortement dépendante de l'état dans lequel se trouve le système et est fortement augmentée au delà de la température de transition principale gel-fluide⁷¹.

1.4 Transitions de phase dans les bicouches lipidiques supportées

Bien qu'il ait déjà été mis en évidence une influence de la proximité du support sur la mobilité et la transition gel-fluide, ces points restent cependant sujets à de nombreuses controverses.

1.4.1 Bicouche formées par fusion des vésicules

Ces travaux concernent ceux de Xie et coll.⁷², Keller et coll.⁴⁴ et Charrier et coll.⁷³. Ces différentes équipes ont étudié par AFM la/les transitions de phase dans des bicouches de phospholipides zwitterioniques, sur mica.

Les travaux de Xie et coll.⁷² sur des bicouches de DMPC (température de transition gel-fluide = 24°C) ont montré que la transition est fortement affectée par l'état initial de la phase gel qui induit une structure présentant des défauts. En refroidissant leurs échantillons pour passer de la phase fluide à la phase gel, ils ont observé un nouveau type de défaut visible sous forme de trou, qu'ils attribuent à une persistance de la phase fluide (phénomène de « surfusion »). Ces défauts tendent ensuite à disparaître en diminuant encore la température. Lorsque la bicouche amorce sa transition, un ordonnancement des lipides s'effectue et la bicouche « se déchire » en formant des trous. Au cours de la transition, il y a formation de trous dans la bicouche, apparition de la phase gel, ordonnée, mais aussi une région ayant une hauteur intermédiaire entre celle des trous et celle de la phase gel. Ils attribuent cette région intermédiaire à une phase désordonnée mobile dont la densité a été réduite pendant le déchirement. Leurs expériences révèlent le lent équilibrage de la transition gel-fluide (thermodynamiquement du premier ordre, transition classique de Van't Hoff).

Keller et coll.⁴⁴ quant à eux ont mis en évidence une transition de phase découplée sur le système 80 % mol DPPC et 20 % mol SOPC. Le mélange utilisé forme une structure

granulaire sur le mica et il est aisé d'observer la transition gel-fluide qui s'amorce initialement au niveau des joints de grains. Le milieu utilisé est de l'eau déionisée. Il en va de même pour la transition inverse. La structure des grains est identique dans les deux feuillets de la bicouche. Au cours du chauffage, le changement de phase de la monocouche « proximale » (la plus proche du support) commence une fois que la monocouche « distale » (la plus éloignée) a complètement terminé sa transition. Le support en mica « stabilise » la phase gel de la monocouche proximale, via des interactions fortes. La différence de température de transition entre le premier et le second feuillet est de l'ordre de 10°C. Il semble y avoir peu d'effet sur la monocouche distale.

D'autre part les travaux de Xie et coll., font état d'un rôle important du sel. En effet, la présence de sel écranterait les charges locales présentes à la surface. C'est ce qui pourrait expliquer les résultats de Xie et coll., alors que dans le cas de l'eau, c'est la charge du support qui se fait fortement ressentir sur la transition.

Charrier et coll.⁷³ attribuent le découplage des feuillets à l'interaction privilégiée entre le feuillet proximal et le support. Le décalage de la température de transition est interprété comme étant la résultante d'une transition effectuée à surface constante plutôt qu'à tension de surface constante. En effet, dans leurs conditions, le gain de surface nécessaire pour que la transition s'effectue à tension de surface constante est estimé à 12 % alors que la seule surface disponible est celle des trous, estimée à 2 %.

1.4.2 Bicouches formées par la technique de Langmuir Blodgett ou Langmuir Schaeffer

Les premières expériences effectuées sur les transitions de phase par FRAP en frange (réseau Ronchi : une seule largeur de frange, non précisée dans l'article) ont été réalisées par Tamm et coll. en 1985⁵⁹. Outre la transition de phase abrupte observée sur des bicouches supportées de DMPC sur des *wafers* de silicium, ils ont également montré, en marquant alternativement chaque feuillet de la bicouche, grâce à la technique de Langmuir- Blodgett/Langmuir-Schaeffer, que les deux feuillets avaient la même dynamique et que l'ajout d'ions mono ou divalents avait peu ou pas d'effet (36 mN/m dans de l'eau déionisée). On notera toutefois les concentrations élevées en marqueurs fluorescents (2 et 4 mol %) et la possibilité d'un biais dans les mesures compte-tenu du temps de flip-flop relativement court de leur système comparé au temps nécessaire pour effectuer une mesure.

La diffusion mesurée par FRAP à l'état fluide dans des multicouches de DMPC apparaît relativement insensible à la nature du marqueur fluorescent, à sa position sur le lipide ou

encore à sa longueur de chaîne. Les énergies d'activation pour la diffusion latérale sont de l'ordre de 43.7 kJ/mol.

1.4.3 Transition principale dans les membranes libres

Lorsqu'une bicouche est refroidie en dessous d'une température de transition caractéristique, elle subit une sorte de changement de phase, appelé transition ordre-désordre, au cours de laquelle elle prend une consistance solide de type gel (**Figure 11**) ; autrement dit, elle perd son caractère fluide. En dessous de la température de transition, la bande de 4.6 Å détectée par diffraction des rayons X, caractéristique de l'espacement entre les chaînes d'hydrocarbures dans une bicouche de cristal liquide, est remplacée par une bande étroite de 4.2 Å identique à celle trouvée avec les paraffines cristallisées. Cela indique que les chaînes hydrocarbonées d'une bicouche sont en pleine extension et compactées selon un arrangement hexagonal comme dans les paraffines cristallisées.

La température de transition d'une bicouche augmente avec la longueur de la chaîne et avec le degré de saturation des résidus d'acides gras qui la composent pour les mêmes raisons qui font que les températures de fusion des acides gras augmentent avec ces facteurs. Les températures de transition de la plupart des membranes biologiques se situent entre 10 et 40°C. La fluidité des membranes biologiques est l'une de leurs propriétés physiologiques importantes car elle permet aux protéines qui s'y trouvent insérées d'interagir. Les températures de transition des membranes de mammifères sont bien en dessous de la température du corps et, par conséquent, ces membranes ont toutes un caractère fluide.

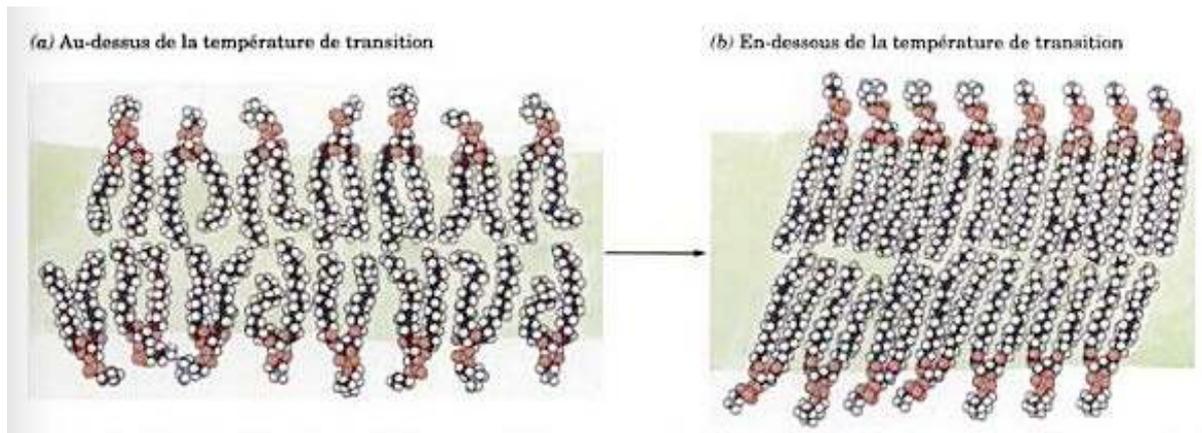


Figure 11 : Structure d'une bicouche lipidique composée de PC et de PE. (a) Au-dessus de la température de transition, les molécules lipidiques dans leur ensemble, ainsi que leurs queues non polaires, sont très mobiles dans le plan de la bicouche. Un tel état de la matière, ordonnée dans certaines directions mais non d'autres, est appelé cristal liquide. (b) En dessous de la température de transition, les molécules lipidiques sont beaucoup mieux ordonnées pour donner un solide de type gel. [D'après Robertson, R.N., *The Lively Membranes*, pp. 69-70. Cambridge University Press (1983)].

La transition principale dans les membranes libres a été mesurée dans des multicouches et des LUV de DMPC et de DPPC⁵⁹. La **Figure 12** représente l'évolution du coefficient de diffusion mesuré par FRAP « en spot » en fonction de la température. La dynamique des deux phospholipides augmente d'un facteur 100 de la phase gel à la phase fluide, avec une diffusion lente en dessous de T_m de l'ordre de 10^{-10} cm²/s.

En 1977, Wu et coll.⁷⁴ ont effectué des mesures par FRAP « en spot » de deux sondes différentes sur des multicouches de DMPC et DPPC. En utilisant un taux de marqueur de 1/1000, les coefficients de diffusion mesurés pour le DMPC à 20 et 30°C sont respectivement de 1×10^{-10} et 5.5×10^{-8} cm²/s, et pour le DPPC à 30 et 45°C de 5×10^{-10} et 7×10^{-8} cm²/s. Au-delà de 24°C, pour le DMPC, la faible dépendance de la température sur le coefficient de diffusion est estimée à 1.7×10^{-9} cm²/s/°C. Pour des températures inférieures à 22°C, le coefficient est considéré inférieur à 5×10^{-10} cm²/s. Ils estiment la largeur de la transition des multicouches de DMPC à 2°C (de 22 à 24°C). Concernant le DPPC, la largeur de la transition est de 3°C et a lieu entre 41 et 53°C, la dynamique de la phase fluide est plus rapide que celle du DMPC avec une pente de 2.2×10^{-9} cm²/s/°C.

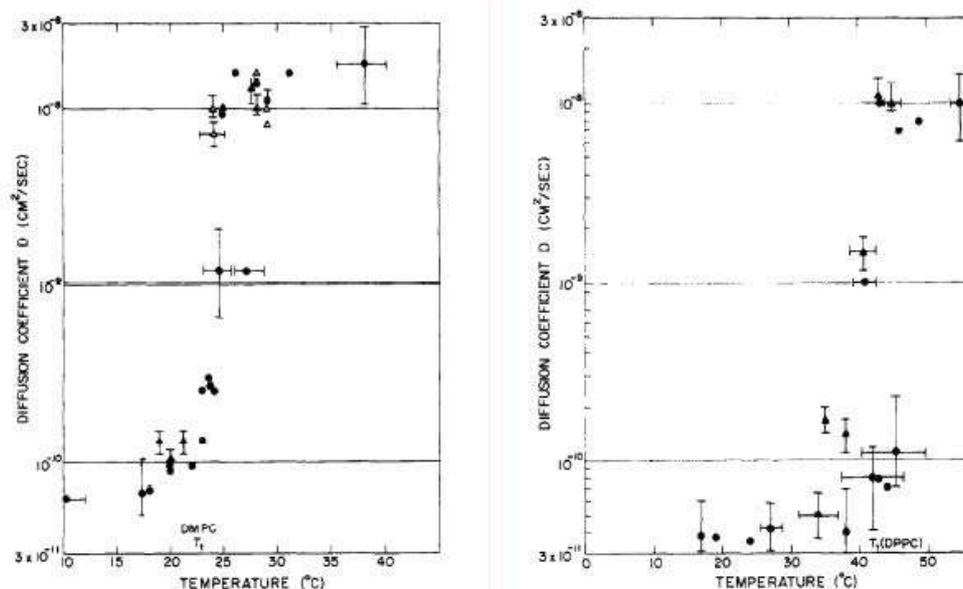


Figure 12 : Dépendance du coefficient de diffusion en fonction de la température du marqueur diI dans les MLV et des LUV de DMPC (figure de gauche) et de DPPC (figure droite).
D'après Wawrezynieck et coll.⁶¹

1.4.4 Effet de la proximité du support : couplage entre les deux feuillets

Bien qu'il ait été montré que les bicouches supportées constituaient des systèmes aux propriétés physiques très similaires à celles des bicouches libres, il subsiste néanmoins quelques différences dues à la présence d'un support solide. La tension latérale peut être beaucoup plus élevée dans les bicouches planes avec une diminution de l'ordre moléculaire qui empêchera par exemple la formation de certaines phases lipidiques présentes dans les bicouches libres (exemple : phase *ripple*)⁷⁵. D'autre part, la plupart des supports utilisés étant chargés (silice, silicium, mica), on observe une forte augmentation des interactions coulombiennes entre le support et la bicouche.

Des mesures par RMN sur des billes de verre ont révélé un coefficient de diffusion latérale deux fois plus lent dans le feuillet en contact avec le support⁵² pour une bicouche en phase fluide, indiquant clairement un couplage plus important entre le feuillet face au support et le support lui-même qu'entre les deux feuillets de la bicouche, et ce, malgré la présence d'un film d'eau de l'ordre du nanomètre.

Une autre étude a également montré que la mobilité des lipides dans une bicouche supportée sur verre était ralentie d'un facteur 4.5 par rapport à une membrane libre⁷⁶.

1.5 Conclusion

Les bicouches lipidiques constituent des systèmes biomimétiques utiles à la compréhension de la dynamique des cellules vivantes et/ou en vue d'applications dans les biotechnologies. Elles peuvent être utilisées sous forme de bicouche libre dans les vésicules ou sous forme de bicouche supportée, cette dernière configuration permettant d'effectuer plus facilement des mesures quantitatives. Si cette localisation est intéressante dans la perspective de mesures, la présence du support induit des effets, qui peuvent être intéressants du point de vue de la compréhension de ces systèmes et de leurs applications et qu'il faut prendre en compte dans l'analyse du comportement de la bicouche. En effet ils peuvent varier en fonction des différents paramètres physico-chimiques des constituants du système.

2 Les protéines membranaires

2.1 Introduction

Nous devons rappeler que les protéines sont des macromolécules qui prennent dans l'espace une forme tridimensionnelle propre à chaque protéine. On peut ainsi imaginer les protéines membranaires comme autant de petits "icebergs" flottant sur une mer de lipides, l'ensemble dessinant une sorte de "mosaïque" à la surface de la membrane cytoplasmique. Dans le contexte des recherches actuelles, ce modèle de la mosaïque semble le plus vraisemblable et le plus près de la réalité. Par ailleurs, il faut comprendre que ce modèle n'est que théorique puisque aucune image, même au microscope électronique, n'a permis d'avoir une image photographique de l'agencement des molécules de cette membrane.

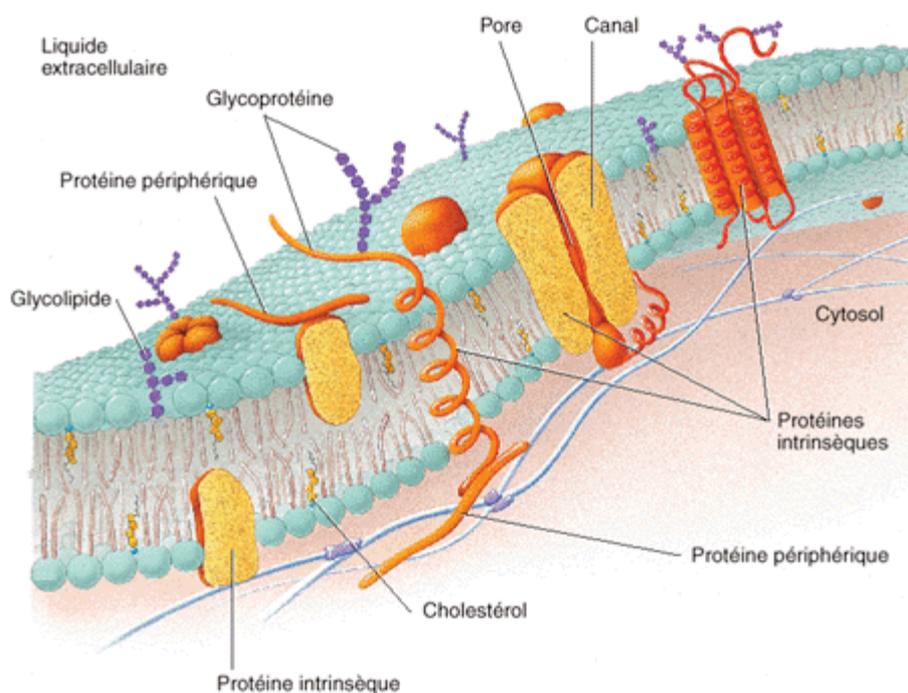


Figure 13 : Représentation schématique d'une membrane plasmique. (Modèle mosaïque fluide de la structure des membranes)

Suivant leur origine, les membranes renferment de 40 à 70 % de protéines réparties dans la bicouche lipidique. Ce sont ces protéines qui donnent une fonction spécifique à la membrane concernée : elles assurent des fonctions très diverses de transport (canaux, transporteurs), catalyse (enzymes), adhésion et reconnaissance. Le rapport protéine/lipide des membranes varie considérablement selon la fonction membranaire comme le montre le **Tableau 3**.

Membrane	Protéine (%)	Lipide (%)	Glucide (%)	Rapport protéine/lipide
Membranes plasmiques :				
Cellules de foie de souris	46	54	2 – 4	0.85
Erythrocyte humain	49	43	8	1.1
Amibe	52	42	4	1.3
Membrane nucléaire de foie de rat	59	35	2.0	1.6
Membrane mitochondriale externe	52	48	(2-4) ^a	1.1
Membrane mitochondriale interne	76	24	(1-2) ^a	3.2
Myéline	18	79	3	0.23
Bactérie Gram positif	75	25	(10) ^a	3.0
Membrane pourpre de <i>Halobacterium</i>	75	25		3.0

^a Déduit des analyses.

Tableau 3 : Composition de quelques membranes biologiques [D'après Guidotti, G. *Annu. Rev. Biochem.* **41**, 732 (1972)]

Les protéines membranaires sont classées selon leur degré d'association aux membranes (**Figure 14**) :

- **les protéines intégrales ou intrinsèques** : elles sont fortement liées aux membranes par des forces hydrophobes (**Figure 15**) et on ne peut les extraire que par traitement des membranes avec des agents qui déstabilisent celles-ci. Ces agents comprennent les solvants organiques, les détergents et des substances chaotropiques (ions qui désorganisent la structure de l'eau). Les protéines intrinsèques ont tendance à s'agréger et à précipiter en solutions aqueuses à moins qu'on ne les solubilise avec des détergents ou des solvants organiques miscibles à l'eau, comme le butanol ou le glycérol. Certaines protéines intrinsèques sont si fortement liées aux lipides qu'il est nécessaire de se placer en conditions dénaturantes pour les en débarrasser. Les protéines intrinsèques solubilisées sont purifiées par plusieurs méthodes de fractionnement.
- **les protéines périphériques ou extrinsèques** : elles sont dissociées des membranes par des techniques relativement douces qui laissent la membrane intacte, telles que le traitement par des solutions de sels de force ionique élevée (ex. NaCl 1M), par des agents chélateurs des métaux, ou des changements de pH. Les protéines périphériques, le cytochrome c par exemple, sont stables en solutions aqueuses et ne se lient pas aux lipides. Elles s'associent à la membrane en se liant à sa surface, avec les groupements de tête de ses lipides ou avec des protéines intrinsèques, par interactions électrostatiques et liaisons hydrogènes. Les protéines périphériques débarrassées de la

membrane se comportent comme des protéines globulaires hydrosolubles et peuvent être purifiées en tant que telles.

Remarque : en plus des lipides et protéines, la membrane comporte également des composés polysaccharidiques (2 à 10% des molécules). Ces composés sont très hydrophiles et ne sont jamais libres dans la membrane, mais toujours liés soit à un lipide formant ainsi un glycolipide, soit à une protéine formant une glycoprotéine. Ils sont positionnés sur la face externe de la membrane plasmique, accentuant encore son asymétrie. Ils jouent un rôle important dans les phénomènes de communication et de reconnaissance intercellulaire.

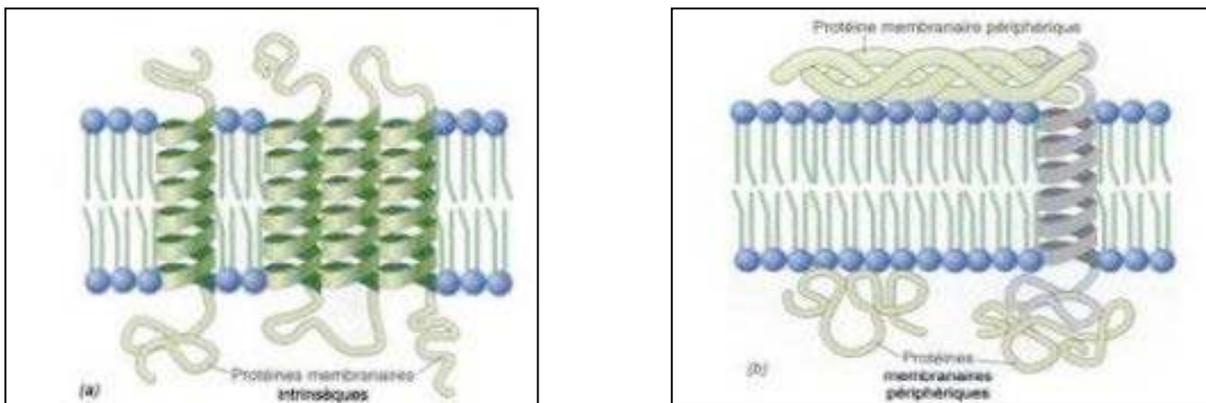


Figure 14: Différentes classes de protéines membranaires

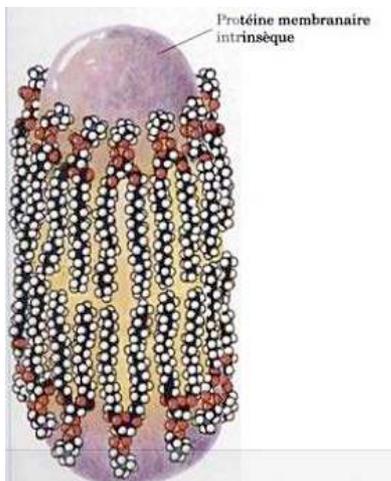


Figure 15 : Modèle d'une protéine membranaire intrinsèque. [D'après Robertson, R.N., *The Lively Membranes*, p. 56, Cambridge University Press (1983)]

Les protéines sont composées d'un enchaînement d'acides aminés. Il en existe 20. Ils peuvent être répartis grossièrement en deux groupes selon leur polarité : les acides aminés hydrophiles ou hydrophobes. Dans les protéines, les acides aminés sont reliés entre eux par une liaison amide entre le groupe carbonyle (C=O) de l'un et le groupe amino (N-H) du suivant. Cette liaison est appelée "liaison peptidique" et les acides aminés ainsi reliés sont nommés "résidus", l'enchaînement des résidus formant la structure primaire de la protéine. D'une

manière générale on attribue le nom de "peptide" aux enchaînements de moins de 50 résidus, alors que le terme "protéine" désigne les ensembles plus complexes et présentant des propriétés fonctionnelles dans le système *in vivo*.

Le squelette polypeptidique peut ensuite s'organiser selon différentes structures secondaires (**Figure 16**) : hélice α , feuillet β , coude β , pelote statistique, qui influent directement sur les interactions avec la membrane^{5,10,77} :

- dans une structure dite "hélice α ", la chaîne peptidique est enroulée suivant une hélice droite, d'un pas de 0,54 nm, chaque tour d'hélice contenant en moyenne 3,6 résidus (**Figure 16**). L'hélice est stabilisée par des liaisons hydrogènes intramoléculaires s'établissant entre les groupements (CO) et (NH) de résidus espacés d'un tour d'hélice. Contrairement à la conformation en hélice α "droite", les hélices "gauche" sont peu répandues.

- la conformation en feuillet β est aussi désignée sous le terme de "feuillet plissé", car les liaisons peptidiques sont arrangées comme sur une feuille de papier pliée en accordéon (**Figure 16**). Cette structure est également stabilisée par des liaisons hydrogènes qui se forment entre chaînes voisines. On parle de feuillet plissé parallèle lorsque les chaînes adjacentes présentent des séquences peptidiques se parcourant dans le même sens, par exemple, de l'extrémité amine vers l'extrémité carboxyle, pour toutes les chaînes. Le terme feuillet plissé antiparallèle est utilisé lorsque les liaisons peptidiques de chacune des chaînes se font en sens inverse : à l'extrémité amine d'une chaîne correspond alors l'extrémité carboxyle de ses voisines.

- les coudes représentent les changements d'orientation de la chaîne peptidique. On parlera plus spécifiquement de coude β lorsque 4 résidus sont impliqués pour induire une rotation de 180° dans la structure des polypeptides. Cette configuration est stabilisée par une liaison hydrogène entre les résidus de tête et de fin de structure.

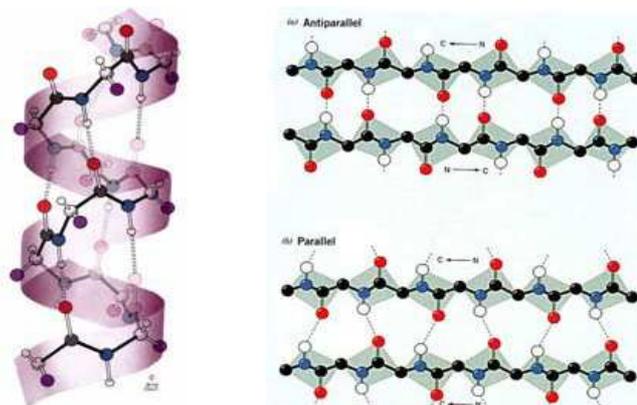
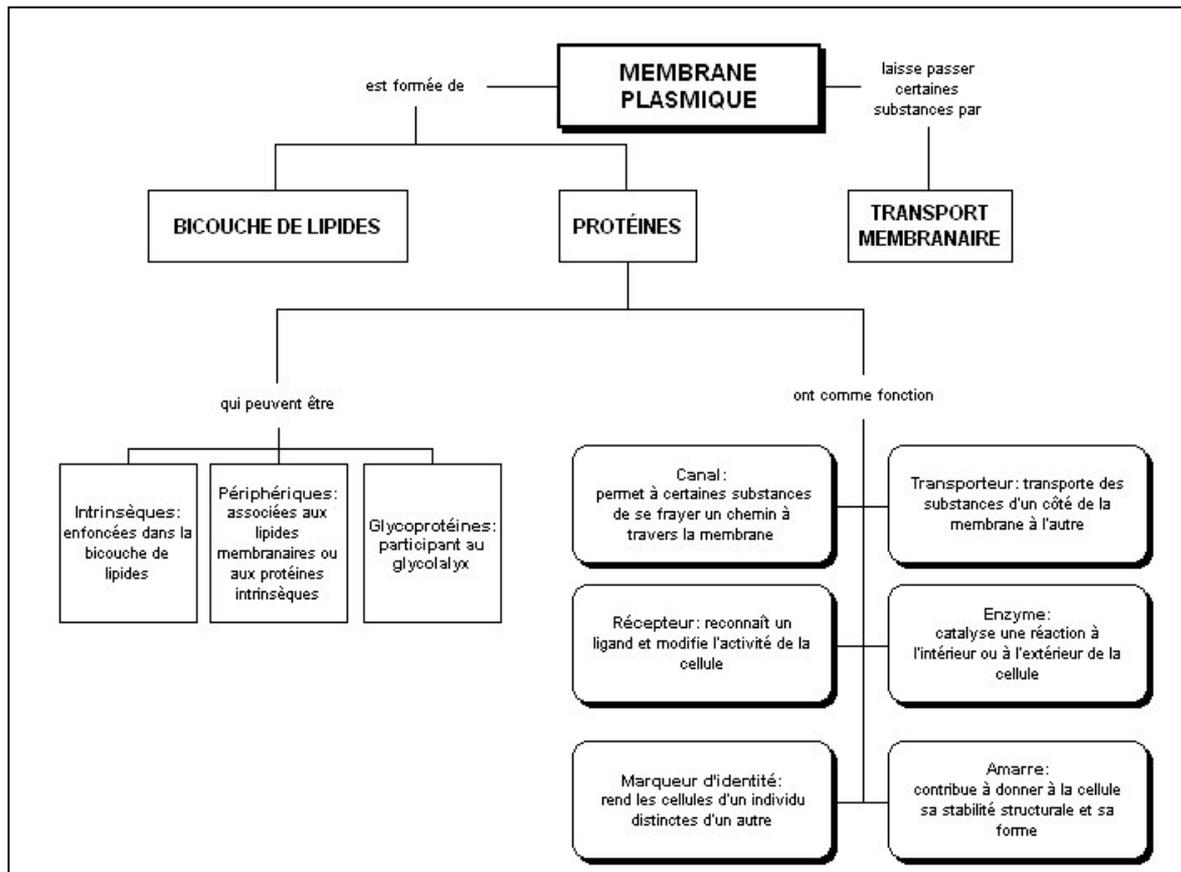


Figure 16: Principales structures secondaires des protéines: l'hélice- α (à gauche) et les feuillets- β parallèle et antiparallèle (à droite) d'après Irving Geis[©].

La présence des phospholipides dans la membrane cytoplasmique a certes des avantages et permet à la cellule de se constituer une véritable barrière. Cependant, cette même couche de phospholipides la rend imperméable à toutes les molécules insolubles dans les lipides comme l'eau, les acides aminés et le glucose par exemple. La présence des protéines dispersées dans la couche de lipides apparaît donc ici comme essentielle à la cellule afin que celle-ci puisse assurer d'autres fonctions que les lipides ne peuvent exercer comme par exemple :

- transporter des molécules hydrosolubles,
- établir des contacts entre les cellules appartenant à un même tissu,
- établir le contact avec les cellules du reste de l'organisme

Les protéines membranaires seront donc responsables des nombreuses réactions chimiques effectuées au niveau de la membrane cytoplasmique des cellules.



2.2 Rôles des protéines dans les membranes biologiques

2.2.1 Rôle de barrière sélective

La bicouche est imperméable aux substances hydrosolubles ou polaires (hydrophiles).

Leur passage n'est possible que grâce à certaines protéines, les canaux et les perméases (protéines vectrices : pompes et transporteurs) qui fonctionnent sur commande cellulaire. Seules exceptions, les petites molécules apolaires (O_2 , CO_2 , ...) diffusent librement et les petites molécules polaires (H_2O , Urée $NH_2-CO-NH_2$, ...) passent lentement au travers de la bicouche. Toutefois, lorsque le passage rapide de grandes quantités d'eau est nécessaire, il est rendu possible à la présence de canaux spécifiques, les aquaporines.

Les substances liposolubles passent librement au travers de la bicouche lipidique.

Les membranes délimitent donc des compartiments, dans lesquels les substances les plus diverses peuvent être synthétisées, s'accumuler, être séquestrées ou circuler, à l'abri de celles présentes dans d'autres secteurs cellulaires. Il s'agit donc de sous ensembles avec des caractéristiques chimiques bien spécifiques.

2.2.2 Rôle de support de charges électriques

Des perméases consommant de l'énergie, les pompes, expulsent ou font entrer des ions différents : entrée de K^+ , sortie de Na^+ par exemple (on estime que certaines cellules spécialisées comme les neurones utilisent les 2/3 de l'énergie produite pour ce transport). L'énergie utilisée permet de générer des différences de concentration de part et d'autre des membranes, créant des gradients électrochimiques (gradient de concentration et gradient électrique). Ainsi est maintenu un potentiel de repos membranaire (en fait transmembranaire) tant que la cellule est vivante. Ce potentiel a 2 utilisations :

Transport transmembranaire de molécules : le gradient crée une force motrice utilisée pour assurer le transport dans le même sens (symport) ou en sens inverse (antiport) d'une autre molécule : transport couplé.

Potentiel d'action : signal électrique propageable tout au long de la membrane. Si la cellule subit une stimulation au niveau de sa membrane plasmique, le trajet des ions s'inverse, entraînant une dépolarisation locale capable de se propager. Les potentiels d'action sont très utilisés par les neurones et les cellules musculaires.

2.2.3 Support de réactions enzymatiques

Lorsqu'une enzyme et son substrat sont dans un milieu liquide, tous deux sont soumis, par le mouvement brownien ou agitation thermique, à des trajets indépendants et aléatoires dans les trois directions de l'espace. La réaction se fait lorsque les deux partenaires se rencontrent et la vitesse de réaction est directement proportionnelle à la probabilité de rencontre. La vitesse de réaction est considérablement augmentée, d'un facteur 100 environ, si l'un des deux partenaires, l'enzyme par exemple, est piégée dans ou sur une membrane. Le trajet du substrat ne reste tridimensionnel qu'un court instant, le temps de rencontrer la membrane en un point quelconque. A partir de là, le trajet du substrat jusqu'à l'enzyme devient bidimensionnel, et en perdant une dimension, la probabilité de rencontre est considérablement augmentée.

2.2.4 Réception et transfert de messages spécifiques

Toutes les cellules d'un organisme reçoivent des milliers de messages chimiques par seconde (hormones, cytokines, ...). Pour être transmis à la cellule, ces messages doivent franchir la membrane plasmique. Seul un très petit nombre de messages intéresse une cellule donnée. Pour cela il faut qu'elle possède un récepteur spécifique de ce message, capable de faire le tri. La molécule sélectionnée, appelée premier messenger ou ligand, trouve sur ce récepteur un site d'attache spécifique et s'y lie. Il existe 2 sortes de récepteurs :

- des récepteurs cytosoliques spécifiques de messages ou ligands hydrophobes qui traversent sans contrainte les bicouches lipidiques.
- des récepteurs membranaires spécifiques de messages ou ligands hydrophiles.

La fixation du ligand spécifique entraîne un changement de conformation spatiale du récepteur qui est mis à profit pour activer une gamme, restreinte, de mécanismes intracellulaires : activation de cascades d'enzymes (en général des kinases) ou mobilisation de second messenger comme AMP cyclique ou le Ca^{2+} . L'ensemble des mécanismes déclenchés par l'activation d'un récepteur est appelé transduction ou voie de signalisation.

Il faut déjà retenir que le seul niveau de spécificité (ou de décryptage d'un signal) réside au niveau du récepteur, membranaire ou cytosolique. Le nombre restreint de second messenger fait que chacun peut être commun à plusieurs voies de signalisation.

2.3 Une protéine modèle : l'alpha-hémolysine

De nombreuses toxines bactériennes, appelées toxines formant des canaux (CFT), sont synthétisées en tant que monomères hydrosolubles qui, en interagissant avec leur membrane cible par le biais d'un récepteur protéique spécifique, s'insèrent spontanément dans la membrane sous forme d'un pore transmembranaire (TM). Suite à ce processus, qui souvent requiert l'oligomérisation de la toxine, la cellule cible perd de petits ions et molécules et meurt par déséquilibre osmotique. La formation d'un seul de ces pores de type de CFT peut suffire à tuer une cellule.

Une de CFT les mieux caractérisées est l' α -hémolysine (α -HL) de *Staphylococcus aureus*, agent pathogène pour l'homme. Cette toxine, sécrétée en tant que monomère hydrosoluble de 293 résidus, s'insère spontanément sous forme de pores heptamériques dans les membranes des érythrocytes et de plusieurs autres types de cellules. Bien que le monomère d' α -hémolysine soit soluble dans l'eau et ne contienne apparemment pas de segments hydrophobes, l'heptamère se comporte comme une protéine TM typique dans la mesure où sa libération de la membrane résiste au traitement par de fortes concentration en sels, pH acide, ou agents chaotropiques, et requiert l'usage de détergents.

La structure par rayons X de l' α -hémolysine déterminée par Eric Gouaux^{77,78} après solubilisation aux détergents montre un complexe heptamérique en forme de champignon de 10 nm de haut et 10 nm de diamètre (**Figure 17**). Le pore TM est formé d'un canal rempli de solvant de 14 à 46 Å de diamètre. Le pied du champignon, qui est à la portion TM de la protéine, est un tonneau β antiparallèle de type porine à 1 segment, de 5.2 nm de haut est de 2.6 nm de diamètre, formé de sept feuillets β antiparallèles à 2 segments, un provenant de chaque sous-unité. Le reste de chaque sous-unité comporte un domaine en sandwich β et un domaine périphérique qui, ensemble, forment un ellipsoïde de 7 nm de long. Sept de ces ellipsoïdes sont organisés en un anneau qui correspond au chapeau du champignon et à ses bords. Le domaine périphérique se projette vers les groupements de tête phospholipidiques de la membrane et interagit sans doute avec eux via les résidus basiques et aromatiques qui pendent dans la crevasse entre la tige et les bords du chapeau.

D'après de nombreuses données, la formation spontanée de ce pore TM heptamérique implique plusieurs étape bien séparées : (i) la liaison du monomère hydrosoluble à la surface de la membrane, probablement suite à l'interaction des boucle polypeptidiques de la protéine avec les groupements de surface de la bicouche lipidique ; (ii) la formation de l'heptamère à la surface de la membrane ; et (iii) l'insertion du tonneau β à 14 segments à travers la

membrane pour former le pore TM. Bien que l'on ne connaisse pas encore les détails structuraux de ces phénomènes, la structure secondaire des monomères apparaît comme inchangée lorsqu'ils s'assemblent pour former le pore TM heptamérique.

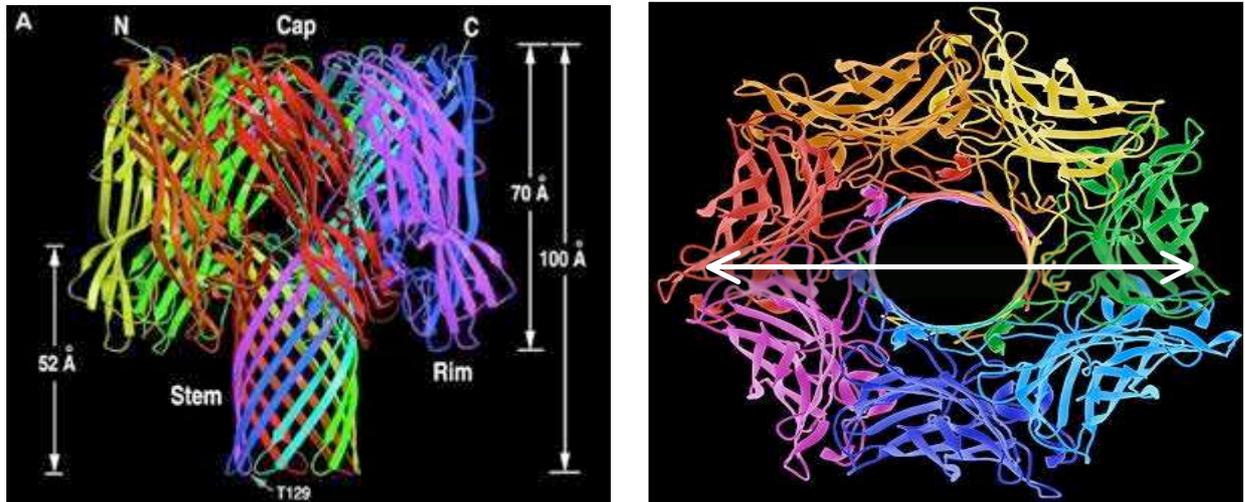


Figure 17 : Structure tridimensionnelle du pore heptamérique formé par l' α -toxine de *S.aureus* (code PDB : 7AHL)

Comme d'autres toxines cytolytiques, l'oligomérisation de l' α HL se produit spontanément au contact avec une substance amphiphile appropriée. Depuis plusieurs années, l' α HL était considérée comme un hexamère en se basant sur des études par microscopie électronique (EM) et des études biochimiques⁷⁸. Finalement, d'autres études de rayons X⁷⁷ ont clairement montré que les oligomères d' α HL formés dans des micelles de DOC (détergent deoxycholate) étaient des heptamères. Cette oligomérisation de l' α -HL a été confirmée par électrophorèse⁷⁸, par AFM⁷⁹ et par Cell-free expression⁸⁰.

Trois domaines caractérisent cette protéine : le domaine 'Cap' pour le chapeau, 'Rim' pour la couronne et 'Stem' pour le pied. Vu l'hydrophobicité du pied et sa hauteur (~ 5 nm) compatible avec la hauteur de la bicouche de DMPC (4 nm) et l'épaisseur du film d'eau entre le support et la bicouche (\cong 1 nm), le pied de l' α HL traverse facilement la membrane en interagissant avec les queues hydrophobes constituant la bicouche, et forme ainsi un pore de 26 Å de diamètre. C'est la raison du choix de l' α HL comme protéine modèle pour nos études sur la diffusion et la mobilité électrophorétique en bicouche lipidique supportée.

Bakás et coll.⁸¹ ont montré que l'adsorption de l' α HL dans des liposomes de DOPC, DMPC et DPPC ne dépendait pas de la fluidité ni de la composition de la bicouche mais que l'insertion, elle, dépendait principalement de l'état physique de la bicouche. Ainsi l'insertion, irréversible,

est favorisée dans une bicouche en phase fluide plutôt qu'en phase gel et en présence d'une concentration de cholestérol plutôt faible qu'élevée.

2.4 Diffusion brownienne et mobilité électrophorétique des protéines membranaires :

Le séquençage de plusieurs génomes indique que les protéines membranaires représentent environ 30% du protéome^{82,83}. Ces protéines sont essentielles à la vie cellulaire, par exemple, elles sont importantes pour l'action pharmacologique et donc l'étude de l'activité des protéines membranaires est cruciale. Jusqu'à présent, les protéines membranaires ont été analysées par plusieurs techniques biochimiques⁸⁴. Parmi ces techniques, l'électrophorèse 2D sur gel, qui a été décrite pour la première en 1975^{85,86}. Cependant, l'électrophorèse 2D sur gel n'est pas bien adaptée à l'analyse des protéines membranaires. Un problème subsiste pour ces protéines : elles ne sont pas solubles dans l'eau et nécessitent l'utilisation de détergent afin de les solubiliser de sorte qu'elles puissent conserver leur structure et donc leur bioactivité. Ainsi, les conserver dans un environnement similaire à la membrane cellulaire comme, par exemple, une bicouche lipidique supportée (BLS) semble être une solution plus attrayante que l'utilisation de conditions dénaturantes^{59,87},

Les protéines et les phospholipides ne passent pas d'un feuillet à l'autre d'une membrane à vitesse appréciable, mais, parce qu'ils flottent dans une bicouche lipidique fluide, peuvent diffuser latéralement sur toute l'étendue de la membrane. Ce déplacement fut démontré pour la première fois par Larry Frye et Michael Edidin en 1970⁸⁸, au cours d'une expérience qui a validé le modèle de la mosaïque fluide. En effet, ils fusionnèrent, en boîte de culture, des cellules humaines à des cellules de souris et obtinrent des hybrides homme-souris. Ils suivirent la répartition des protéines membranaires de ces cellules hybrides à l'aide d'anticorps marqués reconnaissant l'origine humaine ou murine de ces protéines. Après fusion, les protéines étaient situées chacune dans une moitié de la cellule hybride, mais après une période d'incubation à 37°C, les protéines humaines et celles de souris s'étaient complètement mélangées sur toute la surface de la cellule. Ainsi, ils ont prouvé que les protéines se déplaçaient librement dans toute l'étendue de la membrane plasmique.

Néanmoins, les protéines ne peuvent pas toutes diffuser librement dans la membrane ; la mobilité de certaines protéines membranaires est contrecarrée par leur association avec le cytosquelette. Par exemple, la protéine de la bande 3 est en partie immobilisée dans la membrane du globule rouge, à cause de son attachement à l'ankyrine et à la spectrine. Dans d'autres cas, la mobilité de telle protéine membranaire est limitée par association avec telle

autre protéine membranaire, avec une protéine de surface d'une cellule voisine ou avec la matrice extracellulaire. Sukhorukov et coll.⁸⁹ ont étudié, eux aussi, la mobilité de protéines situées soit dans la partie extérieure de la membrane (comme par exemple hFis et Tom7) ainsi que la mobilité de complexes situés à l'intérieur de la membrane (comme COX et F₁F₀ ATPase). Leur résultats montrent que Tom7 et hFis se déplacent tout au long de l'axe mitochondrial dans la partie extérieure de la membrane avec des coefficients de diffusion similaires ($D = 7 \times 10^{-8} \text{ cm}^2/\text{s}$ et $6 \times 10^{-8} \text{ cm}^2/\text{s}$ respectivement) et une fraction immobile égale (7%).

Des auteurs ont effectué des mesures de coefficient de diffusion de protéines membranaires dans des membranes lipidiques, libres ou supportées^{59,82-86,90-95}. La plupart montrent des résultats qui sont en accord avec le modèle de Saffmann-Delbruck⁹⁶ qui prévoit une variation du coefficient de diffusion en $\ln(1/R)$, R étant le rayon de l'objet inséré dans la membrane. Ceci constitue une notable différence avec ce qui est observé en solution, en général correctement décrit par le modèle de Stokes-Einstein ($D \approx kT/R$), R étant le rayon de l'objet tout entier. Seuls Gambin et coll.⁹⁷ observent une diffusion en $1/R$ dans une phase éponge.

Il existe à notre connaissance très peu de mesures de mobilité électrophorétique de protéines membranaires. Outre leur délicate manipulation, il arrive souvent qu'elles "collent" au support de la bicouche lipidique supportée. Récemment Tanaka⁹⁸ et Monson⁹⁹ ont étudié le déplacement électrophorétique de protéines associées à une membrane. Seuls Smith et coll.¹⁰⁰ ont étudié la mobilité d'une protéine réellement transmembranaire, la *human delta-opioid receptor*, incorporée dans une bicouche lipidique de POPC préparée par fusion de vésicules sur une surface de silicium préalablement recouverte d'un 'coussin' de polyacrylamide. Ils ont déterminé une mobilité électrophorétique de la protéine égale à $3 \times 10^{-8} \text{ cm}^2/\text{V.s}$ pour des champs électriques atteignant 1000V/cm. C'est une très faible mobilité qui, si les choses en restaient là, interdirait d'envisager un jour l'utilisation de ce type de système pour effectuer une séparation électrophorétique de protéines membranaires.

2.5 Conclusion

La mobilité des protéines affecte la plupart des processus cellulaires, tels que les taux de réactions enzymatiques, la transduction du signal, et l'assemblage de complexes macromoléculaires. Malgré cette importance, peu d'informations systématiques sont disponibles sur la diffusion de protéine à l'intérieur des cellules. C'est la mise au point d'un système qui permette d'avancer vers la séparation électrophorétique de protéines membranaires qui a constitué une motivation forte de ce travail de thèse. Une séparation qui fonctionne devrait à terme entraîner la détermination de plus de structures de protéines membranaires et aider ainsi à une meilleure compréhension des organismes vivants.

3 Références

1. Singer, S.J. & Nicolson, G.L. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* **175**, 720-31 (1972).
2. Lipowsky, R. & Sackmann, E. "Structure and Dynamics of Membranes". *Handbook of Biological Physics. Elsevier, North Holland* (1995).
3. Vereb, G. et al. Dynamic, yet structured: The cell membrane three decades after the Singer-Nicolson model. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 8053-8 (2003).
4. Forstnerb, M.B., Martin, D.S., Navar, A.M. & Kas, J.A. Simultaneous single-particle tracking and visualization of domain structure on lipid monolayers. *Langmuir* **19**, 4876-4879 (2003).
5. Harder, T. & Simons, K. Caveolae, DIGs, and the dynamics of sphingolipid-cholesterol microdomains. *Curr Opin Cell Biol* **9**, 534-42 (1997).
6. Simons, K. & Ikonen, E. Functional rafts in cell membranes. *Nature* **387**, 569-572 (1997).
7. Brown, D.A. & London, E. Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 17221-17224 (2000).
8. Fantini, J., Garmy, N., Mahfoud, R. & Yahi, N. *Expert Review Mol. Med* (2002).
9. Shechter, E. & Rossignol, B. "Biochimie et biophysique des membranes: Aspects structuraux et fonctionnels". *Masson 2ième édition*. (1997).
10. Koolman, J. & Röhm, K.-H. "Atlas de poche de Biochimie". *Médecine-Sciences Flammarion 2ème édition*. (1995).
11. Alberts, B. et al. "Biologie Moléculaire de la Cellule",. *Médecine-Sciences Flammarion 3ième édition*. (1994).
12. Israelachvili, J.N. Intramolecular and Surface Forces. *Academic Press* (1992).
13. Decher, G., Hong, J.D. & Schmitt, J. Buildup of ultrathin multilayer films by a selfassembly process: III. Consecutively alternating adsorption of anionic and cationic polyelectrolytes on charged surfaces. *Thin Solid Films*, 831 - 835 (1992).
14. Decher, G. & Hong, J.D. Buildup of ultrathin multilayer films by a self-assembly process: I. consecutive adsorption of anionic and cationic bipolar amphiphiles. *Makromol. Chem. Macromol, Symp* **46**, 321 (1991).
15. Lorin, A., Flore, C., Thomas, A. & Bresseur, R. Les liposomes : description, fabrication et applications. . *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment* **8**, 163-176 (2004).
16. Muresan, A.S. & Lee, K.Y.C. Shape evolution of lipid bilayer patches adsorbed on mica: An atomic force microscopy study. *Journal of Physical Chemistry B* **105**, 852-855 (2001).
17. Kim, J., Kim, G. & Cremer, P.S. Investigations of water structure at the solid/liquid interface in the presence of supported lipid bilayers by vibrational sum frequency spectroscopy. *Langmuir* **17**, 7255 - 7260 (2001).
18. Feng, Z.V., Granick, S. & Gewirth, A.A. Modification of a supported lipid bilayer by polyelectrolyte adsorption. *Langmuir* **20**, 8796-804 (2004).
19. McConnell, H.M., Watts, T.H., Weis, R.M. & Brian, A.A. Supported planar membranes in studies of cell-cell recognition in the immune system. *Biochim Biophys Acta* **864**, 95-106 (1986).
20. Sackmann, E. Supported membranes: scientific and practical applications. *Science* **271**, 43-8 (1996).
21. Mc Connell, H. & Brian, A.A. Allogenic simulation of cyto-toxic T-cells by supported planar membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**, 6159-6163 (1984).

22. Grakoui, A. et al. The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. *Science* **285**, 221-7 (1999).
23. Stroumpouli, D., Parra, A., Gliem, J. & Tirrel, M. A kinetic study of vesicle fusion on silicon dioxide surfaces by ellipsometry. *Aiche Journal* **52**, 2931-2937 (2006).
24. Marsh, D. Lateral pressure in membranes. *Biochimica Et Biophysica Acta* **1286**, 183-223 (1996).
25. Albrecht, O., Gruler, H. & Sackmann, E. Polymorphism of phospholipid monolayers. *Journal De Physique* **39**, 301-313 (1978).
26. Blume, A. A comparative study of the phase transitions of phospholipid bilayers and monolayers. *Biochim Biophys Acta* **557**, 32-44 (1979).
27. Nagle, J.F. Theory of the main lipid bilayer phase-transition. *Annual Review of Physical Chemistry* **557**, 32-44 (1980).
28. Koynova, R. & Caffrey, M. Phases and phase transitions of the phosphatidylcholines. *Biochim Biophys Acta* **1376**, 91-145 (1998).
29. Mouritsen, O.G. Theoretical models of phospholipid phase transitions. *Chem Phys Lipids* **57**, 179-94 (1991).
30. Garidel, P. & Blume, A. Miscibility of phospholipids with identical headgroups and acyl chain lengths differing by two methylene units: effects of headgroup structure and headgroup charge. *Biochim Biophys Acta* **1371**, 83-95 (1998).
31. Rappolt, M. et al. New evidence for gel-liquid crystalline phase coexistence in the ripple phase of phosphatidylcholines. *European Biophysics Journal with Biophysics Letters* **29**, 125-133 (2000).
32. Heimburg, T. A model for the lipid pretransition: coupling of ripple formation with the chain-melting transition. *Biophys J* **78**, 1154-65 (2000).
33. Richter, R.P., Maury, N. & Brisson, A.R. On the effect of the solid support on the interleaflet distribution of lipids in supported lipid bilayers. *Langmuir* **21**, 299-304 (2005).
34. Richter, R.P. & Brisson, A.R. Following the formation of supported lipid bilayers on mica: a study combining AFM, QCM-D, and ellipsometry. *Biophys J* **88**, 3422-33 (2005).
35. Richter, R., Mukhopadhyay, A. & Brisson, A. Pathways of lipid vesicle deposition on solid surfaces: a combined QCM-D and AFM study. *Biophys J* **85**, 3035-47 (2003).
36. Reviakine, I. & Brisson, A. Formation of supported phospholipid bilayers from unilamellar vesicles investigated by atomic force microscopy. *Langmuir* **16**, 1806-1815 (2000).
37. Egawa, H. & Furusawa, K. Liposome adhesion on mica surface studied by atomic force microscopy. *Langmuir* **15**, 1660-1666 (1999).
38. Seifert, U. Configurations of fluid membranes and vesicles. *Advances in Physics* **46**, 13-137 (1997).
39. Keller, C.A., Glasmaster, K., Zhdanov, V.P. & Kasemo, B. Formation of supported membranes from vesicles. *Phys Rev Lett* **84**, 5443-6 (2000).
40. Keller, C.A. & Kasemo, B. Surface specific kinetics of lipid vesicle adsorption measured with a quartz crystal microbalance. *Biophys J* **75**, 1397-1402 (1998).
41. Williams, L.M. et al. Kinetics of formation of single phospholipid bilayers on self-assembled monolayer supports, as monitored by surface plasmon resonance. *Supramolecular Science* **4**, 513-517 (1997).
42. Koenig, B.W. et al. Neutron reflectivity and atomic force microscopy studies of a lipid bilayer in water adsorbed to the surface of a silicon single crystal. *Langmuir* **12**, 1343-1350 (1996).
43. Benes, M., Billy, D., Hermens, W.T. & Hof, M. Muscovite (mica) allows the characterisation of supported bilayers by ellipsometry and confocal fluorescence correlation spectroscopy. *Biol Chem* **383**, 337-41 (2002).

44. Keller, D., Larsen, N.B., Moller, I.M. & Mouritsen, O.G. Decoupled phase transitions and grain-boundary melting in supported phospholipid bilayers. *Physical Review Letters* **94**(2005).
45. Lipowsky, R. & Seifert, U. Adhesion of vesicles and membranes. *Molecular Crystals and Liquid Crystals Science and Technology Section a-Molecular Crystals and Liquid Crystals* **202**, 17-25 (1991).
46. Schwartz, D.K. Langmuir-Blodgett film structure. *Surface Science Reports* **27**, 241-334 (1997).
47. Peng, J.B., Barnes, G.T. & Gentle, I.R. The structures of Langmuir-Blodgett films of fatty acids and their salts. *Adv Colloid Interface Sci* **91**, 163-219 (2001).
48. Osborn, T.D. & Yager, P. Modeling success and failure of Langmuir-Blodgett transfer of phospholipid bilayers to silicon dioxide. *Biophys J* **68**, 1364-73 (1995).
49. Sikes, H.D., Woodward, J.T. & Schwartz, D.K. Pattern formation in a substrate induced phase transition during Langmuir-Blodgett transfer. *Journal of Chemical Chemistry* **100**, 9093-9097 (1996).
50. Mikrut, J.M., Dutta, P., Ketterson, J.B. & MacDonald, R.C. Atomic-force and fluorescence microscopy of Langmuir-Blodgett monolayers of L- alpha -dimyristoylphosphatidic acid. *Phys Rev B Condens Matter* **48**, 14479-14487 (1993).
51. Lee, A.G., Birdsall, N.J. & Metcalfe, J.C. Measurement of fast lateral diffusion of lipids in vesicles and in biological membranes by ¹H nuclear magnetic resonance. *Biochemistry* **12**, 1650-9 (1973).
52. Hetzer, M., Heinz, S., Grage, S. & Bayerl, T.M. Asymmetric molecular friction in supported phospholipid bilayers revealed by NMR measurements of lipid diffusion. *Langmuir* **14**, 982-984 (1998).
53. Tabony, J. & Perly, B. Quasielastic neutron scattering measurements of fast local translational diffusion of lipid molecules in phospholipid bilayers. *Biochim Biophys Acta* **1063**, 67-72 (1991).
54. Konig, S., Pfeiffer, W., Bayerl, T., Richter, D. & Sackmann, E. Molecular-dynamics of lipid bilayers studied by incoherent quasi-elastic neutron scattering. *Journal De Physique* **2**, 1589-1615 (1992).
55. Davoust, J., Devaux, P.F. & Leger, L. Fringe pattern photobleaching, a new method for the measurement of transport coefficients of biological macromolecules. *EMBO J* **1**, 1233-8 (1982).
56. Ratto, T.V. & Longo, M.L. Obstructed diffusion in phase-separated supported lipid bilayers: a combined atomic force microscopy and fluorescence recovery after photobleaching approach. *Biophys J* **83**, 3380-92 (2002).
57. Kapitza, H.G., Ruppel, D.A., Galla, H.J. & Sackmann, E. Lateral diffusion of lipids and glycoporphin in solid phosphatidylcholine bilayers. The role of structural defects. *Biophys J* **45**, 577-87 (1984).
58. Derzko, Z. & Jacobson, K. Comparative lateral diffusion of fluorescent lipid analogues in phospholipid multibilayers. *Biochemistry* **19**, 6050-7 (1980).
59. Tamm, L.K. & McConnell, H.M. Supported Phospholipid-Bilayers. *Biophysical Journal* **47**, 105-113 (1985).
60. Zhang, L. & Granick, S. Lipid diffusion compared in outer and inner leaflets of planar supported bilayers. *J Chem Phys* **123**, 211104 (2005).
61. Wawrezynieck, L., Rigneault, H., Marguet, D. & Lenne, P.F. Fluorescence correlation spectroscopy diffusion laws to probe the submicron cell membrane organization. *Biophys J* **89**, 4029-42 (2005).
62. Kusumi, A., Sako, Y. & Yamamoto, M. Confined lateral diffusion of membrane receptors as studied by single particle tracking (nanovid microscopy). Effects of calcium-induced differentiation in cultured epithelial cells. *Biophys J* **65**, 2021-40 (1993).

63. Kiessling, V., Crane, J.M. & Tamm, L.K. Transbilayer effects of raft-like lipid domains in asymmetric planar bilayers measured by single molecule tracking. *Biophys J* **91**, 3313-26 (2006).
64. Ratto, T.V. & Longo, M.L. Anomalous subdiffusion in heterogeneous lipid bilayers. *Langmuir* **19**, 1788-1973 (2003).
65. Przybylo, M. et al. Lipid diffusion in giant unilamellar vesicles is more than 2 times faster than in supported phospholipid bilayers under identical conditions. *Langmuir* **22**, 9096-9 (2006).
66. Forstnerb, M.B., Käs, L. & Martin, D. Single lipid diffusion in Langmuir monolayers. *Langmuir* **17**, 567-570 (2001).
67. Yang, J. & Appelyard, J. The main phase transition of mica-supported phosphatidylcholine membranes. *Journal of Physical Chemistry B* **104**, 8097-8100 (2000).
68. Zachowski, A. Phospholipids in animal eukaryotic membranes: transverse asymmetry and movement. *Biochem J* **294 (Pt 1)**, 1-14 (1993).
69. Devaux, P.F. Static and dynamic lipid asymmetry in cell membranes. *Biochemistry* **30**, 1163-73 (1991).
70. Liu, J. & Conboy, J.C. 1,2-diacyl-phosphatidylcholine flip-flop measured directly by sum-frequency vibrational spectroscopy. *Biophys J* **89**, 2522-32 (2005).
71. John, K., Schreiber, S., Kubelt, J., Herrmann, A. & Muller, P. Transbilayer movement of phospholipids at the main phase transition of lipid membranes: implications for rapid flip-flop in biological membranes. *Biophys J* **83**, 3315-23 (2002).
72. Xie, A.F., Yamada, R., Gewirth, A.A. & Granick, S. Materials science of the gel to fluid phase transition in a supported phospholipid bilayer. *Phys Rev Lett* **89**, 246103 (2002).
73. Charrier, A. & Thibaudau, F. Main phase transitions in supported lipid single-bilayer. *Biophysical Journal* **89**, 1094-1101 (2005).
74. Wu, E.S., Jacobson, K. & Papahadjopoulos, D. Lateral diffusion in phospholipid multibilayers measured by fluorescence recovery after photobleaching. *Biochemistry* **16**, 3936-41 (1977).
75. Johnson, S.J. et al. Structure of an adsorbed dimyristoylphosphatidylcholine bilayer measured with specular reflection of neutrons. *Biophys J* **59**, 289-94 (1991).
76. Sonnleitner, A., Schutz, G.J. & Schmidt, T. Free Brownian motion of individual lipid molecules in biomembranes. *Biophysical Journal* **77**, 2638-2642 (1999).
77. Song, L. et al. Structure of staphylococcal alpha-hemolysin, a heptameric transmembrane pore. *Science* **274**, 1859-66 (1996).
78. Gouaux, J.E. et al. Subunit stoichiometry of staphylococcal alpha-hemolysin in crystals and on membranes: a heptameric transmembrane pore. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 12828-31 (1994).
79. Malghani, M.S., Fang, Y., Cheley, S., Bayley, H. & Yang, J. Heptameric structures of two alpha-hemolysin mutants imaged with in situ atomic force microscopy. *Microsc Res Tech* **44**, 353-6 (1999).
80. Chalmeau, J., Monina, N., Shin, J., Vieu, C. & Noireaux, V. alpha-Hemolysin pore formation into a supported phospholipid bilayer using cell-free expression. *Biochim Biophys Acta* **1808**, 271-8 (2011).
81. Bakas, L., Ostolaza, H., Vaz, W.L. & Goni, F.M. Reversible adsorption and nonreversible insertion of Escherichia coli alpha-hemolysin into lipid bilayers. *Biophys J* **71**, 1869-76 (1996).
82. Wallin, E. & von Heijne, G. Genome-wide analysis of integral membrane proteins from eubacterial, archaean, and eukaryotic organisms. *Protein Science* **7**, 1029-1038 (1998).

83. Paulsen, I.T., Sliwinski, M.K., Nelissen, B., Goffeau, A. & Saier, M.H. Unified inventory of established and putative transporters encoded within the complete genome of *Saccharomyces cerevisiae*. *Febs Letters* **430**, 116-125 (1998).
84. Tamm, L.K. Lateral Diffusion and Fluorescence Microscope Studies on a Monoclonal-Antibody Specifically Bound to Supported Phospholipid-Bilayers. *Biochemistry* **27**, 1450-1457 (1988).
85. Ofarrell, P.H. High-Resolution 2-Dimensional Electrophoresis of Proteins. *Journal of Biological Chemistry* **250**, 4007-4021 (1975).
86. Klose, J. Protein Mapping by Combined Isoelectric Focusing and Electrophoresis of Mouse Tissues - Novel Approach to Testing for Induced Point Mutations in Mammals. *Humangenetik* **26**, 231-243 (1975).
87. Santoni, V., Molloy, M. & Rabilloud, T. Membrane proteins and proteomics: Un amour impossible? *Electrophoresis* **21**, 1054-1070 (2000).
88. Frye, L.D. & Edidin, M. The rapid intermixing of cell surface antigens after formation of mouse-human heterokaryons. *Journal of Cell Science* **7**, 319-335 (1970).
89. Sukhorukov, V.M. et al. Determination of protein mobility in mitochondrial membranes of living cells. *Biochim Biophys Acta* **1798**, 2022-32 (2010).
90. Vaz, W.L., Criado, M., Madeira, V.M., Schoellmann, G. & Jovin, T.M. Size dependence of the translational diffusion of large integral membrane proteins in liquid-crystalline phase lipid bilayers. A study using fluorescence recovery after photobleaching. *Biochemistry* **21**, 5608-12 (1982).
91. Thompson, J.R., Heron, A.J., Santoso, Y. & Wallace, M.I. Enhanced stability and fluidity in droplet on hydrogel bilayers for measuring membrane protein diffusion. *Nano Lett* **7**, 3875-8 (2007).
92. Smith, L.M., Rubenstein, J.L., Parce, J.W. & McConnell, H.M. Lateral diffusion of M-13 coat protein in mixtures of phosphatidylcholine and cholesterol. *Biochemistry* **19**, 5907-11 (1980).
93. Ramadurai, S. et al. Lateral diffusion of membrane proteins. *Journal of the American Chemical Society* **131**, 12650-6 (2009).
94. Peters, R. & Cherry, R.J. Lateral and rotational diffusion of bacteriorhodopsin in lipid bilayers: experimental test of the Saffman-Delbruck equations. *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**, 4317-21 (1982).
95. Chang, C.H., Takeuchi, H., Ito, T., Machida, K. & Ohnishi, S. Lateral Mobility of Erythrocyte-Membrane Proteins Studied by the Fluorescence Photobleaching Recovery Technique. *Journal of Biochemistry* **90**, 997-1004 (1981).
96. Saffman, P.G. & Delbruck, M. Brownian motion in biological membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **72**, 3111-3 (1975).
97. Gambin, Y. et al. Lateral mobility of proteins in liquid membranes revisited. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 2098-102 (2006).
98. Tanaka, M., Hermann, J., Haase, I., Fischer, M. & Boxer, S.G. Frictional drag and electrical manipulation of recombinant proteins in polymer-supported membranes. *Langmuir* **23**, 5638-5644 (2007).
99. Monson, C.F., Pace, H.P., Liu, C.M. & Cremer, P.S. Supported Bilayer Electrophoresis under Controlled Buffer Conditions. *Analytical Chemistry* **83**, 2090-2096 (2011).
100. Smith, E.A. et al. Lipid bilayers on polyacrylamide brushes for inclusion of membrane proteins. *Langmuir* **21**, 9644-50 (2005).

Matériels & Méthodes



3.1 Structure des phospholipides utilisés

Les deux phospholipides zwitterioniques (tête polaire phosphatidylcholine : un groupe phosphate et une amine quaternaire) utilisés sont des phospholipides synthétiques qui ont une structure identique avec deux chaînes carbonées symétriques, mais de longueur différente. Ils sont donnés dans le **Tableau 1**, avec leur température de transition gel-fluide :

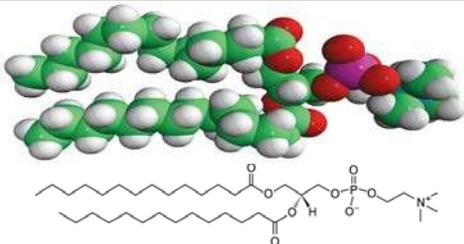
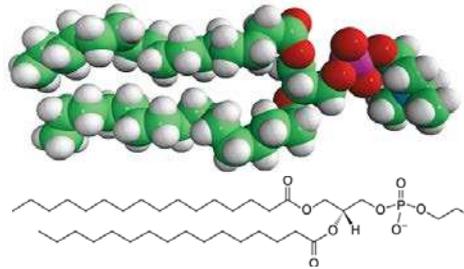
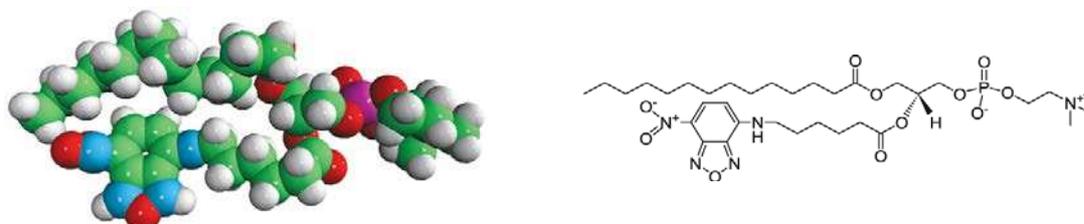
structure	nom	notation	nombre de carbones	T _m
	1,2-Dimyristoyl- <i>sn</i> - Glycero-3- Phosphocoline	DMPC	14	24°C
	1,2-Dipalmitoyl- <i>sn</i> - Glycero-3- Phosphocoline	DPPC	16	41.5° C

Tableau 1 : Structure du DMPC et du DPPC d'après Avanti Polar Lipids® (avantilipids.com)

Pour toutes les expériences menées dans cette étude, nous avons utilisé comme fluorophore du phospholipide le groupement fluorescent NBD (7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl) greffé en substitution de la partie terminale d'une des chaînes carbonées. Le groupement n'étant pas chargé, le phospholipide reste zwitterionique.



En fonction du phospholipide utilisé, nous avons choisi le phospholipide marqué ayant la structure la plus similaire possible à celle de son homologue non marqué de façon à perturber le moins possible les propriétés des bicouches :

- marqueur fluorescent du DMPC : 14 : 0-06 :0 PC-NBD
- marqueur fluorescent du DPPC : 16 : 0-12 :0 PC-NBD

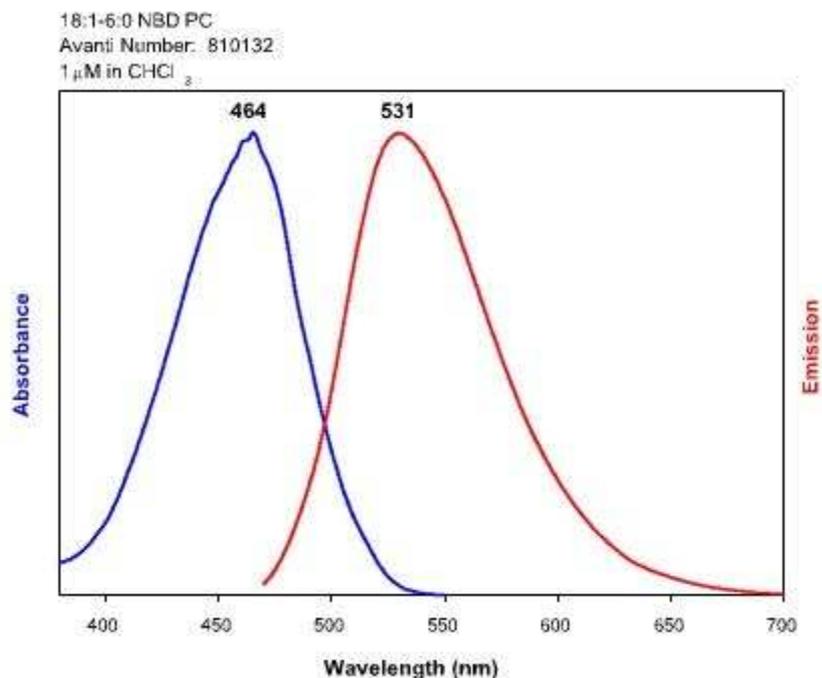


Figure 1 : Spectre d'émission du NBD.

Les lipides (Avantis polar lipid, USA) sont reçus sous forme de poudre ou de solution dans le chloroforme. Ils sont solubilisés ou dilués voire aliquotés en utilisant du chloroforme stabilisé à l'éthanol. Les récipients sont des tubes en verre dont le joint du bouchon est en téflonTM. Ces précautions sont nécessaires dans la mesure où les spectres RMN (¹H et ¹³C) faits au CINaM dans l'équipe de Frédéric FAGES ont montré la persistance de la présence du stabilisant du chloroforme quand ce n'était pas l'alcool ainsi que celle de substances dissoutes quand la solution avait été stockée dans des tubes coniques en matière plastique pourtant 'réputés' pour leur tenue au solvant. Nous voulions ainsi éviter toute pollution de la solution de phospholipides, la présence de seulement quelques molécules non désirées pouvant dramatiquement affecter la tension de surface de la monocouche et les interactions avec le support, affectant par la suite les propriétés dynamiques de la bicouche.

3.2 Préparation des échantillons

3.2.1 Balance de Langmuir

3.2.1.1 Principe

Un film de Langmuir est une monocouche de molécules tensioactives à la surface de l'eau. C'est un système bidimensionnel.

L'adsorption de molécules amphiphiles à la surface de l'eau donne naissance à un film monomoléculaire qui abaisse la tension de surface et a un effet stabilisateur de l'interface. On définit la pression de surface par la diminution de la tension de surface de la sous-phase pure γ_0 par le film adsorbée, soit :

$$\pi = \gamma_0 - \gamma \quad (\text{N/m})$$

où γ est la tension de surface en présence des molécules tensioactives.

La pression de surface π est mesurée en permanence, dans notre cas grâce à un dispositif de type 'lame de Wilhemy'. Une des extrémités de la lame est plongée dans le liquide, l'autre est reliée à un capteur de force. Il s'exerce sur la lame une force verticale dirigée vers le bas. Cette force est la résultante du poids de la lame, de la poussée d'Archimède et de la force due à la tension superficielle. La résolution de nos mesures est de 0,1 mN/m.

L'indicateur le plus important des propriétés des monocouches de molécules amphiphiles est donné par la mesure de la pression de surface en fonction de l'aire A qu'elles occupent à l'interface eau-air. Ces mesures sont effectuées à température constante et permettent de tracer des isothermes de compression $\pi = f(A)$. Elles sont obtenues en comprimant le film à l'aide de barrières mobiles (se déplaçant à vitesse constante) tout en mesurant la pression de surface. L'aire moléculaire est la surface moyenne disponible pour chaque molécule amphiphile constituant le film. Elle dépend de la taille de la tête polaire mais aussi de l'encombrement des chaînes. Les barrières mobiles et la cuve sont en téflonTM afin d'empêcher l'adsorption des molécules. Nous utilisons des barrières en téflon DELRINTM : elles ont été recouvertes d'un film de polymère plus hydrophile que le téflonTM mais qui n'entraîne pas l'adsorption des lipides. Du fait de leur caractère légèrement hydrophile, l'eau forme un ménisque positif (mouillant) et non pas négatif. On peut ainsi atteindre des pressions de surface plus élevées sans que le film de Langmuir ait tendance à 'plonger' sous les barrières.

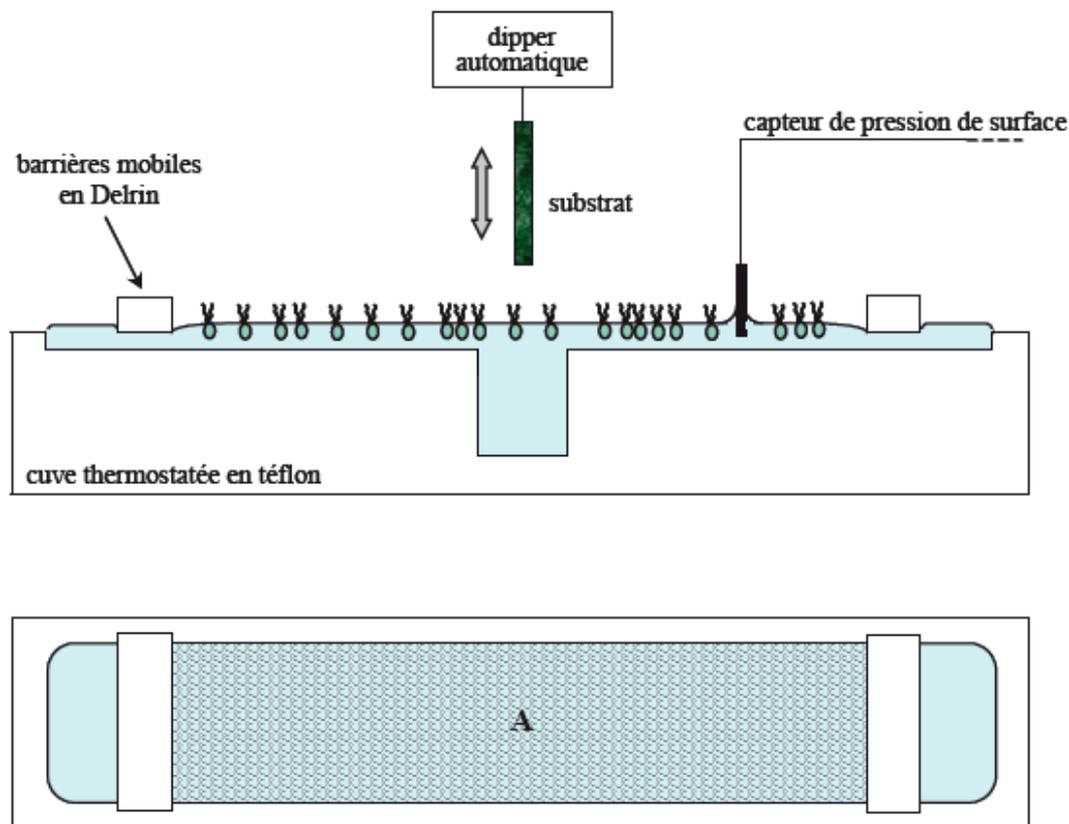


Figure 2 : Illustration de la balance de Langmuir (KSV Minitrough). Les molécules tensio-actives occupent une aire A délimitée par les barrières mobiles.

Avant tout dépôt, l'enregistrement d'une isotherme de compression est une étape fondamentale préliminaire qui révèle l'existence de plusieurs phases, avec des transitions entre celles-ci, qui apparaissent sur les isothermes au travers de paliers et de ruptures de pente (Figure 2). Si l'on continue à augmenter la compression après un certain seuil, le film s'effondre (collapse): les interactions entre molécules sont si importantes qu'afin de minimiser leur énergie, elles forment des multicouches et/ou des micelles.

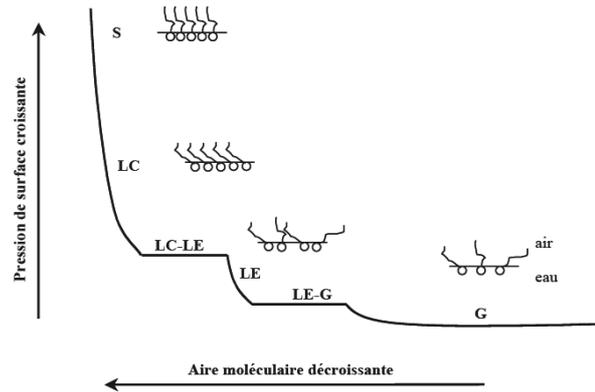


Figure 3 : Isotherme de compression typique d'acide gras. En comprimant la monocouche, les molécules passent successivement d'un état gazeux (G) à une phase liquide expansé (LE) puis liquide condensé (LC). A plus haute densité, on atteint l'état solide (S) et si on continue la compression, la monocouche s'effondre (pression de 'collapse') et forme des structures 3D.

Nous montrons ci-dessous les isothermes de compressions des deux phospholipides utilisés dans ce travail. La Figure 4 (a) concerne la compression d'une monocouche de DMPC sur une sous-phase constituée d'eau déionisée (résistance > 18 MΩ) à différentes températures. Quand la pression augmente, on observe clairement la zone lipide expansé (LE) puis le plateau correspondant à la coexistence liquide expansé + liquide condensé (LE + LC) et enfin une montée abrupte qui traduit le passage à une phase 100% LC puis solide (S). La position du plateau dépend de la température.

A 15°C, 30mN/m correspond à la fin de la phase LE, 35mN/m à la fin de la phase LE + LC. A 40 mN/m, la monocouche est en phase LC, pas très éloignée de sa pression d'effondrement (≈42 mN/m).

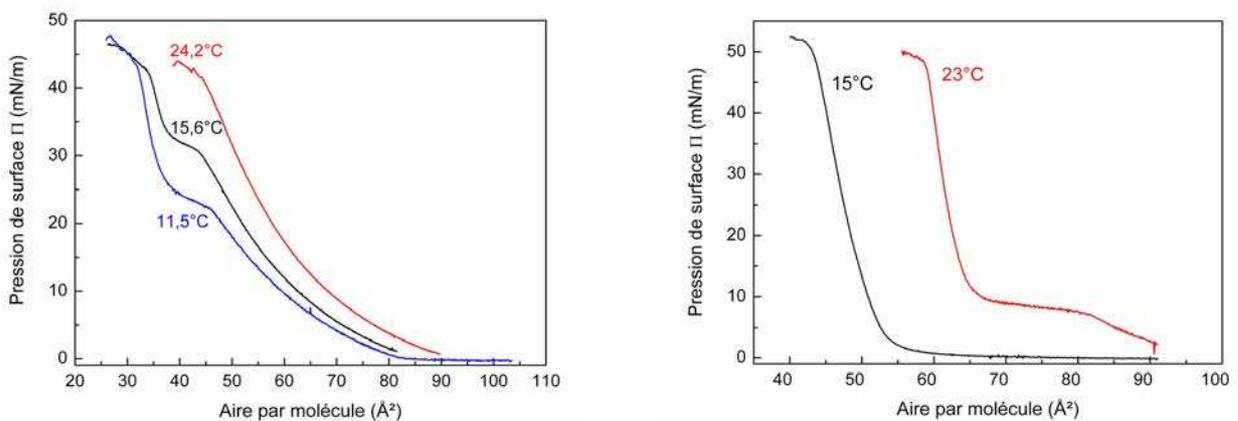


Figure 4 : Isothermes de compression du DMPC avec 0.1% de PC-NBD (a) et du DPPC avec 0.1% de PC-NBD (b) sur une sous-phase d'eau déionisée à différentes températures.

La **Figure 4** (b) montre les isothermes de compression du DPPC sur sous-phase aqueuse à deux températures. On note qu'à 15°C la monocouche est dans le régime LC 100% dès 10 mN/m. Sa pression d'effondrement est de l'ordre de 52 mN/m.

3.2.1.2 Transfert de Langmuir-Blodgett

Le principe général du dépôt de Langmuir-Blodgett (LB) est représenté sur la **Figure 2**. Les phospholipides sont dissous dans un solvant très volatil, dans notre cas nous avons utilisé du chloroforme, de façon à obtenir une solution de concentration de 1 mg/mL. Les molécules (environ 40 μ L de solution) sont répandues à la surface de la cuve contenant une solution aqueuse, se placent naturellement à l'interface eau-air avec la tête hydrophile plongeant dans la sous-phase aqueuse et la partie hydrophobe émergeant. Après évaporation du solvant, au bout d'une quinzaine de minutes, la monocouche est comprimée lentement (5 mm/min) jusqu'à une pression de surface préalablement choisie par l'utilisateur. Lors des transferts sous-phase/support, cette pression est maintenue constante grâce à l'asservissement des barrières.

Après stabilisation de la monocouche, le transfert a lieu en sortant lentement le support de la cuve (5 mm/min). Les phospholipides sont entraînés à la surface du support hydrophile. En principe, une deuxième monocouche, d'orientation inverse, peut être déposée sur la première en redescendant le support dans la cuve (**Figure 5**).

A tout instant, la technique permet de suivre le taux de transfert instantané des molécules sur toute la longueur du support. Le taux de transfert global est calculé en fin de dépôt et donne une indication sur la qualité des monocouches. Il est défini par :

$$T = \frac{\text{aire balayée par les barrières}}{\text{aire du substrat recouverte par la monocouche}}$$

Idéalement, le taux de transfert est de 1. Un taux inférieur signifie que la monocouche déposée est incomplète et un taux supérieur indique que la monocouche est plus dense sur le support solide qu'à l'interface eau/air. Cette forte affinité entre les lipides et le support induit une organisation plus compacte des molécules à la surface du support. Il n'est pas rare d'observer un passage de la phase LE sur la sous-phase à une phase gel sur le support. Il est

communément admis que les transferts, type Langmuir-Blodgett, sont difficiles à réaliser lorsque les monocouches ne se trouvent pas en phase LC, les films devant présenter une certaine rigidité pour passer avec succès d'une surface à l'autre. C'est une des raisons qui ont amené les expérimentateurs à développer la technique de fabrication de bicouches par éclatement des vésicules dans le cas de l'EggPC. Ce lipide est fluide à toutes températures et réputé impossible à transférer par Langmuir-Blodgett. Nous verrons plus tard que les phénomènes sont plus subtils.

Grâce à cette méthode, il est possible de déposer une troisième couche de lipides. C'est un maximum. Si l'on tente de transférer une quatrième couche verticalement, la troisième couche est « pelée » et repart à l'interface eau-air. Les interactions lipides/support-déjà-recouvert deviennent probablement trop faibles pour permettre le dépôt.

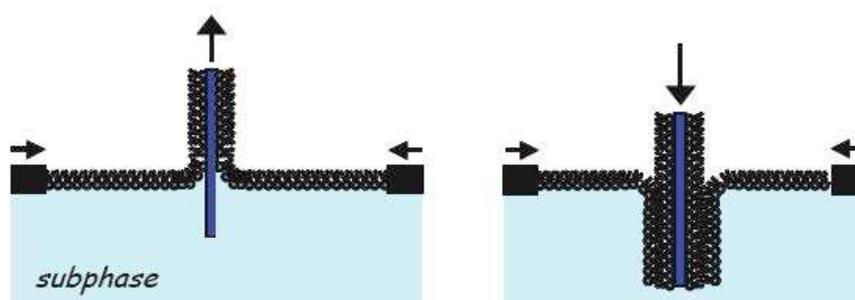


Figure 5: Principe de formation d'une bicouche par Langmuir-Blodgett.

3.2.1.3 Transfert de Langmuir-Schaeffer

Pour former une quadricouche, et également « refermer » une bicouche dans beaucoup de nos expériences, nous avons utilisé la méthode de Langmuir-Schaeffer (LS).

Le support est amené horizontalement, parallèlement à la surface, au contact de la monocouche¹ (**Figure 6**). Il peut s'agir d'un support hydrophobe (remonté du côté air) ou hydrophile comme dans notre cas (descendu du côté eau).

Tous nos dépôts se font à la même pression que la ou les monocouches précédemment transférés.

L'évaluation du taux de transfert se fait grâce à la variation de l'aire entre les barrières.

A l'inverse de la méthode de Langmuir-Blodgett, cette méthode est hors-équilibre donc irréversible et le taux de transfert est quasiment indépendant de la pression de dépôt.

Le support qui porte la bicouche est ensuite placé, sans jamais voir l'air, dans une cellule liquide adaptée pour les mesures de FRAPP.

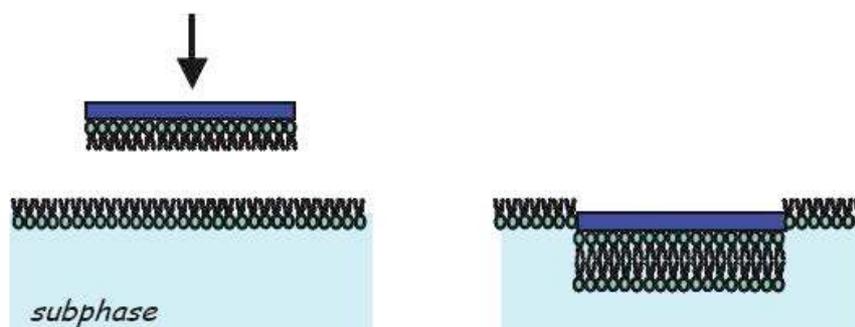


Figure 6 : Principe de formation d'une bicouche ou d'une quadricouche par Langmuir-Schaeffer.

Suivant la nomenclature rencontrée dans la littérature, une bicouche supportée unique est dite unilamellaire. Une quadricouche peut également être dénommée double bicouche.

La technique de Langmuir-Blodgett comporte de nombreux avantages puisqu'elle permet le contrôle de nombreux paramètres lors des dépôts comme la température, la pression, la vitesse du support... Elle donne accès à des informations quantitatives sur la qualité des monocouches et permet de faire des structures multicouches en variant la composition de chaque feuillet sur de grandes surfaces.

Vu les difficultés rencontrées, dans certaines conditions, pour le transfert de la seconde monocouche, nous avons (sauf mention différente) fabriqué toutes nos bicouches de DMPC par un transfert (LB + LS) à 30 mN/m et 15 °C. Ces conditions constituent un bon compromis pour permettre aux phospholipides de se déposer au mieux sur le support solide à partir d'une monocouche (en phase LE), ayant néanmoins une certaine rigidité, et à une pression très inférieure à la pression d'effondrement. Pour le DPPC, en phase LC dès 10 mN/m, le choix était plus réduit. Les transferts ont eu lieu à 40 mN/m à 15°C, soit par (LB+ LS) soit par double LB.

3.2.2 Multi- bicouches

Pour certaines expériences nous avons préparé des multi-bicouches d'EggPC ou de DMPC selon la méthode suivante :

Une goutte de solution de phospholipides dans le chloroforme (environ 100 µl à 1mg/ml) est déposée sur le support. Le solvant est évaporé par tirage sous vide pendant 1 heure. La multi-bicouche est formée en laissant le film se réhydrater dans le solvant (eau ou PBS) pendant 1

heure. Dans ces conditions, le nombre de bicouches formé est estimée à 500 (voir calcul dans Annexes).

3.2.3 Supports

Pour l'élaboration des bicouches, nous avons utilisé du mica muscovite (Metafix, Montdidier, France) et des lames de microscope en verre (Menzel-Gläser, Mannheim, Allemagne).

La muscovite est une espèce minérale du groupe des silicates, sous-groupe des phyllosilicates composée de silicate hydroxylé d'aluminium et de potassium de formule $Al_2[(OH,F)_2|AlSi_3O_{10}]$ contenant des traces de Cr, Li, Fe, V, Mn, Na, Cs, Rb, Ca, Mg, H₂O. C'est le minéral le plus commun du groupe des micas. Les phyllosilicates sont construits par empilement de couches tétraédriques (« T ») où les tétraèdres partagent trois sommets sur quatre (les oxygènes « basaux »), le quatrième sommet (l'oxygène « apical ») étant relié à une couche octaédrique (« O ») occupée par des cations différents (Al, Mg, Fe, Ti, Li, etc.). L'union des couches T et des couches O forme des feuillets, qui représentent l'unité de clivage des phyllosilicates. Dans la couche T, l'aluminium peut se substituer au silicium, auquel cas la charge négative du groupement est plus élevée.

Les échantillons de mica sont ajustés à la taille de la cellule liquide utilisée pour les mesures de FRAPP. Ils ont fraîchement clivés avant tout dépôt, des deux côtés pour les transferts de Langmuir. Le clivage des supports permet d'obtenir aisément des surfaces propres, presque neuves, planes à l'échelle moléculaire.

Le protocole de nettoyage adopté pour les lames de verre est le suivant :

- rinçage abondant à l'eau du robinet et rinçage à l'aide d'un pinceau en soie puis avec de l'eau déionisée (18 MΩ)
- immersion dans une solution de soude alcoolique fraîche (environ 50% solution NaOH saturée et 50% éthanol) sous agitation pendant 10 minutes et sonication dans la même solution de soude alcoolique pendant 10 minutes
- rinçage abondant puis 3 x (sonication dans de l'eau déionisée pendant 10 minutes)
- rinçage puis conservation dans de l'eau déionisée à 4°C.

Par cette méthode le verre est rendu propre et très hydrophile. Les lames ne sont jamais utilisées plus de deux jours après leur nettoyage.

Effet du nettoyage du support en verre

La méthode de nettoyage la plus fréquemment décrite dans la littérature est celle au « piranha », mélange aqueux concentré d'acide sulfurique et de bichromate de potassium.

Dans sa thèse², C. Scomparin fait état de problèmes de reproductibilité des mesures de coefficient de diffusion, selon le délai d'utilisation des lames de verre (de 1 à 5 jours), quand elle utilisait cette méthode. Ces problèmes ont disparus à partir du moment où la méthode de nettoyage à la soude alcoolique a été adoptée.

D'après la littérature, une lame, nettoyée en milieu basique et (facilement) rincée à l'eau déionisée, a immédiatement un potentiel zêta constant. Le mélange basique dissout une mince pellicule de verre. La lame nettoyée 20 minutes à la soude alcoolique présente une surface ayant de nombreuses aspérités.

Pour une lame nettoyée en milieu acide et rincée, le potentiel zêta peut être instable pendant une quinzaine de jours. Une structure nanoporeuse apparaît lorsque le nettoyage au piranha était utilisé. Ceci pourrait expliquer l'instabilité au cours du temps du potentiel zêta, les nanopores « relarguant » petit à petit le mélange décapant. Une structure nanoporeuse apparaissait lorsque le nettoyage au piranha était utilisé. Ce relargage peut avoir un effet sur le comportement de la bicouche supportée (possible surconcentration locale d'acide).

Il est connu dans les salles de Travaux Pratiques qu'en analyse quantitative, une burette utilisée pour le dosage redox par le bichromate ne peut plus jamais être utilisée pour tout autre dosage chimique: la burette est « impossible » à nettoyer, le bichromate étant relargué « indéfiniment » au cours du temps.

3.3 La technique de FRAP

3.3.1 Principe

Le temps de retour de la fluorescence après photoblanchiment peut être mesuré dans tout système optiquement transparent. Nous avons optimisé notre montage pour pouvoir effectuer des mesures dans des systèmes à 2D dont la dimension qui correspond au trajet optique est de quelques nanomètres.

On entend par photoblanchiment l'ensemble des processus par lesquels une molécule perd sa faculté d'émettre de la fluorescence à la suite d'une (forte) excitation lumineuse. Lors du processus de fluorescence, la molécule absorbe un photon, passant d'un état électronique

fondamental (énergie la plus basse) à un état électronique excité (d'une énergie plus haute que celle de l'état initial d'un quantum $h\nu$). Elle peut alors se désexciter spontanément et retourner à son état fondamental en émettant un autre photon d'une énergie plus faible. Cependant, elle peut suivre d'autres voies de désexcitation, radiatives ou non, dont certaines peuvent conduire vers des états où la molécule quitte le cycle excitation émission de fluorescence. C'est le processus de photoblanchiment, ou photodestruction (*photobleaching* en anglais). La variété des événements possibles au sein de la structure électronique d'une molécule explique que, de façon générale, on ne connaisse pas les processus conduisant au photoblanchiment. Dans le cas du NBD, le photoblanchiment est irréversible à l'échelle de temps de nos mesures.

Ce phénomène photochimique intervient lorsque les molécules sont soumises à une forte intensité d'éclairage et augmente avec la durée de l'exposition. Le photoblanchiment produit une zone dont la fluorescence est quasiment nulle. C'est cette propriété qui est mise à profit dans la technique de FRAP.

3.3.2 Dispositif expérimental

La technique de FRAP est utilisée depuis 1976³ pour la mesure de la mobilité de molécules fluorescentes à l'échelle microscopique. Sa version basique (FRAP « en spot ») utilise un simple faisceau laser⁴. Elle consiste à illuminer fortement une région de l'échantillon de façon à photoblanchir les molécules fluorescentes situées dans cette région puis à observer, avec une puissance d'excitation beaucoup plus faible, l'évolution de la fluorescence en fonction du temps. Si les molécules sont mobiles, celles qui sont restées hors de la zone d'exposition vont diffuser dans la zone blanchie et *vice-versa*, ce qui va conduire à un recouvrement de la fluorescence dans la région observée. La cinétique et la forme de la courbe de retour de fluorescence permettent alors de déterminer, avec un modèle théorique adéquat, le coefficient de diffusion des marqueurs dans l'échantillon.

Le système que nous utilisons est un système de FRAP en franges (Fluorescence Recovery After Patterned Photobleaching), plus optimisé que les classiques FRAP. Il permet d'utiliser des densités de marqueurs fluorescents beaucoup plus faibles et de quantifier plus facilement les fractions mobiles et immobiles à l'aide d'un système de modulation en fréquence et d'un photomultiplicateur très sensible (gain 10^8). Grâce à ces franges et à la modulation on détecte un seul mode, ce qui permet d'étudier la dépendance du temps de recouvrement avec le vecteur d'onde.

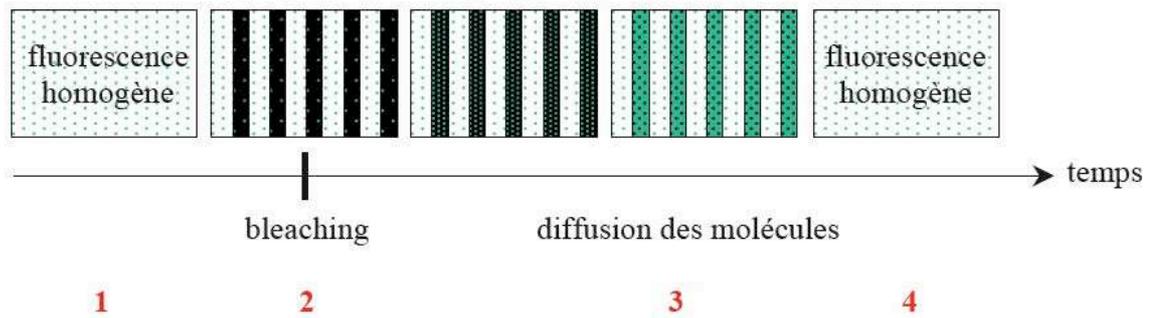


Figure 7 : Principe de la fluorescence après photoblanchiment.

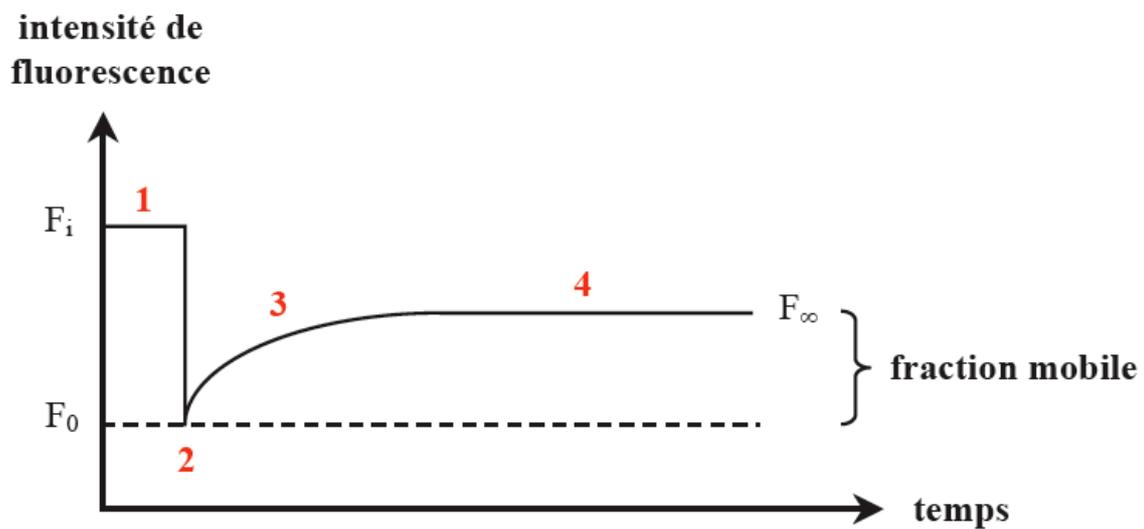


Figure 8: Courbe de remontée de la fluorescence

On définit la fraction mobile de molécules par (Figure 8) :

$$\text{Fraction mobile} = \frac{F_\infty - F_0}{F_i - F_0}$$

- où
- F_i est l'intensité initiale de fluorescence
 - F_∞ est la valeur asymptotique de la courbe
 - F_0 est la valeur juste après le photoblanchiment

En l'absence de fraction immobile, l'asymptote de la courbe de retour de fluorescence doit revenir à son état initial.

Description des différents éléments du dispositif :

- la source lumineuse est un laser Argon monomode ajustée à 488 nm (raie bleue)
- la variation d'intensité du faisceau laser qui induit le blanchiment des molécules est assurée par un dispositif comprenant une cellule de Pockels, située entre un polariseur et un analyseur croisé. Il va produire un éclair d'intensité très élevée (0,9 Watt) pendant un temps donné, typiquement 1 seconde. La cellule de Pockels est composée d'un matériau électro-optique dont les caractéristiques dépendent du champ électrique appliqué. Cette propriété permet de moduler les caractéristiques du faisceau laser (polarisation, intensité, phase) traversant la cellule.
- la lame semi-réfléchissante sépare le faisceau en deux et envoie un des faisceaux sur un miroir monté sur un déplaceur piézo-électrique. Les deux faisceaux sont recombinaés dans l'échantillon créant un réseau de franges d'interférence. Les franges oscilleront dans l'échantillon à la fréquence de vibration du piézo-électrique.
- la fluorescence est collectée par une fibre optique multibrins, connectée à un photomultiplicateur. Le signal est ensuite analysé via une détection synchrone qui va filtrer le signal en se basant sur la fréquence du miroir piézo-électrique (1 kHz).

Typiquement, une expérience se déroule de la façon suivante (**Figure 7**) :

Les molécules fluorescentes sont initialement réparties de façon homogène dans l'échantillon. Le photoblanchiment consiste à augmenter pendant un court instant l'intensité lumineuse grâce à la cellule de Pockels. Les faisceaux arrivent sur l'échantillon avec une intensité maximale et les molécules fluorescentes éclairées vont être photoblanchies (désactivation du fluorophore). Des franges sont ainsi « gravées » dans l'échantillon. Après le blanchiment, l'intensité des faisceaux est réduite de façon à seulement exciter la fluorescence de l'échantillon. On forme toujours des franges d'interférence dans l'échantillon, mais celles-ci ne « s'impriment » plus. Elles permettent uniquement la lecture du retour de fluorescence par excitation des fluorophores. A l'aide du mouvement oscillant du miroir piézo-électrique, les franges du faisceau de lecture passeront par des positions où elles sont en phases avec celles qui sont gravées (l'intensité de fluorescence collectée sera alors maximum) à des positions où elles sont en opposition de phase (l'intensité sera minimum). Cette différence d'intensité donne le contraste. La détection synchrone permet de filtrer le signal reçu en se basant sur la fréquence de vibration du miroir piézo-électrique. Après le blanchiment, les molécules, soumises au mouvement brownien, diffusent dans l'échantillon, passant d'une frange à l'autre. Le contraste enregistré va donc diminuer avec un temps caractéristique dépendant de

la largeur des franges, à partir duquel on déterminera le coefficient de diffusion des molécules. L'utilisation du même interfrange pour le blanchiment et la lecture du signal garantissent qu'ils sont caractérisés tous les deux par la même longueur d'onde spatiale.

L'interfrange est donné par :

$$i = \frac{\lambda}{2 \sin \frac{\theta}{2}}$$

où θ est l'angle entre les deux faisceaux incidents.

Les caractéristiques du vecteur d'onde q dans l'espace réciproque sont :

$$q = \frac{2\pi}{i} \quad \text{ou} \quad q = \frac{4\pi}{\lambda} \sin \frac{\theta}{2}$$

Rappels sur la diffusion brownienne :

La première loi de Fick relie le flux de diffusion d'une espèce au gradient de sa concentration :

$$J = -D \frac{dC}{dx} \quad (1)$$

La seconde loi de Fick exprime le bilan des entrées-sorties dans un petit volume :

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D \frac{\partial^2 C}{\partial x^2} \quad (2)$$

Pour une diffusion brownienne, l'équation de diffusion des molécules dans un milieu à trois dimensions est donné par :

$$\frac{\partial c(\vec{r}, t)}{\partial t} = D \nabla^2 c(\vec{r}, t) \quad (3)$$

où $c(\vec{r}, t)$ est défini comme la concentration en fluorophores au temps t dans petit volume de coordonnées \vec{r} , et D le coefficient de diffusion. Dans un milieu infini, la transformée de Fourier de l'équation 3 donne :

$$\frac{\partial C(\vec{q}, t)}{\partial t} = -Dq^2 C(\vec{q}, t) \quad (4)$$

Avec $C(\vec{q}, t) = (2\pi)^{-3/2} \int c(\vec{r}, t) \exp(i\vec{q}\cdot\vec{r}) d^3r$

La solution de l'équation (4) est :

$$C(\vec{q}, t) = C(\vec{q}, 0) \exp(-Dq^2 t) \quad (5)$$

où $C(\vec{q}, 0)$ est la concentration initiale en molécules fluorescentes dans l'espace de Fourier juste après le photoblanchiment.

Les courbes de retour de fluorescence sont données par :

$$C(t) = C_\infty + (C_0 - C_\infty) \exp^{-t/\tau} \quad (6)$$

où C_0 et C_∞ correspondent aux contrastes juste après et infiniment longtemps après le photoblanchiment. Le temps caractéristique (τ) de retour de fluorescence par diffusion brownienne est donc :

$$\tau = \frac{1}{Dq^2}$$

En effectuant les mesures à différents interfranges, on peut tracer le temps de relaxation en fonction de l'interfrange au carré. Une régression linéaire, que nous appelons *loi de diffusion*, passant par l'origine est caractéristique de la diffusion brownienne d'une seule espèce et permet d'avoir directement accès au coefficient de diffusion avec une pente de $\frac{1}{4\pi D^2}$. La vérification de la proportionnalité entre τ et i^2 fournit un moyen direct de discrimination entre une relaxation par un mouvement purement brownien et un autre type de relaxation (convection, photoblanchiment irréversible)⁴. Nous avons particulièrement étudié les lois de diffusion car il existe assez peu de références sur ce point dans la littérature.

Pour notre étude, nous avons utilisé une gamme de franges allant de 1 à 130 μm . Au delà de ces valeurs, les mesures deviennent difficiles soit parce que les temps d'acquisition

deviennent trop longs et que la dérive du dispositif risque de fausser les mesures, soit parce que le phénomène de relaxation devient trop rapide pour être détecté par le dispositif.

Remarques sur les limitations de la technique :

- il faut éviter le photoblanchiment des molécules pendant la mesure qui risquerait de modifier la courbe de retour de fluorescence et de masquer certains phénomènes. Si au cours de la lecture les fluorophores sont dégradés, on obtiendra des temps de diffusion apparents plus courts.
- le temps de photoblanchiment doit être court par rapport au temps caractéristique de diffusion des fluorophores.
- la région photoblanchie doit être petite par rapport à la taille de l'échantillon si l'on veut éviter les « effets de bords ».

La **Figure 9** récapitule le montage de FRAPP utilisé dans cette étude.

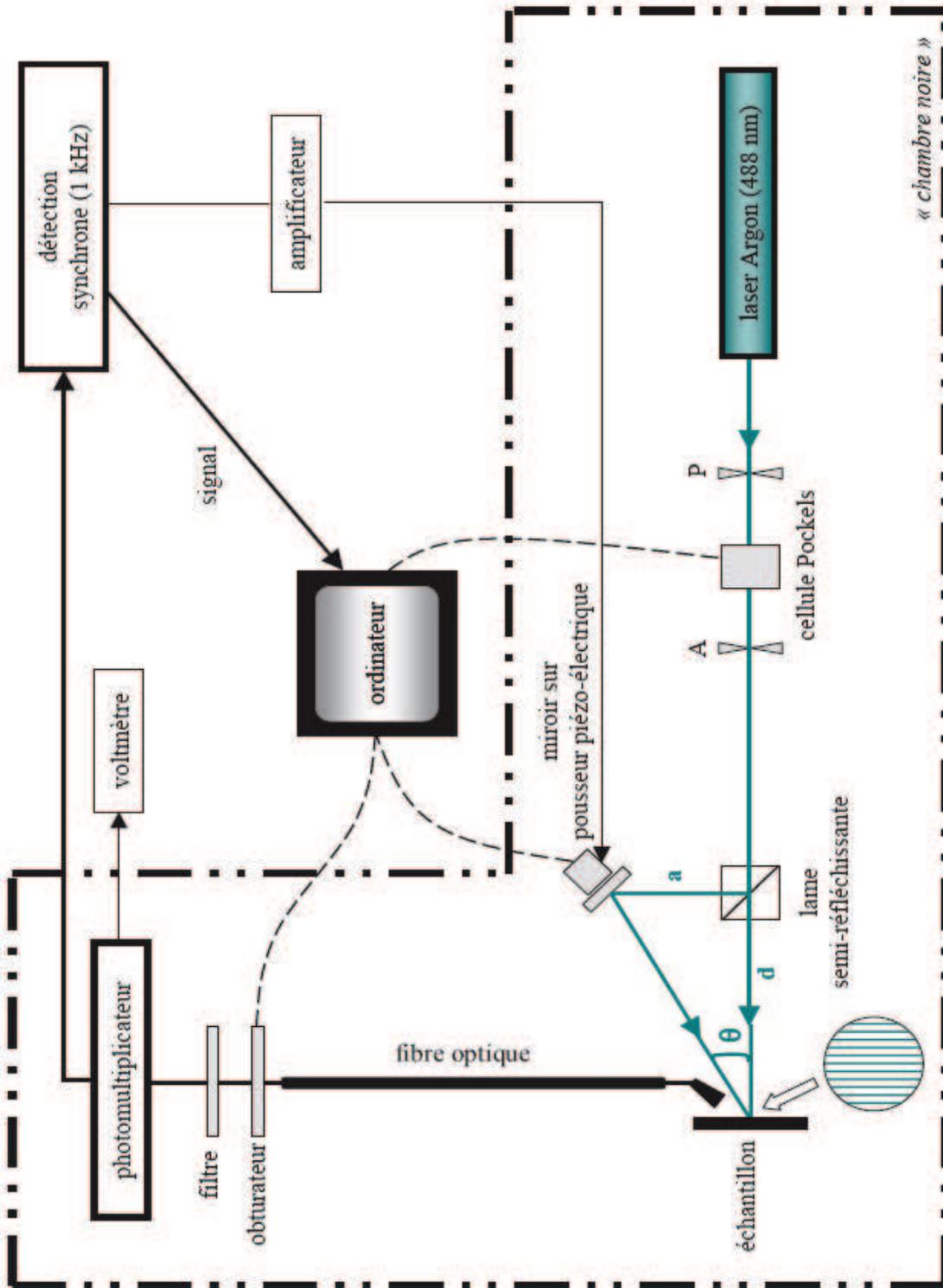


Figure 9 : Montage de FRAPP

3.3.3 Mesures en température

La cellule de FRAPP a été fabriquée dans notre laboratoire. Formée d'un réservoir parallélépipédique formé par deux plaques de verre et des entretoises sur 3 cotés, ces dimensions sont 30 mm x 20 mm x 5 mm correspondant à un volume de 3 ml. Un élément Peltier et un radiateur permettent soit de refroidir soit de chauffer la cellule. La lame en mica (ou en verre) supportant la BLS est introduite dans la cellule en milieu aqueux ou tamponné, de sorte que la membrane ne soit jamais à l'air et soit finalement positionnée sur la face avant de la cellule.

La température est mesurée à l'aide d'un thermocouple placé directement dans la cuve (sensibilité : 0.1°C). Pour les mesures de FRAPP, la stabilité thermique est atteinte environ 30 minutes après fixation de la consigne.

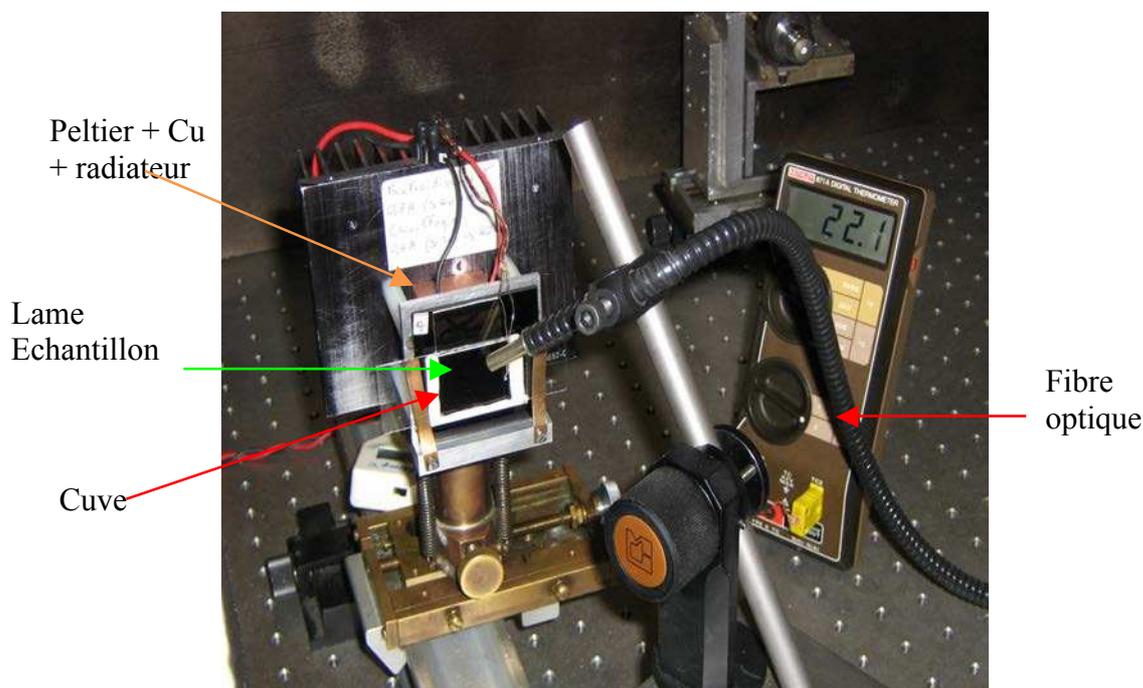


Figure 10 Photographie de la cellule de mesure et du dispositif de thermostatisation

Sur le cliché **Figure 10** on distingue la lame de verre portant la bicouche. Celle-ci est immergée dans une cuve remplie d'eau (3 ml). L'ensemble est adossé à un élément Peltier monté sur un bloc de cuivre et un radiateur, permettant la thermostatisation de l'échantillon. On aperçoit également le thermocouple plongeant dans la cuve, ainsi que la fibre optique qui permet la collecte du signal. Ce dispositif, rapporté aux dimensions de la bicouche (2.5 cm ×

2 cm × 4 nm), assure une bonne inertie thermique au système. La température reste stable pendant toute la durée de l'acquisition à ± 0.1 °C.

3.3.4 Qualité des mesures effectuées

Des mesures de coefficients de diffusion sur des bicouches lipidiques supportées contenant de 0.1 % à 1 % en poids de PC-NBD ont été faites dans notre laboratoire². Aucune différence significative n'a été constatée. Dans la littérature, certaines expériences utilisent des teneurs en lipide marqué allant jusqu'à 4 %. Il a été montré que, dès 1 %, une compression, telle que nous la pratiquons avant transfert sur cuve de Langmuir, pouvait induire la formation de nano-domaines par séparation de phase⁵, ce qui ne manquerait pas d'affecter la dynamique de la bicouche. De ce fait, pour toutes nos préparations, nous avons utilisé un taux de marquage en fluorophore égal à 0.1%. Ce faible taux de marquage évite ainsi ce type d'artefact.

L'incertitude sur les mesures de FRAP est estimée à 10%.

La fraction immobile mesurée sur les courbes de retour de fluorescence reste dans la majorité des cas quasiment inexistante (≤ 4 %). Les seuls cas où une valeur plus grande a été atteinte correspondaient à l'existence d'une seconde composante qui apparaissait comme une fraction immobile à cette valeur de q (ex : bicouche sur mica). Le choix d'une valeur de q appropriée a alors permis la détermination correcte du temps de cette composante.

3.4 Signaux et analyse

La courbe $D = f(T)$ complète pour des conditions données (température, interfrange, bicouche, support, solvant) est effectuée sur le même échantillon dans la même journée. Chaque point correspond à la moyenne d'un minimum de cinq mesures. Typiquement, les premières mesures sont effectuées sur l'échantillon en phase gel, à la température la plus basse. Il est ensuite progressivement chauffé (l'équilibre thermique est plus rapidement atteint). Dans quelques expériences, nous avons effectuées les mesures en refroidissant (de la température la plus haute vers la plus basse). Nous n'avons jamais observé d'hystérésis. Ceci indique, que avec ce montage expérimental et ce mode opératoire, nous effectuons des mesures sur un système qui est à l'équilibre thermodynamique.

La **Figure 11** montre des signaux typiques de recouvrement de fluorescence. Le mouvement diffusif purement brownien d'une seule espèce se traduit par un signal de relaxation du contraste de fluorescence en fonction du temps monoexponentiel, celui de deux espèces par un signal biexponentiel.

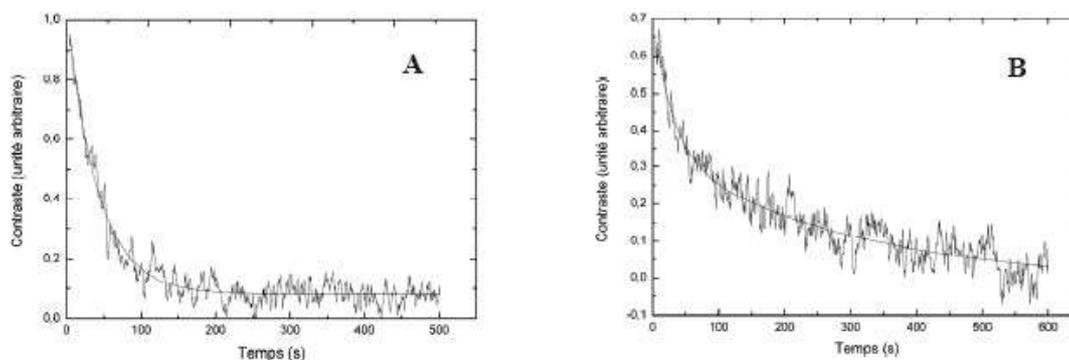


Figure 11 : Allure typique d'un signal de recouvrement monoexponentiel (A : $\tau \sim 39.2$ s, $q = 1035$ cm⁻¹) et biexponentiel (B : $\tau_1 \sim 33.4$ s, $\tau_2 \sim 317.4$ s, $q = 2548$ cm⁻¹) et de leur meilleur ajustement.

3.5 La technique de DSC

Les techniques d'analyse thermique (thermogravimétrie, dilatométrie, thermomécanique, thermo-optique ou calorimétrie) sont adaptées pour la caractérisation du comportement de matériaux liquides, solides cristallins ou amorphes, soumis à une variation de température dans une ambiance contrôlée. Le principe de ce groupe de techniques est basé sur la détermination, en fonction de la température, de paramètres physiques tels que masse, volume, capacité thermique, propriétés spectromécaniques ou autres propriétés structurales.

La microcalorimétrie différentielle en programmation linéaire de température ou, en anglais, *Differential Scanning Calorimetry (DSC)* (**Figure 12**) [Appareil DSC1 Mettler Toledo[®]], est une des techniques d'analyse thermique les plus utilisées pour la caractérisation de changement d'état, de phase ou de structure d'ingrédients alimentaires (eau, lipides, sucres, protéines...).

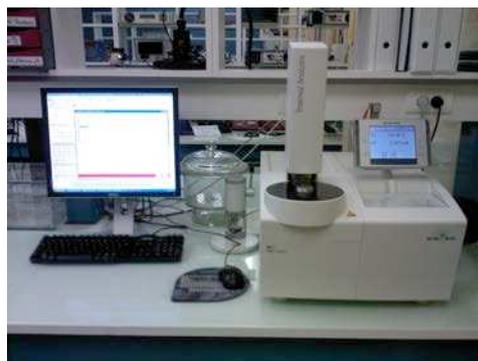


Figure 12 : Photo de l'appareil DSC1 Mettler Toledo[®]

Cet appareil possède un capteur très puissant qui est le capteur HSS7 (**Figure 13**). En effet, c'est un capteur céramique avec 120 thermocouples répartis sur 3 couches qui augmentent la sensibilité et diminuent le bruit à quelques centaines de nano watts pour offrir des performances proches d'une μ DSC.

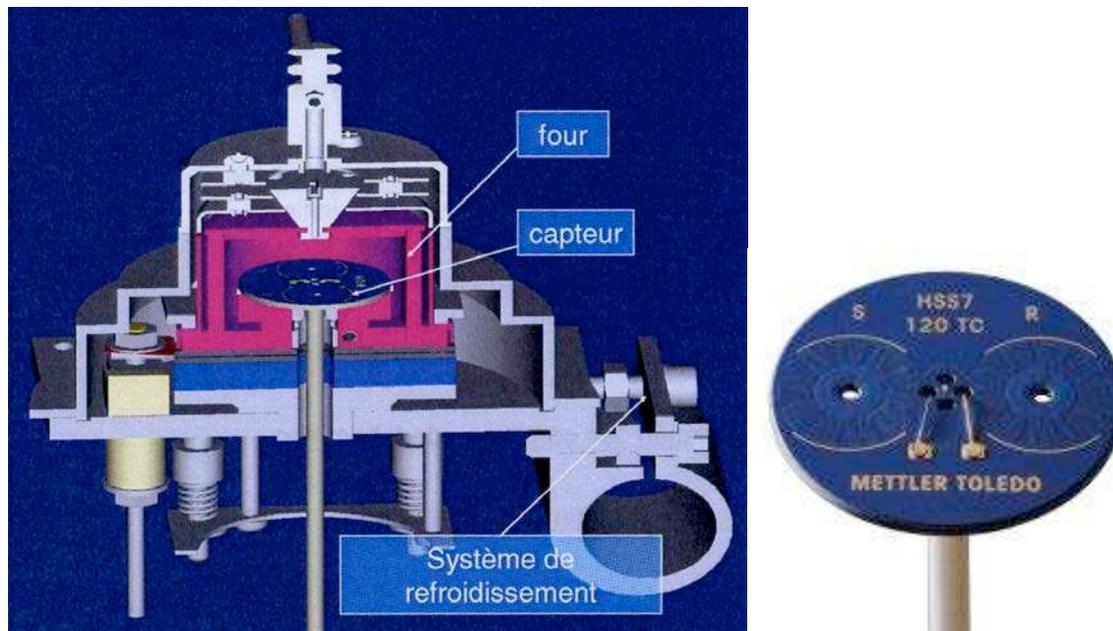


Figure 13: Représentation d'une tête d'analyse de DSC et Photo d'un capteur HSS7

3.5.1 Principe

Lorsqu'un système subit une réaction de transformation sous l'effet d'un programme de chauffage ou de refroidissement, sa température évolue différemment de celle d'un matériau inerte à la chaleur. En microcalorimétrie différentielle, on mesure la différence de température (ΔT) qui s'établit entre le matériau qui réagit (l'échantillon e) et le matériau inerte (la référence r).

Celle-ci est proportionnelle à la chaleur échangée au cours de la réaction :

$$Q = mC_p \Delta T$$

avec	Q	quantité de chaleur échangée (J).
	ΔT	différence de température (K)
	C_p	capacité thermique massique ($J.K^{-1}.g^{-1}$)
	m	masse de l'échantillon ou de la référence (g)

En microcalorimétrie différentielle, les effets thermiques liés à différentes perturbations (régulation de température, environnement du calorimètre) sont pris en compte

par un montage différentiel par lequel sont mesurés les échanges thermiques (qui s'opèrent par conduction) entre le bloc régulé en température et chacun des deux creusets contenant l'un l'échantillon (e) qui réagit et l'autre la référence inerte (r). Des dispositifs thermoélectriques mesurent la différence de température entre les creusets ($T_e - T_r$), ainsi que les différences de température ($T_r - T$) et ($T_e - T$) entre chacun des creusets et l'enceinte thermostatique du calorimètre.

Les schémas représentés (Figure 14 et Figure 15) illustrent le principe de calorimètres munis de capteurs fluxmétriques ou à compensation de puissance fonctionnant avec des creusets de matériaux, formes et volumes différents.

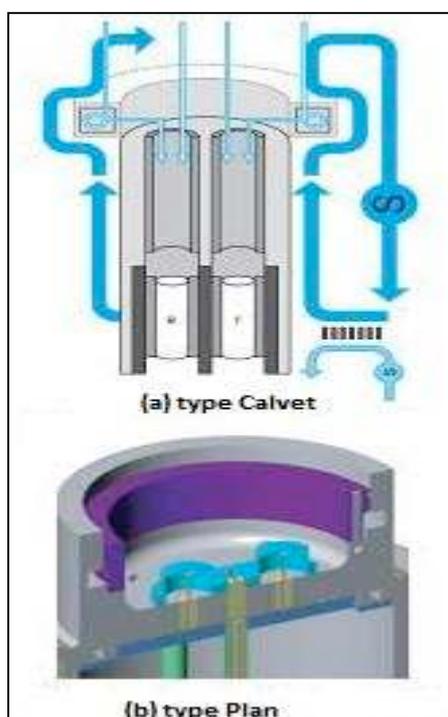


Figure 14 : Schéma de principe de μ calorimètre muni de capteur fluxmétriques

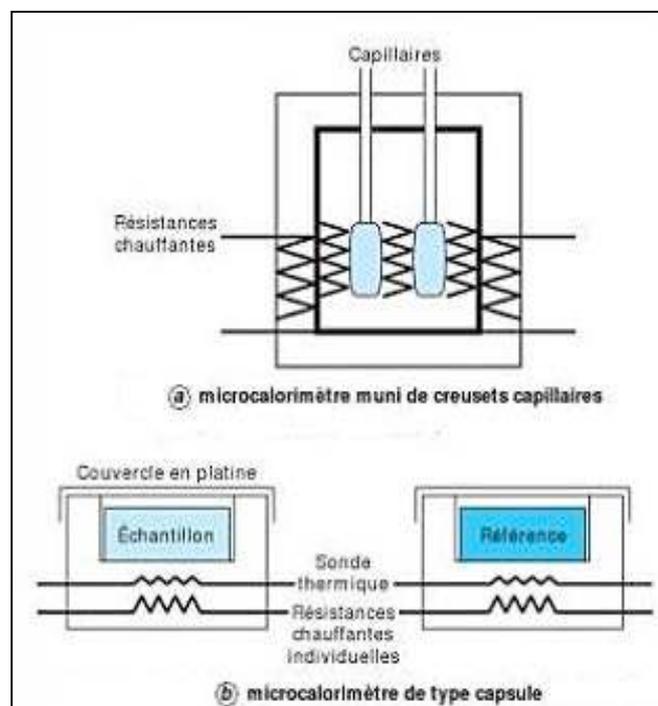


Figure 15 : Schéma de principe de μ calorimètre à compensation de puissance

Parmi les nombreux équipements DSC commercialisés actuellement, les plus couramment utilisés, pour l'investigation rapide de réactions induites par la chaleur, sont à programmation linéaire de température suivant l'équation :

$$T = T_i + t dT/dt$$

avec T_i température initiale ($^{\circ}\text{C}$)

t temps (min)

$dT/dt = \beta$ vitesse de programmation de température ($^{\circ}\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$)

Les microcalorimètres munis de capteurs fluxmétriques de type Galvet (**Figure 14 a**) ou de type plan (**Figure 14 b**) mesurent directement les échanges thermiques qui s'opèrent entre, d'une part, le bloc thermostatique et, d'autre part, chacun des creusets e et r . Les microcalorimètres à compensation de puissance (cas du DSC1 de *Mettler Toledo*) sont munis de thermocouples qui mesurent la différence de température ($T_e - T_r$) qui s'établit entre les creusets e et r , quand une réaction se produit au sein de l'échantillon (**Figure 15 a** et **Figure 15 b**). Cette différence de température est maintenue à une valeur nulle par addition de puissance thermique au niveau du creuset e ou r , selon que la réaction est endothermique ou exothermique. L'intégration de la puissance thermique nécessaire pour maintenir l'écart $T_e - T_r = 0$, en fonction du temps, fournit la chaleur associée au phénomène thermique se produisant dans l'échantillon.

3.5.2 Mesures qualitatives

Si un échantillon soumis à une température se réorganise, il gagne de l'énergie pour atteindre cet état plus ordonné, il dégage alors de la chaleur, le phénomène est exothermique (**Figure 16 a**). Si on continue à chauffer l'échantillon, cela peut conduire à sa dégradation, c'est une transition thermique (**Figure 16 b**), il absorbe l'énergie fournie par le système, le phénomène est endothermique.

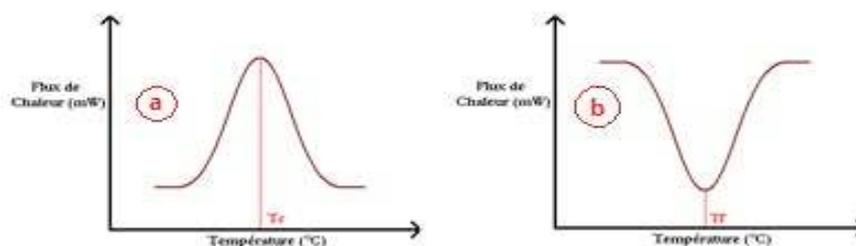


Figure 16 : Principe calorimétrique d'un phénomène exothermique (a) et endothermique (b)

3.5.3 Mode Opérateur

3.5.3.1 Echantillonnage

Parmi les différents creusets commercialisés par METTLER TOLEDO[®], ceux utilisés pour nos études ont un volume soit de 40 soit de 100 μL . Ils sont en aluminium. Nos échantillons sont placés dans un creuset à l'aide d'une micropipette. Nos solutions étant faites dans l'eau pour les phospholipides, le creuset de référence devra contenir le solvant utilisé

lors de la préparation de la solution. On s'assure de l'équivalence des quantités dans chaque creuset (*e* et *r*) par pesée sur une balance de précision (0.01 mg)

3.5.3.2 Réglages

3.5.3.2.1 Ligne de base instrumentale

Elle est obtenue à partir du signal enregistré lors d'un cycle de variation de température appliqué à deux creusets de masse équivalente, soit vide soit contenant la même quantité de solution. Cette ligne de base devra être soustraite du signal obtenu, dans les mêmes conditions (creusets, vitesse de programmation, nature et débit de gaz), à partir de l'échantillon dont on veut étudier le comportement thermique.

3.5.3.2.2 Paramètres calorimétriques

Dans notre travail nous avons suivi la pré-transition et de la transition gel-fluide des phospholipides, sous forme de vésicules ou supportées sur du mica. Ce type de transformation est repéré en DSC par un pic endothermique caractérisé par différentes valeurs de température :

- T_{seuil} et T_{fin} , température de seuil et de fin de déviation de signal déterminées au point situé à l'intersection de la pente ascendante ou descendante des pics et d'une ligne de base.
- T_{max} , température au sommet du pic qui est facilement repérable dans tous les cas.

A pression constante, la chaleur apparente de la réaction Q_{cal} est égale à la variation d'enthalpie (ΔH_{cal}). Elle est calculée à partir de la surface comprise entre le signal de la réaction et une ligne de base tracée entre les températures de début et de fin de déviation du signal de réaction. Lorsqu'il n'est pas possible de tracer une ligne de base linéaire entre les températures de début et de fin de réaction, on peut faire le choix d'une ligne de base sigmoïdale. Les logiciels d'exploitation de signaux (fournis par les constructeurs) proposent différents choix de lignes de base.

3.6 Marquage de l'Alpha-hémolysine

La protéine (α -hémolysine) est vendue par Sigma Aldrich Inc. Elle a été extraite de la bactérie *Staphylococcus Aureus*. Le pore d' α -hémolysine a la forme d'un champignon quand il est inséré de façon unidirectionnelle dans une bicouche. Le pied a la forme d'un tonneau et la tête hydrophile pointe au dessus de la surface de la bicouche⁶⁻⁸.

La protéine a été marquée en utilisant un kit de Molecular Probes[®] (Invitrogen) afin de lier de façon covalente l'Alexa Fluor au monomère protéique. La protéine purifiée (0.6 mg) est solubilisée dans 350 μ L d'une solution tampon (PBS) composée de phosphate de sodium 10 mM, de chlorure de sodium NaCl 100 mM et d'azide de sodium 0.2 mM à un pH final de 7,3. Le tampon ne doit pas contenir d'amines (type Tris), puisque le marquage se fait sur les amines primaires de la protéine, soit les résidus lysines (27 résidus) et histidines (4 résidus). Le protocole de marquage a été adapté de celui de Molecular Probes[®]. Les différentes étapes sont décrites dans la partie Annexes.

On obtient après réaction une solution de protéines marquées avec un rapport 1/3 (déterminé par spectromètre UV à 280 et 488 nm). Cette solution est par la suite mélangée avec des monomères non marqués afin d'obtenir une solution finale de protéine contenant un monomère marqué sur sept. Pour des raisons thermodynamiques, une distribution homogène des monomères marqués par heptamère devrait être favorisée, conduisant ainsi à un heptamère contenant en moyenne un monomère marqué. Ce taux de marquage assez faible ne devrait pas affecter le mécanisme d'insertion de la protéine. La solution (1 μ M) est aliquotée et conservée à - 20°C.

3.7 Insertion de la protéine dans la bicouche lipidique supportée

Pour que la protéine s'insère, un aliquot a été incubé au dessus de la bicouche à une concentration finale de 0.5 μ M (mélange 50/50 avec la solution tampon au-dessus de la bicouche) pendant différents temps d'incubation (de 3 heures à 48 heures). L'étape d'insertion est simple à mettre en œuvre puisque, la forme monomérique soluble dans l'eau se transforme en pré-pore qui s'assemble à la surface de la bicouche puis la traverse en un pore heptamérique lorsqu'elle s'insère. En utilisant ce processus, les protéines sont incorporées unidirectionnellement au sein de la bicouche. L'excès de protéine est enlevé en remplaçant

dix fois la moitié du volume de la solution d'incubation (ceci pour conserver la bicouche « sous » le liquide, à l'abri de l'air) par de la solution de tampon.

L'insertion a été faite à 20°C (température intermédiaire dans la gamme de température qui correspond à la transition gel-fluide de la BLS de DMPC) et à 28°C (température où la BLS est en phase fluide). Le temps d'incubation maximum était 48h.

L'incubation finie, l'échantillon était transféré, en présence de tampon, dans une cellule fabriquée au laboratoire, thermostatée. Elle était mise soit sur le microscope pour prendre des images, soit sur le banc de FRAPP pour la mesure des coefficients de diffusion. Le haut de la cellule de mesure était complètement remplie de tampon et couvert par du parafilm™ afin d'éviter une dérive due à l'évaporation aux températures plus élevées.

3.8 Prise des images

La présence d'Alexa fluor 488®, qui possède une très forte brillance verte (absorption 495 nm, émission 519 nm, coefficient d'extinction 71.000 M⁻¹.cm⁻¹), nous a permis d'observer les taches fluorescentes sous microscope. L'objectif de fluorescence était un x 20 Fluotar, de Leica®. Les images ont été prises avec un appareil photo ordinaire (5 MPixels, f2.8 grand angle, 2592 x 1936 pixels) monté sur l'oculaire du microscope au moyen d'un adaptateur "maison" afin d'assurer la reproductibilité de son positionnement. Le grossissement final est x 200. L'appareil photo a été réglé manuellement afin de reproduire ce que l'on observe sous microscope et donc de pouvoir comparer les images, tous les paramètres du microscope (intensité du faisceau, diaphragme, ...) ainsi que ceux de l'appareil photo étant fixés. Nous avons obtenu des images de haute qualité à température ambiante que nous avons analysées. L'insertion dans chaque échantillon a été caractérisée en utilisant Image J®, un logiciel d'analyse d'images, qui compte le nombre de spots *versus* l'aire totale sous le microscope, détermine leur intensité et la distance qui les sépare. Le nombre de spots/mm² et l'intensité sont déterminés par l'analyse de 3 images pour chaque échantillon.

3.9 Montage électrophorèse

Des électrodes en platine (diamètre = 0,25 mm) ont été rajoutées à la cellule de FRAPP et sont distantes de 3 cm. Le champ électrique appliqué varie de 1 à 5 V/cm. Pour vérifier la valeur "vu" par la membrane dans la cellule, nous avons utilisé une lame de verre (identique à celles utilisées pour supporter nos bicouches) revêtue de deux nano-électrodes d'or de 40 nm d'épaisseur (Figure 17 vue transversale). Nous avons placé cette lamelle (face vers le bas,

comme dans le cas d'une lame portant une BLS) dans la cellule et nous avons mesuré le potentiel entre ces 2 électrodes. Le champ électrique mesuré est le même que celui appliqué dans toute la cellule.

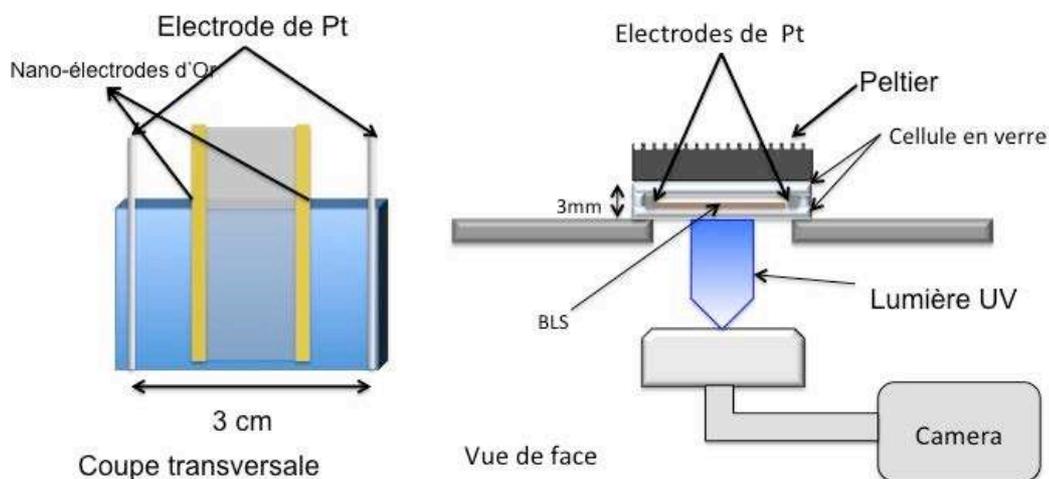


Figure 17 : Schéma de la cellule de mesure (diffusion, mobilité). Figure gauche : contrôle au moyen d'une lame de verre revêtue de nano-électrodes d'or. Figure droite : montage d'électrophorèse permettant la mesure de la vitesse de déplacement sous champ électrique

La valeur de la tension est appliquée pendant une durée maximale de 60 s. Le champ électrique 5V/cm (valeur maximale appliquée) correspond à une tension de 15 V, ce qui représente une intensité inférieure à 1 mA et une dissipation de puissance totale de 10^{-2} W. L'utilisation de l'élément Peltier et le remplacement du solvant après chaque mesure de la vitesse (afin d'enlever les produits d'électrolyse) permet de n'enregistrer ni augmentation de température due à l'effet Joule, ni changement de pH. Six valeurs de pH différentes ont été testées. Un pH supérieur à 8.3 (obtenu par ajout de quelques gouttes de soude 1M) est légèrement extérieur à la gamme autorisée pour ce tampon mais nous a permis de mesurer la mobilité de la protéine en milieu basique (pH 9.1 et 9.2) sans changer la composition chimique.

La température a été mesurée avant et après l'application du champ à l'aide d'un thermocouple immergé dans la cellule.

Pour la mesure de la mobilité, nous avons utilisé un montage de vidéo-microscopie constitué d'un microscope inversé à fluorescence, équipé d'une caméra de fluorescence (Hamamatsu C2400-77 : 768 x 494 pixels, 30 MHz) et d'un intensificateur de fluorescence (grossissement final : x 400). La mesure du coefficient de diffusion (à champ électrique nul) a été faite à l'aide d'un « plugin » du logiciel Image J[®] développé par le Groupe MOSAIC de l'ETH de Zürich (pour plus de détail sur le « plugin », voir la référence⁹). La mesure de la vitesse a été obtenue en divisant la distance parcourue par le temps. Plusieurs mesures ont été

effectuées (3 par conditions de manipulation), parfois en inversant le champs électrique et/ou en utilisant différents temps d'enregistrement : 20s a été le temps habituel. La reproductibilité était de l'ordre de 10%.

3.10 Microscopie à Force Atomique (AFM)

Les BLS ont été étudiés *in situ* par AFM. Les images ont été acquises dans un tampon contenant des ions Ca^{2+} ou dans de l'eau déionisée milliQ, en mode contact à l'aide d'un Nanoscope MultiMode AFM (Digital Instruments, CA) équipé d'un J-scanner (120 μm) et d'un levier en nitrure de silicium avec une constante de ressort nominale de 0,06 N/m, à une fréquence de balayage de 2 à 3 Hz et un angle de 90°. L'imagerie démarre à basse température, lorsque le DMPC est en phase gel, et est obtenue *in situ* pendant 3h. Toutes les images présentées (dans le chapitre III) ont été enregistrées à la force d'imagerie la plus faible possible, en utilisant le logiciel standard de Digital Instruments.

3.11 Références

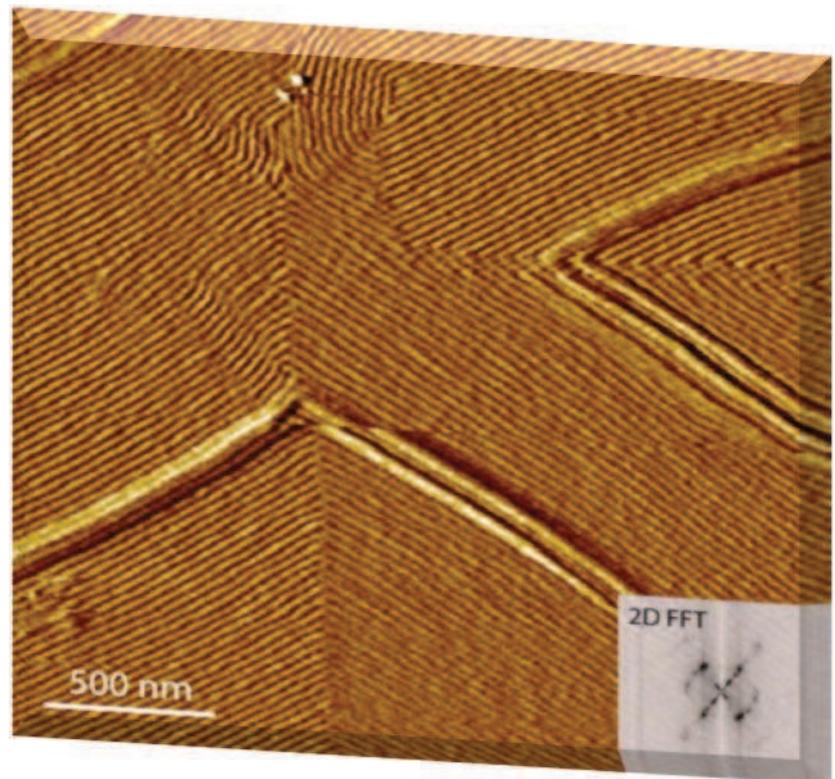
1. Charitat, T., Bellet-Amalric, E., Fragneto, G. & Graner, F. Adsorbed and free lipid bilayers at the solid-liquid interface. *European Physical Journal B* 8, 583-593 (1999).
2. Scomparin, C. Dynamique des bicouches lipidiques supportées. *Thèse* (2007).
3. Axelrod, D., Koppel, D.E., Schlessinger, J., Elson, E.L. & Webb, W.W. Mobility Measurements by Analysis of Fluorescence Photobleaching Recovery Kinetics. *Biophysical Journal* 16, A217-A217 (1976).
4. Davoust, J., Devaux, P.F. & Leger, L. Fringe pattern photobleaching, a new method for the measurement of transport coefficients of biological macromolecules. *EMBO J* 1, 1233-8 (1982).
5. Tsukanova, V., Grainger, D.W. & Salesse, C. Monolayer behavior of NBD-labeled phospholipids at the air/water interface. *Langmuir* 18, 5539-5550 (2002).
6. Walker, B., Braha, O., Cheley, S. & Bayley, H. An intermediate in the assembly of a pore-forming protein trapped with a genetically-engineered switch. *Chem Biol* 2, 99-105 (1995).
7. Tobkes, N., Wallace, B.A. & Bayley, H. Secondary structure and assembly mechanism of an oligomeric channel protein. *Biochemistry* 24, 1915-20 (1985).
8. Song, L. et al. Structure of staphylococcal alpha-hemolysin, a heptameric transmembrane pore. *Science* 274, 1859-66 (1996).
9. Sbalzarini, I.F. & Koumoutsakos, P. Feature point tracking and trajectory analysis for video imaging in cell biology. *Journal of Structural Biology* 151, 182-195 (2005).

*Partie A: Les bicouches
lipidiques supportées*

RESULTATS



Chapitre III : Rôle de l’interaction bicouche-support sur la formation de la phase ‘Ripple’ dans une bicouche lipidique supportée unilamellaire



“Membranes are typically not flat rigid sheets but often display curvature when they form vesicles and organelles. They are soft and display both fluctuations in area and curvature...”

Thomas Heimburg

1 Résumé

Les mécanismes de formation ainsi que les conditions d’existence de la phase « ondulée » ou « *ripple* » relèvent de questions fondamentales de thermodynamique. D’un point de vue biologique, cette phase est très importante. En effet il a été montré que l’état de la bicouche et/ou sa courbure peuvent jouer un rôle sur sa bioactivité. L’addition de substances (alcool, protéines...) peut être utilisée afin de moduler cette bioactivité^{1,2}. Il est parfois énoncé dans la littérature qu’une bicouche supportée unilamellaire ne peut, à de notables exceptions près, former de phase *ripple* du fait de la proximité du support, qui gêne les fluctuations de la membrane.

Nous présentons de nouvelles conditions de formation de cette phase : elle peut survenir dans de simples bicouches lipidiques supportées unilamellaires. Sa formation ne dépend que de l’interaction bicouche/support, sans nécessiter l’utilisation de mélanges de lipides ou la présence d’ions spécifiques. Dans ce chapitre, nous montrons comment nous avons mis en évidence l’existence de cette phase “*ripple*” via la mesure des coefficients de diffusion des lipides par FRAPP en fonction de la température. La plage de température correspondante est en bon accord avec celles déterminées par d’autres méthodes. Nous avons également utilisé l’AFM mais comme la proximité du support semble effectivement induire une plus petite amplitude des ondulations, l’acquisition de l’image est plus difficile.

2 Généralités sur la phase ripple

Les bicouches lipidiques ont prouvées leur importance comme systèmes synthétiques afin d’étudier les membranes cellulaires. Les différentes phases et le passage de l’une à l’autre, ont été le sujet de plusieurs études³⁻⁶. A basse température, les lipides sont en phase gel (L_{β}) dans laquelle les chaînes sont inclinées par rapport au plan de la membrane. Lorsque la température augmente, l’angle d’inclinaison change. Ce changement de structure est appelé prétransition. En continuant à élever la température, les lipides présentent un changement conformationnel des chaînes hydrocarbonées type chaînes droites → chaînes désordonnées; cette transition est appelée transition principale. Au delà, tous les lipides sont en phase fluide (L_{α}). Selon les conditions expérimentales, il peut exister une phase intermédiaire dans le système appelée (P_{β}) qui présente un ordre bidimensionnel, contenant une alternance de lipides en phase gel ou fluide, appelée phase « ondulée » ou, en anglais, phase “*ripple*”^{5,7,8}.

Il est établi que cette phase apparaît dans de grosses vésicules unilamellaires (LUV) et dans des vésicules multilamellaires (MLV).

Elle apparaît dans des bicouches lipidiques supportées unilamellaires dans seulement trois cas :

- 1- Utilisation d'un mélange de deux lipides différents (bicouche dite « asymétrique »)
- 2- Dans la bicouche supérieure d'une double bicouche lipidique supportée, mais on ne peut plus parler de bicouche supportée unilamellaire mais d'un cas particulier d'une multicouche avec $n=2$ ⁹⁻¹¹
- 3- En présence d'ions spécifiques¹².

Dans certains de ces cas, cette phase peut ne pas apparaître, par exemple, du fait d'une contrainte latérale¹³.

Le fait que son existence dépende de multiples facteurs rend la phase *ripple* intrigante et intéressante. Différents modèles ont été proposés pour la décrire^{4,8,14-26}. Certains auteurs proposent une épaisseur variable et un découplage de feuillet^{25,26}, tandis que d'autres proposent une épaisseur constante^{15,16,22}. Des simulations ont montré que les deux structures pouvaient exister^{16,27}. Heimburg a proposé que la phase *ripple* soit considérée comme une phase intermédiaire qui relierait la prétransition et la transition, selon une plage de température plus ou moins étendue. Cette étendue dépendrait de la compressibilité latérale de l'objet¹⁷. Selon son modèle, la conformation d'une bicouche donnée résulterait de la contrainte exercée par « 2 murs rigides » (formés par les autres bicouches dans le cas d'une multicouche) et résultant de la valeur de l'énergie libre (ΔG), elle-même dépendant des conditions du système²⁶.

Pour un rapport donné (lipides en phase fluide/lipides en phase gel), une courbure de la membrane peut être induite du fait de la répartition des uns et des autres dans les différents feuillet. Ceci peut être décrit *via* un équilibre de constante K (**Figure 1**).

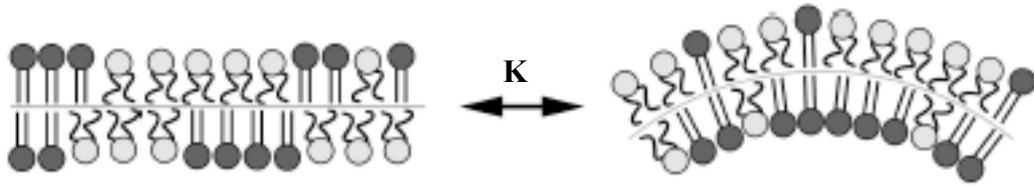


Figure 1: Équilibre entre une portion d’une membrane linéaire et d’une membrane courbée. La courbure conduit à un réarrangement de lipides en phase gel ou fluide sur les deux monocouches. Repris de “Chapter 8 of Planar lipid bilayers and their applications”, T. Heimburg (2003)²⁶

Avec

$$K = \exp\left(\frac{-\Delta G(T)}{RT}\right)$$

La différence d’énergie libre totale (ΔG) est la somme d’une composante élastique et d’un terme (ΔG_0) qui est le résultat d’une interaction avec l’environnement (solvant, protéines associées, surface, ions, ...).

$$\Delta G(T) = \Delta G_0 + \Delta G_{elast}$$

Aucune des interactions contenues dans le terme ΔG_0 ne dépend du processus de fusion. Si elles sont suffisamment fortes, donc en d’autres termes, si ΔG_0 est suffisamment négatif, l’énergie libre $\Delta G(T)$ peut devenir négative au voisinage de la transition. Dans ce cas, la membrane présentera une courbure qui entraînera la formation de la phase *ripple* (**Figure 2**).

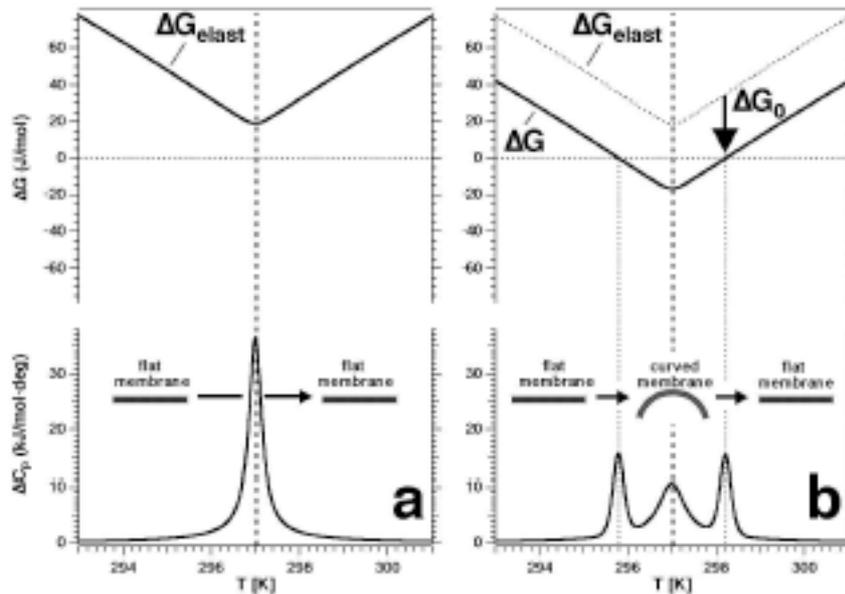


Figure 2: **Gauche**: En supposant deux états d’une portion de membrane, une linéaire et l’autre courbée, on peut calculer la différence de l’énergie libre de courbure ΔG_{elast} grâce aux profils de capacité calorifique (haut de la figure). Si $\Delta G_{elast} > 0$, la géométrie linéaire est thermodynamiquement stable. **Droite** : Si la différence de l’énergie libre entre la forme linéaire et la forme courbée est décalée vers des valeurs plus faibles, à cause d’une interaction des conformations avec le milieu aqueux, ΔG peut changer de signe (haut de la figure). Dans ces conditions, les changements conformationnels ainsi que le profil de la capacité thermique se divisent en un modèle présentant trois maxima, correspondant aux modifications géométriques et à la fusion de la phase courbée (bas de la figure) “ Chapter 8 of Planar lipid bilayers and their applications“, T. Heimburg (2003)²⁶

Enfin un dernier argument pourrait être utilisé pour expliquer l’existence de la phase “ripple” dans une bicouche supportée unilamellaire présente dans l’eau. L’analyse de Perkins et coll (²⁸) indique qu’une différence de contenu entre l’intérieur et l’extérieur d’une grosse vésicule (LUV) induit un stress osmotique qui lui-même induit la formation d’une phase “ripple”. Réciproquement, on pourrait considérer que la membrane, située entre le mica chargé négativement et l’eau du reste de la solution, subit une sorte de stress osmotique, qu’elle « relaxerait » en formant une phase “ripple”.

La formation, l’amplitude et la périodicité de la phase ripple ont été étudiées en utilisant plusieurs techniques telles que l’AFM, la DSC, les rayons X, la microscopie électronique à transmission (après cryofracture)...^{5,13,29-33}.

Tamm, le premier, a évoqué la possibilité de l’existence dans l’eau de la phase ripple dans une bicouche unilamellaire de DPPC sur un support « wafer de SiO_2 »³⁴. Il a observé un

plateau sur la courbe des coefficients de diffusion en fonction de la température $D = f(T)$ (Figure 3).

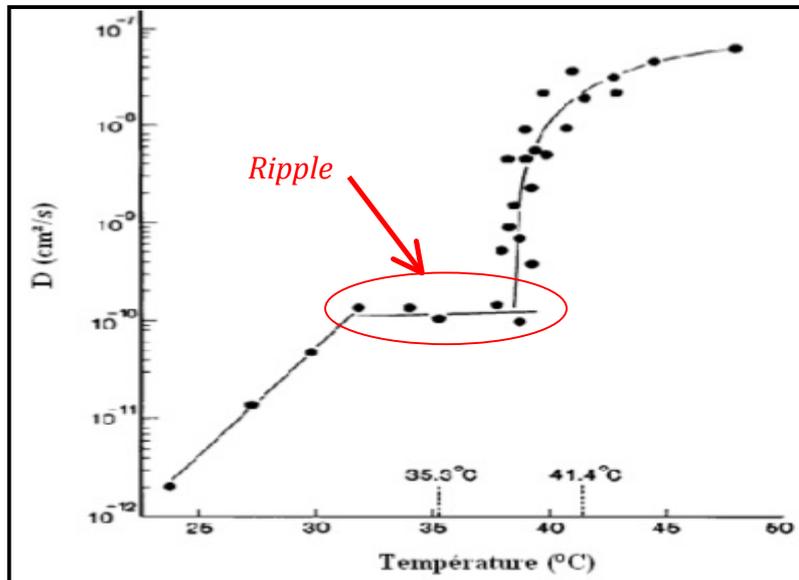


Figure 3 Dépendance en température du coefficient de diffusion du DPPC en fonction de la température (bicouche unilamellaire supportée sur « wafer » d'oxyde de silicium (repris de Tamm et coll.³⁴))

Des travaux antérieurs avaient également montré la présence de plateau sur la courbe $D = f(T)$ avec une plage de température correspondant à l'existence de la phase *ripple* mais les auteurs n'ont pas porté attention à ce comportement³⁴⁻³⁶.

Dans une bicouche supportée, nous pouvons considérer que la membrane est confinée entre un support et le reste de la solution. Si cette image n'est pas tout à fait celle d'un confinement entre 2 murs rigides équivalents, elle en est voisine. De plus l'approche de Heimburg souligne l'importance de l'interaction plus ou moins forte avec le support.

Dans cette partie, nous nous sommes attachés à répondre à la question : Une phase “*ripple*” peut elle se former dans une simple bicouche lipidique supportée (BLS) uniquement à cause de l'interaction bicouche/support ?

Cette problématique de l'interaction avec le support selon les conditions expérimentales est présente tout au long de ce travail. Une comparaison est faite avec les différentes observations et comportements décrits dans la littérature afin d'en proposer une description cohérente.

3 Résultats

La Figure 4 présente la courbe $D = f(T^\circ)$ obtenue pour deux lipides différents (DMPC, DPPC) sur deux supports différents (verre, mica). Les bicouches unilamellaires supportées obtenues sont de grande qualité quand on transfère les lipides par la technique de Langmuir (Blodgett + Schaeffer). Le milieu liquide qui recouvre la bicouche est l'eau distillée (MilliQ 18M Ω /cm).

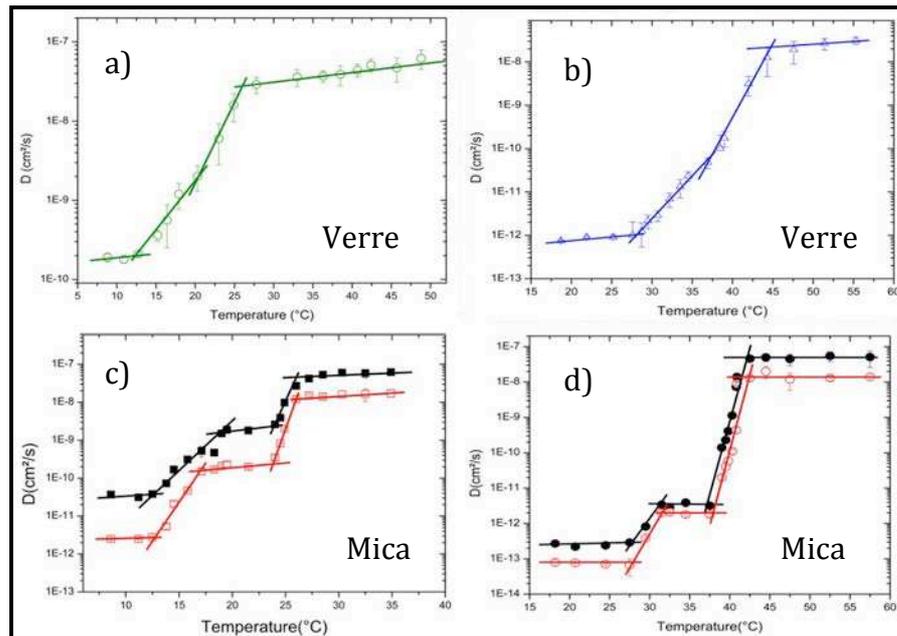


Figure 4 Coefficient de diffusion des lipides sur le verre et sur le mica en fonction de la température. (a) et (c) DMPC. (b) et (d) DPPC.

3.1 Coefficients de diffusion sur le verre (Figure 4 a et 4 b)

Aux basses températures, le coefficient de diffusion (D) varie peu, cela correspond à la phase gel (L_B). De 13.5°C à 20.3°C pour le DMPC et de 27.9°C à 36.3°C pour le DPPC, D varie notablement avec la température. Puis la pente augmente fortement entre 20.3°C et 26.5°C pour le DMPC et de 36.3°C à 45.5°C pour le DPPC. Ceci correspond à la transition principale. Pour des températures supérieures, D varie peu, les deux phospholipides sont en phase fluide (L_a).

3.2 Coefficient de diffusion sur le mica (Figure 4c et 4 d)

Sur ce support, tous les coefficients de diffusion sont plus lents que sur le verre. De plus, les signaux obtenus par FRAPP sont bi-exponentiels, ce qui correspond à deux temps (en q^2) et donc à deux valeurs de coefficient de diffusion. Ceci est interprété comme la signature du découplage du feuillet distal et du feuillet proximal, l'interaction de la bicouche avec le mica étant plus forte qu'avec le verre³⁷. Les plages de température de la prétransition et de la transition sont raccourcies, du fait de l'apparition d'un plateau (19°C à 23.5°C pour le DMPC et 31.3°C à 37.5°C pour le DPPC). Ce plateau s'étend sur approximativement 5-6°C. Les températures de transition T_{pre} et T_m des deux feuillettes sont identiques.

3.3 Coefficient de diffusion des lipides de la bicouche supérieure d'une double bicouche lipidique de DPPC supportée sur le mica

La **Figure 5** représente la courbe $D = f(T)$ des lipides présents dans la bicouche supérieure (la plus éloignée du support) d'une double bicouche lipidique de DPPC supportée sur le mica. Seule cette seconde bicouche contient des lipides fluorescents. Cette double bicouche a été obtenue par la méthode de Langmuir (multi-bicouche avec $n=2$) mais bien contrôlée. Nous avons observé qualitativement le même comportement en ce qui concerne les différents régimes (phase gel, prétransition, plateau, transition et phase fluide). Mais il n'y a plus qu'une seule courbe $D = f(T)$ car les signaux sont maintenant mono-exponentiels, ce qui signifie qu'il n'y a plus de découplage des feuillettes. Les coefficients de diffusion dans ce système sont plus rapides que pour les bicouches unilamellaires supportées

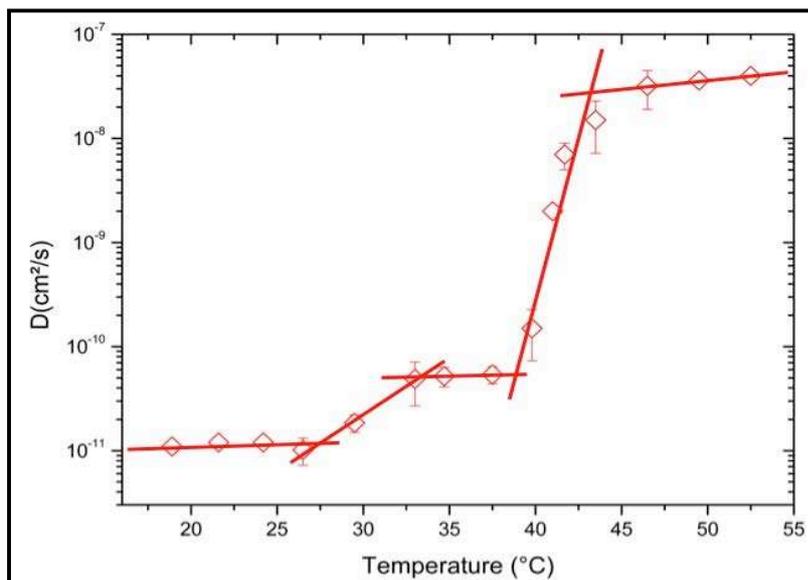


Figure 5 Coefficient de diffusion du DPPC de la bicouche supérieure d'une double bicouche supportée sur le mica en fonction de la température.

DMPC							
	Phase Gel		Pretransition	Phase <i>ripple</i>		Transition principale	
	T (°C)	D (cm ² /s)	T (°C)	T (°C)	D (cm ² /s)	T (°C)	D (cm ² /s)
Verre	13.5	2.10 ⁻¹⁰	13.5 → 20.3	/	/	20.3 → 26.5	4-5.10 ⁻⁸
Mica	Distal	3.5 10 ⁻¹¹	12.8 → 19	19 → 23.5	1.7 10 ⁻⁹	23.5 → 26.1	6. 10 ⁻⁸
	Proxi-mal	2.8 10 ⁻¹²	12.8 → 19	17.9 → 23.5	2. 10 ⁻¹⁰	23.5 → 26.1	1.7 10 ⁻⁸
DPPC							
Verre	27.9	8.10 ⁻¹³	27.9 → 36.3	/	/	36.3 → 45.5	3.10 ⁻⁸
Mica	Distal	2.5 10 ⁻¹³	27.7 → 31.3	31.3 → 37.5	3.5 10 ⁻¹²	37.5 → 42.5	5. 10 ⁻⁸
	Proxi-mal	8. 10 ⁻¹⁴	27.7 → 31.3	31.3 → 37.5	2. 10 ⁻¹²	37.5 → 42.5	1.4 10 ⁻⁸
Bicouche supérieure d’une double bicouche DPPC							
Mica	26.6	1.1 10 ⁻¹¹	26.6 → 33.2	33.2 → 39.1	5. 10 ⁻¹¹	39.1 → 42.5	4.10 ⁻⁸

Tableau 1 Valeurs des températures et des coefficients de diffusion pour les différentes phases des bicouches de DMPC et DPPC supportées sur verre ou mica

Ces deux observations (D plus rapide et non-découplage) indiquent une plus faible interaction de la seconde bicouche avec le support du fait d’une plus grande distance entre les deux. L’ensemble des valeurs est regroupé dans le **Tableau 1**.

4 Discussion

La comparaison du comportement du DPPC sur verre et mica avec les résultats de Tamm³⁴ soulignent la sensibilité de ces systèmes :

- avec le verre, nous n’observons ni plateau, ni découplage de feuillets.
- avec un wafer de SiO₂, Tamm observe un plateau mais pas de découplage
- avec le mica, nous observons plateau ET découplage

Les deux paramètres principaux qui diffèrent d’un système à l’autre sont la chimie (charge des groupements SiOH < charge des SiO₂ < charge des groupements phyllosilicates du mica) et la rugosité (rugosité_{verre} > rugosité_{wafer} > rugosité_{mica}).

Bien que zwitterionique, le groupement le plus proche du support est l’amine quaternaire qui est positive. Nous montrerons l’importance de l’interaction électrostatique dans le chapitre suivant. On peut aussi penser qu’une surface moins rugueuse (le mica est atomiquement plan) favorise une « adsorption » de la bicouche sur celle-ci tandis que dans le cas d’une « planche de fakir » comme le verre, elle « flotte » plus librement. Une détermination des contributions

respectives de ces deux facteurs serait riche d'enseignements dans la compréhension du comportement des bicouches supportées.

Si nous savions déjà que l'interaction de la bicouche avec le mica était plus grande qu'avec le verre, du fait des valeurs des coefficients de diffusion et de l'existence du découplage des feuillettes, nous en observons maintenant une autre manifestation du fait que les valeurs la prétransition et la transition sont séparés par un plateau, signature de l'existence de la phase “ripple”. Il faut noter que la gamme de température du plateau est identique à celle observée par AFM² ainsi que par DSC¹⁸ sur vésicules où la phase “ripple” est réputée exister.

La littérature en général et les mesures précédentes en particulier montrent l'extraordinaire sensibilité des BLS aux conditions expérimentales (température, nature du support, cinétique, méthodes de fabrication, force ionique, etc...). C'est une cause probable de l'observation de différents comportements qui apparaissent parfois controversés voire contradictoires.

Par exemple, lorsqu'on utilise la fusion de vésicules (FV) pour préparer une bicouche lipidique supportée avec un lipide dont la transition principale gel-fluide est comprise entre 5 à 55 °C, selon la température à laquelle on prépare la bicouche, il arrive fréquemment que les images AFM de la bicouche résultante montrent l'existence de domaines, séparés par des frontières qui constituent des sortes de joint de grains. Ces domaines sont stables car ils subsistent même après plusieurs cycles chauffage-refroidissement, comme on peut le voir sur certaines images AFM³⁸⁻⁴⁰. La taille de ces domaines est le résultat d'un équilibre subtil, qui implique au moins trois « acteurs » : la nature du support (chimie, rugosité), celle des lipides et la température. Ces frontières-joint de grains semblent être responsables du décalage de T_m (qui peut atteindre 15 °C). Dans la littérature, ce décalage est décrit comme résultant d'une transition séparée des deux feuillettes, de fait découplés. Ceci vient du fait qu'elle se produit à surface constante et non à tension de surface constante³⁹. Ce décalage de température n'est pas observé lorsque les BLS sont préparées avec la méthode LB comme on le voit sur la **Figure 4**. L'existence de ces contraintes latérales pourrait empêcher la formation de la phase “ripple” et donc leur observation comme proposé par Johnson et al¹³. Une façon de limiter l'influence de l'existence des domaines quand on utilise la fusion des vésicules est d'éclater ces dernières à une température plus élevée que T_m : cela mène à de grands domaines de diamètre compris entre 1 μm et 15 μm selon la température d'éclatement. On peut penser que plus la surface des domaines sera grande, plus on se rapprochera du comportement d'une bicouche de surface « infinie ». Nous avons insisté sur cet exemple d'une part pour illustrer la sensibilité du système BLS et d'autre part pour suggérer une possible raison de non-observation de la phase

ripple par certains auteurs²⁸. Nous avons quelques indications, déduites de mesures de FRAPP, qui vont dans ce sens mais une étude spécifique serait nécessaire pour vérifier complètement ces hypothèses⁴¹.

De ce fait, tous les résultats présentés dans ce travail ont été obtenus grâce à des BLS bien contrôlées et de haute qualité traitant ainsi avec une surface presque “infinie” comparées à des bicouches présentant des domaines sur les images AFM.

Une étude calorimétrique utilisant l'AFM par Enders et coll.² a utilisé la fusion des vésicules de DMPC à 37 °C sur du mica pendant 30'. Elle a montré l'existence de structures “*ripple*”. Nous pensons que, en ce qui concerne les conditions de préparation de leur bicouche (37 °C est une température largement supérieure à 22 °C, T_m du DMPC), le système correspond en fait à une bicouche unilamellaire ayant une qualité approchant celle d'une bicouche préparé par LB. Curieusement, les auteurs concluent qu'ils ont sans doute imagé une région de double bicouche parce que l'idée admise est que la proximité de la bicouche avec le support empêche la formation des ondulations^{9,10}. En fait, cet argument est partiellement vrai car ils mesurent des amplitudes d'ondulations d'environ 0.4 nm, la même valeur enregistrée pour des structures *ripple* avec des bicouches supportées unilamellaires^{12,42}. Dans d'autres systèmes constitués de bicouches libres (“free-standing”), multi ou double bicouche^{5,9,10,43} dans lesquels les fluctuations de la membrane peuvent être grandes, on enregistre des amplitudes qui varie de 1,5 à 15 nm. On peut penser que, dans des conditions données, l'amplitude des ondulations est un indice du numéro de la bicouche que l'on teste : 1 ou plus grand que 1.

Cette faible amplitude observée sur des bicouches supportées unilamellaires^{2,10,42,44} pourrait expliquer pourquoi il est parfois difficile de produire une image AFM si elle n'est pas spécifiquement recherchée. En se basant sur notre courbe de $D = f(T)$, en effectuant des acquisitions AFM à une température comprise dans la plage de température du plateau, nous avons obtenu des images AFM montrant l'existence de la phase “*ripple*” (**Figure 6**).

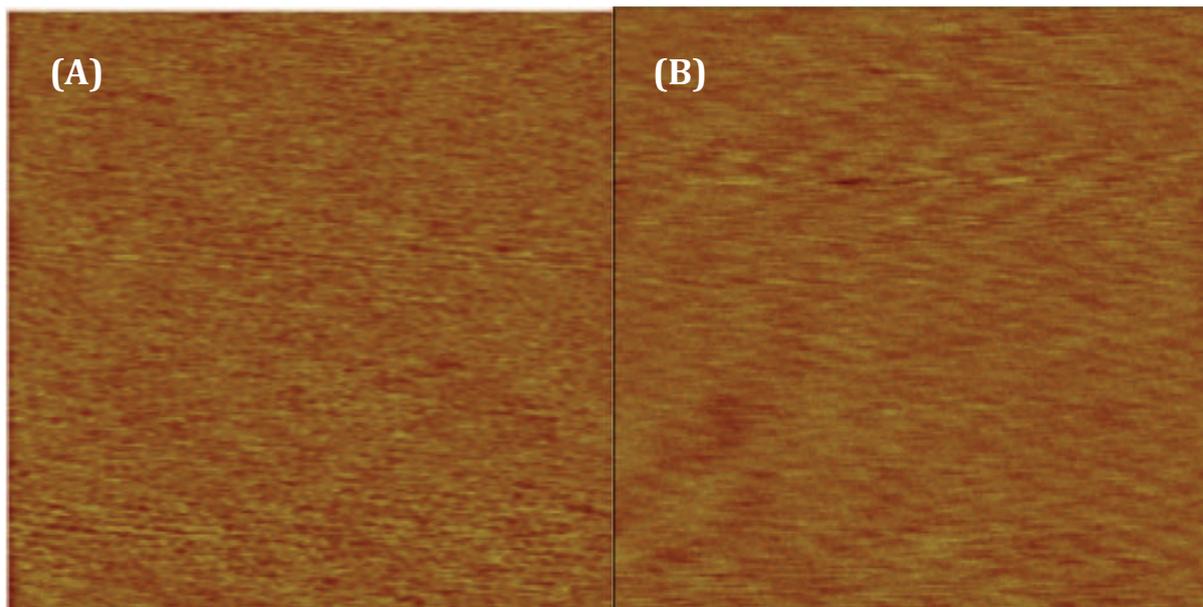


Figure 6: Images AFM images d'une bicouche supportée unilamellaire de DMPC (A) dans un tampon contenant du calcium, (B) dans l'eau, à 20°C. Taille des images: 100nmx100nm; 3nm haut.

Sur chaque image, on distingue des ondulations périodiques, signature de la présence d'une phase *ripple* dans l'eau. Les images semblent de « mauvaise qualité », mais celle-ci est inhérente à la faible amplitude des ondulations qui se traduit forcément par un faible contraste. C'est la raison pour laquelle une image équivalente acquise dans le tampon Hepes, en présence de Ca^{2+} est présentée. En effet dans ces conditions, l'existence de la phase *ripple* a été prouvée (Enders).

Si cette phase *ripple* se forme au voisinage du support, est-elle due à la présence de lipides en phase gel et en phase fluide ou observons-nous une ondulation due à un ordre induit par les têtes PC ?

Si on compare l'amplitude de nos ondulations (0.4 nm), également mesurée par d'autres auteurs, à celles de Sheikh et coll (0.1 nm⁴⁵) et à celles de la phase *ripple* de double bicouche (entre 1 et 15 nm), il existe un doute puisque 0.4 nm est une valeur intermédiaire bien que différente. On sait aussi que ce ne sont que des ordres de grandeur à considérer avec précaution du fait de biais pouvant être induits par le rayon de courbure des pointes AFM. Cependant l'identité des plages de températures entre le plateau de la bicouche unilamellaire et celui de la 2nde bicouche de la quadricouche, la persistance de l'existence du plateau avec des concentrations ioniques jusqu'à 1M, quand l'interaction avec le support diminue (chapitre IV), l'insertion préférentielle de protéines membranaires dans des lignes lorsqu'elles sont incubées au dessus d'une phase ondulée (chapitre V), nous semblent indiquer que la présence

de lipides ayant des chaînes hydrocarbonées plus ou moins « fondues » et de ce fait présentant des ondulations plus faibles du fait de la proximité du substrat, est la plus probable. Ceci n'empêcherait pas que les deux effets soient liés : un arrangement des têtes PC dans le plan induirait un décalage en z des chaînes HC, rendant pour certaines un début de fusion plus facile. Des études complémentaires seraient nécessaires afin de répondre à ce questionnement.

5 Conclusion

A partir de l'analyse des courbes $D = f(T)$, nous avons établi que l'existence d'un plateau situé entre la prétransition et la transition principale était la signature de l'existence d'une phase *ripple*. Une phase *ripple*, au sens strict, se forme bien dans l'eau au voisinage du support pour une bicouche supportée unilamellaire si l'interaction bicouche/support est suffisamment forte. A partir de ces observations, nous proposons les énoncés suivants :

Une forte interaction bicouche/support induit 3 conséquences :

- la diminution du coefficient de diffusion
- le découplage des feuillettes qui conduit à la mesure de deux coefficients de diffusion différents
- la formation de la phase “*ripple*” sur une plage de température donnée.

Ainsi, dans les systèmes de bicouche supportée unilamellaire, nous pensons que ces différentes mobilités entre le feuillet distal et proximal ouvrent la voie à l'existence d'une membrane ayant une épaisseur variable et des ondulations de faibles amplitudes. Dans les systèmes où la bicouche étudiée peut presque être considérée comme une bicouche “free-standing” (multi, double, grosses vésicules), les membranes auront une épaisseur constante (les feuillettes pourront facilement être en phase) et les ondulations seront de grande amplitude. D'après Heimburg²⁶, la présence de la phase “*ripple*” dans l'eau dépend de l'énergie d'interaction de la bicouche avec le support. Si elle est forte ($\Delta G_0 < 0$), comme avec le mica, le système présentera une phase “*ripple*” intermédiaire reliant une prétransition et une transition. Si elle est faible ($\Delta G_0 > 0$), comme avec le verre, la prétransition sera directement suivie par la transition. Une image AFM de la bicouche aura alors l'aspect d'îlots de phase fluide dispersés dans la phase gel.

Un ensemble d'indices nous font penser que cette phase *ripple* est plus probablement due à la présence de lipides ayant des chaînes hydrocarbonées plus ou moins « fondues » mais l'hypothèse d'un rôle de l'arrangement des têtes PC dans le plan ne peut être écartée.

Ces observations déduites de mesures de FRAPP sur une SLB bien contrôlée, préparée en utilisant la méthode de Langmuir-Blodgett, ont permis de revisiter les comportements décrits dans la littérature et de proposer une analyse cohérente (amplitude des ondulations, difficultés d'imagerie, rôle de l'existence de domaines, influence du support, ...).

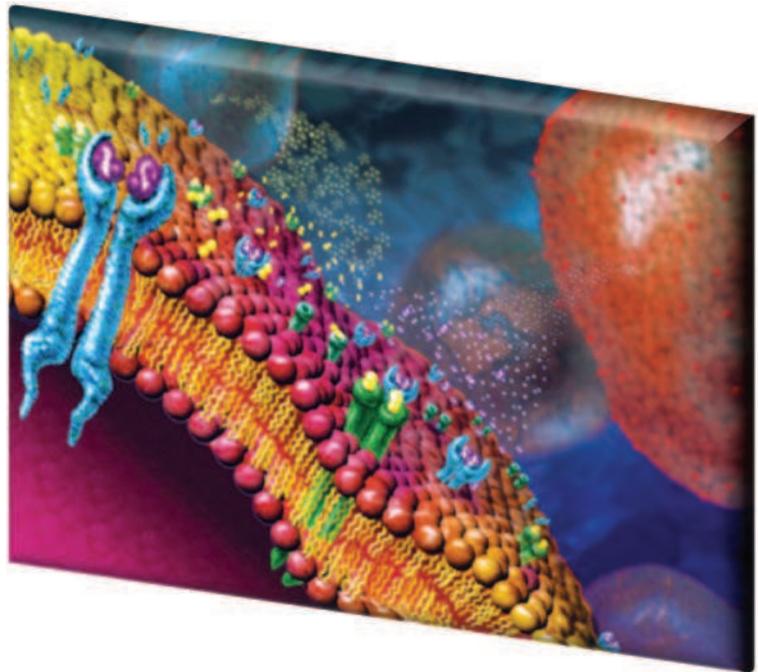
6 Références

1. Leidy, C., Mouritsen, O.G., Jorgensen, K. & Peters, N.H. Evolution of a rippled membrane during phospholipase A(2) hydrolysis studied by time-resolved AFM. *Biophysical Journal* **87**, 408-418 (2004).
2. Enders, O., Ngezahayo, A., Wiechmann, M., Leisten, F. & Kolb, H.A. Structural calorimetry of main transition of supported DMPC bilayers by temperature-controlled AFM. *Biophysical Journal* **87**, 2522-2531 (2004).
3. Wack, D.C. & Webb, W.W. Synchrotron X-Ray Study of the Modulated Lamellar Phase P-Beta' in the Lecithin-Water System. *Physical Review A* **40**, 2712-2730 (1989).
4. Tardieu, A., Luzzati, V. & Reman, F.C. Structure and polymorphosim of the hydrocarbon chains of lipids: a study of lecithin-water phases. *Journal of Molecular Biology* **75**, 711-733 (1972).
5. Janiak, M.J., Small, D.M. & Shipley, G.G. Temperature and Compositional Dependence of the Structure of Hydrated Dimyristoyl Lecithin. *Journal of Biological Chemistry* **254**, 6068-6078 (1979).
6. Asher, S.A. & Pershan, P.S. Alignment and Defect Structures in Oriented Phosphatidylcholine Multilayers. *Biophysical Journal* **27**, 393-421 (1979).
7. Zasadzinski, J.A.N. & Schneider, M.B. Ripple Wavelength, Amplitude, and Configuration in Lyotropic Liquid-Crystals as a Function of Effective Headgroup Size. *Journal De Physique* **48**, 2001-2011 (1987).
8. Ruppel, D. & Sackmann, E. On Defects in Different Phases of Two-Dimensional Lipid Bilayers. *Journal De Physique* **44**, 1025-1034 (1983).
9. Leidy, C., Kaasgaard, T., Crowe, J.H., Mouritsen, O.G. & Jorgensen, K. Ripples and the formation of anisotropic lipid domains: Imaging two-component double bilayers by atomic force microscopy. *Biophysical Journal* **83**, 2625-2633 (2002).
10. Kaasgaard, T., Leidy, C., Crowe, J.H., Mouritsen, O.G. & Jorgensen, K. Temperature-controlled structure and kinetics of ripple phases in one- and two-component supported lipid bilayers. *Biophysical Journal* **85**, 350-360 (2003).
11. Fang, Y. & Yang, J. Role of the bilayer-bilayer interaction on the ripple structure of supported bilayers in solution. *Journal of Physical Chemistry* **100**, 15614-15619 (1996).
12. Mou, J.X., Yang, J. & Shao, Z.F. Tris(Hydroxymethyl)Aminomethane (C₄H₁₁N₃) Induced a Ripple Phase in Supported Unilamellar Phospholipid-Bilayers. *Biochemistry* **33**, 4439-4443 (1994).
13. Johnson, S.J. et al. Structure of an Adsorbed Dimyristoylphosphatidylcholine Bilayer Measured with Specular Reflection of Neutrons. *Biophysical Journal* **59**, 289-294 (1991).
14. Scott, H.L. & Mccullough, W.S. Theories of the Modulated Ripple Phase of Lipid Bilayers. *International Journal of Modern Physics B* **5**, 2479-2497 (1991).

15. Lubensky, T.C. & Mackintosh, F.C. Theory of Ripple Phases of Lipid Bilayers. *Physical Review Letters* **71**, 1565-1568 (1993).
16. Lenz, O. & Schmid, F. Structure of symmetric and asymmetric "ripple" phases in lipid bilayers. *Physical Review Letters* **98**(2007).
17. Heimburg, T. A model for the lipid pretransition: coupling of ripple formation with the chain-melting transition. *Biophys J* **78**, 1154-65 (2000).
18. Heimburg, T. Mechanical aspects of membrane thermodynamics. Estimation of the mechanical properties of lipid membranes close to the chain melting transition from calorimetry. *Biochim Biophys Acta* **1415**, 147-62 (1998).
19. Hatta, I., Kato, S. & Takahashi, H. Phase-Transitions and Polymorphism in Phospholipids. *Phase Transitions* **45**, 157-184 (1993).
20. Goldstein, R.E. & Leibler, S. Model for Lamellar Phases of Interacting Lipid-Membranes. *Physical Review Letters* **61**, 2213-2216 (1988).
21. Falkovitz, M.S., Seul, M., Frisch, H.L. & McConnell, H.M. Theory of periodic structures in lipid bilayer membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**, 3918-21 (1982).
22. Doniach, S. Thermodynamic Model for the Monoclinic (Ripple) Phase of Hydrated Phospholipid-Bilayers. *Journal of Chemical Physics* **70**, 4587-4596 (1979).
23. Cevc, G. Polymorphism of the bilayer membranes in the ordered phase and the molecular origin of the lipid pretransition and rippled lamellae. *Biochim Biophys Acta* **1062**, 59-69 (1991).
24. Carlson, J.M. & Sethna, J.P. Theory of the ripple phase in hydrated phospholipid bilayers. *Phys Rev A* **36**, 3359-3374 (1987).
25. Carlson, J.M., Langer, S.A. & Sethna, J.P. Frustration in Modulated Phases - Ripples and Boojums. *Europhysics Letters* **5**, 327-331 (1988).
26. Heimburg, T. Book chapter in 'Planar Lipid Bilayers (BLMs) and their application *Tien H.T; Ottova-eitmannova (Editors). Elsevier Amsterdam. 269* (2003).
27. de Vries, A.H., Yefimov, S., Mark, A.E. & Marrink, S.J. Molecular structure of the lecithin ripple phase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 5392-5396 (2005).
28. Perkins, W.R. et al. Solute-induced shift of phase transition temperature in Di-saturated PC liposomes: adoption of ripple phase creates osmotic stress. *Biochim Biophys Acta* **1327**, 41-51 (1977).
29. Woodward, J.T. & Zasadzinski, J.A. High-resolution scanning tunneling microscopy of fully hydrated ripple-phase bilayers. *Biophysical Journal* **72**, 964-976 (1997).
30. Sirota, E.B., Smith, G.S., Safinya, C.R., Plano, R.J. & Clark, N.A. X-Ray-Scattering Studies of Aligned, Stacked Surfactant Membranes. *Science* **242**, 1406-1409 (1988).
31. Singer, S.J. & Nicolson, G.L. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* **175**, 720-31 (1972).
32. Mortensen, K., Pfeiffer, W., Sackmann, E. & Knoll, W. Structural-Properties of a Phosphatidylcholine-Cholesterol System as Studied by Small-Angle Neutron-Scattering - Ripple Structure and Phase-Diagram. *Biochimica Et Biophysica Acta* **945**, 221-245 (1988).
33. Cunningham, B.A., Brown, A.D., Wolfe, D.H., Williams, W.P. & Brain, A. Ripple phase formation in phosphatidylcholine: Effect of acyl chain relative length, position, and unsaturation. *Physical Review E* **58**, 3662-3672 (1998).
34. Tamm, L.K. & McConnell, H.M. Supported Phospholipid-Bilayers. *Biophysical Journal* **47**, 105-113 (1985).
35. Tamm, L.K. Lateral diffusion and fluorescence microscope studies on a monoclonal antibody specifically bound to supported phospholipid bilayers. *Biochemistry* **27**, 1450-7 (1988).

36. Kapitza, H.G., Ruppel, D.A., Galla, H.J. & Sackmann, E. Lateral Diffusion of Lipids and Glycophorin in Solid Phosphatidylcholine Bilayers - the Role of Structural Defects. *Biophysical Journal* **45**, 577-587 (1984).
37. Scomparin, C., Lecuyer, S., Ferreira, M., Charitat, T. & Tinland, B. Diffusion in supported lipid bilayers: Influence of substrate and preparation technique on the internal dynamics. *European Physical Journal E* **28**, 211-220 (2009).
38. Keller, D., Larsen, N.B., Moller, I.M. & Mouritsen, O.G. Decoupled phase transitions and grain-boundary melting in supported phospholipid bilayers. *Physical Review Letters* **94**(2005).
39. Feng, Z.V., Spurlin, T.A. & Gewirth, A.A. Direct visualization of asymmetric behavior in supported lipid bilayers at the gel-fluid phase transition. *Biophysical Journal* **88**, 2154-2164 (2005).
40. Charrier, A. & Thibaudau, F. Main phase transitions in supported lipid single-bilayer. *Biophysical Journal* **89**, 1094-1101 (2005).
41. Tinland, b. *communication privée*.
42. Czajkowsky, D.M., Huang, C. & Shao, Z.F. Ripple Phase in Asymmetric Unilamellar Bilayers with Saturated and Unsaturated Phospholipids. *Biochemistry* **34**, 12501-12505 (1995).
43. Woodward, J.T. & Zasadzinski, J.A. Amplitude, wave form, and temperature dependence of bilayer ripples in the P-beta' phase. *Physical Review E* **53**, R3044-R3047 (1996).
44. Daillant, J. et al. Structure and fluctuations of a single floating lipid bilayer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 11639-11644 (2005).
45. Sheikh, K.H., Giordani, C., Kilpatrick, J.I. & Jarvis, S.P. Direct Submolecular Scale Imaging of Mesoscale Molecular Order in Supported Dipalmitoylphosphatidylcholine Bilayers. *Langmuir* **27**, 3749-3753 (2011).

*Chapitre IV : Effet de la force ionique :
dynamique des phosphatidylcholines et
énergie d'interaction bicouche/support*



“Let yourself be open and life will be easier. A spoon of salt in a glass of water makes the water undrinkable. A spoon of salt in a lake is almost unnoticed”

Gautama Siddharta

1 Introduction

Les bicouches lipidiques sont généralement considérées comme une matrice structurale pour différentes molécules comme les protéines et le cholestérol. La membrane cellulaire peut être associée à différents rôles : elles contrôlent la diffusion de petites molécules, d'eau et d'ions à travers la membrane. Il est important de dire que la structure et le comportement des lipides sont affectés par le pH, la force ionique et le type d'ions en solution^{1,2}. Ainsi, dans les conditions physiologiques, les lipides présents dans les bicouches ou dans les membranes cellulaires interagissent avec une solution d'ions de sels, dont la composition dépend de la zone où se trouve la membrane. Les plus importants sont Na^+ , K^+ , Cl^- , Ca^{2+} et Mg^{2+} . Les ions divalents Ca^{2+} jouent un rôle dans les membranes mitochondriales alors que les ions monovalents tels que Na^+ et K^+ sont importants dans la modulation des propriétés de la membrane plasmique³⁻⁵. De récentes études ont montré que les ions monovalents comme le sodium pouvaient avoir un impact significatif sur la bicouche lipidique car ils renforcent les interactions lipides-lipides et peuvent provoquer la compression de la membrane⁶⁻⁹. D'autres études expérimentales traitent de la quantification du potentiel de la membrane à travers la mobilité électrophorétique des lipides sous différentes forces ioniques mesurant ainsi la valeur du potentiel zêta (ζ)^{10,11}. Jusqu'à présent, toutes les études ont donné des résultats montrant que les cations pénétraient profondément dans la membrane jusqu'à la région carbonyle et formaient des complexes avec les lipides^{9,12-14}. Cette liaison cation-lipide a un impact sur les propriétés structurales et la dynamique des membranes PC car elle conduit à une diminution de l'aire par lipides accompagnés d'un ralentissement de la diffusion latérale dans la membrane^{9,12-14}. Cependant, la compréhension des effets du sel sur la bicouche est incomplète et parfois étonnante, certains résultats montrant qu'un ion peut se lier à trois phospholipides⁹ et d'autres que 2 à 9 ions peuvent se lier à 100 lipides^{15,16}.

Ce qui vient d'être exposé concerne des bicouches libres et, à notre connaissance, il n'existe pas d'étude sur les BLS, peut-être parce que les comportements observés avec des bicouches libres ont été extrapolés, un peu vite à celui des bicouches supportées. Or, dans nos systèmes, l'importance du rôle de l'interaction bicouche/support est reconnue. C'est pourquoi nous sommes intéressés à l'effet de la présence de sel sur le comportement de nos systèmes bicouche/support en étudiant comment étaient affectés ou non le taux de transfert (par double Langmuir-Blodgett) et le coefficient de diffusion.

2 Résultats et discussion

2.1 Taux de transfert

La **Figure 1** montre les taux de transfert sur mica obtenus lors de la fabrication de bicouches supportées unilamellaire (une seule bicouche) de DPPC. La sous-phase est soit de l'eau pure, soit une solution de chlorure de sodium (NaCl) soit une solution de chlorure de calcium (CaCl₂). De ce fait l'axe des x représente les forces ioniques équivalentes. Le taux de transfert de la première monocouche est toujours excellent (≥ 1), indiquant une très bonne affinité des lipides pour la surface du support (carrés rouges). Celui de la seconde est bon jusque vers 10 mM puis décroît brutalement à une valeur négative proche de -1. La présence d'ions Ca²⁺, divalents, ne modifie en rien ce comportement.

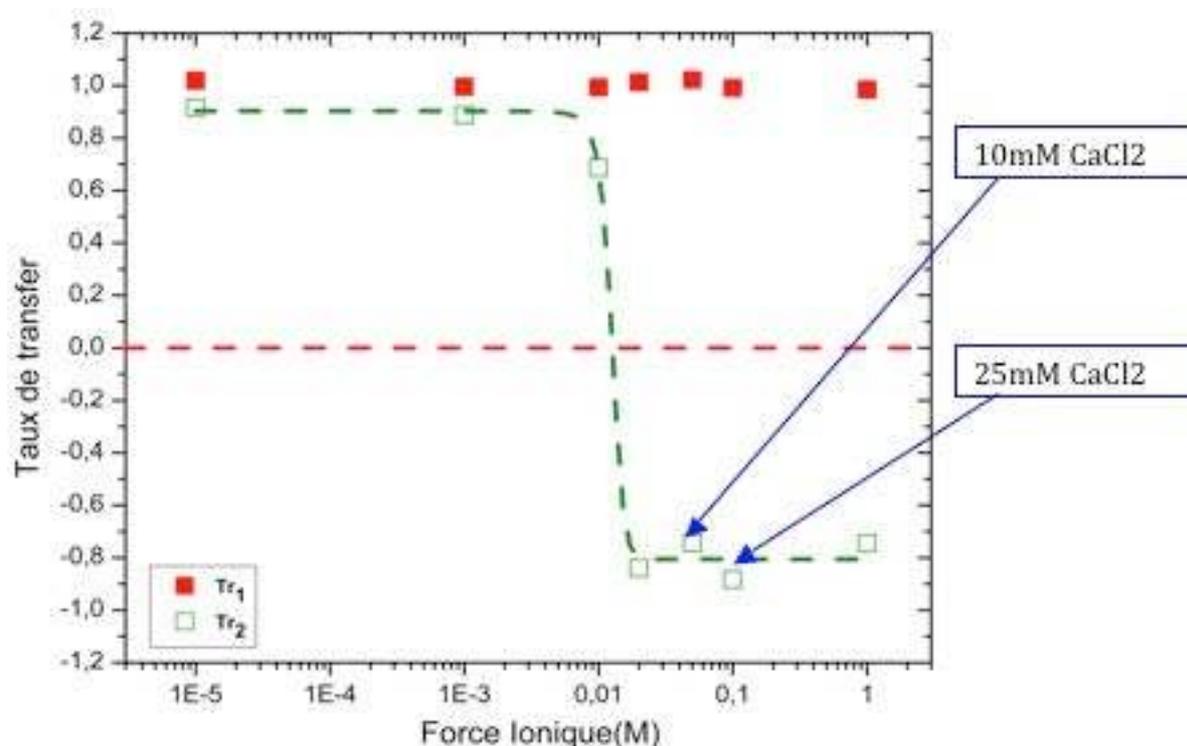


Figure 1: Taux de transfert de DPPC sur mica en fonction de la force ionique de la sous-phase. Les carrés rouges et verts représentent respectivement Tr₁ et Tr₂.

Ceci veut dire que non seulement on ne transfère pas une 2nde monocouche pour « refermer » la bicouche mais qu'au contraire, on « nettoie » presque quantitativement la surface de sa 1^{ère} monocouche. Ainsi il semble qu'au delà d'une certaine force ionique, la force d'arrachement qui s'exerce sur la 1^{ère} monocouche lors de la tentative de transfert de la 2nde monocouche devienne supérieure à la force d'adhésion qui maintenait la 1^{ère} monocouche sur la surface ou

en d'autres termes, que l'énergie d'interaction bicouche/support diminue lorsque la force ionique augmente. Ceci nous suggère qu'en modélisant l'énergie d'interaction, on devrait pouvoir estimer sa valeur grâce à cette expérience relativement simple.

2.2 Coefficients de diffusion

Pour pallier à la difficulté décrite précédemment, nous avons désormais formé nos bicouches à partir d'un film de Langmuir de DPPC (ou de DMPC) sur une sous-phase d'eau pure. La lame portant la bicouche est ensuite transférée dans un cristalliseur (100 ml) contenant la solution saline à la force ionique souhaitée et laissée à équilibrer pendant 30 minutes. On considère qu'après ce temps, toute l'eau, y compris le film aqueux compris entre la bicouche et le support s'est échangé avec la solution saline. La lame est alors transférée dans la cellule de FRAPP remplie de la même solution saline pour effectuer les mesures de coefficient de diffusion

La **Figure 2** montre la variation du coefficient de diffusion d'une bicouche de DPPC supportée sur du mica en fonction de la température et pour différentes concentrations en sel, c'est-à-dire différentes forces ioniques. Dans l'eau et pour les concentrations 1 et 10mM en NaCl, nous observons :

- un découplage des feuilletts distal et proximal¹⁷

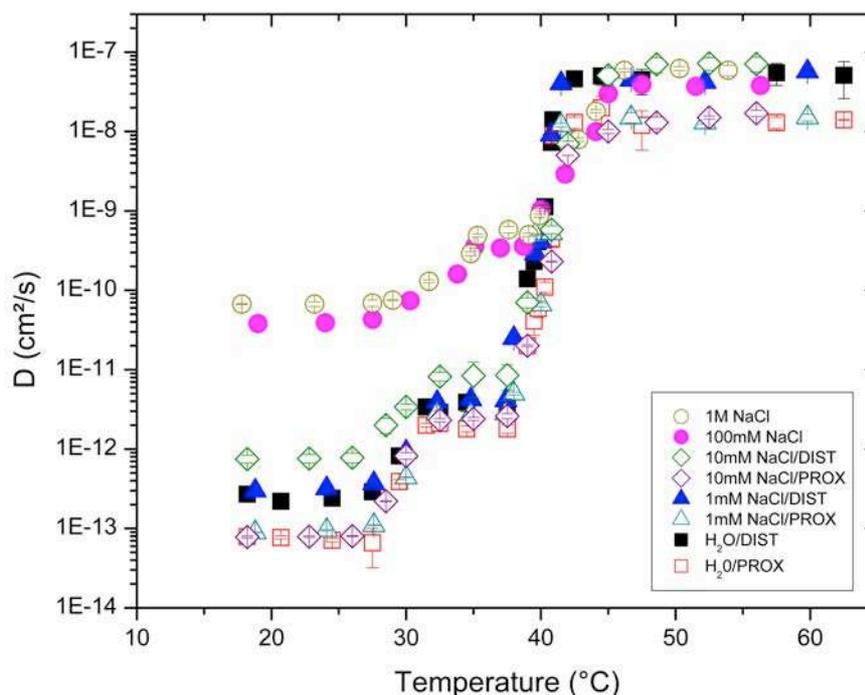


Figure 2: Coefficient de diffusion du DPPC dans une bicouche lipidique supportée sur mica en fonction de la température et de la concentration en NaCl

- les étapes classiques et successives du changement d'état sur mica : phase gel/pré-transition/phase *ripple*/transition principale/phase fluide. A notre connaissance, les résultats de la littérature montrant la totalité de l'évolution du système via le coefficient de diffusion sont rares voire inexistants.

Le **Tableau 1** montre les valeurs significatives de D dans les différentes phases.

DPPC / mica		Phase Gel	Phase Ripple	Phase Fluide
		D (cm ² /s)		
1M NaCl		6.5 E-11	5.8 E-10	6.5 E-8
100mM NaCl		4 E-11	3.4 E-10	4 E-8
100mM NaCl + 2mM CaCl ₂	distal	4 E-11	3.4 E-10	5 E-8
	proximal	1.9 E-11	1.7 E-10	2.1 E-8
10mM NaCl	distal	7.6 E-13	8.2 E-12	7.3 E-8
	proximal	7.9 E-14	2.5 E-12	1.7 E-8
1mM NaCl	distal	3.3 E-13	4.2 E-12	6.2 E-8
	proximal	8.6 E-14	2.4 E-12	1.5 E-8
H ₂ O	distal	3 E-13	3.7 E-12	6 E-8
	proximal	8 E-14	2.1 E-12	1.3 E-8

Tableau 1: Valeurs des coefficients de diffusion de la phase gel, ripple et fluide pour les BLS de DPPC supportées sur mica en fonction de la concentration en sel.

Dans l'eau et le sel 1 mM, les courbes $D = f(T)$ des feuillet proximaux et distaux sont superposables entre eux.

Pour 10 mM NaCl, si la diffusion du feuillet proximal reste dans la barre d'erreur des deux forces ioniques précédentes, la diffusion du feuillet distal est multipliée par ≈ 3 dans la phase gel, par ≈ 2 dans la phase *ripple* et par ≈ 1 dans la phase fluide.

Pour les solutions salines 100mM et 1 M, il n'y a plus de découplage. Les coefficients de diffusion dans la phase gel ont augmenté de plusieurs ordres de grandeur et valent maintenant respectivement 4 et 6.5×10^{-11} cm²/s. Les courbes rejoignent celles des feuillet distaux des autres forces ioniques dans la phase fluide. La valeur ($\approx 6.5 \times 10^{-8}$ cm²/s) pour NaCl 1M est voisine de celle mesurée dans les bicouches libres ($\approx 10^{-7}$ cm²/s) (vésicules ou suspendues) de lipides type PC.

Ainsi quand on ajoute du NaCl, le découplage disparaît, le coefficient de diffusion augmente.

La phase *ripple*, elle, est toujours présente, quelle que soit la concentration en sel.

La **Figure 3** montre le même type de courbes, obtenues avec une bicouche de DPPC supportée sur du verre. L'interaction entre les deux est réputée plus faible¹⁷. Effectivement, à force ionique égale, les coefficients de diffusion des lipides de la bicouche supportée sur verre sont toujours plus élevés que ceux de la bicouche supportée sur mica aux faibles forces ioniques et tendent à se rejoindre pour 100 mM et 1M en NaCl

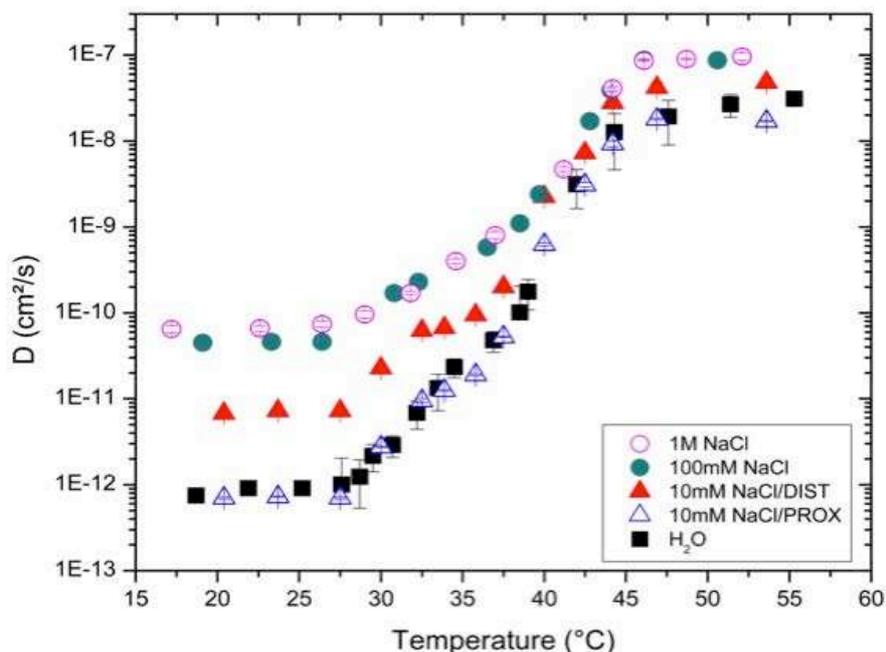


Figure 3: Coefficient de diffusion du DPPC dans une bicouche lipidique supportée sur verre en fonction de la température et de la concentration en NaCl

Les courbes dans NaCl 1M et 100 mM sur verre ou sur mica se superposent.

Le **Tableau 2** montre les valeurs significatives de D dans les différentes phases.

DPPC / verre		Phase Gel	Phase Ripple	Phase Fluide
		D (cm ² /s)		
1M NaCl		6.7 E-11	/	8.9 E-8
100mM NaCl		4.6 E-11	/	8.9 E-8
10mM NaCl	distal	7.2 E-12	7 E-11	4.7 E-8
	proximal	7.5 E-13	1.2 E-12	1.9 E-8
H ₂ O		8.1 E-13	/	2.7 E-8

Tableau 2: Valeurs des coefficients de diffusion de la phase gel, ripple et fluide pour les BLSs de DPPC supportées sur verre en fonction de la concentration en sel.

Dans l'eau, on n'observe pas de découplage des feuillet, non plus que dans NaCl 100mM et 1M, comme sur le mica. S'il existe un facteur 100 entre les valeurs de la diffusion en phase gel, il n'y a plus qu'un facteur 3 dans la phase fluide. Le fait original est que l'on observe maintenant un découplage dans NaCl 10mM : la diffusion du feuillet proximal reste identique à celle mesurée dans l'eau mais celle du feuillet distal augmente.

La **Figure 4** est un schéma, à peu près à l'échelle, d'un système support + un film d'eau ($e \cong 1$ nm) + une 1^{ère} bicouche + une 2^{ème} bicouche séparée de la 1^{ère} par une épaisseur d'eau de 4-5 nm¹⁸. Si on porte la longueur de Debye K^{-1} sur l'axe des y , et si on fait l'hypothèse que l'interaction devient négligeable à partir de K^{-1} , valeur à laquelle le potentiel d'interaction vaut $1/e$, tout se passe comme si la principale interaction qui « tient » la bicouche était l'interaction électrostatique, en plus de celle de Van der Waals, des interactions bicouche/solvant, feuillet/feuillet et des interactions hydrophobes. Tous les comportements peuvent être décrits de façon cohérente avec ce postulat.

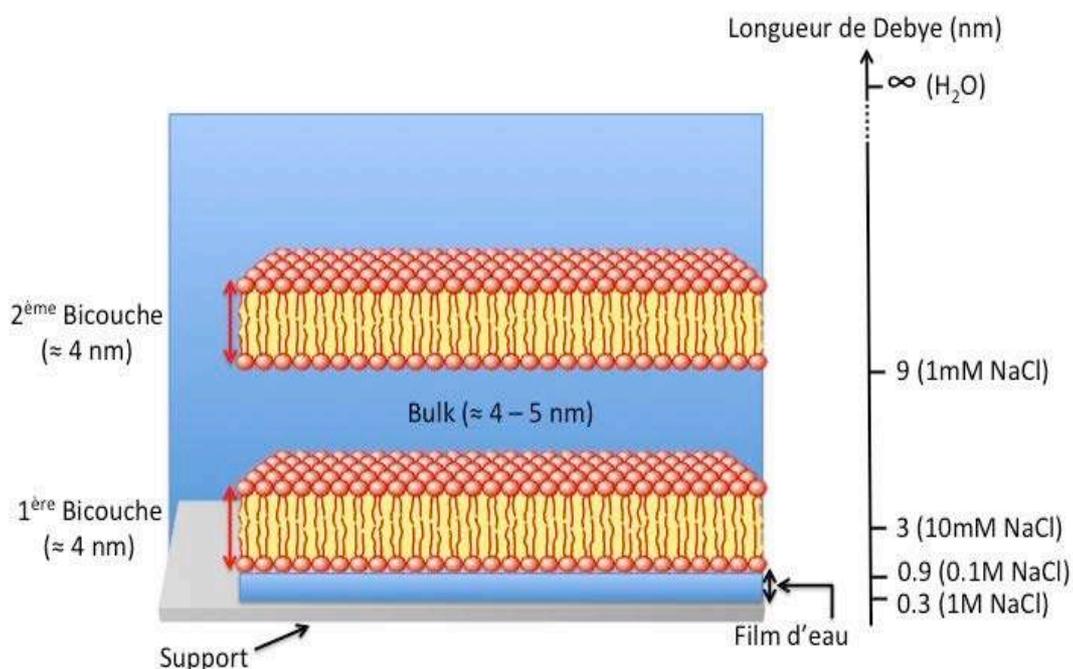


Figure 4: Représentation de la longueur de Debye au niveau d'une bicouche ainsi que d'une double bicouche

2.3 Bicouche DPPC/mica :

Dans l'eau, K^{-1} tend vers l'infini, dans NaCl 1mM il vaut 9 nm, la bicouche est entièrement située dans un potentiel fort, l'interaction électrostatique bicouche/support est maximale. Le feuillet proximal ressent plus l'interaction et la rugosité du support, son coefficient de

diffusion est inférieur à celui du feuillet distal, on observe un découplage des feuillets. Plus NaCl augmente, plus l'interaction diminue, plus le coefficient de diffusion augmente. Pour 10 mM NaCl ($K^{-1} \approx 3$ nm), il y a toujours découplage mais les têtes PC du feuillet distal qui se trouvent à environ 5-6 nm du support subissent un potentiel plus faible, le coefficient de diffusion des lipides augmente fortement. Pour 100 mM et 1M NaCl, K^{-1} vaut respectivement 0.9 et 0.3 nm, le potentiel est faible (l'interaction totale n'est pas nulle puisque la bicouche reste à la surface du support et ne « part » pas en vésicules dans la solution) mais l'interaction n'est plus assez forte et différenciée pour induire le découplage, le coefficient de diffusion dans la phase gel augmente encore.

2.4 Bicouche DPPC/verre

Les résultats de la **Figure 3** peuvent être décrits en utilisant la même approche, renforcée par le comportement observé dans NaCl 10mM. Alors que dans l'eau, dans NaCl 100 mM et 1M on n'observe pas de découplage pour les raisons décrites plus haut (faible interaction avec le verre et, dans le sel, écrantage de l'interaction électrostatique), on l'observe dans NaCl 10 mM avec $K^{-1} \approx 3$ nm : le feuillet proximal est dans un potentiel important, il est « tenu », le distal (et surtout les têtes PC qui sont à environ 5-6 nm du support) est dans un potentiel plus faible, il l'est moins. Nous avons donc induit le découplage des feuillets en ajustant la force ionique du milieu.

Au final, sous l'hypothèse d'un potentiel qui s'affaiblit notablement à K^{-1} , nous pouvons dire que l'épaisseur du film d'eau entre le support et la bicouche est comprise entre 0.9 et 3 nm.

2.5 Double bicouche DPPC/mica

Nous avons observé dans le chapitre précédent que, dans l'eau, la diffusion des lipides dans la bicouche supérieure d'une quadricouche (ou double bicouche) était supérieure à celle dans une bicouche supportée unilamellaire, qu'il n'y avait plus de découplage des feuillets mais que le plateau *ripple* était toujours présent (ce qui, au passage, montre que le concept *ripple* est robuste). Cette augmentation de la diffusion était attribuée à l'éloignement de la 2nde bicouche du support (potentiel électrostatique plus faible, moins de friction « mécanique » BLS/support, amplitude des fluctuations thermiques de la bicouche supérieure plus grande). La **Figure 5** montre que pour 10mM et 1M NaCl, la bicouche est de moins en moins tenue par l'interaction électrostatique, le coefficient de diffusion augmente.

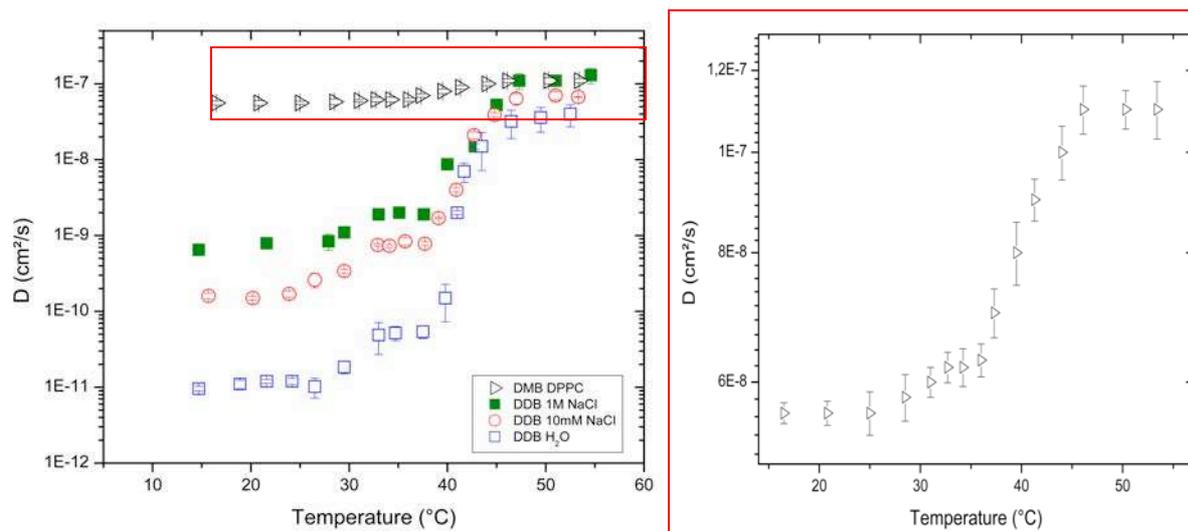


Figure 5: Coefficient de diffusion du DPPC dans la bicouche supérieure d'une double bicouche supportée sur mica en fonction de la température et de la concentration en NaCl. Le rectangle rouge contient la courbe d'une multibicouche. (b) est un agrandissement de ce rectangle.

On constate que par rapport à son homologue unilamellaire à la même force ionique le coefficient de diffusion en phase gel a été multiplié par 10.

Le **Tableau 3** montre les valeurs significatives de D dans les différentes phases.

DPPC/mica	Phase Gel	Phase Ripple	Phase Fluide
	D (cm ² /s)		
DMB/H ₂ O	5.4 E-8	6.3 E-8	1.1 E-7
DDB/1M NaCl	7.9 E-10	1.9 E-9	1.1 E-7
DDB/10mM NaCl	1.6 E-10	7.4 E-10	6.8 E-8
DDB/H ₂ O	1.1 E-11	5.3 E-10	3.7 E-8

Tableau 3: Valeurs des coefficients de diffusion de la phase gel, ripple et fluide pour le DMB et les DDB de DPPC supportées sur mica en fonction de la concentration en sel.

La courbe qui représente la variation du coefficient de diffusion d'une multi-bicouche avec la température témoigne d'une interaction encore plus faible du fait de l'éloignement : la valeur de la diffusion en phase gel est plus élevée que dans les précédentes situations, la diffusion en phase fluide rejoint celle d'une bicouche libre.

La variation globale de D semble résulter du changement de la variation de la longueur de Debye et de l'éloignement.

2.6 Bicouche DPPC/mica en présence de CaCl_2

L'utilisation d'une solution saline ($1\text{M NaCl} + 2\text{mM CaCl}_2$) n'induit aucun changement de la diffusion, K^{-1} vaut $\approx 0.3\text{ nm}$, l'interaction électrostatique est suffisamment écrantée pour que la présence d'un ion divalent n'ait aucun effet. Il en va différemment pour ($100\text{mM NaCl} + 2\text{mM CaCl}_2$) : K^{-1} vaut $\approx 0.9\text{ nm}$, les ions Ca^{2+} peuvent ponter le support et le feuillet proximal compte-tenu d'un film d'eau d'environ 1 nm d'épaisseur, nous observons un découplage (voir **Figure 6**).

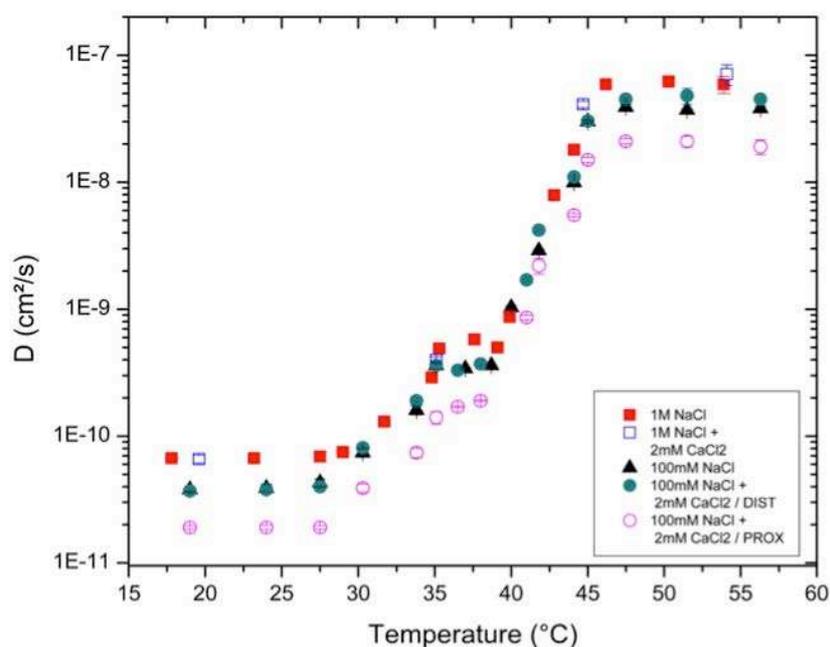


Figure 6: Coefficient de diffusion du DPPC dans une bicouche supportée sur mica en fonction de la température et de la présence de Ca^{2+}

2.7 Expériences avec le DMPC

Pour tester l'influence éventuelle de la longueur des chaînes HC, nous avons étudié l'effet de la présence de NaCl sur des BLS de DMPC supportées sur le verre et le mica. Qualitativement le comportement est le même que celui du DPPC. Dans l'eau, on constate que le coefficient de diffusion augmente lorsqu'on passe du mica au verre (facteur 10 en phase gel), et que le découplage des feuilletts a disparu (voir courbes chapitre III).

En utilisant une solution de NaCl 100mM , le coefficient de diffusion augmente d'un facteur 10 par rapport au DMPC supporté sur le verre et, en phase fluide, le coefficient de diffusion est similaire à celui d'une bicouche libre. Le **Tableau 4** montre les valeurs significatives de D dans les différentes phases.

DMPC		Phase Gel	Phase Ripple	Phase Fluide
		D (cm ² /s)		
100mM NaCl / Verre		2.5 E-9	/	1.2 E-7
H ₂ O/verre		2 E-10	/	4.8 E-8
H ₂ O/mica	distal	3.5 E-11	1.7 E-9	6.5 E-8
	proximal	2.8 E-12	2 E-10	1.7 E-8

Tableau 4: Valeurs des coefficients de diffusion de la phase gel, ripple et fluide pour les BLS de DMPC supportées sur verre ou mica

2.8 Estimation de l'énergie d'interaction bicouche/support à partir des courbes de diffusion

Nous voulons souligner le fait que ces courbes $D = f(T)$ sont riches d'informations. Outre les coefficients de diffusion, les pentes de la prétransition et de la transition renseignent sur l'énergie d'interaction totale du système bicouche/support.

En effet nous avons remarqué que l'écart entre 2 courbes de coefficients de diffusion était plus grand dans la phase gel que dans la phase *ripple* et que les valeurs dans la phase fluide avaient tendance à converger vers une même valeur, celle d'une bicouche libre. Ceci implique donc que les pentes qui relient ces différentes phases diminuent. Par ailleurs nous observons que plus l'énergie d'interaction semble forte, comme en témoigne la valeur élevée de la diffusion, plus la valeur de la pente est élevée. Nous pensons qu'il est possible d'estimer l'énergie d'interaction bicouche/support à partir des valeurs des pentes, permettant ainsi de comparer une situation à une autre.

Le concept d'acquisition d'une "quantité d'énergie suffisante" pour passer d'un état d'énergie à l'autre est justifié par l'équation d'Arrhenius (équation 1) :

$$D = D_0 \exp(-E_a/RT) \quad \text{Eq 1}$$

avec $E_{a_{app}}$ = l'énergie d'activation apparente de diffusion ou ΔH dans le cas d'une transition

D_0 = une constante pré-exponentielle

R = La constante des gaz parfait

T = Température absolue

Dans le cas d'une transition de phase, on peut estimer que le coefficient de diffusion D peut s'écrire sous la forme d'une combinaison linéaire de la diffusion en phase fluide et en phase

gel (D_f et D_g respectivement) en tenant compte de pré-facteurs qui représentent le pourcentage de phospholipides en phase fluide et en phase gel :

$$D = (\alpha/(\alpha + \beta)) D_f + (\beta/(\alpha + \beta)) D_g \quad \text{Eq 2}$$

$\alpha/(\alpha + \beta)$ et $\beta/(\alpha + \beta)$ étant respectivement les proportions de phospholipides en phase fluide et gel et $(\alpha + \beta) = 1$.

La courbe du coefficient de diffusion D en fonction de la température T ressemble, par exemple, à celle du pourcentage de phase gel en fonction de la température. Le coefficient de diffusion étant proportionnel à l'aire des différentes phases suivant le modèle introduit par Sackmann et coll.²⁵, nous pouvons utiliser l'équation de Van 't Hoff (équation 3), avec $K = A_f/A_g = D_g/D_f$:

$$\frac{d \ln K}{dT} = - \frac{\Delta H}{RT^2} \quad \text{Eq 3}$$

que l'on peut écrire :

$$\frac{d \ln K}{d(1/T)} = - \frac{\Delta H}{RT} \quad \text{Eq 4}$$

Ainsi, en traçant $\ln D$ en fonction de $1/T$, on peut déterminer les valeurs de $E_{a,app}$ entre deux phases, correspondant aux pentes dans la **Figure 7**.

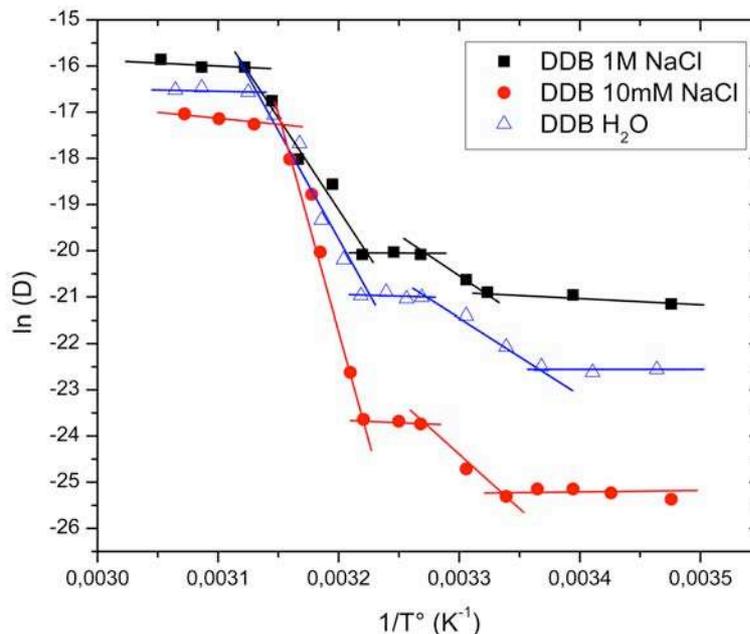


Figure 7: Courbe représentant $\ln(D)$ en fonction de $1/T$ et en fonction de la concentration du NaCl pour des DDB de DPPC sur mica.

Quelques expériences préliminaires de DSC nous ont permis de confirmer cela.

Rappel :

Le signal d'une expérience DSC sur des vésicules formant une phase ripple présente trois pics différents (figure 8) : deux pics, séparés par une plage de température, qui décrivent respectivement la prétransition et la transition. Le troisième pic, présent entre les 2 pics précédents, correspond à la phase *ripple*. Il n'est pas toujours bien visible expérimentalement parce que de faible amplitude et très élargi : dans son article Heimburg constate néanmoins que la courbe $C_p(T)$ ne revient pas complètement à la ligne de base¹⁹.

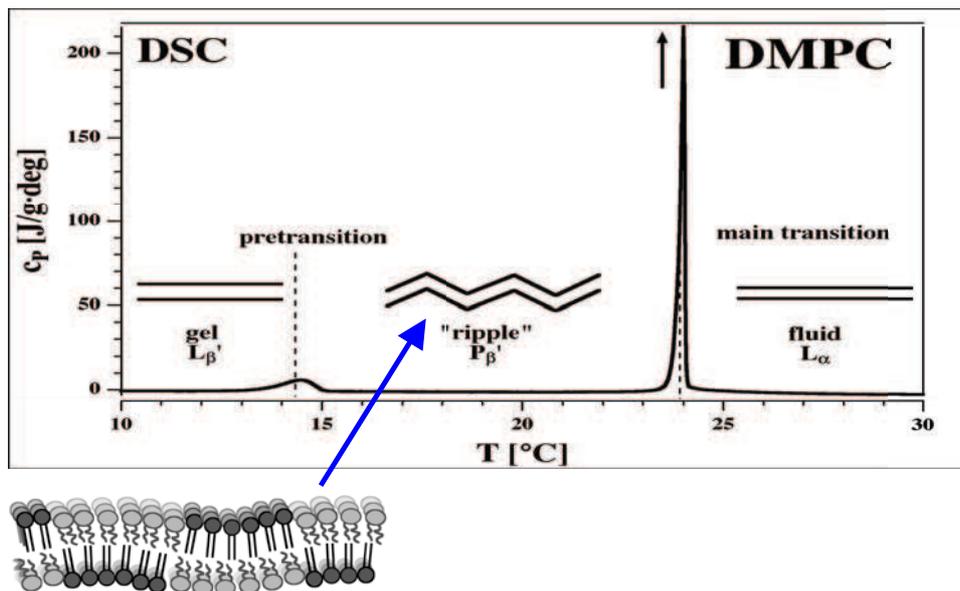


Figure 8: Profil de la capacité thermique de membranes multilamellaires de DMPC, montrant la prétransition et la transition principale. Entre ces deux transitions, la membrane adapte une géométrie différente, appelée phase *ripple*, qui montre des ondulations périodiques et dont les périodes sont d'environ 1 à 20 nm. Au-dessus de la transition ou au-dessous de la prétransition la membrane est linéaire. Repris de *Chapter 8 of the book "Planar lipid bilayers and their applications"*, T. Heimburg, 269-293, (2003)

La **Figure 9** montre un exemple de signal DSC obtenu pour du DPPC supportée sur du mica, dans l'eau. Nous avons préparé la multibicouche par hydratation de film de phospholipides, puis découpé un disque ($\phi = 4,5$ mm) placé dans un creuset de DSC. Pour les bicouches unilamellaires, nous avons découpé plusieurs disques que nous avons empilés dans le creuset. Ceci nous a permis d'avoir suffisamment de lipides pour obtenir un signal. On observe les deux pics caractéristiques de la prétransition et de la transition, séparés par une région qui correspond à la formation de la phase *ripple*.

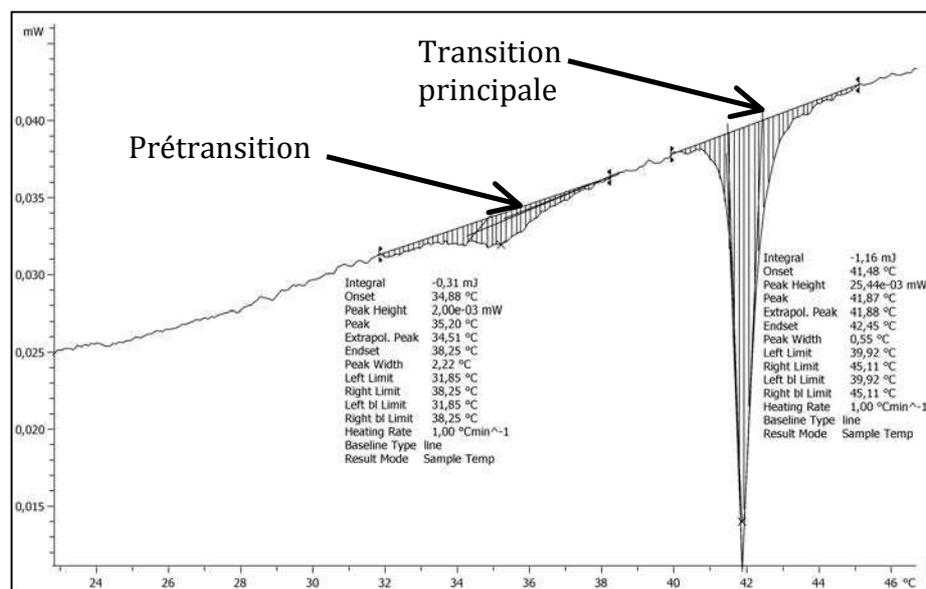


Figure 9: Courbe de DSC représentant les pics de prétransition et de transition principale d'une multibicouche de DPPC supportée sur du mica, dans l'eau

Pour estimer la quantité de phospholipides présente et pouvoir calculer une quantité d'énergie par mole, nous avons soit utilisé la concentration de départ (vésicules et multi-bicouches), soit calculée celle-ci *via* la surface de notre support et l'aire moléculaire du lipide (59.7 \AA^2 pour le DMPC²⁰ et 62.9 \AA^2 pour le DPPC²¹).

Dans le tableau 5 nous comparons les valeurs de DSC et les valeurs des pentes relevées sur nos courbes de FRAPP $D=f(T)$.

Tableau 5 : Comparaison des chaleurs de transition obtenues par FRAPP ou DSC dans l'eau.
*Ces techniques ont été reprises du site LIPIDAT²⁴.

PHOSPHOLIPIDE	TECHNIQUE	E _a pre (kJ/mol)	E _a tr (kJ/mol)
Vésicules DPPC ²²⁻²⁴	DSC*, ESR*, DPH*, X-Ray* ...	5	34
	FRAPP	10	44
Multibicouche DPPC/mica	DSC	10	38
	FRAPP	277	1638
BLS de DPPC/mica	DSC	260	1676
	FRAPP	391	1159
BLS de DMPC/mica	DSC	487	1222

Les barres d'erreur pour les deux méthodes sont de l'ordre de 10%. Nous constatons que l'accord est très bon entre les deux techniques de mesure.

Les valeurs de E_{aapp} déterminées à partir des pentes des courbes $\ln D = f(1/T)$ ont été reportées dans les tableaux 6 à 9 pour les différents systèmes étudiés.

DPPC /mica		Pretransition		Transition principale	
		T_{pre} (°C)	E_{aapp} (kJ/mol)	T_m (°C)	E_{aapp} (kJ/mol)
1M ou 100mM NaCl		32.1	214.6	40.7	416.7
100mM NaCl + 2mM CaCl ₂	distal	31.3	213.4	41.1	443.2
	proximal	32.3	239.7	41.3	497.1
10mM NaCl	distal	29.3	274.6	41	977.9
	proximal	29.9	406.2	41.1	1321.5
1mM NaCl	distal	30	414.7	41.5	1639.3
	proximal	30.1	524.5	41.9	1653.7
H ₂ O	distal	30.3	468	41.6	1642.3
	proximal	30.7	648.8	42	1655.7

Tableau 6: Valeurs des E_{aapp} de la prétransition et de la transition principale pour les BLS de DPPC supportées sur mica en fonction de la concentration en sel.

DPPC /mica	Prétransition		Transition Principale	
	T_{pre} (°C)	E_{aapp} (kJ/mol)	T_m (°C)	E_{aapp} (kJ/mol)
DMB/H ₂ O	30.5	9.8	41.1	44.6
DDB/1M NaCl	30.5	120.1	41.4	323.9
DDB/10mM NaCl	29.1	117.6	41.4	407.9
DDB/H ₂ O	29.8	184.7	41.1	637.9

Tableau 7: Valeurs des E_{aapp} de la prétransition et de la transition principale pour le DMB et les DDB de DPPC supportées sur mica en fonction de la concentration en sel

DPPC / verre		Prétransition		Transition principale	
		T _{pre} (°C)	E _{aapp} (kJ/mol)	T _m (°C)	E _{aapp} (kJ/mol)
1M ou 100mM NaCl		31.7	177.7	41.6	437.01
10mM NaCl	distal	30	328.9	41.4	664.6
	proximal	30	398.1	41.4	722.7
H ₂ O		31.05	354.6	41.3	656.2

Tableau 8: Valeurs des E_{aapp} de la prétransition et de la transition principale pour les BLS de DPPC supportées sur verre en fonction de la concentration en sel.

DMPC		Prétransition		Transition principale	
		T _{pre} (°C)	E _{aapp} (kJ/mol)	T _m (°C)	E _{aapp} (kJ/mol)
100mM NaCl / Verre		17	104	24.5	228.5
H ₂ O/verre		16.9	221.8	23.4	318.8
H ₂ O/mica	distal	15.9	377	24.8	963.8
	proximal	15.9	604.6	24.8	1289.9

Tableau 9: Valeurs des E_{aapp} de la prétransition et la transition pour les BLS de DMPC supportées sur verre ou mica.

Nous souhaitons illustrer ce qui vient d'être présenté au moyen de quelques exemples, proposant ainsi un début d'analyse simple. Une modélisation rigoureuse des interactions, de leur variation avec la distance, les charges,..., permettrait d'exploiter plus complètement ces données expérimentales.

a) Comparaison entre DPPC et DMPC

Nous observons que les pentes moyennes BLS DPPC (et BLS DMPC) dans l'eau sont multipliées par un facteur 3 du fait du changement de support verre → mica, là où nous avons noté des coefficients de diffusion qui devenaient plus grands lors du passage mica → verre.

Le changement de 2 CH₂ de la longueur des chaînes carbonées par passage du DMPC au DPPC se traduit par un coefficient multiplicateur 1.5-2 sur les valeurs de E_{aapp}.

Support	Mica/H ₂ O	Verre/ H ₂ O
Lipide	E _{aapp} (kJ/mol)	
DPPC	1650	656
DMPC	1130	318

Tableau 10: Comparaison des E_{aapp} pour différents lipides et différents supports

b) Etude approfondie sur le DPPC

L'énergie totale des interactions peut s'écrire :

$$E_{aapp} = E_{Debye} + \Delta H + E_{VDW} + E_{\text{feuillet/feuillet}} + E_{\text{bicouche/solvant}} + \dots$$

que l'on peut simplifier en:

$$E_{aapp} = E_{Debye} + \Delta H + E_{vdW} + E_{diverses}$$

où E_{Debye} est l'énergie d'interaction électrostatique, ΔH le changement d'état (prétransition ou transition), E_{VDW} celle de van der Waals, et un terme E_{diverses} qui regroupe toutes les interactions qui, *a priori*, ne sont pas affectées par nos changements de paramètres.

En utilisant certains cas limites, nous pouvons accéder aux ordres de grandeurs de certains termes d'énergie à partir des valeurs données dans les tableaux précédents.

Ainsi, en ne s'intéressant qu'aux pentes de la transition :

- Dans les vésicules,

$$E_{aapp} = \Delta H + E_{diverses} = 34 \text{ kJ/mol, pas de terme de Debye, pas de terme van der Walls}$$

- Dans une multi-bicouche,

$$E_{aapp} = \Delta H + E_{VDW} + E_{diverses} = 41 \text{ J/mol, } E_{Debye} \cong 0$$

En faisant la différence avec l'énergie de la situation précédente, on estime E_{VDW} soit 7 kJ/mol, énergie qui participe au maintien des bicouches à la surface du support.

- Pour une BLS de DPPC/mica dans l'eau,

$$E_{aapp} = E_{Debye} + \Delta H + E_{vdW} + E_{diverses} = 1650 \text{ kJ/mol, soit une estimation de } E_{Debye} \text{ égale à } 1609 \text{ kJ/mol}$$

- Pour une BLS de DPPC/mica dans NaCl 1M, E_{aapp} a diminuée mais vaut encore $\cong 416$ kJ/mole, soit E_{Debye} $\cong 375$ kJ/mol.

- Pour une BLS de DPPC/verre dans NaCl 1M, E_{app} a diminuée de 656 à 437 kJ/mol soit un terme $E_{Debye} \cong 219$ kJ/mol, une valeur moins élevée que celle déterminée sur le mica (375 kJ/mol), les valeurs de D étant voisines de la phase gel à la phase fluide. Dans le chapitre III consacré à la phase *ripple*, nous avons expliqué que la différence d'interaction entre le mica et le verre, qui induisait le découplage et des coefficients de diffusion différents, pouvait être due soit à la chimie (différence de charge de surface) soit à la rugosité, sans pouvoir les départager. Si on admet que l'interaction électrostatique entre la bicouche et le support se réduit à la même valeur dans NaCl 1M quel que soit le support, la valeur résiduelle ($375 - 219 = 156$ kJ/mol) peut être attribuée à la différence de « friction mécanique » bicouche/support quand on passe du verre au mica : la bicouche « flottant » au dessus des aspérités de la lame de verre subit une friction moindre qu'avec le mica atomiquement plan.

3 Conclusion

Pour obtenir une meilleure compréhension des interactions de la bicouche avec le support nous avons effectué des mesures de diffusion par FRAPP sur des bicouches lipidiques supportées de phosphatidylcholines (PC). Nous avons montré que le principal effet d'un accroissement de la force ionique sur une membrane phospholipidique était d'augmenter la diffusion des PC du fait d'une diminution de l'interaction électrostatique avec le substrat. Les deux paramètres principaux qui régissent le comportement de la bicouche sont l'interaction électrostatique (force ionique/longueur de Debye) et la distance bicouche/support. Des expériences de DSC ont confirmé que la pente des transitions observées sur les courbes $\ln D = f(1/T)$ permettaient d'évaluer les ordres de grandeurs de l'énergie d'interaction. Une analyse sommaire est ébauchée pour estimer, en comparant les situations expérimentales correspondant à des cas limites, les contributions des différents termes qui la composent. D'un point de vue général, l'ensemble des situations expérimentales observées dans ce chapitre nous montre que, *via* la mesure du coefficient de diffusion, les pentes des transitions, la forme de la courbe $D = f(T)$, le découplage ou non des feuillettes, nous accédons à des indicateurs de l'interaction bicouche/support assez fins sur ces systèmes extrêmement sensibles

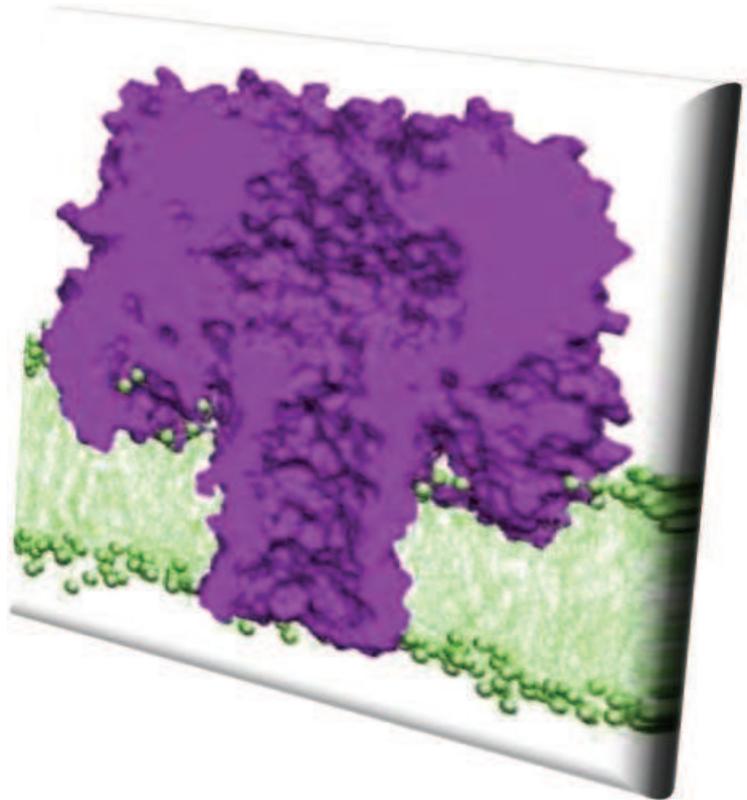
4 Références

1. Verkleij, A.J., de Kruyff, B., Ververgaert, P.H., Tocanne, J.F. & van Deenen, L.L. The influence of pH, Ca²⁺ and protein on the thermotropic behaviour of the negatively charged phospholipid, phosphatidylglycerol. *Biochim Biophys Acta* **339**, 432-7 (1974).
2. Hauser, H. & Shipley, G.G. Interactions of monovalent cations with phosphatidylserine bilayer membranes. *Biochemistry* **22**, 2171-8 (1983).
3. Herbet, L., Napolitano, C.A. & McDaniel, R.V. Direct determination of the calcium profile structure for dipalmitoyllecithin multilayers using neutron diffraction. *Biophys J* **46**, 677-85 (1984).
4. Binder, H. & Zschornig, O. The effect of metal cations on the phase behavior and hydration characteristics of phospholipid membranes. *Chem Phys Lipids* **115**, 39-61 (2002).
5. Altenbach, C. & Seelig, J. Ca²⁺ binding to phosphatidylcholine bilayers as studied by deuterium magnetic resonance. Evidence for the formation of a Ca²⁺ complex with two phospholipid molecules. *Biochemistry* **23**, 3913-20 (1984).
6. Garcia-Manyes, S., Oncins, G. & Sanz, F. Effect of pH and ionic strength on phospholipid nanomechanics and on deposition process onto hydrophilic surfaces measured by AFM. *Electrochimica Acta* **51**, 5029-5036 (2006).
7. Garcia-Manyes, S., Oncins, G. & Sanz, F. Effect of ion-binding and chemical phospholipid structure on the nanomechanics of lipid bilayers studied by force spectroscopy. *Biophys J* **89**, 1812-26 (2005).
8. Fukuma, T., Higgins, M.J. & Jarvis, S.P. Direct imaging of lipid-ion network formation under physiological conditions by frequency modulation atomic force microscopy. *Physical Review Letters* **98**, 106101 (2007).
9. Bockmann, R.A., Hac, A., Heimburg, T. & Grubmüller, H. Effect of sodium chloride on a lipid bilayer. *Biophysical Journal* **85**, 1647-1655 (2003).
10. Makino, K. et al. Temperature-Induced and Ionic Strength-Induced Conformational-Changes in the Lipid Head Group Region of Liposomes as Suggested by Zeta-Potential Data. *Biophysical Chemistry* **41**, 175-183 (1991).
11. Eisenberg, M., Gresalfi, T., Riccio, T. & Mclaughlin, S. Adsorption of Mono-Valent Cations to Bilayer Membranes Containing Negative Phospholipids. *Biochemistry* **18**, 5213-5223 (1979).
12. Venable, R.M., Zhang, Y.H., Hardy, B.J. & Pastor, R.W. Molecular-Dynamics Simulations of a Lipid Bilayer and of Hexadecane - an Investigation of Membrane Fluidity. *Science* **262**, 223-226 (1993).
13. Vanderploeg, P. & Berendsen, H.J.C. Molecular-Dynamics Simulation of a Bilayer-Membrane. *Journal of Chemical Physics* **76**, 3271-3276 (1982).
14. Cascales, J.J.L., Berendsen, H.J.C. & de la Torre, J.G. Molecular dynamics simulation of water between two charged layers of dipalmitoylphosphatidylserine. *Journal of Physical Chemistry* **100**, 8621-8627 (1996).
15. Tatulian, S.A. Binding of Alkaline-Earth Metal-Cations and Some Anions to Phosphatidylcholine Liposomes. *European Journal of Biochemistry* **170**, 413-420 (1987).
16. Pandit, S.A., Bostick, D. & Berkowitz, M.L. Molecular dynamics simulation of a dipalmitoylphosphatidylcholine bilayer with NaCl. *Biophysical Journal* **84**, 3743-3750 (2003).

17. Scomparin, C., Lecuyer, S., Ferreira, M., Charitat, T. & Tinland, B. Diffusion in supported lipid bilayers: Influence of substrate and preparation technique on the internal dynamics. *European Physical Journal E* **28**, 211-220 (2009).
18. Charitat, T., Bellet-Amalric, E., Fragneto, G. & Graner, F. Adsorbed and free lipid bilayers at the solid-liquid interface. *European Physical Journal B* **8**, 583-593 (1999).
19. Heimburg, T. Book chapter in 'Planar Lipid Bilayers (BLMs) and their application Tien H.T; Ottova-eitmannova (Editors). Elsevier Amsterdam. 269 (2003).
20. Petrache, H.I., Tristram-Nagle, S. & Nagle, J.F. Fluid phase structure of EPC and DMPC bilayers. *Chemistry and Physics of Lipids* **95**, 83-94 (1998).
21. Nagle, J.F. et al. X-ray structure determination of fully hydrated L(alpha) phase DPPC bilayers. *Biophysical Journal* **70**, Wp225-Wp225 (1996).
22. Tristram-Nagle, S., Suter, R.M., Sun, W.J. & Nagle, J.F. Kinetics of subgel formation in DPPC: X-ray diffraction proves nucleation-growth hypothesis. *Biochim Biophys Acta* **1191**, 14-20 (1994).
23. Heimburg, T., Wurz, U. & Marsh, D. Binary phase diagram of hydrated dimyristoylglycerol-dimyristoylphosphatidylcholine mixtures. *Biophys J* **63**, 1369-78 (1992).
24. LIPIDAT. <http://www.lipidat.tcd.ie>.
25. Trauble, H. & Sackmann, E. Studies of the crystalline-liquid crystalline phase transition of lipid model membranes. 3. Structure of a steroid-lecithin system below and above the lipid-phase transition. *Journal of the American Chemical Society* **94**, 4499-510 (1972).
26. Gurtovenko, A.A. & Vattulainen, I. Effect of NaCl and KCl on phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine lipid membranes: insight from atomic-scale simulations for understanding salt-induced effects in the plasma membrane. *J Phys Chem B* **112**, 1953-62 (2008).

*Partie B: Protéine
membranaire*

Chapitre V : Nouveau régime de diffusion dans une bicouche lipidique d'une protéine membranaire modèle



“Membrane proteins and proteomics :

Un amour impossible”

Véronique Santoni et coll.

1 Résumé

Les mécanismes cellulaires sont activement modulés par la dynamique membranaire. Nous avons étudié la dynamique d'un système biomimétique simple que nous avons préparé. Il est constitué par l' α -hémolysine (α -HL) de *Staphylococcus Aureus* insérée soit sous forme d'un pore heptamérique, soit sous forme de complexes de pores dans une bicouche lipidique DMPC supportée sur du verre. Nous avons mesuré par FRAPP la diffusion de la protéine. En incubant la protéine à 20°C (température intermédiaire dans la transition) deux situations sont observées : i) lorsque le temps d'incubation est inférieur à 15 heures, la protéine s'insère sous forme de pore heptamérique et diffuse environ trois fois plus lentement que les lipides composant la bicouche, ii) un temps d'incubation supérieur à 15 heures induit la formation de complexes plus gros, qui diffusent plus lentement. Nos résultats indiquent que, alors que le modèle de Saffman-Delbruck décrit correctement la diffusion de protéines membranaires de faible rayon (décroissance en $\ln D$), au delà d'un rayon critique, le coefficient de diffusion des protéines décroît en $1/R^2$.

2 Introduction

Les protéines membranaires sont l'objet d'études intensives de la part des biologistes. En effet, elles constituent environ 30% du protéome des cellules de mammifères et régissent de nombreuses fonctions telles que le transport des ions dans ou hors de la cellule. Il existe deux descriptions principales du rôle de la bicouche lipidique: le modèle de la mosaïque fluide de Singer et Nicholson¹ et l'approche plus sophistiquée de Heimburg². Le modèle de la mosaïque fluide considère les objets qui « nagent » dans une mer de lipides. Celui de Heimburg fait jouer un rôle important au lipide : ainsi une protéine membranaire A, soluble dans un type de lipides en phase fluide, n'interagira avec une protéine B soluble dans un type de lipides en phase gel, que si, par exemple, une élévation de température induit une phase fluide généralisée. Nous savons que le rôle des protéines membranaires est régi par plusieurs facteurs tels que la composition des lipides, la température, les interactions protéine-lipide et/ou protéine-protéine, l'interaction avec le cytosquelette, etc. Une façon de comprendre les mécanismes cellulaires est d'examiner la dynamique des protéines membranaires³⁻⁵. A cet égard, beaucoup de travail a été fait, soit directement sur les cellules soit sur divers systèmes artificiels.

En raison de la composition complexe de la membrane *in vivo*, les mesures sont parfois difficiles à interpréter, ce qui explique pourquoi les systèmes biomimétiques se sont révélés précieux. Il peut s'agir de protéines liées aux membranes^{6,7}, de peptides ou d'hélices transmembranaires insérées dans la phase lipidique⁸, de protéines membranaires insérées dans des liposomes multilamellaires⁹, reconstitués dans des GUV¹⁰⁻¹³ ou dans d'autres systèmes¹⁴. Cependant, tout en recourant à des systèmes artificiels destinés à simplifier le problème, la construction d'un système modèle est souvent un long et difficile processus nécessitant plusieurs étapes. En d'autres termes, le gain en simplicité dû à l'utilisation d'un système modèle peut être annulé par la complexité de sa préparation. Elle implique souvent plusieurs manipulations comme la formation de protéoliposome, déshydratation-réhydratation, fusion des vésicules, etc. En raison de l'insolubilité des protéines membranaires dans l'eau, leur purification ou reconstitution dans le milieu demande un énorme travail, par exemple, en utilisant des détergents, parfois sophistiqués, qui doivent ensuite être éliminées par diverses méthodes avant les mesures¹⁵⁻¹⁷ tout en conservant la structure 3D de la protéine voire sa bio-activité. Toutes ces étapes peuvent altérer le système modèle, ce qui peut conduire à des réponses expérimentales biaisées. Ainsi la protéine est parfois partiellement mobile ou complètement immobile¹⁸⁻²⁰ dans le système qui en résulte, sans que l'on sache exactement pourquoi.

Une autre stratégie pour obtenir que les protéines diffusent « librement » dans la bicouche hôte est d'augmenter la distance entre la protéine et le support en utilisant un coussin²¹⁻²⁴. Récemment, Hristova et coll^{23,24} ont montré que, si le rôle du coussin est important, l'exigence principale est une préparation correcte de la bicouche. Avec sa méthode d'assemblage direct de la bicouche (éclatement de protéoliposomes sur une monocouche lipidique), les protéines étaient toujours mobiles alors qu'avec d'autres protocoles, elles pouvaient être complètement immobiles. Les résultats de Ramadurai et coll¹⁰ et de Peters et coll¹¹ sont bien décrits par le modèle Saffmann-Delbrück (SD)²⁵, ceux de Gambin et coll⁸ correspondent à une dépendance en $1/R$ du coefficient de diffusion (diffusion Stokes-Einstein) et les simulations de Guigas et coll²⁶ révèlent un comportement asymptotique pour les objets de grande taille et élastique, avec une dépendance en $1/R^2$, R étant le rayon de la partie de la protéine insérée dans la bicouche. Guigas et coll soulignent les difficultés rencontrées pour obtenir des mesures expérimentales dans le régime asymptotique en raison d'un manque d'inclusions de très grande taille, ou à de problèmes expérimentaux comme le photoblanchiment (gros objets = diffusion lente = risque de photoblanchiment des

fluorophores). Des auteurs comme Abney et coll ont étudié un autre paramètre : l'influence de la concentration en protéines²⁷. En résumé, bien que certains mécanismes commencent à être compris et que certains inconvénients aient été clairement identifiés, il semble y avoir peu de données expérimentales décrivant clairement la mobilité des protéines membranaires en fonction de leur taille^{3-5,7-12,14-17,21-24,28,29}. Comme déjà mentionné, cela est sans doute dû à la difficulté de manipuler plusieurs protéines différentes et de préparer le système expérimental pour, enfin, déterminer la variation de D en fonction de R. Ceci est illustré par le nombre d'études tentant de construire un système modèle sans *artefact*.

Nous décrivons dans ce chapitre un système biomimétique simple, basique mais bien contrôlé que nous avons construit par auto-insertion de l' α -hémolysine dans une bicouche de DMPC pur, elle-même supportée sur une plaque de verre, après avoir été déposée à l'aide d'une balance de Langmuir Blodgett.

Les avantages de ce système sont les suivants : le verre est facile à nettoyer, la bicouche est facile à déposer, la protéine s'auto-insère sous sa forme monomérique, conduisant à un pore transmembranaire stéréo-spécifique, et le système est prêt pour la mesure. L'interaction modérée (support/bicouche) permet que la dynamique des feuilletts soit identique. En outre, le bio-mimétisme de ce système peut facilement être accru, sans pour autant compliquer la procédure de construction : utilisation d'un mélange de lipides, ajout de cholestérol ou en choisissant le revêtement du support. On peut ainsi affiner/régler les interactions entre les différentes composantes.

Plus généralement, un autre avantage important est la localisation spatiale du système. Ceci permet de faire des mesures précises comme nous le faisons par FRAPP et le cas échéant d'utiliser d'autres techniques comme l'AFM, la résonance plasmonique de surface. Ce système expérimental facile à construire et facile à étudier, pourra être utilisé comme système de référence.

Nous avons choisi l' α -hémolysine de *Staphylococcus aureus* comme protéine membranaire modèle parce que cette α -toxine est bien documentée *cf. Revue bibliographique* (structure, dimensions, mécanisme de construction³⁰⁻⁴⁴. En outre l' α -HI a été utilisée pour de nombreuses applications dans le domaine de la bio-ingénierie⁴⁵⁻⁴⁹, plus particulièrement comme nanopore inséré dans des bicouches en libre-suspension pour la translocation de l'ADN simple brin. L' α -HI monomérique est soluble dans l'eau. Il forme un pré-pore heptamérique à la surface de la membrane puis la traverse en un pore fonctionnel (propriété

hémolytique), transmembranaire. Le pore d' α -hémolysine a la forme d'un champignon quand il est inséré de façon unidirectionnelle dans la bicouche. En accord avec les simulations d'Aksimentiev et coll⁴⁴, le pied a la forme d'un tonneau et la base du chapeau^{38,42,44} est partiellement insérée dans la bicouche. La friction a donc lieu sur ces deux parties. En utilisant le modèle SD, un calcul du rayon de l'objet à partir de la valeur du coefficient de diffusion nous donne une valeur proche de 5 nm. Dès lors, nous avons adopté 5 nm comme estimation géométrique du rayon équivalent R de la partie insérée de l'heptamère. Le rayon équivalent moyen de l'objet anisotrope constitué par le dimère d'heptamère est alors de 7.1 nm et, supposant un arrangement hexagonal des trois pores, de 10 nm pour l'objet formé par le trimère.

En plus du fait que nous pouvons moduler la fluidité de la bicouche de DMPC à travers une transition gel-fluide facilement accessible, nous avons choisi ce lipide parce qu'il forme une bicouche de 4-5 nm d'épaisseur. Étant donné un film d'eau entre bicouche et substrat compris entre 1 et quelques nm d'épaisseur, cela garantit un système (membrane + film d'eau + support) permettant au pied de la protéine de s'insérer facilement.

3 Résultats et discussion

Dans nos conditions (bicouche unilamellaire sur verre dans tampon PBS 10mM, NaCl 100 mM), la bicouche a le comportement d'une bicouche libre comme en témoignent les valeurs très proches des coefficients de diffusion de lipides mesurées dans la phase fluide⁵⁰⁻⁵⁴.

3.1 Caractérisation de notre système

Des études ont montré que l'efficacité de l'insertion des protéines était liée à la fluidité de la membrane^{45,52,55,56}. Cette fluidité peut être obtenue en utilisant soit des lipides qui sont fluides dans la gamme de température utilisée (comme l'EggPC, le DOPC), soit des mélanges de lipides en phase fluide (ex : DOPC) avec des lipides en phase gel (comme DPPC) soit en contrôlant la température d'incubation de la protéine au sein de la bicouche lipidique.

Pour vérifier si l'insertion de protéines était plus facile en phase fluide qu'en phase gel, nous avons effectué un essai d'incubation sur une bicouche de DMPC à l'état gel (à 10°C) pendant 24 heures. Nous n'avons pas observé de spots fluorescents, ni d'agrégats à la surface de la bicouche. Nous avons alors tenté de moduler l'insertion de la protéine en

choisissant 20°C comme température d'incubation, température à laquelle coexistent les phases fluides et gels d'une bicouche de DMPC. Dans cette configuration, l'heptamère d' α -HI devrait s'insérer préférentiellement dans les régions fluides. La **Figure 1** est une image sous microscope de la bicouche après incubation et rinçage qui montre plusieurs spots fluorescents.

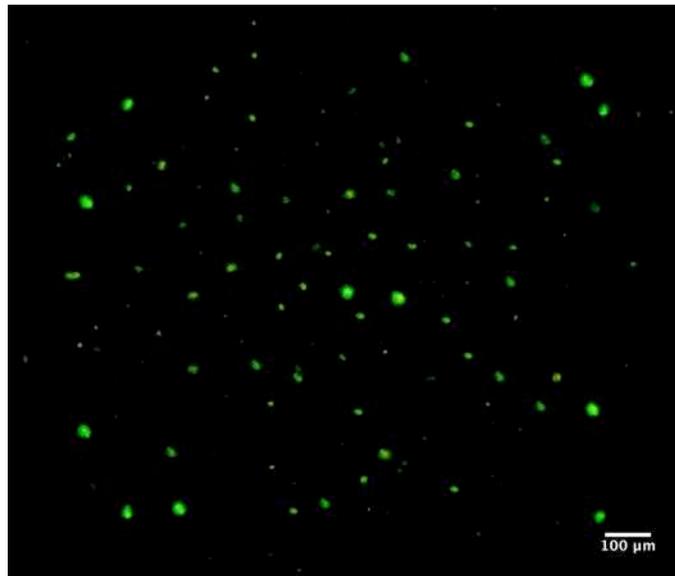


Figure 1: Image sous microscope de protéines insérées dans une bicouche lipidique supportée de DMPC après 24h d'incubation à 20°C (x200 grossissement). Bar = 100 μ m

Le **Tableau 1** montre les résultats de l'analyse de la photo par Image J.

Temps d'incubation (h)	3	7	15	18	24	48
Nombre de spots fluorescents/mm ²	10 \pm 1	21 \pm 1	38 \pm 2	127 \pm 20	139 \pm 6	191 \pm 13
Intensité moyenne des spots fluorescents (u.a.)	36 \pm 2	36 \pm 3	35 \pm 1	/	67 \pm 3	108 \pm 4
Distance entre 2 spots fluorescents (μ m)	344 \pm 85	247 \pm 46	164 \pm 27	112 \pm 14	71 \pm 7	63 \pm 10

Tableau 1: Insertion de l' α -HI dans une BLS de DMPC à 20°C. Densité, intensité et distance centre-à-centre des spots fluorescents pour différents temps d'incubation.

La courbe d'incubation a une forme sigmoïdale (symbole : triangle ouvert). Le nombre de spots fluorescents/mm² en fonction du temps d'incubation (**Figure 2**) augmente doucement, comme s'il existait un temps de latence puis on observe ce qui ressemble à une

transition pour arriver finalement à un niveau auquel le nombre de spots fluorescents reste constant.

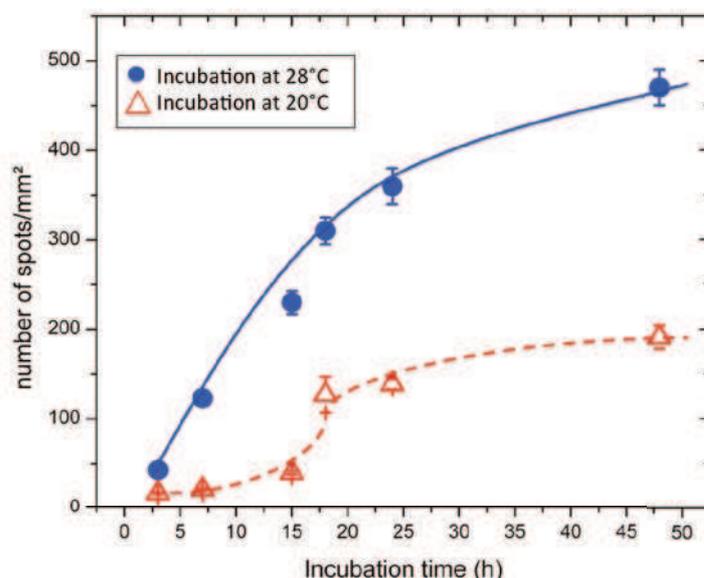


Figure 2: Nombre de spots fluorescents/mm² en fonction de temps d'incubation. Les triangles rouges (Δ) et les cercles bleus (\bullet) représentent respectivement l'insertion de l' α -HI à 20°C et à 28°C. Les lignes sont des guides pour les yeux.

Enfin nous avons incubé la protéine de 3 à 48h à 28°C, une température supérieure à T_m , à laquelle la bicouche est 100% fluide (**Figure 2**, cercle bleu). Nous obtenons une courbe isotherme d'insertion plus classique et sur laquelle on voit que le degré d'insertion atteint est plus important. Le **Tableau 2** montre les résultats de l'analyse de la photo par Image J.

Temps d'incubation (h)	3	7	15	18	24	48
Nombre de spots fluorescents/mm ²	43 ± 4	123 ± 9	230 ± 13	310 ± 17	310 ± 14	470 ± 21
Intensité moyenne des spots fluorescents (u.a.)	36 ± 2	36 ± 3	35 ± 1	37 ± 2	36 ± 3	37 ± 1
Distance entre 2 spots fluorescents (μm)	62.4 ± 11	42 ± 8	35.2 ± 4	27.6 ± 5	19.5 ± 4	11.3 ± 2
D ($\times 10^{-8}$ cm ² /s) à 33°C	3.7	3.6	3.6	3.7	3.5	3.8

Tableau 2: Insertion de l' α -HI dans une BLS de DMPC à 28°C. Densité, intensité et distance centre-à-centre des spots fluorescents ainsi que le coefficient de diffusion à 33°C pour différents temps d'incubation.

Aux deux températures d'incubation, la distance de centre à centre entre les spots fluorescents diminue. En fait, dans ce système, les répulsions électrostatiques sont censées

être celles qui sont les plus à longue portée. En raison de la force ionique, la longueur de Debye est d'environ 0,9 nm, ce qui est très faible par rapport à la plus courte distance entre les points (environ 63 μm pour l'incubation à 20°C et 11 μm pour l'incubation à 28°C). Cela signifie que la concentration en protéines reste très diluée même aux niveaux maxima d'insertion.

Pour vérifier que ce que nous avons observé ne serait pas une conséquence de l'augmentation de la température d'incubation (qui pourrait promouvoir thermodynamiquement une meilleure insertion), nous avons utilisé un autre phospholipide (EggPC), fluide à toute température (pas d'obligation de changement de température). Pour cela, nous avons préparé une bicouche supportée d'EggPC en utilisant la balance de Langmuir. Après 12 heures d'incubation à 20°C, nous avons décompté une densité de 1200 spots/ mm^2 (**Figure 3**), ce qui démontre une meilleure insertion quand la bicouche est fluide.

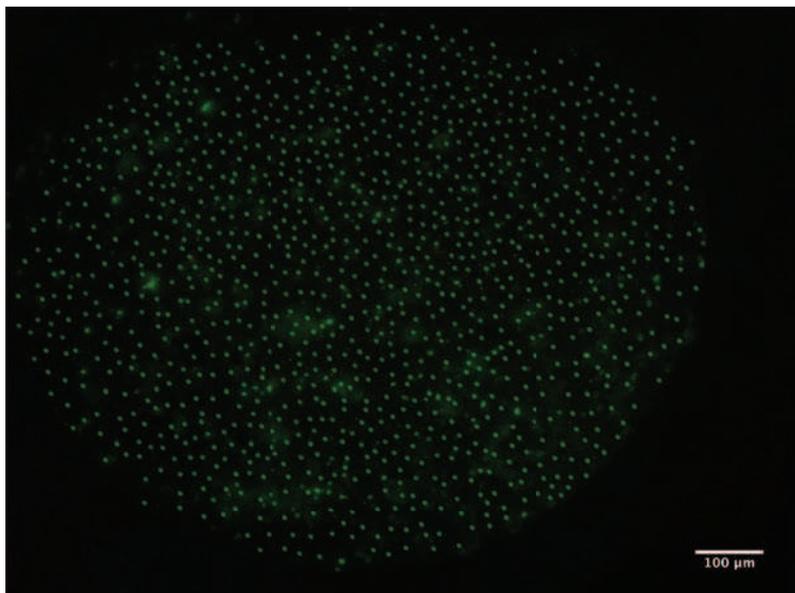


Figure 3: Photographie sous microscope après 12h d'incubation à 20°C de la protéine au dessus d'une BLS d'EggPC (x200 de grossissement). Bar = 100 μm

Nous nous sommes également interrogé sur le fait que notre bicouche semblait ne pas se saturer ainsi que fréquemment observé dans la littérature. Etait ce normal ? Nous avons repris le protocole décrit par Fang et coll.⁴¹, à la suite duquel il a obtenu des images AFM sur lesquelles on constate que les pores l' α -HI sont serrés les uns contre les autres. Nous avons incubé l' α -HI dans une multicouche d'EggPC à 4°C pendant 4 jours, suivi d'une heure à 37°C. Nous avons alors obtenu une saturation de la membrane par la protéine comme en

témoigne la **Figure 4** : on ne peut plus, comme précédemment, distinguer individuellement les spots fluorescents.

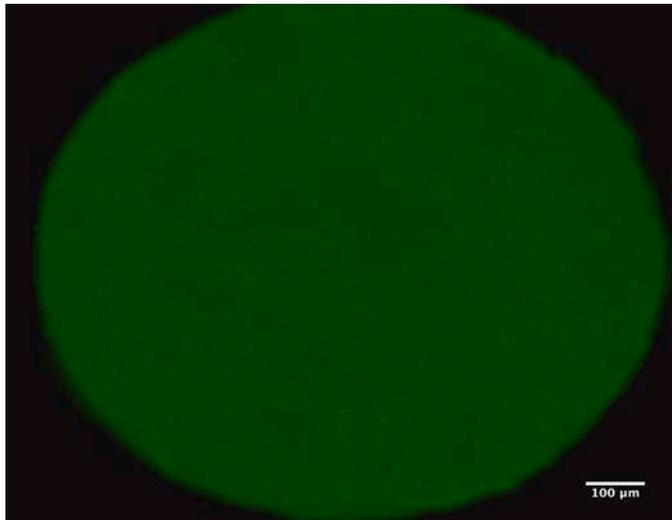


Figure 4: Photographie sous microscope après après 4J à 4°C puis 1h à 37°C au dessus d'une BLS d'EggPC (x200 grossissement). Bar = 100µm

Une question cruciale pour la suite de notre étude était : Que sont ces spots ? De quoi sont ils constitués ? Nous n'avons pas obtenu de preuve directe de leur nature mais un ensemble d'observations et de déductions, obtenues parfois en raisonnant par l'absurde, mais toutes cohérentes entre elles, nous ont permis de répondre à ces questions.

La **Figure 5** montre la distribution de l'intensité des spots fluorescents en fonction du temps d'incubation, déterminée par l'analyse de trois images dans chaque cas. L'intensité des spots fluorescents est constante (≈ 35 à 36 u.a.) de 3 à 15 heures d'incubation. Pour la majorité des spots fluorescents observés après 24 h et 48h d'incubation, l'intensité est à peu près double et triple (respectivement 67 et 108 u.a.). Pour 18h d'incubation, on observe un mélange de spots fluorescents dont l'intensité est répartie de la façon suivante : 56% des spots ont une intensité égale à 36 u.a. et 44% à 67 u.a. Ainsi l'intensité ne varie pas de façon aléatoire mais par sauts discrets.

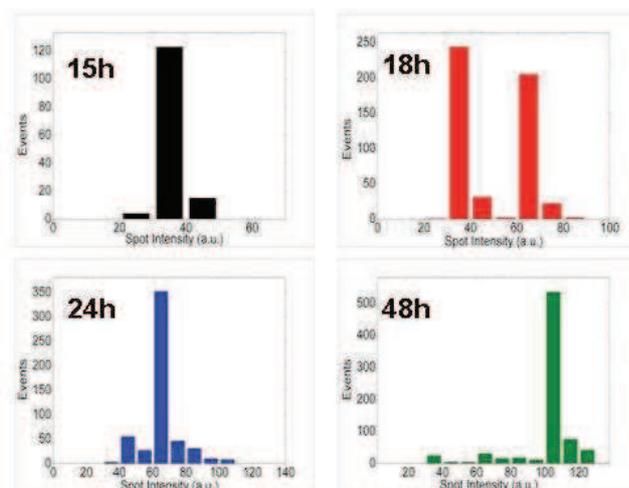


Figure 5: Nombre d'événements en fonction de l'intensité des spots fluorescents pour différents temps d'incubation à T= 20°C.

Nous avons envisagés trois possibilités : il pourrait s'agir a) d'agrégats, OU b) d'heptamères contenant soit des monomères sur-marqués soit plusieurs monomères marqués OU enfin c) de complexes d'heptamères. Si on retient les possibilités a) ou b) : la fluorescence pourrait être variable mais leurs coefficients de diffusion devraient rester constants : nous verrons plus tard qu'ils diminuent, comme il est de rigueur lorsque la taille de l'objet augmente. Nous dirons simplement que le coefficient de diffusion ($3.8 \times 10^{-8} \text{cm}^2/\text{s}$) de l'objet qui a une intensité de fluorescence égale à 36 a.u. est de l'ordre de grandeur de celui d'un objet dont le rayon de la partie immergée dans la bicouche serait de 5 nm. L'occurrence de a) ou b) aurait donné lieu à une distribution aléatoire des intensités pour un temps d'incubation donné. La présence aléatoire de monomères sur-marqués ou de plusieurs monomères marqués au sein d'un heptamère aurait pu induire soit une augmentation de la fluorescence, soit parfois une diminution de l'intensité de fluorescence due au “quenching” des marqueurs voisins ou encore un déplacement en longueur d'onde.

Les spots obtenus après incubation à 28°C au dessus d'une bicouche de DMPC en phase fluide ou au dessus d'une bicouche d'EggPC ont tous une intensité de fluorescence égale à 36 a.u. et un coefficient de diffusion ($3.8 \times 10^{-8} \text{cm}^2/\text{s}$) compatible avec une partie immergée de 5 nm de rayon.

Cette reproductibilité est incompatible avec les hypothèses a) et b).

De ces considérations, nous avons déduit que les incréments d'intensités de spots fluorescents indiquaient la formation de complexes heptamériques, contenant essentiellement un, deux ou trois pores, respectivement, le niveau de fluorescence 35-36 (u.a.) correspondant lui à l'insertion de simples pores heptamériques. La formation du plus gros objet, un trimère, ressemble à ce qui est observé *in vitro* et *in vivo* pour les porines^{57,58}.

Nous aurions souhaité obtenir une « preuve » indiscutable que nos spots étaient bien des pores heptamériques mais la chose n'est pas aisée : Bayley et coll⁴¹ ont fait des images AFM de très haute qualité puisqu'elles leur ont permis de compter les monomères du pore et de trouver le chiffre 7. Ils expliquent dans leur article, qu'à faible dilution, ils n'obtiennent qu'une image floue d'un objet d'environ 10 nm de diamètre. Ce n'est que quand la bicouche est saturée en heptamères en suivant le protocole d'incubation qui nous a mené au même aspect de la bicouche (modulo microscope *versus* AFM), quand ils se « tiennent » alors les uns les autres, qu'ils ont pu réaliser les images d'heptamère. Il faudrait disposer d'un AFM à haute vitesse pour obtenir les images d'un objet isolé, ce type de microscope commence seulement à être disponible dans certains laboratoires.

Ainsi, le choix de conditions pour lesquelles toutes les régions de la bicouche ne sont pas également accessibles ne conduit pas à une bicouche contenant uniquement des pores heptamériques « simples » insérés. A 20°C, après une phase de latence au début, on obtient la dispersion homogène dans la bicouche de complexes constitués de deux ou trois pores. Le nombre de spots fluorescents augmente avec le temps d'incubation, mais les "nouvelles" protéines insérées participent préférentiellement à la formation de complexes. Nous avons ainsi obtenu un système qui nous permet, en utilisant un seul type de protéines (pas de changement d'un échantillon à l'autre, sauf pour les temps d'incubation), de tester l'effet de la taille de l'objet sur la diffusion, à des concentrations très diluées.

Ceci indique que la cinétique d'incorporation originale de la protéine dans la bicouche est associée à la transition de phase des phospholipides et que donc l'insertion dépend de la taille des domaines fluides disponibles. Ceci pourrait être utilisé comme paramètre pour « sonder » la taille moyenne de l'inclusion finale et, en jouant sur la coexistence de phases gels et fluides, pourrait permettre une étude ultérieure du mécanisme de formation des complexes protéiques.

Tout semble se passer comme si les heptamères sondaient la taille des domaines des fluides et que l'insertion d'un deuxième ou un troisième pore devenait plus difficile (moins d'espace disponible pour le second, encore moins pour l'insertion du troisième), ce qui

rendrait le processus d'insertion « moins efficace » et donc finalement plus lent. Ces considérations peuvent expliquer pourquoi le nombre de spots fluorescents “sature” à une valeur qui est loin de la saturation de la bicouche. Une étude complète de cette cinétique d'insertion révélée par la **Figure 2** serait nécessaire pour l'étude du mécanisme d'insertion, mais cela dépasse le cadre de notre étude.

3.2 Diffusion de la protéine dans la Bicouche

La **Figure 6** montre la variation du coefficient de diffusion D de nos objets en fonction de la température, après différents temps d'incubation (température d'incubation = 20°C, donc coexistence de domaines gels et fluides). Les carrés noirs indiquent la diffusion propre des phospholipides (DMPC marqué au NBD à 0.1%) en l'absence de protéines insérées. Dans les autres expériences représentées dans le graphe, en présence de la protéine, les phospholipides ne sont pas marqués, seule la protéine l'est par l'AlexaFluor 488TM.

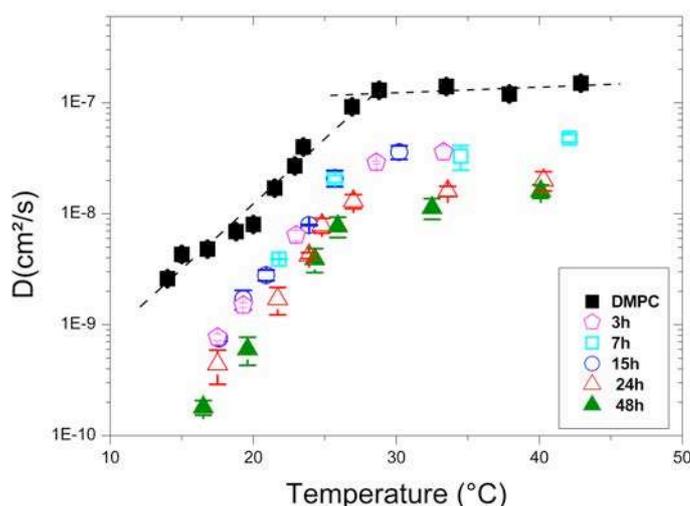


Figure 6: Coefficient de diffusion des objets insérés en fonction de la température, pour différents temps d'incubation (incubation à 20°C). Les carrés noirs indiquent le coefficient de diffusion des phospholipides de DMPC en l'absence de protéines. La ligne pointillée est un guide pour les yeux.

La variation de D de 12.5 à 27.5°C correspond à la transition complète habituelle gel-fluide des phospholipides. Au delà de ces températures, D correspond à la phase fluide du DMPC et ne varie pas fortement avec température. Des valeurs significatives des coefficients de diffusion, correspondant aux différentes températures et aux différents temps d'incubation (au sein de la transition gel-fluide ou même dans la région fluide), sont reportées dans le **Tableau 3**.

T (°C)	19.3	23.2	30.5	37.6	
Temps (h)/Objet					
3, 7 et 15 → Heptamère	0.2 ±0.01	0.6 ±0.04	3.8 ±0.3	4.0 ±0.4	D (10 ⁻⁸ cm ² /s)
18 → Mélange Heptamère/Dimère	0.1 ±0.01	0.4 ±0.03	2.5 ±0.2	2.6 ±0.2	
24 → Dimère	0.07 ±0.005	0.4 ±0.02	1.6 ±0.2	1.8 ±0.4	
48 → Trimère	0.05 ±0.006	0.3 ±0.02	1.1 ±0.2	1.2 ±0.2	

Tableau 3: Valeurs des coefficients de diffusion des objets incubés à 20°C pour différents temps d'incubation et à différentes températures

Tous les signaux de FRAPP sont mono-exponentiels pour tous les temps d'incubation sauf pour 18 heures d'incubation où le signal de FRAPP était bi-exponentiel. Pour ce temps d'incubation, le ratio des amplitudes est identique (0.55/0.45) au ratio (nombre d'heptamère/nombre de dimères) déterminé à partir de l'analyse des intensités des spots fluorescents. Les deux temps, déterminés par l'ajustement de la bi-exponentielle, correspondent quantitativement et respectivement aux coefficients de diffusion des heptamères et dimères d'heptamères (*ceci constitue un autre argument en faveur de notre analyse de ce que sont les spots fluorescents*).

Il est important de noter que 100% des protéines sont mobiles : il n'y a pas de fraction immobile comme souvent observé dans des études précédentes^{21,23}. Nous avons inséré l' α -HI dans une bicouche de DMPC supportée sur du mica (temps d'incubation = 7h, l'intensité et la densité des spots fluorescents étaient identiques en comparaison avec une bicouche supportée sur du verre contenant la protéine). Nous avons observé qu'il n'y avait pas de relaxation du contraste de fluorescence, ce qui signifie que les protéines ne diffusaient pas, quelle qu'aient été la valeur du vecteur q (l'espacement des franges i) et la température.

Etant donné que la seule différence entre les deux systèmes était le support, on peut en déduire que l' α -HI a une forte interaction avec le mica, ce qui empêche les protéines de diffuser à toutes températures, et que donc cette immobilité n'est pas due à la formation d'agrégats (intensités des spots fluorescents proches de 36 u.a), ni à l'existence d'une grande partie extra-membranaire ni à une insertion non stéréospécifique. Ceci indique, également, que l'insertion de la protéine est transmembranaire.

Le verre et le mica se différencient par leur composition chimique et leur rugosité (le mica est atomiquement plat), ce qui pourrait expliquer la faible interaction de la protéine avec le verre ainsi que l'impossibilité de diffuser sur le mica.

Quand on chauffe notre système (BLS + α -HI), le coefficient de diffusion suit exactement la transition gel-fluide de la bicouche. Cependant, on observe un déplacement modéré de la température de transition (T_m) vers de plus hautes températures ($\Delta T_m \approx 1$ à 3°C dépendant de la taille de l'objet étudié). Si on considère que les protéines se comportent comme des sondes de la bicouche, cela signifie qu'elles stabilisent/rigidifient la bicouche, puisque le système exigerait une chaleur supplémentaire afin de manifester la transition gel-fluide. Cela peut être expliqué par le fait que, en remplissant partiellement les régions fluides, les complexes augmentent la pression locale et donc rigidifient la bicouche. L'augmentation de la rigidité due à l'insertion des heptamères a aussi été déduite par Chalmeau et coll^{21,23,59} par le changement d'énergie de dissipation des courbes en utilisant la technique QCM-D (Quartz Crystal Microbalance-Dissipation).

Pour tous les temps d'incubation, les protéines diffusent plus lentement que les phospholipides. Pour les objets ayant été incubés pendant 3, 7 et 15 heures à 20°C (pore heptamérique), le coefficient de diffusion est constant pour une température donnée ($\approx 3.8 \times 10^{-8} \text{ cm}^2/\text{s}$ pour les protéines au lieu de $1.3 \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$ pour les lipides à 33°C). D'autres auteurs^{10,24} observent aussi une diffusion plus lente que la diffusion des phospholipides de la bicouche. Comme nous, Ramadurai et coll¹⁰ montrent que le coefficient de diffusion de leurs protéines, de rayon $\leq 4 \text{ nm}$, est approximativement trois fois plus lent que les phospholipides. Le coefficient de diffusion de leur protéine qui à un rayon de 4 nm est un peu plus rapide que celui de notre pore heptamérique (rayon $\approx 5 \text{ nm}$ ⁴⁴). La comparaison a été faite à 33°C , une température où la bicouche est fluide, comme la bicouche de DOPC de Ramadurai et coll. La diffusion des objets formés après incubation pendant 24 et 48 heures à 20°C devient plus lente parce que ce sont des complexes formés de deux ou trois heptamères. Le tableau 4 présente la variation du coefficient de diffusion en fonction du rayon équivalent calculé. Si on estime à 5 nm le rayon géométrique équivalent de la partie immergée du « champignon », les rayons des dimères et trimères d' α -HI sont respectivement de 7.1 et 10 nm .

Bicouche de DMPC supportée sur verre	Monomère 	Dimère 	Trimère 
R équivalent inséré (nm)	5	7.1	10
D ($\times 10^{-8}$ cm ² /s) à 33°C	3.6 \pm 0.5	1.8 \pm 0.2	1.3 \pm 0.2

Tableau 4: Estimation géométrique du rayon des objets et coefficients de diffusion à 33°C (phase fluide) associés. Le dimère forme un objet anisotrope ayant un petit axe de 5 nm et un grand axe de 10 nm. De l'aire occupée, le rayon moyen de cette assemblage créé peut être estimé à $\sqrt{5 \times 10} = 7.1$ nm. En supposant un assemblage hexagonal des trois heptamères, le rayon équivalent au cercle contenant le trimère est de 10 nm.

Guigas et Weiss²⁶ ont prédit, par simulation, que $D = f(R)$ devait passer d'un régime dans lequel la dépendance en R est faible (modèle de Saffman-Delbrück : $D \approx \ln(1/R)$) à un régime dans lequel D varie en $1/R^2$ à partir d'un rayon critique R_c (7.3 nm dans leur condition) sous l'effet combiné d'une friction hydrodynamique asymptotique et de degrés internes de liberté des objets dont on peut penser qu'ils jouent un rôle pour de grosses inclusions membranaires type radeau. Il faut rappeler que le modèle de Saffman-Delbrück a été établi pour des inclusions membranaires incompressibles, cylindriques, insérés dans un fluide incompressible et en faisant l'hypothèse de non-glissement à l'interface fluide/structure. Ces hypothèses, bien que valables à l'échelle macroscopique, pourraient ne plus être valide à l'échelle méso ou nano. Ainsi, Zhu et coll ont montré que la condition de non-glissement n'était pas vérifiée à l'échelle moléculaire^{44,60}. L'eau et les membranes lipidiques ont une compressibilité finie et des inclusions membranaires du type pore heptamérique ou complexe de pores (di- ou trimère) peuvent présenter des degrés internes de liberté qui pourraient réduire leur diffusion latérale. Il est probable qu'un pore, volumineux, présentant un canal qui le traverse est effectivement plus compressible (donc présente plus de degrés de liberté), moins rigide qu'une simple hélice peptidique. Cela devrait être encore plus vrai pour un dimère ou trimère d'heptamères : sans doute le trimère d'heptamère « embarque »-t-il avec lui un cortège de lipides, différents de ceux du reste de la membrane. Nos complexes font partie du type d'inclusions pour lesquelles Guigas et coll ont effectué leur simulations : le trimère constitue une sorte de radeau modèle. En général les radeaux des cellules ont une durée de vie très courte et nécessitent par exemple l'utilisation de FCS (Fluorescence Correlation Spectroscopy) pour être étudiés. Nos complexes trimériques, formant des radeaux modèles à longue durée de vie, pourraient permettre des études fondamentales sur leur comportement, leur formation,...

La **Figure 7** montre que, dans la gamme de taille étudiée, D varie plutôt en $1/R^2$, en bon accord avec la prédiction de Guigas et coll. Ce comportement est observé à toutes les températures. Certes, cette variation est établie sur 3 points seulement mais on constate qu'elle est clairement incompatible avec le modèle de Saffman-Delbrück et celui de Stokes-Einstein.

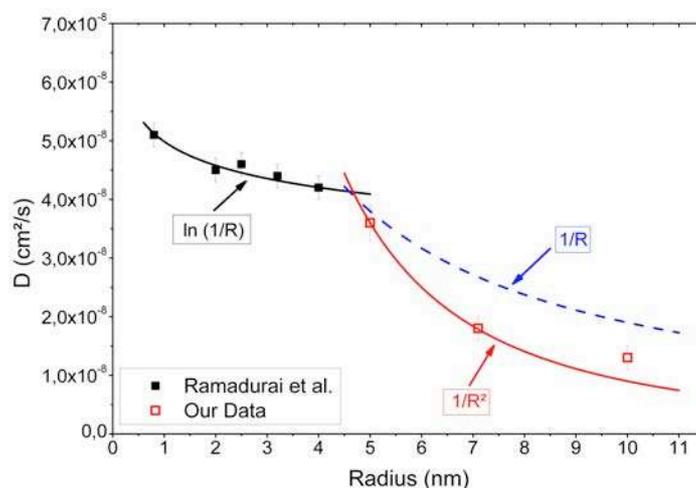


Figure 7: Courbe de D en fonction du rayon des objets à 33°C en utilisant différents modèles théoriques. Les données correspondant aux carrés noirs ont été retracées avec la permission de Ramadurai et coll.

Cela signifie que le modèle de Saffman-Delbrück s'applique correctement pour les *faibles* rayons (typiquement ≤ 4 nm) mais pas pour la gamme explorée dans notre étude. En fait, pour des raisons en partie évoquées au début de ce chapitre, il n'est pas trivial d'explorer la gamme des grandes tailles, c'est-à-dire de disposer, de manipuler et d'insérer des protéines membranaires dont le rayon inséré soit supérieur à 5 nm. C'est la formation de complexes, qui nous a permis, par chance, d'accéder à ce domaine de taille. Disposer de complexes comprenant un nombre de pores plus grand (4, 5 ou plus ?) permettrait d'explorer plus complètement la dépendance de D en fonction de R .

3.3 Insertion de l' α -HI dans la phase ripple

Dans le chapitre III, nous avons montré qu'il était possible d'observer une phase *ripple* dans une bicouche lipidique supportée unilamellaire. Nous avons effectué une expérience complémentaire en incubant pendant 15 heures de l' α -HI au dessus d'une bicouche de DMPC supportée sur du mica à la température de 17.2°C (bicouche en phase *ripple*). L'intensité lumineuse des spots est 36 a.u. L'image prise sous microscope (**Figure 8**) montre que les spots fluorescents matérialisent des directions privilégiées, faisant apparaître des « zones »,

avec des orientations caractéristiques de celles décrites dans la littérature entre des domaines *ripple* (valeurs des angles : 58 à 120°). Ce comportement semble correspondre à l'aptitude des protéines à mieux s'insérer dans la phase fluide, en l'occurrence les zones fluides apparentes de la phase *ripple*. On note que la distance interligne est bien supérieure à la période habituelle des phases *ripple*.



Figure 8 : Image obtenue après incubation de l' α -HI dans une BLS de DMPC à 17.2°C. Les lignes servent de guide pour visualiser l'insertion de la protéine dans la phase ripple. Les angles mesurés varient de 58° à 120°C. Bar = 40 μ m.

L'insertion des protéines dans une phase *ripple* pourrait permettre le dessin de motifs protéiques pour certaines applications.

4 Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons présenté un système biomimétique bien défini, à la fois facile à construire et qui présente une vraie diffusion. A chaque fois qu'un paramètre (température, support, taille du complexe) a été changé, le coefficient de diffusion a varié. Dans ce système biomimétique, nous avons favorisé l'étude de la taille sur la diffusion et non celle de l'effet de la concentration (interaction protéine-protéine). En commençant avec un heptamère inséré dans la BLS et en augmentant le temps d'incubation en phase mixte (gel/fluide), nous avons observé la formation de complexes protéiques, qui ont permis pour la première fois de mesurer la diffusion de gros objets. Le coefficient de diffusion de ces objets

diminue en $1/R^2$. L'étude pourrait être continuée en obtenant des complexes encore plus gros ou bien une insertion plus dense de pores isolés afin d'étudier l'effet de la concentration.

5 Références

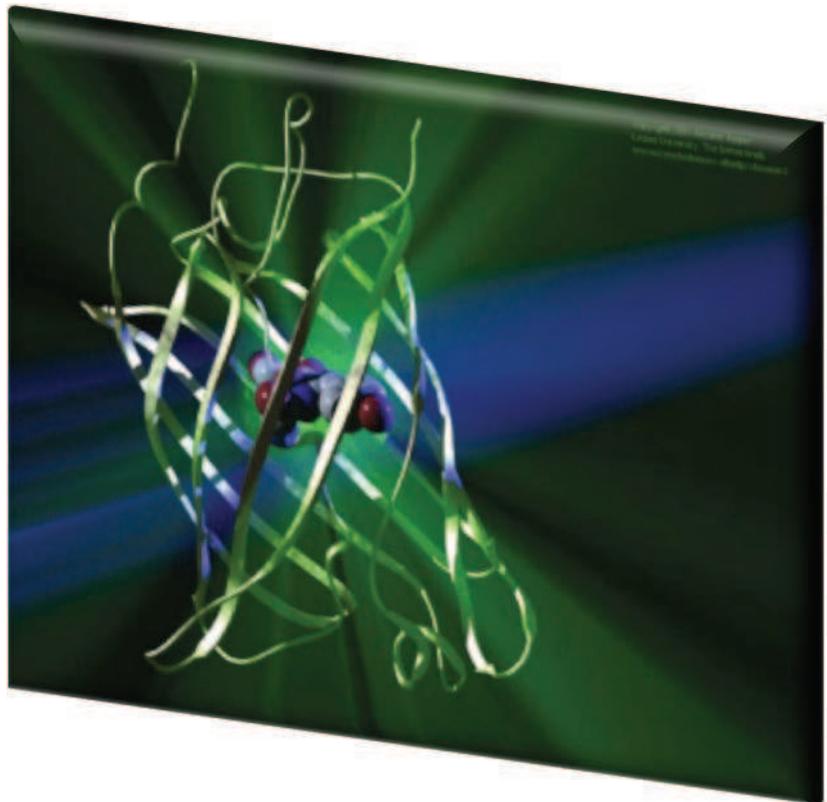
1. Singer, S.J. & Nicolson, G.L. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* **175**, 720-31 (1972).
2. Heimburg, T. Book chapter in 'Planar Lipid Bilayers (BLMs) and their application Tien H.T; Ottova-eitmannova (Editors). Elsevier Amsterdam. 269 (2003).
3. Sowers, A.E. & Hackenbrock, C.R. Variation in protein lateral diffusion coefficients is related to variation in protein concentration found in mitochondrial inner membranes. *Biochim Biophys Acta* **821**, 85-90 (1985).
4. Frick, M., Schmidt, K. & Nichols, B.J. Modulation of lateral diffusion in the plasma membrane by protein density. *Curr Biol* **17**, 462-7 (2007).
5. Dupuy, A.D. & Engelman, D.M. Protein area occupancy at the center of the red blood cell membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 2848-52 (2008).
6. Tanaka, M., Hermann, J., Haase, I., Fischer, M. & Boxer, S.G. Frictional drag and electrical manipulation of recombinant proteins in polymer-supported membranes. *Langmuir* **23**, 5638-44 (2007).
7. Forstnerb, M.B., Yee, C.K., Parikh, A.N. & Groves, J.T. Lipid Lateral Mobility and Membrane Phase Structure Modulation by Protein Binding. *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 15221-15227 (2006).
8. Gambin, Y. et al. Lateral mobility of proteins in liquid membranes revisited. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 2098-102 (2006).
9. Smith, L.M., Rubenstein, J.L., Parce, J.W. & McConnell, H.M. Lateral diffusion of M-13 coat protein in mixtures of phosphatidylcholine and cholesterol. *Biochemistry* **19**, 5907-11 (1980).
10. Ramadurai, S. et al. Lateral diffusion of membrane proteins. *Journal of the American Chemical Society* **131**, 12650-6 (2009).
11. Peters, R. & Cherry, R.J. Lateral and rotational diffusion of bacteriorhodopsin in lipid bilayers: experimental test of the Saffman-Delbruck equations. *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**, 4317-21 (1982).
12. Knol, J. et al. Unidirectional reconstitution into detergent-destabilized liposomes of the purified lactose transport system of *Streptococcus thermophilus*. *Journal of Biological Chemistry* **271**, 15358-66 (1996).
13. Chang, C.H., Takeuchi, H., Ito, T., Machida, K. & Ohnishi, S. Lateral mobility of erythrocyte membrane proteins studied by the fluorescence photobleaching recovery technique. *J Biochem* **90**, 997-1004 (1981).
14. Thompson, J.R., Heron, A.J., Santoso, Y. & Wallace, M.I. Enhanced stability and fluidity in droplet on hydrogel bilayers for measuring membrane protein diffusion. *Nano Lett* **7**, 3875-8 (2007).
15. Paternostre, M.T., Roux, M. & Rigaud, J.L. Mechanisms of membrane protein insertion into liposomes during reconstitution procedures involving the use of detergents. 1. Solubilization of large unilamellar liposomes (prepared by reverse-phase evaporation) by triton X-100, octyl glucoside, and sodium cholate. *Biochemistry* **27**, 2668-77 (1988).

16. Kahya, N., Pecheur, E.I., de Boeij, W.P., Wiersma, D.A. & Hoekstra, D. Reconstitution of membrane proteins into giant unilamellar vesicles via peptide-induced fusion. *Biophys J* **81**, 1464-74 (2001).
17. Girard, P. et al. A new method for the reconstitution of membrane proteins into giant unilamellar vesicles. *Biophys J* **87**, 419-29 (2004).
18. Watts, T.H. & McConnell, H.M. Biophysical aspects of antigen recognition by T cells. *Annu Rev Immunol* **5**, 461-75 (1987).
19. Salafsky, J., Groves, J.T. & Boxer, S.G. Architecture and function of membrane proteins in planar supported bilayers: a study with photosynthetic reaction centers. *Biochemistry* **35**, 14773-81 (1996).
20. McConnell, H.M., Watts, T.H., Weis, R.M. & Brian, A.A. Supported planar membranes in studies of cell-cell recognition in the immune system. *Biochim Biophys Acta* **864**, 95-106 (1986).
21. Wagner, M.L. & Tamm, L.K. Tethered polymer-supported planar lipid bilayers for reconstitution of integral membrane proteins: silane-polyethyleneglycol-lipid as a cushion and covalent linker. *Biophys J* **79**, 1400-14 (2000).
22. Smith, E.A. et al. Lipid bilayers on polyacrylamide brushes for inclusion of membrane proteins. *Langmuir* **21**, 9644-50 (2005).
23. Merzlyakov, M., Li, E. & Hristova, K. Directed assembly of surface-supported bilayers with transmembrane helices. *Langmuir* **22**, 1247-53 (2006).
24. Merzlyakov, M., Li, E., Gitsov, I. & Hristova, K. Surface-supported bilayers with transmembrane proteins: role of the polymer cushion revisited. *Langmuir* **22**, 10145-51 (2006).
25. Saffman, P.G. & Delbruck, M. Brownian motion in biological membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **72**, 3111-3 (1975).
26. Guigas, G. & Weiss, M. Size-dependent diffusion of membrane inclusions. *Biophys J* **91**, 2393-8 (2006).
27. Abney, J.R., Scalettar, B.A. & Owicki, J.C. Self diffusion of interacting membrane proteins. *Biophys J* **55**, 817-33 (1989).
28. Vaz, W.L., Criado, M., Madeira, V.M., Schoellmann, G. & Jovin, T.M. Size dependence of the translational diffusion of large integral membrane proteins in liquid-crystalline phase lipid bilayers. A study using fluorescence recovery after photobleaching. *Biochemistry* **21**, 5608-12 (1982).
29. Hughes, T. et al. AFM visualization of mobile influenza A M2 molecules in planar bilayers. *Biophys J* **87**, 311-22 (2004).
30. Ward, R.J. & Leonards, K. The Staphylococcus aureus α -toxin channel complex and the effect of Ca²⁺ ions on its interaction with lipid layers. *Journal of Structural Biology* **109**, 129-141 (1982).
31. Walker, B., Braha, O., Cheley, S. & Bayley, H. An intermediate in the assembly of a pore-forming protein trapped with a genetically-engineered switch. *Chem Biol* **2**, 99-105 (1995).
32. Tobkes, N., Wallace, B.A. & Bayley, H. Secondary structure and assembly mechanism of an oligomeric channel protein. *Biochemistry* **24**, 1915-20 (1985).
33. Song, L. et al. Structure of staphylococcal alpha-hemolysin, a heptameric transmembrane pore. *Science* **274**, 1859-66 (1996).
34. Schuster, B., Pum, D., Braha, O., Bayley, H. & Sleytr, U.B. Self-assembled alpha-hemolysin pores in an S-layer-supported lipid bilayer. *Biochim Biophys Acta* **1370**, 280-8 (1998).

35. Montoya, M. & Gouaux, E. Beta-barrel membrane protein folding and structure viewed through the lens of alpha-hemolysin. *Biochim Biophys Acta* **1609**, 19-27 (2003).
36. Malghani, M.S., Fang, Y., Cheley, S., Bayley, H. & Yang, J. Heptameric structures of two alpha-hemolysin mutants imaged with in situ atomic force microscopy. *Microsc Res Tech* **44**, 353-6 (1999).
37. Krasilnikov, O.V. et al. Electrophysiological evidence for heptameric stoichiometry of ion channels formed by Staphylococcus aureus alpha-toxin in planar lipid bilayers. *Mol Microbiol* **37**, 1372-8 (2000).
38. Jayasinghe, L., Miles, G. & Bayley, H. Role of the amino latch of staphylococcal alpha-hemolysin in pore formation: a co-operative interaction between the N terminus and position 217. *Journal of Biological Chemistry* **281**, 2195-204 (2006).
39. Ikigai, H. & Nakae, T. Conformational alteration in alpha-toxin from Staphylococcus aureus concomitant with the transformation of the water-soluble monomer to the membrane oligomer. *Biochem Biophys Res Commun* **130**, 175-81 (1985).
40. Gouaux, J.E. et al. Subunit stoichiometry of staphylococcal alpha-hemolysin in crystals and on membranes: a heptameric transmembrane pore. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 12828-31 (1994).
41. Fang, Y., Cheley, S., Bayley, H. & Yang, J. The heptameric prepore of a staphylococcal alpha-hemolysin mutant in lipid bilayers imaged by atomic force microscopy. *Biochemistry* **36**, 9518-22 (1997).
42. Czajkowsky, D.M., Sheng, S.T. & Shao, Z.F. Staphylococcal alpha-hemolysin can form hexamers in phospholipid bilayers. *Journal of Molecular Biology* **276**, 325-330 (1998).
43. Bhakdi, S., Füssle, R. & Tranum-Jensen, J. Staphylococcal alpha-toxin: oligomerization of hydrophilic monomers to form amphiphilic hexamers induced through contact with deoxycholate detergent micelles. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**, 5475-9 (1981).
44. Aksimentiev, A. & Schulten, K. Imaging alpha-hemolysin with molecular dynamics: Ionic conductance, osmotic permeability, and the electrostatic potential map. *Biophysical Journal* **88**, 3745-3761 (2005).
45. Werner, J.H. et al. Progress towards single-molecule DNA sequencing: a one color demonstration. *J Biotechnol* **102**, 1-14 (2003).
46. Menestrina, G. et al. Ion channels and bacterial infection: the case of beta-barrel pore-forming protein toxins of Staphylococcus aureus. *Febs Letters* **552**, 54-60 (2003).
47. Kasianowicz, J.J., Brandin, E., Branton, D. & Deamer, D.W. Characterization of individual polynucleotide molecules using a membrane channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 13770-3 (1996).
48. Gu, L.Q., Braha, O., Conlan, S., Cheley, S. & Bayley, H. Stochastic sensing of organic analytes by a pore-forming protein containing a molecular adapter. *Nature* **398**, 686-90 (1999).
49. Akeson, M., Branton, D., Kasianowicz, J.J., Brandin, E. & Deamer, D.W. Microsecond time-scale discrimination among polycytidylic acid, polyadenylic acid, and polyuridylic acid as homopolymers or as segments within single RNA molecules. *Biophys J* **77**, 3227-33 (1999).
50. Wu, E.S., Jacobson, K. & Papahadjopoulos, D. Lateral diffusion in phospholipid multibilayers measured by fluorescence recovery after photobleaching. *Biochemistry* **16**, 3936-41 (1977).
51. Smith, B.A. & McConnell, H.M. Determination of molecular motion in membranes using periodic pattern photobleaching. *Proc Natl Acad Sci U S A* **75**, 2759-63 (1978).

52. Milhiet, P.E. et al. High-resolution AFM of membrane proteins directly incorporated at high density in planar lipid bilayer. *Biophys J* **91**, 3268-75 (2006).
53. Ladha, S. et al. Lateral diffusion in planar lipid bilayers: a fluorescence recovery after photobleaching investigation of its modulation by lipid composition, cholesterol, or alamethicin content and divalent cations. *Biophys J* **71**, 1364-73 (1996).
54. Alecio, M.R., Golan, D.E., Veatch, W.R. & Rando, R.R. Use of a fluorescent cholesterol derivative to measure lateral mobility of cholesterol in membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**, 5171-4 (1982).
55. Glazier, S.A. et al. Reconstitution of the Pore-Forming Toxin α -Hemolysin in Phospholipid/18-Octadecyl-1-thiahexa(ethylene oxide) and Phospholipid/n-Octadecanethiol Supported Bilayer Membranes. *Langmuir* **16**, 10428-10435 (2000).
56. Bakas, L., Ostolaza, H., Vaz, W.L. & Goni, F.M. Reversible adsorption and nonreversible insertion of Escherichia coli alpha-hemolysin into lipid bilayers. *Biophys J* **71**, 1869-76 (1996).
57. Yoshihara, E., Yoneyama, H. & Nakae, T. In vitro assembly of the functional porin trimer from dissociated monomers in Pseudomonas aeruginosa. *Journal of Biological Chemistry* **266**, 952-7 (1991).
58. Reid, J., Fung, H., Gehring, K., Klebba, P.E. & Nikaido, H. Targeting of porin to the outer membrane of Escherichia coli. Rate of trimer assembly and identification of a dimer intermediate. *Journal of Biological Chemistry* **263**, 7753-9 (1988).
59. Chalmeau, J., Monina, N., Shin, J., Vieu, C. & Noireaux, V. alpha-Hemolysin pore formation into a supported phospholipid bilayer using cell-free expression. *Biochim Biophys Acta* **1808**, 271-8 (2011).
60. Zhu, Y. & Granick, S. Limits of the hydrodynamic no-slip boundary condition. *Phys Rev Lett* **88**, 106102 (2002).

Chapitre VI : Micro-électrophorèse 2D des protéines membranaires dans des n-bicouches lipidiques supportées



“An external electric field, meeting it and passing through it, affects the negative as much as the positive quanta of the atom, and pushes the former to one side, and the latter in the other direction”

Johannes Stark

1 Introduction

L'analyse du protéome implique la séparation des protéines comme première étape afin de les caractériser. Jusqu'à aujourd'hui, l'électrophorèse traditionnelle 2D sur gel a été utilisée pour effectuer cette séparation, y compris pour des protéines membranaires, mais en utilisant dans ce cas des mélanges de détergents sophistiqués dans le but de solubiliser ces complexes, afin de préserver les structures des protéines membranaires¹.

De ce fait, un grand nombre de scientifiques ont cherché à mettre au point de nouvelles méthodes pour séparer les protéines membranaires. L'utilisation des bicouches lipidiques supportées comme modèle de la membrane cellulaire apparaît comme étant bien fondée pour étudier le coefficient de diffusion des phospholipides, des protéines membranaires ainsi que la mobilité électrophorétique de protéines associées à la membrane². Par exemple, les premières études d'électrophorèse sur les BLS ont permis de séparer des lipides marqués et chargés^{3,4}. Poo et Robinson ont démontré que les champs électriques pouvaient redistribuer les composants chargés de la membrane, comme observé pour la Concanavaleine A⁵. Stezle et coll. ont décrit l'électrophorèse contrôlée de BLS³. Groves et coll. ont étudié la migration de protéines associées à la membrane quand elles étaient attachées à un lipide de la membrane *via* une liaison glycane-phosphatidyl inositol avec un lipide⁶. Han et coll. ont été en mesure de contrôler le mouvement électrophorétique de la streptavidine en faisant varier la charge de la bicouche *via* sa composition⁷. En utilisant une cellule d'écoulement à pH contrôlé, Monson et coll. ont décrit la migration d'une streptavidine liée à la bicouche lipidique (par un lipide biotinylé), supportée ou non sur un coussin de PDMS (polydiméthylsiloxane)⁸.

Ils ont pu contrôler la mobilité électrophorétique en faisant varier le pH du tampon.

L'immobilisation de protéines transmembranaires due à leur interaction directe avec le support est supposée être une caractéristique générale des protéines transmembranaires dans les BLS^{6,9,10}. Cela a conduit les chercheurs à tenter de positionner la bicouche loin du support à l'aide d'un coussin de polymères ou, plus radicalement, à limiter leurs études à des protéines ancrées à la surface de la membrane. À notre connaissance, Smith et coll. ont été les premiers (et les seuls) à essayer de mesurer la mobilité électrophorétique d'une protéine vraiment transmembranaire. Ils ont suivi la migration de HDOR¹¹, insérée dans une bicouche lipidique supportée sur un coussin de polyacrylamide, sous un champ électrique de 1000V/cm et ont mesuré une mobilité relativement faible de $3 \cdot 10^{-8} \text{ cm}^2/\text{V.s}$. Nous avons expliqué dans le chapitre précédent que l'interaction de l' α -hémolysine avec le verre, après une insertion stéréo

spécifique due à la configuration du système, était suffisamment faible pour éviter son immobilisation. Dans ce qui suit, nous présentons les mesures de mobilité électrophorétique de l' α -HL insérée dans une BLS, au dessus d'une bicouche double ($n = 2 \rightarrow$ DDB) ou au-dessus d'une multibicouche ($n \approx 500 \rightarrow$ DMB). La définition de la mobilité électrophorétique étant le rapport q/f , où q est la charge nette de l'objet et f la friction sur cet objet, nous avons étudié la dépendance de cette mobilité électrophorétique en fonction de la charge de la protéine et de sa taille.

2 Résultats et discussion

2.1 Etudes sur différents systèmes SLB/DDB/DMB

2.1.1 Contrôle du système par les coefficients de diffusion

Pour tester la « sensibilité » de notre système bicouche (BLS, DDB et DMB), nous avons effectué une expérience de contrôle avant d'appliquer le champ électrique. Nous avons mesuré le coefficient de diffusion de l' α -HL en phase fluide par vidéo-microscopie et “suivi de particules” dans chaque système. Nous avons comparé celui-ci aux précédentes mesures de FRAPP (chapitre V). Les valeurs sont identiques. Dans nos conditions salines, les coefficients de diffusion des phospholipides que nous avons utilisés (EggPC, DMPC et DPPC) (10 mM PBS + 100 mM NaCl) ne sont pas très différents entre eux et sont proches du coefficient de diffusion de ces mêmes phospholipides dans une membrane libre¹²⁻¹⁶. Cela pourrait s'expliquer par le fait que: a) dans la phase liquide, la queue hydrocarbonée du lipide a une conformation « pelote » plutôt que linéaire (en phase gel). Les chaînes hydrocarbonées d'un mélange de longueurs différentes (EggPC) ou ayant une différence de 2 groupements méthylènes (DMPC \rightarrow DPPC) ont à peu près le même coefficient de friction et ne peuvent être distinguées par des mesures de diffusion, b) le support est chargé négativement mais l'interaction entre la bicouche et le support est faible en raison de la faible longueur de Debye (100 mM NaCl $\rightarrow \approx 0,9$ nm < épaisseur du film d'eau entre la bicouche et le support) et de la grande distance bicouche-support pour la bicouche supérieure de la double bicouche (≈ 10 nm) et la bicouche supérieure de la multibicouche (≈ 4 μ m).

Nous avons constaté que le coefficient de diffusion de l' α -HL était le même dans toutes ces bicouches à l'état fluide ($D_{\text{fluid}} \approx 3.8 \times 10^{-8}$ cm²/s) et que la nature des phospholipides n'affectait pas sa diffusion.

2.1.2 Mobilité électrophorétique (μ) sur BLS :

Lorsque nous avons essayé de mesurer la mobilité électrophorétique de l' α -HL insérée en appliquant un champ électrique parallèle à la membrane, nous avons observé que la protéine ne bougeait pas. Pourquoi une protéine qui diffusait sur une bicouche supportée sur le verre ne bougerait-elle pas en présence du champ électrique ? Nous n'avons pas d'explication claire et n'avons pas étudié précisément ce point. Il se peut, par exemple, qu'en appliquant le champ électrique, la charge de la surface du verre soit modifiée, induisant ainsi une plus grande interaction avec la protéine et donc son immobilisation. Nous avons contourné la difficulté en utilisant un autre stratagème : alors que des auteurs solutionnent le problème interaction protéine/support en utilisant un coussin de polymère, nous avons trouvé astucieux et commode d'utiliser une double bicouche supportée de DPPC et plus tard une multibicouche supportée, encore plus facile à préparer et à mettre en œuvre. En raison de la forme de notre cellule d'incubation, la protéine s'insère uniquement dans la bicouche supérieure, loin du support et l'interaction avec ce dernier se trouve, de fait, réduite. Ainsi, les mesures seront effectuées par des protéines situées sur le dessus de la double bicouche (DDB) ou de la multi bicouche (DMB). Nous venons ainsi de définir un système de n-bicouches supportées avec $2 \leq n \leq 500$

2.1.3 Mobilité électrophorétique sur DDB de DPPC : $n = 2$

Pour mesurer la mobilité électrophorétique de l' α -HL dans DDB, nous avons suivi le déplacement de la protéine par vidéo-microscopie. La **Figure 1** montre un déplacement typique de la protéine dans la phase fluide de la DDB après application d'un champ électrique (3 V/cm). Les flèches rouges repèrent les spots. Les flèches jaunes matérialisent le changement de distance spot-ligne de départ (rouge). Nous avons estimé la charge du monomère de protéine à l'aide du logiciel "libre accès" développé par Christopher Putnam du Scripps Research Institute en Californie. Le logiciel calcule la charge de la séquence d'acide aminé au pH correspondant au tampon. Le point isoélectrique pI est de 8.1. C'est un peu plus faible mais du même ordre de grandeur que la valeur déterminée expérimentalement 8.5¹⁷. La charge de la protéine monomérique est 1,5 e⁻ à pH 7.2, pH physiologique : la protéine devrait migrer vers l'électrode négative. C'est ce qui a été observé : comme indiqué dans la **Figure 1**, l'ensemble des points, tous à la même vitesse, migre vers l'électrode négative. Le déplacement est de 13 μ m pour une durée d'application d'un champ de 3V/cm pendant 20s.

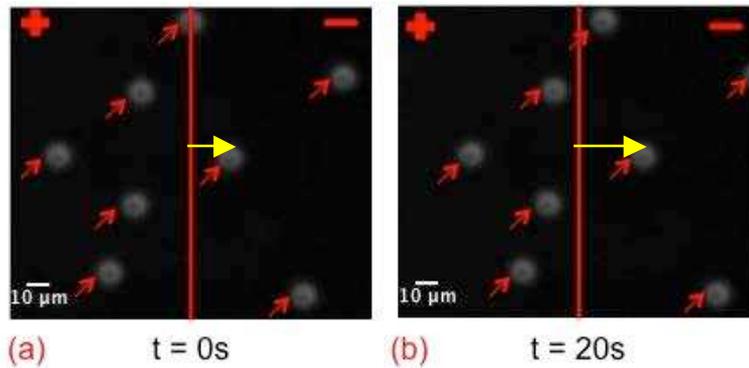


Figure 1: Image de fluorescence de quelques heptamères d' α -HL migrant sous un champ électrique de 3V/cm. Les images ont été prises (a) avant l'application du champ électrique et (b) après l'application du champ électrique durant 20s. La barre est de 10 μm et la ligne rouge sert de guide correspondant à la position de l' α -HL avant application du champ électrique.

Nous avons étudié la dépendance de la vitesse en fonction du champ électrique et l'effet de l'état de la bicouche (phase gel ou fluide) sur la mobilité électrophorétique. Sur la **Figure 2**, nous voyons que lorsque le champ électrique augmente, la vitesse augmente, la pente définissant ainsi la mobilité électrophorétique de la heptamère α -HL soit en phase gel (**Figure 2 a**), soit en phase fluide **Figure 2 b**). La mobilité électrophorétique de la protéine en phase gel ($\mu_{\text{gel}} = 1 \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{V.s}$) est environ 2 ordres de grandeur plus lente qu'en phase fluide ($\mu_{\text{fluide}} = 2 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{V.s}$). Sans surprise, cela correspond à une viscosité plus élevée d'une phase par rapport à l'autre, la protéine subissant une friction plus grande en phase gel qu'en phase fluide.

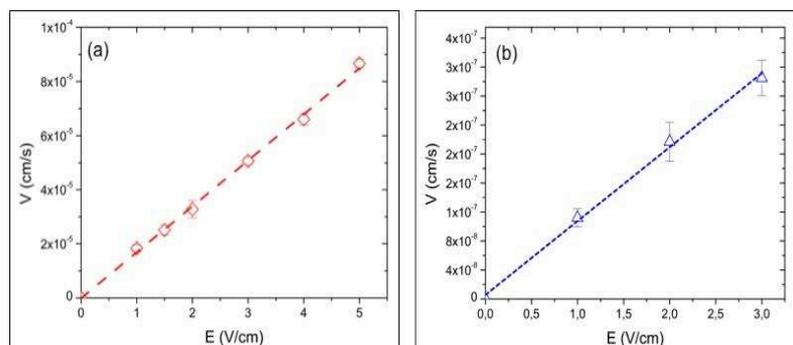


Figure 2: Dépendance de la vitesse de l'heptamère dans la DDB de DPPC en fonction du champ électrique (E) en (a) phase fluide et (b) en phase gel. Dans les deux cas, la dépendance est linéaire. La pente permet de calculer la mobilité électrophorétique

2.1.4 Mobilité électrophorétique sur DMB d'EggPC et de DMPC : $n \approx 500$

La valeur de mobilité électrophorétique est plus élevée en phase fluide qu'en phase gel. La mesure a été effectuée à une température élevée (43°C) pour que le DPPC soit en phase fluide. La mobilité a-t-elle pu être affectée par la convection ? Pour tester cette hypothèse, nous avons utilisé une multibicouche d'EggPC, fluide à toutes températures. L'insertion des protéines a été réalisée sur le dessus d'une multibicouche d'EggPC.

Les valeurs de la mobilité électrophorétique obtenues sur les différents types de bicouches ainsi que les coefficients de diffusion correspondants sont reportés dans le **Tableau 1**. La mobilité électrophorétique (μ) et le coefficient de diffusion (D) pour la double bicouche de DPPC et la multibicouche d'EggPC sont identiques dans la phase fluide. Ainsi μ et D ne dépendent pas de la structure (double bicouche ou multibicouche) ou du phospholipide.

DMPC	BLS/Verre		DMB/ Mica	
Phase	Gel	Fluide	Gel	Fluide
Diffusion (cm ² /s)	4x10 ⁻¹⁰ ±0.4	3.6x10 ⁻⁸ ±0.5	7.6 x10 ⁻¹⁰ ±0.7	3.6 x10 ⁻⁸ ±0.3
Mobility (cm ² /V.s)	————	————	-4.4 x10 ⁻⁷ ± 0.6	-1.93 x10 ⁻⁵ ±0.2
DPPC	DDB/ Mica			
Diffusion (cm ² /s)	————	————	2.3 x10 ⁻¹⁰ ±0.2	3.9 x10 ⁻⁸ ±0.7
Mobility (cm ² /V.s)	————	————	-1.4 x10 ⁻⁷ ±0.3	-1.95 x10 ⁻⁵ ±0.4
EggPC	DMB/ Mica			
Diffusion (cm ² /s)	————	————	————	3.8 x10 ⁻⁸ ±0.2
Mobility (cm ² /V.s)	————	————	————	-2.04 x10 ⁻⁵ ±0.3

Tableau 1 : Valeurs des coefficients de diffusion et des mobilités électrophorétiques de l'heptamère d' α -HL dans différentes membranes supportées sur mica ou verre et en différentes phases. Toutes les valeurs ne peuvent être obtenues : EggPC étant fluide à toutes températures, la mobilité et la diffusion ne peuvent être mesurées dans la phase gel. Le coefficient de diffusion de l'heptamère dans la BLS de DPPC, en phase gel ou fluide, est impossible à mesurer du fait de la forte interaction protéine/support : elle apparaît immobile.

Nous avons préparé une multibicouche de DMPC : les valeurs de μ et D en phase gel de DMPC sont supérieures aux valeurs mesurées en phase gel de DPPC.

Nous notons que les valeurs de mobilité électrophorétique enregistrées dans notre système sont compatibles avec une utilisation pratique de l'électrophorèse. A 1V/cm, en phase fluide, le déplacement de la protéine serait de 12 μ m/minute, distance à comparer avec celles présentes dans une puce type *lab-on-a-chip*.

2.2 Mobilité électrophorétique de l' α -HL à en fonction de la charge (\approx pH)

La mobilité de l' α -HL marquée à l'Alexa fluor 488[®] a été mesurée à différents pH (de 5,4 à 9,2). La protéine migre vers l'électrode négative lorsque le pH est inférieur ou égal à 7,2 et vers l'électrode positive lors de l'utilisation du tampon à pH 9,1 et 9,2. Cela signifie que la protéine a une charge nette positive à $\text{pH} \leq 7,2$ et une charge nette négative à pH 9,1 et 9,2 (voir **Figure 3**). La mobilité de l' α -HL a varié entre $-8.2 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{V.s}$ à pH 5,4 et $6 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{V.s}$ à pH 9,2. Le sens de migration observé correspond à la charge des protéines et le changement de direction ne survient que lorsque la charge de l' α -HL change de signe. Monson et coll ont observé qualitativement le même comportement avec de la streptavidine ancrée à la bicouche via un lipide biotynilé⁸.

Ces valeurs de mobilité sont plus grandes que celle mesurée à pH 7.2 : dans un mélange de protéines, on pourrait choisir d'accélérer l'une ou l'autre en s'approchant ou pas de leur point isoélectrique pI. La **Figure 3** montre la variation de la charge d'un monomère de protéine (échelle gauche) et la variation de la mobilité (échelle droite) en fonction du pH de la solution tampon.

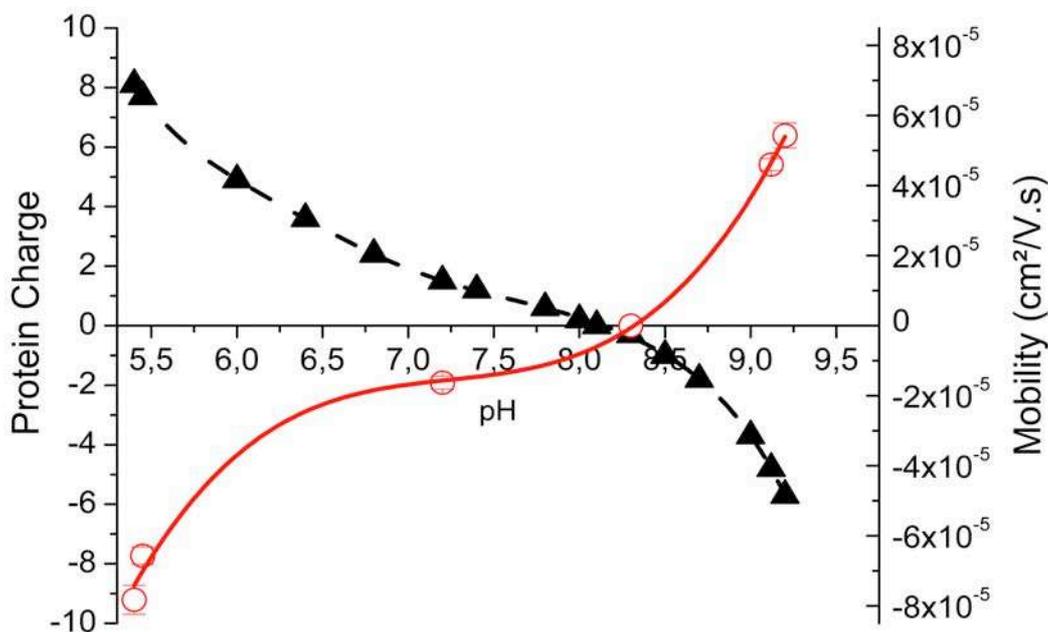


Figure 3: Charge de l' α -HL monomérique et mobilité du pore heptamérique d' α -HL marqué en fonction du pH à 1V/cm. Les cercles rouges (●) représentent la mobilité électrophorétique tandis que les triangles noirs (▲) représentent la charge du monomère d' α -HL. Toutes les expériences ont été faites dans une multibicouche de DMPC dans une solution tampon de phosphate 10mM + 100mM NaCl. Les lignes sont des guides pour les yeux.

L'heptamère d' α -HL marqué à l'Alexa migre et sa mobilité apparente est la somme de différentes contributions dont la charge du marqueur (Alexa), le mouvement des

phospholipides et l'électroosmose (en anglais Electro Osmotic Flow : EOF) représentées dans l'équation 1 :

$$\mu = \mu_{\text{objet}} + \mu_{\text{phospholipide}} + \mu_{\text{EOF}} \quad (\text{eq. \#1})$$

On peut considérer que :

- Les têtes PC des lipides sont globalement neutres, donc elles ne devraient pas être affectées par le champ électrique : $\mu_{\text{phospholipide}} \cong 0^{3,4,6}$.
- La direction de migration est compatible avec le signe de la charge calculée du monomère. Ceci indique que malgré les charges négatives que peut apporter le marqueur Alexa Fluor[®] et du au faible taux de marquage, la charge globale de l'heptamère n'est que légèrement affectée : $\mu_{\text{objet}} \cong \mu_{\text{heptamère}}$

Par ailleurs on constate que

- la mobilité est nulle à pH 8.3. Ce pH se trouve dans la gamme de pI (8.1 par calcul du logiciel, 8.5 d'après Dingès et coll.¹⁷).
- sur la **Figure 3**, un changement de la charge de q à $-q$ conduit à un changement de la mobilité de $-\mu$ à μ .

Ceci signifie que l'EOF (flux électroosmotique) est négligeable : $\mu_{\text{EOF}} \cong 0$. La force ionique élevée, qui écrante les charges (longueur de Debye courte), et le fait que la première bicouche puisse agir comme un revêtement protecteur de la surface, peuvent expliquer que la valeur de l'EOF soit négligeable.

On constate dans le tableau 1 que le rapport μ/D est constant. En supposant que la charge de l'heptamère soit égale à sept fois la charge du monomère et en utilisant l'équation de Nernst-Einstein ($\mu_D = D / k_B T$), nous avons calculé $\mu_E / \mu_D \cong 1.3$ pour l'heptamère de la DDB de DPPC et la DMB de DMPC (et d'EggPC).

Cette valeur supérieure de 30% à 1 est surprenante. A-t-elle une signification physique puisque nous estimons l'erreur sur nos mesures à 10% ?

On sait parfaitement expliquer une valeur inférieure à 1. En général la première justification avancée est que c'est la conséquence directe de l'EOF, dont nous venons de montrer qu'elle était négligeable. Une autre raison, décrite par Nkodo et coll.¹⁸, est que la relation de Nernst-Einstein n'est pas vérifiée pour de longues chaînes de polymère. En effet, concernant la

diffusion, une pelote d'ADN (de longueur de contour L) n'est pas à drainage libre (friction sur la sphère équivalente : $f \approx \sqrt{L}$). Sous champ électrique, la pelote devient à drainage libre, il y a friction sur tous les segments de la molécule d'ADN ($f \approx L$), le solvant s'écoule à travers la pelote. Parce que la charge d'ADN est également proportionnelle à L , ceci explique pourquoi il n'est pas possible de séparer les molécules d'ADN en solution.

Pour l'heptamère, on peut penser à un comportement similaire : en diffusion, la friction totale est la somme de la friction sur la face extérieure de la tête hydrophile ($f_T \approx \sqrt{L}$, avec L la longueur équivalente de la partie hydrophile) et de la friction sur la partie membranaire de la protéine (f_P) :

$$f = f_P + f_T \approx f_P + \sqrt{L} \quad (\text{eq.\#2})$$

En appliquant le champ, la friction f_P sur la partie intégrée, hydrophobe, n'est sans doute pas modifiée, mais il existe aussi désormais une friction sur tous les segments hydrophiles de la tête hydrophile de l'heptamère ($f_T \approx L$): $f \approx f_P + L$. Cette plus grande friction conduit à une mobilité inférieure à la valeur prévue à partir de D par la relation de Nernst-Einstein, puisque le rapport entre les deux mobilités est :

$$\frac{\mu_e}{\mu_D} \approx \frac{f_P + \sqrt{L}}{f_P + L} \leq 1 \quad (\text{eq.\#3})$$

Mais nous avons observé expérimentalement, *via* nos mesures de diffusion, que c'était sans doute la friction sur la partie insérée f_P qui déterminait principalement le coefficient de diffusion ($f_P \gg f_T$). Tanaka et coll.¹⁹ ont également remarqué que les coefficients de diffusion de HIS-EGFP et de HIS-DsRed (protéines soluble dans l'eau ancrées à la membrane par un lipide substitué) étaient presque identiques en dépit d'une grande différence de poids moléculaire.

La justification ne suffit donc pas et le rapport devrait être voisin de 1, en absence d'EOF et de migration de la matrice lipidique. Les arguments sont donc en faveur de l'obtention d'une valeur plus petite que 1 et on ne sait justifier une valeur plus grande.

Si on considère que la charge du monomère et le pI ont été estimés respectivement à 1.5 et 8.1, alors que la détermination expérimentale (*via* $\mu = 0$) donne 8.3 et que la référence bibliographique donne 8.5¹⁷, on peut penser qu'une sous estimation de 30% de la charge du monomère par le logiciel est tout à fait possible est raisonnable.

Nous pouvons donc, inversement, en déduire que nos expériences permettent de déterminer un pI de l'heptamère égal à 8.3 et une charge du monomère égale à environ $2 e^-$ (30%) dans nos conditions.

2.3 Mobilité électrophorétique des complexes d' α -HL

Comme décrit dans le chapitre V, en ajustant les conditions d'incubation, la formation de complexes d'heptamère d' α -HL (dimère et trimère d'heptamère) est possible. Ceci nous a permis de faire l'étude de la mobilité en fonction de la taille de l'objet.

Le **Tableau 2** récapitule les valeurs de la mobilité et de la diffusion mesurées pour l'heptamère, le dimère et le trimère d'heptamère dans la phase fluide en fonction du rayon géométrique estimé de la partie insérée.

	Monomer	Dimer	Trimer
			
R (nm)	5	7.1	10
D ($\times 10^{-8}$ cm ² /s)	3.6 \pm 0.5	1.8 \pm 0.2	1.3 \pm 0.2
μ_e ($\times 10^{-5}$ cm ² /V.s)	-1.93 \pm 0.2	-0.97 \pm 0.04	0.62 \pm 0.02

Tableau 2 : Rayon des objets, coefficients de diffusion et mobilité électrophorétique des différents objets dans une multibicouche de DMPC en phase fluide. Le dimère est un objet anisotrope de petit axe 5 nm et de grand axe 10 nm. De la zone occupée, le rayon moyen de l'assemblage créé peut être estimé à $\sqrt{5 \times 10} = 7,1$ nm. En supposant un arrangement hexagonal des trois heptamères, le rayon équivalent du cercle contenant le trimère est de 10 nm.

La **Figure 4** montre la dépendance de la mobilité en fonction du rayon de l'objet. Quand l'objet est plus gros, la mobilité électrophorétique diminue en $1/R^2$. Cette variation est semblable à ce qui a été observé pour le coefficient de diffusion.

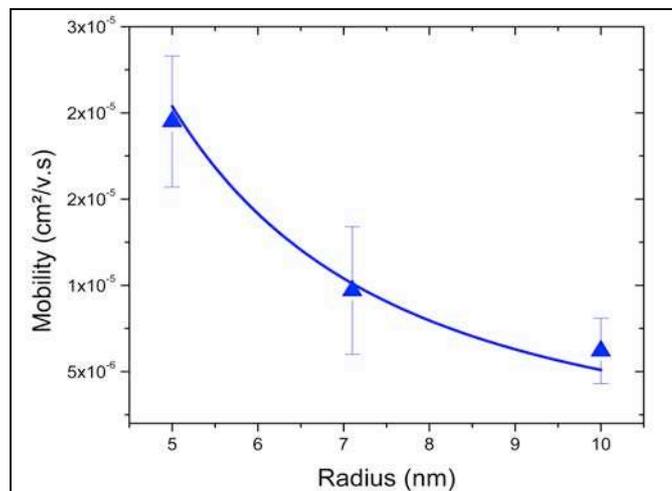


Figure 4: Dépendance de la mobilité en fonction du rayon de l'objet dans une multibicouche de DPPC en phase fluide. L'ajustement représente le régime $1/R^2$.

Cette dépendance en $1/R^2$ de μ et D et le fait que leur rapport soit constant valident le fait que la friction existant à l'intérieur de la bicouche joue un rôle prépondérant dans la dynamique des protéines membranaires.

3 Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons montré qu'une protéine membranaire modèle (α -hémolysine) migre quand on applique un champ électrique parallèlement à la surface de la membrane : elle est électrophorétiquement mobile dans un système de n -bicouches ($2 \leq n \leq \approx 500$). Sa mobilité électrophorétique dépend de la taille, de la charge et du pH de l'objet. Dans nos conditions expérimentales nous estimons le pI de l'heptamère égal à 8.3 et la charge du monomère à $2 e^-$. Nous avons observé une dépendance en $1/R^2$, similaire à celle observée pour la diffusion. Dans ce système, seule la force électrophorétique agit sur la protéine, les autres contributions comme l'EOF, la migration des lipides, ... semblent négligeables.

Pour une utilisation pratique, la préparation d'une n -bicouche par réhydratation d'un film d'EggPC, l'insertion des protéines membranaires *via* l'injection d'un micro-volume de protéoliposomes à une extrémité de la n -bicouche et l'application d'un champ électrique modéré dessinent la perspective d'une mise en œuvre simple.

Nous avons montré que l'idée de séparer électrophorétiquement des protéines membranaires insérées dans un système à n-bicouches était assez prometteuse : le moteur, c'est-à-dire les charges, est en phase aqueuse, le frein, puissant, est dans la bicouche. Cette localisation différenciée augmente la probabilité que deux protéines membranaires aient des rapports q/f différents et soient donc séparables. La souplesse inhérente du système à n-bicouches, outre l'éloignement du support qu'il procure (l'objet ne peut « coller »), devrait lui permettre de s'accommoder de la présence de toute protéine membranaire, y compris de celles qui auraient au total deux parties hydrophiles volumineuses de part et d'autre de la bicouche d'insertion. Cela semble plus attractif que la formation d'un coussin qui, outre sa difficulté éventuelle de fabrication, peut simplement déplacer le problème interaction protéine/support vers celui de l'interaction protéine/coussin.

L'électrophorèse en n-BLS semble être une méthode capable de séparer les protéines membranaires dans leur environnement, augmentant ainsi les chances de conserver leur structure 3D et leur bioactivité. Cette preuve de concept, opérée *via* l'étude de la migration d'une protéine modèle, nous rapproche de la mise au point d'une séparation électrophorétique effective des protéines dans une n-bicouche lipidique supportée. Au-delà, de nouvelles approches pour créer des obstacles afin d'augmenter la sélectivité, ou faire des essais sur des mélanges de protéines membranaires, seront à envisager dans le but de rendre encore plus performante cette possible séparation électrophorétique.

4 Références

1. Santoni, V., Molloy, M. & Rabilloud, T. Membrane proteins and proteomics: Un amour impossible? *Electrophoresis* **21**, 1054-1070 (2000).
2. Tamm, L.K. & McConnell, H.M. Supported Phospholipid-Bilayers. *Biophysical Journal* **47**, 105-113 (1985).
3. Stelzle, M., Miehlich, R. & Sackmann, E. 2-Dimensional Microelectrophoresis in Supported Lipid Bilayers. *Biophysical Journal* **63**, 1346-1354 (1992).
4. Groves, J.T. & Boxer, S.G. Electric field-induced concentration gradients in planar supported bilayers. *Biophysical Journal* **69**, 1972-1975 (1995).
5. Poo, M.M. & Robinson, K.R. Electrophoresis of Concanavalin-a Receptors Along Embryonic Muscle-Cell Membrane. *Nature* **265**, 602-605 (1977).
6. Groves, J.T., Wulfing, C. & Boxer, S.G. Electrical manipulation of glycan phosphatidyl inositol tethered proteins in planar supported bilayers. *Biophysical Journal* **71**, 2716-2723 (1996).
7. Han, X.J. et al. Manipulation and charge determination of proteins in photopatterned solid supported bilayers. *Integrative Biology* **1**, 205-211 (2009).

8. Monson, C.F., Pace, H.P., Liu, C.M. & Cremer, P.S. Supported Bilayer Electrophoresis under Controlled Buffer Conditions. *Analytical Chemistry* **83**, 2090-2096 (2011).
9. Salafsky, J., Groves, J.T. & Boxer, S.G. Architecture and function of membrane proteins in planar supported bilayers: A study with photosynthetic reaction centers. *Biochemistry* **35**, 14773-14781 (1996).
10. McConnell, H.M. & Watts, T.H. High-Affinity Fluorescent Peptide Binding to I-Ad in Lipid-Membranes. *Journal of Cellular Biochemistry*, 209-209 (1987).
11. Smith, E.A. et al. Lipid bilayers on polyacrylamide brushes for inclusion of membrane proteins. *Langmuir* **21**, 9644-9650 (2005).
12. Wu, E.S., Jacobson, K. & Papahadjopoulos, D. Lateral Diffusion in Phospholipid Multibilayers Measured by Fluorescence Recovery after Photobleaching. *Biochemistry* **16**, 3936-3941 (1977).
13. Sonnleitner, A., Schutz, G.J. & Schmidt, T. Free Brownian motion of individual lipid molecules in biomembranes. *Biophysical Journal* **77**, 2638-2642 (1999).
14. Smith, B.A. & McConnell, H.M. Determination of Molecular-Motion in Membranes Using Periodic Pattern Photobleaching. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **75**, 2759-2763 (1978).
15. Ladha, S. et al. Lateral diffusion in planar lipid bilayers: A fluorescence recovery after photobleaching investigation of its modulation by lipid composition, cholesterol, or alamethicin content and divalent cations. *Biophysical Journal* **71**, 1364-1373 (1996).
16. Alecio, M.R., Golan, D.E., Veatch, W.R. & Rando, R.R. Use of a fluorescent cholesterol derivative to measure lateral mobility of cholesterol in membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**, 5171-4 (1982).
17. Dinges, M.M., Orwin, P.M. & Schlievert, P.M. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clinical Microbiology Reviews* **13**, 16-+ (2000).
18. Nkodo, A.E. et al. Diffusion coefficient of DNA molecules during free solution electrophoresis. *Electrophoresis* **22**, 2424-32 (2001).
19. Tanaka, M., Hermann, J., Haase, I., Fischer, M. & Boxer, S.G. Frictional drag and electrical manipulation of recombinant proteins in polymer-supported membranes. *Langmuir* **23**, 5638-5644 (2007).

Conclusion générale

L'idée qui sous-tendait ce travail était de progresser vers la réalisation d'une séparation électrophorétique d'un mélange de protéines membranaires dans un milieu qui leur conviendrait, type bicouche lipidique supportée. Il semble que ce but soit « à portée de main ».

Dans une première partie de ce travail nous avons acquis une meilleure compréhension du comportement dynamique des bicouches lipidiques supportées pures. Ainsi, à partir des courbes $D = f(T)$, nous avons montré qu'une bicouche supportée unilamellaire (donc au voisinage du support), dans l'eau, formait une phase *ripple*, au sens strict, à condition que l'interaction bicouche/support soit suffisamment forte.

Une forte interaction bicouche/support induit 3 conséquences :

- la diminution du coefficient de diffusion
- le découplage des feuillettes, qui conduit à la mesure de deux coefficients de diffusion différents
- la formation de la phase "*ripple*" sur une plage de température donnée, entre pré-transition et transition principale.

La diminution de la portée des interactions électrostatiques par adjonction de sel se traduit par une augmentation de plusieurs ordres de grandeur du coefficient de diffusion, approchant au final, en phase fluide le comportement d'une bicouche libre, tout en montrant constamment les différentes étapes caractéristiques de l'ensemble de la transition gel/fluide. Cette interaction coulombienne est la plus importante et peut être ajustée jusqu'à « tenir » sélectivement les différents feuillettes. Nous avons montré qu'il était possible d'estimer l'énergie d'interaction bicouche/support, en bonne cohérence avec les variations des valeurs des coefficients de diffusion observées sur les différentes régions de la courbe $D = f(T)$. Les bicouches lipidiques supportées sont des systèmes extrêmement sensibles. Le soin dans la préparation des supports, des bicouches, dans la réalisation des mesures de coefficient de diffusion permet d'accéder, au moins en terme d'ordres de grandeur, à des données non-triviales du type de l'estimation de l'énergie d'interaction bicouche/support et de quelques uns

de ses termes contributifs. Ces ordres de grandeur ont été validés par une étude préliminaire originale de DSC sur des vésicules, multi-bicouches et bicouches lipidiques supportées. Cet ensemble de résultats permet une description-compréhension globale et cohérente du comportement des bicouches lipidiques supportées.

Dans une seconde partie, notre attention s'est portée sur le comportement d'une protéine membranaire modèle insérée dans la bicouche lipidique. L' α -Hémolysine s'insère spontanément dans nos bicouches supportées et diffuse librement. En l'incubant en phase mixte (mélange de zones *gel* et de zones *fluide*), nous avons observé la formation de complexes de protéines. Ceci nous a permis d'établir que la dépendance du coefficient de diffusion avec R le rayon équivalent de la partie insérée de la protéine était en $1/R^2$. Ce régime est nouveau puisque la diffusion des protéines étudiées jusque là était plutôt correctement décrite par le modèle de Saffmann-Delbruck. C'est l'accession à une gamme de grandes tailles qui a permis cette observation, ce changement de comportement s'expliquant par une plus grande compressibilité et une friction hydrodynamique plus complexe que celles observées sur des objets plus petits, plus rigides.

L'application d'un champ électrique parallèlement à la surface de la bicouche permet le transport électrophorétique de nos objets modèles insérés. Le sens et l'importance du déplacement sont modulés par la charge de l'objet. Nous avons montré que, dans nos conditions et à pH physiologique, le pI de l'heptamère était 8.3 et la charge de son monomère constitutif égale à $2 e^-$. La dépendance de la mobilité électrophorétique avec la taille est également en $1/R^2$. La dépendance en taille, les valeurs obtenues et le mode opératoire simple, notamment pour la préparation d'une n-bicouche d'EggPC, permettent d'espérer la réalisation prochaine d'une véritable séparation électrophorétique pour un mélange de protéines membranaires.

Annexe



Annexe 1 : Analyse des signaux biexponentiels

Lors de l'analyse des signaux de recouvrement de fluorescence non monoexponentiels, nous avons testé plusieurs hypothèses d'ajustement pour déterminer les temps de relaxation. La quantité de marqueur fluorescent dans chaque feuillet étant identique, nous avons ajusté les signaux par des biexponentielles d'amplitudes égales. Aucune fraction immobile n'a été observée. En modifiant les amplitudes des deux temps de décroissance dans des proportions non égales (80%-20% ou encore 60%-40%), les écarts entre les ajustements deviennent plus importants, voire dans certaines conditions, la composante la plus lente n'apparaît pas. En forçant l'égalité des amplitudes, nous avons réduit le nombre de paramètres ajustables en passant de 5 (2 pour le temps, 2 pour les amplitudes, 1 pour la ligne de base) à 3. Le système est plus contraint. Ceci a eu pour conséquence de réduire notablement les barres d'erreur sur les temps de relaxation, ce qui valide notre analyse.

Par la suite nous avons systématiquement forcé l'égalité des amplitudes et ajusté nos courbes avec seulement trois paramètres pour tous les signaux comportant deux composantes.

Annexe 2 : Protocole de marquage de la protéine (α -HL) à l'Alexa Fluor

488[®]

1. Préparer une solution de PBS contenant 10 mM de phosphate de potassium (550 mg dans 250mL), 0.15 M NaCl (2.2 g dans 5mL) et 0.2mM (3.25 mg dans 5 mL) de NaN₃. (20')
2. Préparer une solution de bicarbonate de sodium 1M en ajoutant 1mL d'H₂O dans le flacon de bicarbonate de sodium. (10')
3. La concentration de la solution de protéine à préparer est 0.4 mg/ml. Ajouter 1.5 mL de PBS à 0.6mg de l' α -HL (en fait la totalité). Prendre 750 μ L de cette solution pour la marquer à l'Alexa. (10')
4. Ajouter 50 μ L de la solution de bicarbonate à la solution de protéine (solution S1). Ajuster le pH avec du bicarbonate afin d'obtenir un pH basique. (5') [8.8<pH<9.1]
5. Transférer la solution de protéine dans le flacon du marqueur (sortir le flacon avant pour qu'il se mette à la température ambiante). Bien homogénéiser la solution en remuant la solution pendant 15 minutes à RT. [milieu réactionnel]
6. Monter la colonne et la mettre en position verticale. Mettre un entonnoir au bout de la colonne. Insérer doucement la colonne dans l'« X-cut » se trouvant dans l'un des porteurs en mousse fournis. Serrer la colonne sur le support à l'endroit où se trouve le porteur en mousse.
7. Préparer le tampon d'éluion en diluant 10 fois la solution fournie (10X) à température ambiante dans de l'eau. (Pour une purification, on a besoin au maximum de 10 mL de cette solution).
8. En utilisant une des pipettes fournies, mélanger et homogénéiser la résine (composant C). Pipeter la résine dans la colonne, en laissant l'excès du tampon se drainer dans un autre récipient. La résine devrait se tasser dans la colonne jusqu'à ce que la résine soit à 3 cm du haut de la colonne.
9. Vérifier que le tampon s'élue dans la colonne avec un débit constant avant d'ajouter le mélange réactionnel. Si le débit est lent ou nul, monter à nouveau la colonne.
10. Verser doucement le mélange réactionnel dans la colonne. Laisser le mélange entrer dans la résine. Rincer le flacon du mélange avec 100 μ L du tampon d'éluion et verser le dans la colonne. (20')
11. Ajouter doucement le tampon d'éluion (étape 7) en faisant attention à ne pas perturber la colonne. Continuer à ajouter le tampon d'éluion jusqu'à ce que la protéine marquée soit bien éluée (récupérer dans un des flacons fournis de 4 mL). (environ 30 minutes)

N.B : 1- Récupérer et conserver sous forme de fraction tout le tampon d'éluion. 2- Si dans certains cas où il n'y a pas de séparation des bandes, il est mieux de tout récupérer.

12. (Une autre méthode de purification peut être utilisée à la place des étapes 6-11). A la fin du temps d'incubation, diviser la solution mère (750 µL) en 2 solutions de 375 µL chacune. Transvaser les solutions dans 2 tubes Centricon™ afin de séparer le colorant en excès. Rinçage 4 fois pour chaque tube centricon.

13. Passage au spectromètre et mesure d' A_{280} et A_{494} .

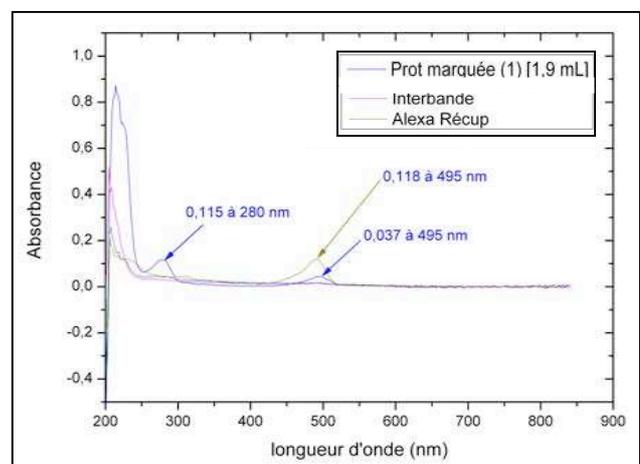
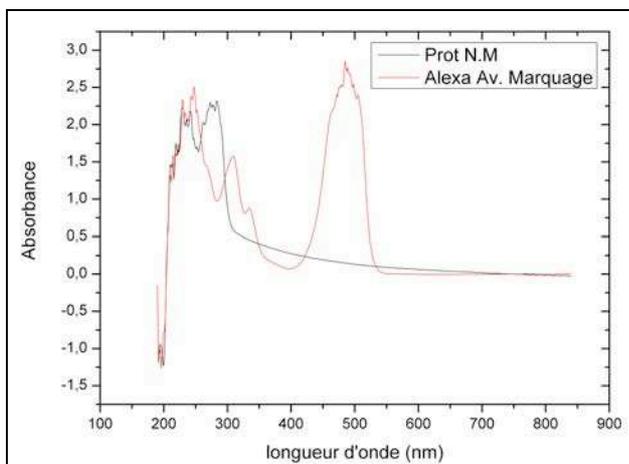
$$\text{Concentration de la protéine} = \frac{[A_{280} - (A_{494} \times 0.11)] \times \text{facteur de dilution}}{38919 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}}$$

0.11 = facteur de correction prenant en compte l'absorption du colorant à 280 nm

$$\epsilon_{\alpha\text{-HI}} = 38919 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$$

$$\text{Moles d'Alexa/ mole de protéines} = \frac{A_{494} \times \text{facteur de dilution}}{71\,000 \times \text{concentration de la protéine (M)}}$$

$$\epsilon \text{ Alexa Fluor 488}^{\text{®}} \text{ à } 494 \text{ nm} = 71\,000 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$$



$$\text{Concentration de la protéine Non Marquée} = \frac{A}{\epsilon \cdot l} = \frac{2.189}{38919} = 56 \mu\text{M}$$

Taux de marquage final = 0.2 marqueur Alexa / mole de protéine.

Annexe 3 : Estimation du nombre de moles de lipides (n) présent sur les disques de mica (bicouche de DPPC) lors d'une mesure de DSC

On prend le cas de 20 disques :

Le taux de transfert moyen est égal à 1. L'aire moléculaire du phospholipide est égale à 62.9 Å² (référence [21], chapitre IV).

La surface d'un disque :

$$S_{\text{disque}} = \pi R^2 \text{ avec } R = 3 \text{ mm} \quad \rightarrow \quad S_{\text{disque}} \approx 28.26 \text{ mm}^2$$

Sur 1 disque, il y a 4 monocouches de DPPC (1 bicouche de chaque côté du disque de mica), la surface de BLS est : $S_{\text{BLS}} = 4 \times 28.26 \text{ mm}^2 = 113.04 \text{ mm}^2 = 113.04 \times 10^{14} \text{ Å}^2$

$$S_{\text{TOTALE}} = \text{Nbre de disques} \times S_{\text{BLS}} = 20 \times 113.04 \times 10^{14} = 2.26 \times 10^{17} \text{ Å}^2$$

Le nombre de molécules \mathcal{N} est égal à : $\mathcal{N} = \frac{2.26 \times 10^{17}}{62.9} = 3.6 \times 10^{15}$ molécules

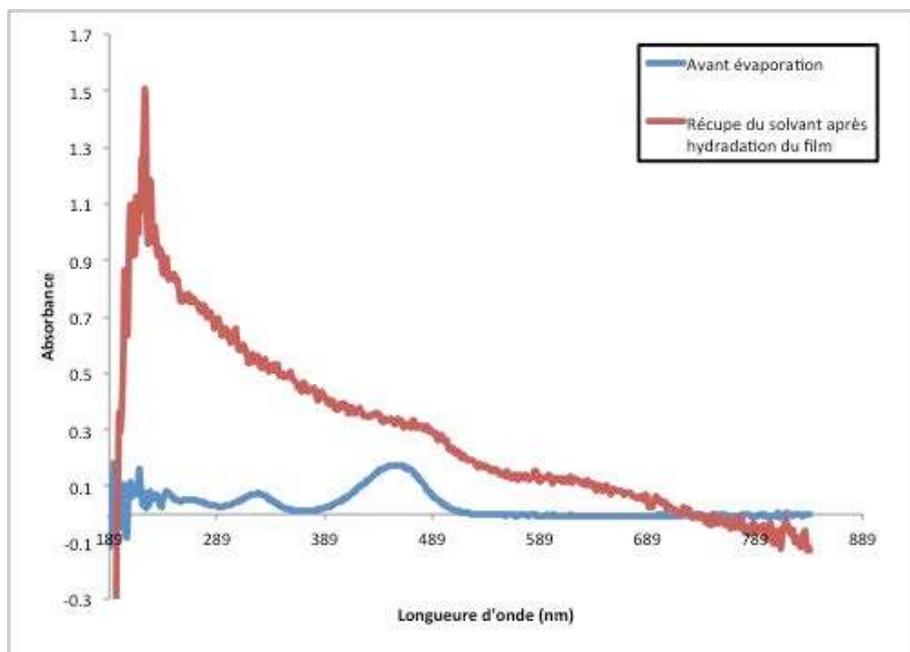
$$\text{D'où } n = \frac{\mathcal{N}}{\mathcal{N}_A} = \frac{3.6 \times 10^{15}}{6.0 \times 10^{23}} = 6 \times 10^{-9} \text{ mol}$$

Par conséquent, le nombre de moles est égal à 6×10^{-9} mole

Annexe 4 : Estimation de nombre de bicouches dans le cas de la préparation de multi-bicouches (réhydratation de film lipidique)

Nous avons introduit 150 μL de la solution de DPPC (2 mg/ml) marquée à 0.5% de NBD dans une cellule de diamètre de 1.4 cm, tout en assurant une bonne étanchéité avec le support (pas de fuite).

Avant et après évaporation du chloroforme, nous avons mesuré par Spectroscopie UV la concentration en phospholipide marqué comme le montre le graphe suivant :



$$C = \frac{m}{V} \Rightarrow m = C \times V = 2 \times 0.15 = 0.3 \text{ mg de lipides}$$

Par spectrophotométrie UV nous avons déterminé une quantité de lipides présente dans le surnageant, après réhydratation, d'environ 6%. Ceci indique que la grande majorité des lipides reste à la surface du support sous forme d'une multibicouche.

La masse de lipides est 0.3 mg, soit

$$n = \frac{m}{M} = \frac{0.3 \times 10^{-3}}{734.05} = 4 \times 10^{-7} \text{ mol de lipides}$$

Le nombre de molécules de DPPC :

$$n = \frac{M}{M_A} \Rightarrow N = n \times N_A = 4 \times 10^{-7} \times 6.023 \times 10^{23} = 2.4 \times 10^{17} \text{ molécules de DPPC}$$

L'aire moléculaire du phospholipide DPPC est égale à 62.9 \AA^2 (référence [21] du chapitre IV), donc l'aire totale occupée par les lipides est égale à : $2.4 \times 10^{17} \times 62.9 = 15.1 \times 10^{18} \text{ \AA}^2$

La surface du support est : $S_{\text{support}} = \pi \times R^2 = \pi \times (7)^2 = 154 \text{ mm}^2 = 1.54 \times 10^{16} \text{ \AA}^2$

En faisant le rapport des 2 surfaces, nous estimons le nombre de monocouches sur le support de mica :

$$\text{Nombre de monocouches} = \frac{15.1 \times 10^{18} \text{ \AA}^2}{1.54 \times 10^{16} \text{ \AA}^2} = 981 \text{ monocouches}$$

Le nombre de bicouches formant la multibicouche est $981/2 = 491 \approx 500$ bicouches

Résumé

Après le génome, le nouveau défi est celui du *protéome*. Nous avons progressé vers la mise au point de la séparation électrophorétique des protéines membranaires dans un milieu qui leur conviendrait, type bicouche lipidique supportée. La grandeur principale, mesurée par FRAPP, a été le coefficient de diffusion des objets d'un système biomimétique modèle (lipides, protéines). L'étude du comportement de la bicouche supportée a permis de mettre en évidence, pour certains supports et dans certaines conditions de température, la formation d'une phase ondulée (ou *ripple*) malgré la proximité du support. La diminution de la portée des interactions coulombiennes par adjonction de sel se traduit par une augmentation de plusieurs ordres de grandeur du coefficient de diffusion, approchant au final le comportement d'une bicouche libre, tout en conservant les étapes caractéristiques de la transition gel/fluide. L'ordre de grandeur de ces énergies d'interactions a été estimé à partir des courbes $D = f(T)$ et validé par une étude préliminaire originale de DSC sur des bicouches lipidiques supportées.

L' α -Hémolysine s'insère spontanément sous forme d'un pore heptamérique dans nos bicouches supportées et diffuse librement. En l'incubant en phase mixte (zones *gel*+ zones *fluide*), nous observons la formation de complexes de protéines. La dépendance du coefficient de diffusion avec la taille de l'objet est en $1/R^2$, R étant le rayon équivalent de la partie insérée de l'objet. L'application d'un champ électrique montre un transport électrophorétique dont la direction et l'importance sont modulées par la charge de l'objet. La mobilité électrophorétique varie également en $1/R^2$. La dépendance en taille, les valeurs obtenues et le mode opératoire simple permettent d'espérer la réalisation prochaine d'une véritable séparation électrophorétique pour un mélange de protéines.

Summary

After the genome, the new challenge is the proteome. We have progressed toward electrophoretic separation of membrane proteins in a medium that they love, a supported lipid bilayer. The main parameter, measured by FRAPP, was the diffusion coefficient of different objects (lipids, proteins). Studying bilayer behaviour has showed that, on particular supports and in a given temperature range, ripple phase can exist, despite the proximity of the support. Adding salt decreases coulombic interactions which turns to increase the diffusion coefficient over several orders of magnitude, reaching the value for a free-standing bilayer in the fluid phase, meanwhile the main characteristic steps of the global gel/fluid transition are still observed. Estimation of the value of the interaction energy has been made and compared to results of a preliminary DSC study. α -Hemolysin self-inserts spontaneously as an heptameric pore in supported bilayers and diffuses freely. Incubating in a gel/fluid mixture leads to protein complex formation. Diffusion varies with size as $1/R^2$, R being the equivalent radius of the inserted part of the object. Applying an electric field results in an electrophoretic motion where direction and magnitude are modulated by the charge of the object. Electrophoretic mobility varies also as $1/R^2$. Size dependence, magnitude of mobilities and a simple building protocol allow to hope carrying out soon a real electrophoretic separation of a protein mixture.